ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของสุกร ที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด

นาย วีระศักดิ์ สะดะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN: 974-53-1758-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF CYTOKINE PRODUCTION IN THE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PIGS RECOVERED FROM PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) INFECTION AND REACTIVATED WITH HETEROLOGOUS STRAINS

Mr. Weerasak Sada

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Acardemic Year 2004

ISBN: 974-53-1758-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด
โดย	นาย วีระศักดิ์ สะดะ
สาขาวิชา	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มรว.กัลญา ติงศภัทิย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์)

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

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(สัตวแพทย์หญิง ดร. สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วีระศักดิ์ สะดะ: ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด (CHARACTERIZATION OF CYTOKINE PRODUCTION IN THE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PIGS RECOVERED FROM PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) INFECTION AND REACTIVATED WITH HETEROLOGOUS STRAINS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.สพ.ญ.ดร.สันนิภา สุรทัตต์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช 78 หน้า. ISBN : 974-53-1758-6

งานวิจัยนี้ศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (PBMC) ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดรุนแรงมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด โดยทำการให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดรุนแรงที่แยกได้ในประเทศไทยกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) หรือกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) แก่สุกรจากฟาร์มที่ปลอดโรคพี อาร์ อาร์ เอส หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ทำการเก็บตัวอย่าง PBMC นำมากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนสร้าง IL-10 ในระดับที่สูงขึ้นทั้งในภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นเซลล์ซ้ำจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์รุนแรงทุกสายพันธุ์ โดยพบว่าประชากรเซลล์ลิมโฟไซต์ทุกชนิดที่ทำการศึกษา ($CD4^+$ $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$) สามารถสร้าง IL-10 ได้ สำหรับการสร้าง IFN-γ พบว่าเซลล์ชนิด memTh ($CD4^+CD8^+$) จากสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนจะสร้าง IFN-γ สูงขึ้นเฉพาะต่อเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยเชื้อไวรัสจากต่างกลุ่มสายพันธุ์ งานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นมาก่อน ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงทุกสายพันธุ์ไม่มีผลต่อปริมาณการสร้าง IL-10 และ IFN-γ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำสุกรทดลองที่ได้รับวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปชนิดเชื้อเป็นจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 3 สัปดาห์ ตามด้วยการให้เชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยชนิดรุนแรงทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่สอง 3 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ PBMC จากสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับเชื้อไวรัสจากกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป มีการสร้าง IL-10 ที่สูงขึ้น แต่มีการสร้าง IFN-γ ลดลง สำหรับสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนตามด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาไม่มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์เมื่อเปรียบเทียบกับสุกรกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันได้ว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งชนิดรุนแรงและวัคซีนมีผลเพิ่มการสร้าง IL-10 โดยเซลล์ PBMC เมื่อได้รับเชื้อซ้ำในครั้งถัดไป นอกจากนี้การศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลต่อปริมาณและรูปแบบของไซโตไคน์ที่สร้างโดยเซลล์ PBMC ของสุกร

สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4689154420 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: SWINE, PRRSV, IFN-γ, IL-10, RE-ACTIVATED

WEERASAK SADA: CHARACTERIZATION OF CYTOKINE PRODUCTION IN THE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PIGS RECOVERED FROM PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) INFECTION AND REACTIVATED WITH HETEROLOGOUS STRAINS. THESIS ADVISOR: SANIPA SURADHAT Ph.D., THESIS COADVISOR: ROONGROJE THANAWONGNUWECH Ph.D., 78 pp.

ISBN: 974-53-1758-6

The objective of this study was to determine the effects of previous exposure to PRRSV on the cytokine production by porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) upon *in vitro* re-activation with various PRRSV strains. PRRSV-seronegative pigs were intranasally inoculated with the Thai PRRSV isolates; US (01NP1) and EU genotype (02SB3). At 3 weeks post-inoculation, blood samples were collected, PBMC samples were isolated and *in vitro* cultured with various PRRSV strains. Results showed that previous exposure with virulent PRRSV increased background IL-10 production by the PBMC and increased IL-10 production upon re-activation with virulent PRRSV strains. All studied lymphocyte populations ($CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+CD8^+$) were found to produce IL-10. Enhanced IFN-γ production by the memTh ($CD4^+CD8^+$ subpopulation) when activated with heterologous PRRSV strains was observed. In addition, PBMC from pigs previously vaccinated with PRRSV-EU- vaccine were *in vitro* activated with various PRRSV strains. Interestingly, significant effects on IL-10 and IFN-γ productions were observed. In an *in vivo* experiment, pigs were vaccinated with modified live-PRRSV-EU twice at 3 weeks interval. Three weeks after the 2^{nd} vaccination, pigs were challenged with yhe virulent Thai PRRSV of both genotypes. The results demonstrated an enhanced IL-10 production, and a reduction of IFN-γ production by the PBMC of vaccinated pigs when challenged with the homologous genotype. The heterologous challenge of vaccinated pigs did not have significant effect on the cytokine production when compared with the non-vaccinated challenged group. Our result confirmed that pre-exposure with PRRSV could enhance IL-10 production by porcine PBMC. In addition, strains and virulence of PRRSV could influence the patterns and levels of cytokine production by porcine PBMC.

Department Medical Microbiology	Student signature……
Field of study Medical Microbiology	Advisor's signature……
Academic year 2004	Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.สพ.ญ.ดร. สันนิภา สุรทัตต์ และ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และตรวจทางแก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ฟาร์มท่าจาม ฉะเชิงเทรา บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ ธุรกิจสุกร ที่ให้ความอนุเคราะห์สุกรทดลอง

ขอขอบคุณกองทุนอุดหนุน และส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิยาลัย ปีการศึกษา 2547 ที่สนับสนุนทุนการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณ รศ.นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม และ คุณสุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล สาขาวิชาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องโฟไซโตมิทรี รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคการทำงานต่างๆ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือสถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคการทำงาน

ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และเพื่อนนิสิตปริญญาโท คณะสัตวแพทยศาสตร์ ทุกคนที่ช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการวิจัยจนสำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….……..…….…….…..…ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..……..…จ
กิตติกรรมประกาศ....……..……...ฉ
สารบัญตาราง...……..……...….ฌ
สารบัญภาพ…..……..……ญ
บทที่
1 บทนำ ……...……...…1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา……..……..…1
1.2 สมมติฐาน……..……...…5
1.3 วัตถุประสงค์……..……..…….....5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……...……..……..…5
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……...……..……...…6
2.1 เชื้อไวรัส……...……..…6
2.2 พยาธิกำเนิด……...……..……10
2.3 ภูมิคุ้มกันวิทยา……...……..……11
2.3.1 ผลของ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ…12
2.3.2 ผลของ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะ……13
2.3.2.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ……..……..…13
2.3.2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์……...……..14
2.3.3 ผลของ PRRSV ต่อการสร้างไซโตไคน์……..14
2.4 วัคซีน……...……..…18
2.5 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร……...……..……18
2.5.1 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ที ลิมโฟไซต์……...…18
3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..…22
3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง……..…22
3.2 ไวรัส……22
3.3 Virus titration และการย้อม IPMA……...…23
3.4 สัตว์ทดลอง……...…24
3.5 สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง……...…25

บทที่ หน้า

3.6 วิธีการเก็บตัวอย่างและแยกเม็ดเลือดขาว……26

3.7 แอนติบอดี……28

3.8 ขั้นตอนการย้อมผิวเซลล์……28

3.9 ขั้นตอนการย้อมภายในเซลล์……28

3.10 วิธีการเลือกประชากรเซลล์……29

3.11 การวิเคราะห์ผลและสถิติที่ใช้……29

4 ผลการทดลอง……31

4.1 การทดลองที่ 1……31

4.2 การทดลองที่ 2……36

4.3 การทดลองที่ 3……41

4.4 การทดลองที่ 4……48

5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……55

รายการอ้างอิง……62

ภาคผนวก……76

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 องค์ประกอบของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส……..……7

2 สรุปการแบ่งกลุ่มสุกรที่ใช้ในการทดลองที่ 2 3 และ 4……..……25

3 สรุปผลการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ……..…46

4 สรุปผลการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ……..…47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แบบจำลองไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แสดงส่วนประกอบของเชื้อไวรัส	9
2	แสดงการจำแนกประเภทของเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร โดยใช้แอนติเจนต่างๆ	21
3	แสดงแผนผังสรุปวิธีการทดลอง	27
4	แสดงตัวอย่างการเลือกประชากรเซลล์ในการศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์และการสร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์	30
5	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	32
6	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IFN-γ จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	33
7	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IL-10 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	35
8	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	37
9	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IFN-γ จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	38
10	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IL-10 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	40
11	ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด	43

ภาพที่ หน้า

12 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด……44

13 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป และสุกรควบคุม นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด……45

14 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และกลุ่มควบคุม……..……..…..50

15 ปริมาณร้อยละของประชากรเซลล์ย่อยที่แสดง CD25 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรง กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และกลุ่มควบคุม……..…51

16 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และกลุ่มควบคุม……...……..…52

17 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และกลุ่มควบคุม……..……54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพี อาร์ อาร์ เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) เป็นโรคระบาดที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก โดยมีลักษณะอาการที่สำคัญของโรค 2 กลุ่มอาการ คือ กลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ ก่อให้เกิดสภาวะการสืบพันธุ์ล้มเหลวในสุกรแม่พันธุ์ จะพบการแท้งในทุกระยะของการตั้งท้อง รวมถึงการผสมไม่ติด สำหรับสุกรพ่อพันธุ์จะส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อต่ำลง (Mengeling et al., 1996) และกลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับปัญหาระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกช่วงอายุ ซึ่งจะพบอาการมีไข้ หอบ หายใจลำบาก (Benfield et al., 2000, Yoon and Stevenson, 2002) นอกจากนี้มักพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่ายขึ้นทั้งจากไวรัสและแบคทีเรีย โดยก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน (Porcine Respiratory Disease Complex; PRDC) (Yahara et al., 2002) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรทั่วโลก และเป็นปัญหาหลักของการผลิตสุกรในประเทศไทยในปัจจุบัน (Thanawongnuwech et al., 2004)

ในปี พ.ศ. 2530 ได้มีการรายงานการระบาดของโรคพี อาร์ อาร์ เอส เป็นครั้งแรกที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุของปัญหาที่แน่ชัดจึงเรียกว่า Mystery Swine Disease (Albina, 1997) ต่อมาพบการระบาดที่ประเทศเยอรมันและเนเธอร์แลนด์ในปี พ.ศ. 2533 และสามารถแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของปัญหาได้ในปี พ.ศ. 2534 (Snijder and Meulenberg, 1998) สำหรับประเทศไทยมีการรายงานพบเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างซีรั่มที่ส่งตรวจ ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996[a]) สาเหตุของโรคพี อาร์ อาร์ เอส เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) ปัจจุบันมีการจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสเป็น 2 กลุ่มสายพันธุ์ (Genotype) ตามความแตกต่างทางลักษณะพันธุกรรมและคุณสมบัติของแอนติเจน คือ กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (EU) และยังสามารถพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันด้วย โดยเฉพาะในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา จึงมีการจัดแบ่งกลุ่มย่อยตามความรุนแรงของการเกิดโรค (Botner et al., 1999) ทั้งนี้เนื่องจากไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็วมากในการติดเชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีทั้งในระดับกรดนิวคลิอิกของสารพันธุกรรม และในระดับกรดอะมิโน เรียกคุณสมบัตินี้ว่า quasispecies (Chang et al., 2002; Goldberg et al., 2003) ในประเทศไทยเดิมพบว่า

เชื้อไวรัสที่ระบาดมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (Damrongwatanapokin et al., 1996[a]) แต่ปัจจุบันสามารถตรวจพบการระบาดของโรคจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ในฟาร์มสุกร (Thanawongnuwech et al., 2002) โดยพบการระบาดของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (Thanawongnuwech et al., 2004)

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถติดต่อผ่านทางการหายใจ ระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งเข็มฉีดยา เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัสทางการหายใจผ่านเข้าทางเยื่อบุโพรงจมูก (nasal epithelial cell) และเข้าสู่เซลล์มาโครฟาจที่ต่อมทอนซิลและปอด ไวรัสจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และมาโครฟาจ (Vanderheijden et al., 2003) จากนั้นไวรัสแพร่ไปตามกระแสเลือดซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 12 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ และเชื้อจะกระจายไปยังอวัยวะน้ำเหลืองต่าง ๆ ทั่วร่างกาย และก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น ปอดอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ สมองอักเสบ และหลอดเลือดอักเสบ เป็นต้น (Rossow et al., 1995) แม้ว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปจะมีการกระจายของแอนติเจนในอวัยวะต่าง ๆ มากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (Laohasittikul et al., 2004) แต่สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาจะแสดงอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (Liden et al., 2003)

สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเริ่มแสดงอาการในช่วง 48 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ และอาการจะค่อย ๆ หายไปภายในเวลา 1 เดือน (Murtaugh et al., 2002) แม้ว่าสัตว์ที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการป่วยแล้ว แต่จะยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกายสัตว์ที่ติดเชื้อได้มากกว่า 12 สัปดาห์ โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ที่อวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ม้ามทอนซิล เป็นต้น (Rossow et al., 1995; Wills et al., 1997) สัตว์ที่มีการติดเชื้อแฝงนี้ (persistent infection) สามารถปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอกและแพร่เชื้อไปยังสัตว์ตัวอื่นได้ ซึ่งบ่งชี้ถึงความล้มเหลวในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นในสัตว์ที่ติดเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทำให้ความสามารถในการเก็บกินและทำลายจุลชีพของเซลล์มาโครฟาจลดลง (Thanawongnuwech et al., 1997; 1998) นอกจากนี้ภายหลังการติดเชื้อพบว่ามีการสร้าง pro-inflammatory cytokines โดยเฉพาะ ทูเมอร์เนโครซิส แฟกเตอร์ อัลฟ่า (Tomour necrosis factor –alpha; TNF-α) และ อินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า (interferon-alpha; IFN-α) (Albina et al., 1998; van Reeth et al., 2002) ของเซลล์มาโครฟาจที่ปอดในระดับที่ต่ำและช้ากว่าการติดเชื้อจากไวรัสชนิดอื่นๆ ในระบบทางเดินหายใจ (Lopez-Feurtes et al., 2000) การกดการสร้าง pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ส่งผลให้การสร้างไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ ลดลงด้วย ทำให้การต่อต้านการติดเชื้อไวรัสที่ปอดและการพัฒนาของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในขั้นต่อไปได้ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีระยะการติดเชื้อที่ยาวนานและเกิดการติดเชื้อแฝงได้ง่าย

เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีความสามารถควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในด้านกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร (Lager and Mengeling, 2000) แม้มีรายงานว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (protective immunity) ทั้งในกลุ่มภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity) และภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) ได้ แต่พบค่อนข้างช้า และไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสในกระแสเลือดในระยะแรกของการติดเชื้อได้ โดยพบว่าเมื่อมีการติดเชื้อจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มจำนวนของแอนติบอดีชนิด non-neutralizing ในระยะแรกของการติดเชื้อ (Labarque et al., 2000) อันเป็นกลไกหนึ่งที่ส่งผลให้มีการกระจายและเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้นและเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เรียกกระบวนการนี้ว่า antibody dependent enhancement (ADE) (Yoon et al., 1996) ส่วนการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด neutralizing มักจะช้าและพบได้ในระดับต่ำๆ (Albina et al., 1998) นอกจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เองไม่ดีแล้ว ยังมีรายงานอีกว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนจะส่งผลให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการให้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในระดับที่ต่ำกว่าสุกรที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Li and Yang, 2003) และพบว่าการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทำให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในระดับที่ต่ำและช้ากว่าสุกรที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (Bruin et al., 2000) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีความสามารถกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกร

ปัจจุบันมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มากขึ้น เนื่องจากเชื่อว่าน่าจะมีความสำคัญในการป้องกันและกำจัดเชื้อมากกว่าภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Bautista et al., 1997) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 (interleukin; IL-10) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) ที่แยกได้จากเลือด และเซลล์จากน้ำล้างปอด (Suradhat et al., 2003, Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) โดยที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์จากน้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ (Thanawang et al., 2004) IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์หลายชนิด มีหน้าที่กดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ลดการอักเสบและกดการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จะส่งผลให้มีการลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในระยะต่อมา (Moore et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีระดับต่ำและต้องใช้เวลานาน นอกจากนี้แล้วภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นยังไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอในการกำจัดเชื้อออกจากร่างกาย และ

การเพิ่มขึ้นของ IL-10 ในระยะต้นของการติดเชื้อ อาจทำให้สุกรที่ติดเชื้อมีความไวต่อการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากการกดการทำงานของ ของเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่เร็วเกินไป

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถปล่อยเชื้อไวรัสออกสู่ภายนอกร่างกายได้เป็นระยะเวลานานแม้ไม่แสดงอาการป่วย ทำให้มีการกระจายของเชื้อวนเวียนอยู่ในฟาร์มอย่างต่อเนื่อง ร่วมกับระบบการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นระบบเปิดและเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ดังนั้นสุกรจึงมีโอกาสในการรับเชื้อซ้ำอีกครั้งสูงไม่ว่าจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์ใหม่ จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำรวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสุกรสร้างขึ้น โดยพบว่าภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นสามารถป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสสายพันธุ์เดิมได้ดีแต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำจากไวรัสต่างสายพันธุ์ได้ดีนัก (Botner et al., 1999)

ปัจจุบันมีการพัฒนาวัคซีนมาใช้ในการควบคุมป้องกันการเกิดโรคกันอย่างแพร่หลาย แต่ก็พบว่ายังมีปัจจัยหลายๆ อย่างที่ทำให้การใช้วัคซีนไม่ประสบความสำเร็จ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของความปลอดภัยของวัคซีนเชื้อเป็น โดยมีรายงานว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนสามารถแพร่เชื้อไวรัสไปสู่สุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนและก่อให้เกิดการระบาดของโรคในฟาร์มได้ (Botner et al., 1999) แม้ว่าเชื้อไวรัสจากวัคซีนสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของอาการทางคลินิกน้อยกว่าการติดเชื้อจากธรรมชาติ แต่ก็เหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ช้า (Choen and Chae, 2004) วัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า (interferon-gamma; IFN-γ) ในระดับที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Meier et al., 2003) แม้จะมีรายงานว่าวัคซีนเชื้อเป็นมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าวัคซีนเชื้อตาย (Chung and Chae, 2003) แต่ก็พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์เดิม (Neilsen et al., 1997) หรือแม้แต่การใช้วัคซีนที่ประกอบด้วยไวรัสหลายสายพันธุ์ เพื่อหวังให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหลายสายพันธุ์ ก็พบว่าไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มได้อย่างสมบูรณ์ (Plana-Dura et al., 1997) นอกจากการทำวัคซีนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้ว ยังมีรายงานว่าการใช้วัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส อาจส่งผลให้สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรีย และอาจทำให้สุกรแสดงอาการที่รุนแรงขึ้นอีกด้วย (Halbur et al., 2000) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นสามารถกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกับการติดเชื้อจากธรรมชาติ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าความบกพร่องของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีทั้งรูปแบบที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ในระยะแรกของการติดเชื้อ เพื่อควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และส่งผลให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นไปได้ช้าและไม่มีประสิทธิภาพพอ ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสซ้ำและข้อมูลเกี่ยวกับวัคซีนที่นำมาใช้มักจะเป็นในด้านของ

ระบาดวิทยาและพยาธิวิทยา โดยมีรายงานเกี่ยวกับลักษณะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะในด้านของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์และการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์อย่างจำกัด จึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการศึกษาถึงลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส หรือได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อน และถูกกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดกัน รวมถึงศึกษาประชากรของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่สร้างไซโตไคน์ด้วย เพื่อสร้างความเข้าใจถึงผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และเป็นข้อมูลที่นำไปใช้ประกอบการตัดสินใจในการวางมาตรการควบคุมโรคหรือการพัฒนาวัคซีนที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 สมมติฐาน

การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส หรือการทำวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนมีผลต่อลักษณะการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC เมื่อได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ต่างชนิด

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ และ IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ

1.3.2 เพื่อศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ และ IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นต่อการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวของสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันและพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

1.4.2 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาและพัฒนาวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรค พี อาร์ อาร์ เอส ที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งแนวทางในการแก้ไข ควบคุม และป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกร

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคพี อาร์ อาร์ เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV) มีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มสุกรที่ North Carolina ในปี พ.ศ. 2530 โดยพบว่าเกิดปัญหาในระบบสืบพันธุ์ของสุกรพ่อแม่พันธุ์ รวมทั้งปัญหาระบบทางเดินหายใจในสุกรหย่านม ส่งผลให้สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง หลังจากนั้นพบลักษณะกลุ่มอาการเดียวกันนี้ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ ขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดจึงเรียกกลุ่มอาการนี้ตามลักษณะอาการที่พบ เช่น โรค mystery swine โรค porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) โรค blue ear โรค swine infertility and respiratory syndrome (SIRV) รวมทั้ง พี อาร์ อาร์ เอส (Collin et al., 1992)

ในปี พ.ศ. 2534 สามารถแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคได้ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์เป็นครั้งแรก และตั้งชื่อว่า Lelystad virus ซึ่งจัดเป็นต้นแบบของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป (Snijder and Meulenberge, 1998) ต่อมาสามารถแยกเชื้อได้ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2535 ใช้ชื่อว่า VR-2332 เป็นต้นแบบของสายพันธุ์อเมริกา (Collin et al., 1992) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างซีรั่มที่ส่งตรวจ ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996[a]) และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้ในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996[b]) โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา แต่ปัจจุบันสามารถพบการระบาดของโรคจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ (genotype) ในฟาร์มสุกร (Thanawongnuwech et al., 2002) โดยพบการระบาดของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปร้อยละ 66.42 และกลุ่มสายพันธุ์อเมริการ้อยละ 33.58 จากการตรวจด้วยวิธี nested multiplex RT-PCR (Thanawongnuwech et al., 2004) จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาของสุกรในปี พ.ศ. 2539 ถึง 2542 พบว่าร้อยละของผลบวกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.6 ในปี พ.ศ. 2539 เป็นมากกว่าร้อยละ 79 ในปี พ.ศ. 2542 (Thanawongnuewch et al., 2004) ซึ่งคาดว่าการระบาดของเชื้อไวรัสมาจากการนำเข้าสุกรพ่อแม่พันธุ์

2.1 เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จัดอยู่ในกลุ่ม *Arterivirus* แฟมิลี่ Arteriviridae ออร์เดอร์ Nidovirales โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ lactate dehydrogenase elevating virus (LDV) ในหนู equine arteritis virus (EAV) และ simian hemorrhagic fever virus (Rowland et al., 1999)

ลักษณะสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นชนิด สายบวก single stranded RNA ขนาดประมาณ 15 Kb เชื้อไวรัสมีเปลือกหุ้ม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 48-83 นาโนเมตร (Meng et al., 2000)

องค์ประกอบของยีโนมของไวรัสประกอบด้วย 8 open reading frames (ORFs) คือ ORF 1a และ ORF 1b อยู่ด้าน 5' ของยีโนม เป็นร้อยละ 80 ของยีโนมทั้งหมดของไวรัส และมีหน้าที่สร้าง viral RNA polymerase สำหรับ ORF 2-5 สร้างโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) อยู่ด้าน 3' ของยีโนม โดย ORF 2 ให้ส่วนโปรตีน GP2 มีขนาด 29-50 KD ORF 3 ให้ส่วนโปรตีน GP3 มีขนาด 45-50 KD ORF 4 ให้ส่วนโปรตีน GP4 มีขนาด 31-35 KD ORF 5 ให้ส่วนของโปรตีน E มีขนาด 25 KD ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Andreyev et al., 1997) ORF 6 ให้ส่วนโปรตีน matrix (M) มีขนาด 18-19 KD และ ORF 7 ให้ส่วนของโปรตีน nucleocapsid (N) มีขนาด 14-15 KD สำหรับขนาดของลำดับกรดอะมิโนที่สร้างจาก ORF 2-7 ของกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป แสดงดังตารางที่ 1

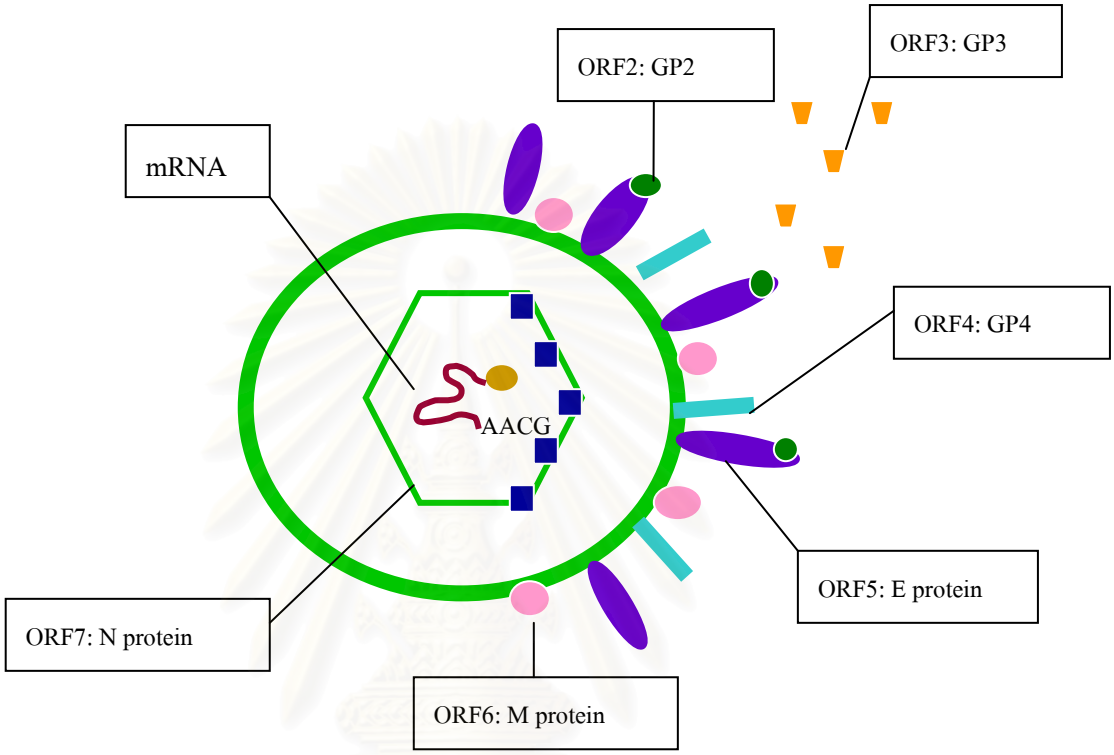
ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (ดัดแปลงจาก Yoon et al., 2002)

ORF	**mRNA (Kb)**	**No. of amino acids**		**Molecular weight (kD)**	**Location in virion**	**Function**
		EU	**US**			
1	11.5				Nonstructural	Replicase complex
2	3.3	249	256	29-30	Envelope (GP2)	T cell epitope
3	2.7	265	254	42-50	Structural (GP3)	Linear B-cell epitopes
4	2.2	183	178	31-35	Envelope (GP4)	Neutralizing epitope Linear B-cell epitopes
5	1.7	201	200	25	Envelope (E, GP5)	Cell receptor binding Apoptosis Neutralizing epitope T cell epitope
6	1.1	174	173	18-19	Matrix (M)	Neutralizing epitope T cell epitope Virulence
7	0.7	128	124	15	Nucleocapsid (N)	Cytopathogenesis

การศึกษาความใกล้เคียงของลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์อเมริกาและสายพันธุ์ยุโรป ของยีน ORF 2 3 4 และ 5 พบว่ามีความใกล้เคียงของลำดับพันธุกรรมเท่ากับร้อยละ 65-67 61-64 63-66 และ 61-63 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาด้วยกันพบว่ามีความเหมือนกันของลำดับพันธุกรรมของยีน ORF 2 3 4 และ 5 เป็นร้อยละ 96-98 92-98 92-99 และ 90-98 ตามลำดับ สำหรับลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากยีน ORF 7 พบว่าเชื้อไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกามีความเหมือนกันร้อยละ 95-100 ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีความใกล้เคียงเพียงร้อยละ 54-59 และพบว่า ORF 6 เป็นยีนที่มีความจำเพาะมากที่สุดในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (Meng et al., 1995)

ปัจจุบันมีการจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสเป็น 2 กลุ่มสายพันธุ์ ตามความแตกต่างทางลักษณะพันธุกรรมและคุณสมบัติของแอนติเจน คือ กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (EU) โดยอาศัยความแตกต่างของยีน ORF 5 จากศึกษาลำดับสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในประเทศไทยจากยีน ORF5 พบว่าเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสจากประเทศแคนาดา (IAF-EXP91) (ร้อยละ 89-90) ในขณะที่เชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นแบบ (Lelystad virus) (ร้อยละ 87-97.5) (Thanawongnuwech et al., 2004) จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อไวรัสต้นแบบ (VR2332) พบว่ามีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมในระดับกรดนิวคลิอิกเป็นร้อยละ 83.7-85.2 ในขณะที่มีความใกล้เคียงในระดับกรดอะมิโนเป็นร้อยละ 83.5-85.5 สำหรับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (Porcillis) มีความใกล้เคียงกันร้อยละ 99 ในระดับกรดนิวคลิอิกของลำดับพันธุกรรม และร้อยละ 98.6 ในระดับกรดอะมิโน (Thanawongnuwech et al., 2004)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แบบจำลองไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แสดงส่วนประกอบของเชื้อไวรัส (ดัดแปลงจาก Dae et al., 2000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 พยาธิกำเนิด

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการก่อโรคได้สูง โดยพบว่าเชื้อไวรัสปริมาณ 10-40 อนุภาคก็สามารถก่อโรคได้ (Nelson et al., 1994; Yoon et al., 1999) ในระบบการผลิตสุกรพบว่าเชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายได้หลายรูปแบบ เช่น การสัมผัสโดยตรงทางน้ำมูก น้ำลาย อุจจาระ การแพร่ผ่านทางอากาศ ทางน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ รวมทั้งการแพร่กระจายผ่านทางเข็มฉีดยา รถบรรทุก เสื้อผ้า รวมทั้งอุปกรณ์เครื่องใช้ภายในฟาร์ม เป็นต้น (Otake et al., 2002)

เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายสัตว์ผ่านการหายใจ เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่เยื่อบุโพรงจมูก เซลล์มาโครฟาจที่ระบบทางเดินหายใจหรือระบบน้ำเหลือง โดยอาศัยตัวรับสองชนิดที่พบบนผิวเซลล์มาโครฟาจ คือ heparan sulphate glycosaminoglycans และ sialoadherin (Nauwynck et al., 2003) เชื้อไวรัสจะเข้าภายในเซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะพบเชื้อไวรัสอยู่ใน vesicle ที่เรียกว่า clathrin-coated pits (Nauwynck et al., 1999) หลังจากเชื้อเข้าไปภายในเซลล์แล้ว 3-6 ชั่วโมงเยื่อบุ vesicle จะเปลี่ยนแปลงเป็นลักษณะ 2 ชั้นเรียกว่า replication complex อยู่รอบๆ นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งเป็นคุณสมบัติทั่วไปของการเข้าไปภายในเซลล์ของติดเชื้อไวรัสตระกูล *Arterivirus* จากการศึกษาในเชื้อไวรัส EAV พบว่าผนังเยื่อบุนี้พัฒนามาจาก endoplasmic reticulum (Pedersen et al., 1999) เมื่อส่วน nucleocapsid ของเชื้อไวรัสมีการแตกหน่อ (budding) เข้าไปในช่องว่างของ smooth endoplasmic reticulum หรือตำแหน่งของ golgi หรือทั้งสองที่แล้ว จะได้เชื้อไวรัสอนุภาคใหม่โดยจะรวมอยู่ในถุง vesicle และเคลื่อนไปที่ไปเชื่อมกับ plasma membrane ของเซลล์โฮสต์ เชื้อไวรัสก็จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ (Mardassi et al., 1996; review Meulenberg, 2000) ใช้เวลาประมาณ 9-12 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบของการเพิ่มจำนวน (Rossow et al., 1995) หลังจากนั้นเชื้อไวรัสจะแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดและไปยังอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ จากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสที่ปอด หัวใจ ต่อมน้ำเหลือง ทอนซิล ไทมัส ม้าม ลำไส้ ไต ตับ ต่อมหมวกไต สมอง และอัณฑะ เป็นต้น และก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ขึ้น ได้แก่ ปอดอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ ผนังเยื่อบุเส้นเลือดอักเสบ เป็นต้น (Halbur et al., 1996; Rossow et al., 1996) โดยพบว่าเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปจะมีการกระจายตัวของแอนติเจนในอวัยวะต่างๆ มากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (Laohasittikul et al., 2004)

ลักษณะอาการของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะแบ่งเป็น 2 กลุ่มอาการ คือกลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ โดยพบว่าจะก่อให้เกิดการแท้งในแม่สุกรทุกระยะของการตั้งท้อง โดยเฉพาะในระยะท้ายของการตั้งท้อง มีการเพิ่มขึ้นของมัมมี่ อัตราการตายแรกคลอด หรือลูกสุกรอ่อนแอหลังคลอด รวมถึงปัญหาการกลับสัดของแม่สุกรอีกด้วย นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์มีคุณภาพต่ำลง (Mengeling et al., 1996) กับ

กลุ่มปัญหาระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในสุกรอนุบาล จะพบอาการมีไข้ หอบและหายใจลำบาก (Benfield et al., 2000; Yoon and Stevenson, 2002) สุกรที่ติดเชื้อจะพบปัญหาการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่ายขึ้นทั้งจากไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, Swine influenza หรือ Porcine circo virus เป็นต้น โดยก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน (Porcine Respiratory Disease Complex; PRDC) (Yahara et al., 2002; Zimmerman, 2002)

สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะเริ่มแสดงป่วยหลังจากได้รับเชื้อประมาณ 48 ชั่วโมง และอาการจะค่อยๆ หายภายใน 1 เดือน (Murtaugh et al., 2002) โดยพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาจะแสดงอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (Meng et al., 2000; Liden et al., 2003) ความรุนแรงของอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นจากในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันก็มีความแตกต่างกันไปขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของยีน ORF5 (Yang et al., 1996; Opriessing et al., 2002) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ และคงอยู่นานถึง 21 วันหลังติดเชื้อ (Rossow et al., 1995; Delputte et al., 2004) แต่แม้สัตว์จะไม่แสดงอาการป่วยก็สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกายโดยเฉพาะที่ต่อมทอนซิล ปอด ต่อมน้ำลาย และไต ได้นานมากกว่า 12 สัปดาห์ (Wills et al., 1997; Bayer et al., 2000; Rowland et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในน้ำลายได้นานกว่า 42 วันหลังติดเชื้อ ในน้ำมูก 21 วันหลังติดเชื้อและพบเชื้อไวรัสในน้ำเชื้อได้นานถึง 92 วันหลังติดเชื้อ (Christopher-Henning et al., 1995) ในบางรายงานสามารถพบเชื้อไวรัสในน้ำเชื้อได้นานถึง 150 วันหลังติดเชื้อ (Wills et al., 1997) โดยสัตว์ที่มีการติดเชื้อแฝงนี้ยังสามารถปล่อยเชื้อไวรัสออกสู่นอกร่างกายและแพร่ไปยังสัตว์ตัวอื่นได้ (Meng, 2000) จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้สัตว์ที่ติดเชื้ออยู่แล้วได้รับเชื้อซ้ำอยู่เรื่อยๆ

2.3 ภูมิคุ้มกันวิทยา

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโดยทั่วไป เมื่อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกจับกินและนำเสนอแอนติเจนให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน สำหรับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (protective immunity) ได้ทั้งแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) และแบบจำเพาะ (acquire immunity) ทั้งชนิดสารน้ำ (humoral immunity) และชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) รวมทั้งยังมีบทบาทในการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสุกรที่ติดเชื้อมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ช้าและไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอในการป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์เมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการติด

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ส่งผลทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทำวัคซีนต่อโรคอหิวาต์สุกรลดลงอีกด้วย (Li and Yang, 2003)

2.3.1 ผลของ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ (Innate immunity)

เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เข้าสู่ร่างกายสุกรผ่านทางจมูกและทางช่องคลอด ดังนั้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นเป็นขั้นตอนแรกเพื่อเป็นการป้องกันหรือกำจัดเชื้อจุลชีพ กลไกในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้ประกอบด้วยหลายปัจจัย เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานจะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil) เนเจอรัลคิลเลอร์เซลล์ (natural killer cell; NK cells) และเซลล์เก็บกินที่มีนิวเคลียสเดียว (mononuclear phagocytes) เช่น เซลล์มาโครฟาจ เป็นต้น ในช่วงที่มีการติดเชื้อพบว่าเซลล์ชนิด NK cellsในกระแสเลือดสูงขึ้นหลังติดเชื้อ 5 วัน และที่ปอดในวันที่ 7 หลังติดเชื้อ (Samsom et al., 2000) NK cells เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ เช่นเดียวกับเซลล์มาโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์อีกชนิดที่มีความสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และยังเป็นเป้าหมายของเชื้อไวรัส สุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีปริมาณเซลล์มาโครฟาจที่ปอดเพิ่มขึ้นหลังจากติดเชื้อ 5 วันถึง 52 วัน ซึ่งพบว่ามากกว่าร้อยละสามของเซลล์เหล่านี้จะมีเชื้อไวรัสอยู่ภายในเซลล์ (Larbarque et al., 2000) อย่างไรก็ตามแม้พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่มีบทบาทในการกำจัดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น แต่สุกรก็ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อหรือกำจัดเชื้อได้หมด จากการทดลองให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปร่วมกับเซลล์มาโครฟาจในห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อมีประสิทธิภาพในการเก็บกินเชื้อ *E.coli* ลดลงร้อยละ 40 หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Oleksiewicz et al., 1999) เช่นเดียวกับการศึกษาในสุกรที่พบว่าเชื้อไวรัสเหนี่ยวนำให้เซลล์มาโครฟาจมีประสิทธิภาพในการเก็บกินเชื้อจุลชีพต่างๆ ลดลง (Thanawongnuwech et al., 1997; 1998; 2000; Riber et al., 2004) การทำงานของเซลล์ที่ลดลงนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากกลไกหลายๆ อย่างร่วมกัน โดยมีรายงานว่าเชื้อไวรัสเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อและยังมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ข้างเคียงอีกด้วย (Sur et al., 1997; Miller and Fox, 2004) เชื้อไวรัสสามารถยับยั้งการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์ ทำให้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถรับรู้ได้ นอกจากนี้เชื้อไวรัสสามารถลดปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นปัจจัยในการทำลายเชื้อภายในเซลล์ของเซลล์มาโครฟาจได้อีกด้วย (Pampusch et al., 1998; Riber et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาปริมาณเซลล์จากน้ำล้างปอดของลูกสุกรที่คลอดจากแม่ที่ได้รับเชื้อผ่านทางช่องคลอดพบว่า ลูกสุกรจะมีปริมาณเซลล์ในน้ำล้างปอด โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจลดลงที่อายุ 2 สัปดาห์ (Neilsen et al., 1996; Chiou et al., 2000)

2.3.2 ผลของ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity)

2.3.2.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral immunity)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นจำนวนมาก หลังจากมีการติดเชื้อจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ในซีรั่มในวันที่ 5-7 สูงสุดในวันที่ 14 หลังติดเชื้อและลดลงอย่างรวดเร็วใน 2-3 สัปดาห์ (Yoon et al., 1995) แอนติบอดีชนิด IgG จะตรวจพบหลังจากติดเชื้อ 7-10 วัน (Yoon et al., 1995 Labarque et al., 2000) และพบสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2-4 หลังจากการติดเชื้อและคงอยู่ตลอดในระดับต่ำๆ นานกว่า 300 วันหลังติดเชื้อ (Nelson et al., 1994) สำหรับแอนติบอดีชนิด IgA สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ และสูงสุดในวันที่ 25 หลังจากการติดเชื้อและยังคงตรวจพบได้นานถึง 35 วันหลังติดเชื้อ (Labarque et al., 2000) จากการศึกษาแอนติบอดีในน้ำล้างปอดพบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกันกับในซีรั่ม แม้ว่าแอนติบอดีในน้ำล้างปอดอาจจะเป็นตัวกำจัดเชื้อไวรัสจากปอด แต่พบว่าไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งหมด (Labarque et al., 2000) ทำให้สุกรที่ได้รับเชื้อมีโอกาสในการติดเชื้อแฝงได้ง่าย (Allende et al., 2000) จากการศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีที่สุกรสร้างขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีความจำเพาะกับโปรตีน M N และ GP5 ในขณะที่แอนติบอดีจากการติดเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเป็นโปรตีน M และ N (Delputte et al., 2004)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อในเซลล์และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์ที่ติดเชื้อสู่ตัวอื่นๆ สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของแอนติบอดีชนิด non-neutralizing ในระดับสูงภายใน 7-10 วันหลังจากติดเชื้อ แต่จะพบแอนติบอดีชนิด neutralizing หลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 3 สัปดาห์โดยพบในระดับที่ต่ำๆ (Murtaugh et al., 2002) จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรที่มีปัญหาการแท้งจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าสุกรที่มีระดับแอนติบอดีชนิด neutralizing ที่สูงจะสามารถป้องกันการแท้งได้ (Osorio et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของแอนติบอดีในการป้องกันโรคยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดนัก เพราะแม้สุกรมีระดับแอนติบอดีสูงแต่ก็ยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ (Christainson et al., 1992; Wills et al., 1997; Dee et al., 1998) นอกจากนี้การเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีชนิด non-neutralizing สูงในระยะแรกของการติดเชื้ออาจจะเป็นกลไกที่เร่งการกระจายและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้นและเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เรียกกระบวนการนี้ว่า antibody dependent enhancement (ADE) ซึ่งจะช่วยทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่มี Fc receptor ได้ง่ายขึ้นโดยอาศัย antigen-antibody complex (Choi et al., 1992; Yoon et al., 1996) ในระยะหลังมีรายงานว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของ บี เซลล์ (B cells) ทั้งชนิด

ที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสได้ในระยะ 10 วันแรกหลังจากได้รับเชื้อ (Lamontagne et al., 2001) ซึ่ง B cells ที่ถูกกระตุ้นนี้จะพัฒนาเป็นพลาสม่าเซลล์ และสร้างแอนติบอดีต่อไป ดังนั้น สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จึงมีปริมาณแอนติบอดีที่สูงขึ้น (Albina et al., 1998) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแอนติบอดีที่สุกรสร้างขึ้นนั้นสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเข้าในเซลล์ได้เฉพาะสายพันธุ์เดิม แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสต่างกลุ่มสายพันธุ์ได้ (Molitor et al., 1997; Albina et al., 1998) อย่างไรก็ตามกลไกต่างๆ เหล่านี้ก็ยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด

2.3.2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity)

ปัจจุบันมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์กันมากขึ้น โดยเชื่อว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีความสำคัญในการป้องกันและกำจัดเชื้อได้ดีกว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Choi et al., 1992; Rossow et al., 1995; Bautista et al., 1997)

ที เซลล์ (T cells) เป็นเซลล์ที่สำคัญในระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ การติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสามารถตรวจพบการพัฒนาการทำงานของ T cells หลังจากติดเชื้อไปแล้ว 4 สัปดาห์ (Bautista and Molitor, 1997) แต่การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสจะพบได้ในสัปดาห์ที่ 5-9 หลังจากติดเชื้อ และพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด $CD4^+$ เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองหลังจากติดเชื้อไปแล้ว 10 สัปดาห์ (Lopez-Feurtes et al., 1999) สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้เซลล์ PBMC ของสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ร่วมกับ IL-2 พบว่าเซลล์ชนิด $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$ เป็นกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้น (Zuckermann and Husmann, 1996) จากการศึกษาในน้ำล้างปอดพบว่ามีประชากรย่อยกลุ่ม $CD8^+$ ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์ชนิด NK cells และ CTL มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดวันที่ 4 และ 21 หลังจากติดเชื้อ (Samsom et al., 2000)

2.3.3 ผลของ PRRSV ต่อการสร้างไซโตไคน์

ในช่วงเวลาที่ผ่านมาความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับไซโตไคน์ที่มีบทบาทเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันวิทยา พยาธิวิทยา สรีรวิทยาทั้งในคนและสัตว์รวมทั้งสุกร โดยพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะมีบทบาทเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งในระบบแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ

ไซโตไคน์ที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ อินเตอร์เฟียรอน ชนิด I (Type I interferon; interferon- alpha/beta ; IFN-α/β) TNF-α interleukin (IL)-1 IL-6 IL-10 และ IL-12 ซึ่งเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะลดระดับการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ โดยเฉพาะ Type I interferon ทั้งในการศึกษา *in vitro* และ *in vivo* (Albina

et al., 1998; van Reeth et al., 1999) IFN-α เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์มาโครฟาจ ส่วน IFN-β สร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น ไฟโบรบลาส ไซโตไคน์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโดยกระบวนการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น 2',5' oligoadenylate synthetase ไปขัดขวางกระบวนการถอดรหัสของ RNA หรือ DNAของเชื้อไวรัส เป็นต้น โดยเฉพาะ IFN-α เป็นไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการยับยั้งการติดเชื้อและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ (van Reeth et al., 1999; Thanawongnuwech et al., 2001) และสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจและ NK cells ในการติดเชื้อไวรัสโดยทั่วไป IFN-α ที่ถูกเหนี่ยวนำจะเป็นตัวกระตุ้น nuclear transcription factor (NF-ΚB) ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ โดยควบคุมการแปลรหัส (transcription) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า 100 ชนิด นอกจากนี้ Type I interferon ยังมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถการแสดงโมเลกุล MHC class I ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการเสนอแอนติเจนให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จะสามารถตรวจพบ IFN-α ได้ในช่วง 3-10 วันหลังติดเชื้อ ซึ่งช้ากว่าการติดเชื้อไวรัส influenza และ porcine respiratory coronavirus และยังพบในระดับที่ต่ำกว่าอีกด้วย (van Reeth et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเชื้อไวรัสในแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่แตกต่างกันด้วย (Chung et al., 2004)

นอกจากนี้แล้วเชื้อไวรัสยังกดการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-1 และ TNF-α (Choi et al., 2002) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ โดยสร้างมาจากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการทำลายเชื้อและกระตุ้นขบวนการ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้ออีกด้วย (van Reeth et al., 2002) ดังนั้นการขาดไซโตไคน์ที่จำเป็นร่วมกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะที่ไม่มีประสิทธิภาพ น่าจะส่งผลให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพี อาร์ อาร์ เอส ในขั้นต่อไปได้ไม่ดีนัก

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อไวรัสสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่แสดง IL-6 (Thanawongnuwech et al., 2001) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาททั้งการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะและจำเพาะต่อการติดเชื้อ พบว่าไซโตไคน์ชนิดนี้สร้างมาจากเซลล์มาโครฟาจ เซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือด เซลล์ไฟโบรบลาส และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อจุลชีพโดยผ่านไซโตไคน์ชนิด IL-1 และ TNF-α และพบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-12 เพิ่มขึ้นในเซลล์จากน้ำล้างปอด (Thanawongnuwech et al., 2001) IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ โดยกระตุ้นการพัฒนาของ T cells ชนิด naïve T helper cells เป็น Th1 และกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจและเดนไดรติกเซลล์ได้ด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส นั้นสามารถเหนี่ยวนำลักษณะการสร้างไซโตไคน์ทั้ง

ในรูปแบบที่ลดความสามารถและเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อได้ แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกหรือการทำงานร่วมกันของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ได้ชัดเจนนัก

นอกจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแล้ว ยังพบว่ามีผลต่อไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย โดยเฉพาะ IFN-γ ซึ่งเป็นอินเตอร์เฟียรอน ชนิด 2 (type II interferon) ที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัสในสุกร (Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001) และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของกระบวนการอักเสบและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัสแล้ว IFN-γ ยังเป็นตัวประสานการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย (Biron, 1998) จากการศึกษาชนิดเซลล์ที่สร้าง IFN-γ โดยการกระตุ้นเซลล์ PBMC ด้วย PMA และ iodomycin และวิเคราะห์ผลด้วยวิธีโฟลไซโตมิทรี พบว่า IFN-γ สร้างจากเซลล์ชนิด αβ T cells γδ T cells และ โมโนไซต์ ร้อยละ 70 1 และ 2 ตามลำดับ (Rodriguez-Carreno et al., 2002) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถตรวจพบการเพิ่มการแสดงออกยีนที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ที่ต่อมน้ำเหลือง ปอด (Rowland et al., 2001) และ PBMC (Lopez-Feurtes et al., 1999) โดยพบเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ที่จำเพาะต่อเชื้อในวันที่ 14 หลังจากติดเชื้อและสูงที่สุด ในวันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ (Xiao et al., 2003) ซึ่งช้ากว่าการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น สามารถตรวจวัดไซโตไคน์ชนิดนี้ต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมได้ในวันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ (Hoegen et al., 2004) และไวรัสอหิวาต์สุกรสามารถตรวจพบได้ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ (Suradhat et al., 2001) และพบว่าลูกสุกรที่คลอดจากแม่ที่ได้รับเชื้อไวรัสผ่านทางช่องคลอดแม้ว่าสามารถตรวจพบ IFN-γ ในเซลล์ PBMC สูงขึ้นหลังคลอด 2 สัปดาห์แต่ก็ลดลงที่ 4 สัปดาห์หลังคลอด (Aasted et al., 2002) จากการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า IFN-γ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ได้ (Bautista and Molitor, 1999) ซึ่งในการศึกษาให้เชื้อไวรัสในสุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนนั้น สุกรจะไม่แสดงอาการป่วยใดๆ และสามารถลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือดได้ แสดงให้เห็นว่าสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส น่าจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ แต่ในหลายการทดลองกลับพบว่าการติดเชื้อครั้งแรกในสุกรสามารถป้องกันการติดเชื้อครั้งที่สองได้เพียงบางส่วน และป้องกันได้ดีเฉพาะในสายพันธุ์เดิมเท่านั้น (Lager et al., 1997; Mengeling et al., 2003) แม้การติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้แต่ก็ไม่ดีเท่าที่ควรจึงส่งผลให้สุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำ (Lager et al., 1999)

IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทกับการทำงานของเซลล์ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ รวมถึงการสร้างไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ โดยสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่

เคราติโนไซต์ (keratinocytes) โมโนไซต์ (monocyte) B cell หรือ T cells เป็นต้น (Abbas et al., 2000) สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ พบว่า IL-10 มีบทบาทในระยะแรกของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการกระตุ้นเซลล์ APC ด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีนสร้าง IL-10 ในระยะแรกๆ จะมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-12 และ TNF ของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น เนื่องจาก IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า IL-10 มีบทบาทสำคัญทางอ้อมในการกดการสร้าง IFN-γ ด้วย (Abbas et al., 2000) นอกจากนี้พบว่า IL-10 ยังมีบทบาทยับยั้งการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจ และเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells) (Morel et al., 2002) ส่งผลให้สุกรที่ติดเชื้อมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ไม่ดี (Mocellin et al., 2003) แม้ IL-10 มีบทบาทในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ แต่ก็มีรายงานว่า IL-10 สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ชนิด B cellsได้ (Abbas et al., 2000) นอกจากนี้ IL-10 ยังสามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเซลล์ชนิด NK cells ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้อีกด้วย (Mocellin et al., 2003)

ปัจจุบันมีรายงานว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรทั้งจากการศึกษาใน *in vitro* และ *in vivo* (Suradhat et al., 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) การเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ส่งผลให้ความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มาโครฟาจลดลง โดยการยับยั้งการนำเสนอ MHC class II ที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของ IL-10 นั้นสัมพันธ์กับการลดลงของกระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์มาโครฟาจอีกด้วย (Pampusch et al., 1998; Johnsen et al., 2002) ในสุกรที่ติดเชื้อสามารถตรวจพบ IL-10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวตั้งแต่วันที่ 1 ของการติดเชื้อ และพบได้นานถึง 28 วันหลังการติดเชื้อ (Feng et al., 2003) สำหรับในเซลล์น้ำล้างปอดจะพบได้ในวันที่ 9 และวันที่ 15 หลังการติดเชื้อ โดยไม่พบความแตกต่างในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 จากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์ (Thanawang et al., 2004) นอกจากกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแล้วยังพบว่า IL-10 มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ B cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Abbas et al., 2000) ในระยะหลังนี้มีรายงานว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถกระตุ้นการทำงานของ B cells ในระยะต้นของการติดเชื้อได้เช่นกันโดยเฉพาะในต่อมทอนซิล ดังนั้นจึงพบแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงในระยะแรกๆ และพบได้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากมีการติดเชื้อแฝงในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lamontagne et al., 2001) จากความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ของเชื้อไวรัสในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อนี้ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและจำเพาะที่ไม่มีประสิทธิภาพ

2.4 วัคซีน

การควบคุมป้องกันและกำจัดโรคพี อาร์ อาร์ เอส ที่มีประสิทธิภาพยังคงเป็นคำถามที่ตอบได้ยาก ปัจจุบันมีการพัฒนาวัคซีนมาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ก็ยังมีหลายๆ ปัจจัยที่ทำให้การใช้วัคซีนไม่ประสบผลสำเร็จ ไม่ว่าจะเป็นในด้านของความปลอดภัยของวัคซีนเชื้อเป็น ประสิทธิผลของวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำ รวมถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกร แม้ว่าเชื้อไวรัสจากวัคซีนเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของอาการทางคลินิกน้อยกว่าการติดเชื้อจากธรรมชาติ แต่ก็เหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ช้ากว่า (Dee et al., 1997; Cheon and Chae, 2004) แม้มีรายงานว่าวัคซีนเชื้อเป็นจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงกว่าวัคซีนเชื้อตาย (Chung and Chae, 2003) ก็พบว่าการเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ในระดับที่ต่ำเมื่อเทียบกับการกระตุ้นจากวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Meier et al., 2003) และยังพบว่าภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่สุกรสร้างขึ้นนั้นสามารถป้องกันการติดเชื้อเฉพาะสายพันธุ์เดิม (Nielsen et al., 1997; Labarque et al., 2003; Lager et al., 2003) หรือแม้แต่การใช้วัคซีนที่ประกอบด้วยไวรัสหลายสายพันธุ์ เพื่อหวังให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหลายสายพันธุ์ ก็พบว่าไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มได้อย่างสมบูรณ์ (Plana-Dura et., 1997) แม้จะมีรายงานว่าภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นอาจจะสามรถป้องกันการติดเชื้อจากต่างสายพันธุ์ (Mengeling et al., 2003) จากการศึกษาใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นฉีดเข้ากล้ามสุกรจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 8 สัปดาห์พบว่าวัคซีนสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ในครั้งแรกแต่พบว่าการสร้าง IFN-γ หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่สองมีระดับที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับวัคซีนครั้งแรก (Royaee et al., 2004) นอกจากการทำวัคซีนจะไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำจากไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้ว ยังมีรายงานเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ส่งผลให้สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรีย และก่อให้เกิดแสดงอาการที่รุนแรงขึ้นอีกด้วย (Halbur et al., 2000) อย่างไรก็ตามรายงานในด้านภูมิคุ้มกันวิทยาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นต่อการติดเชื้อซ้ำนั้นยังมีไม่มากนัก จึงยังไม่มีข้อมูลในการอธิบายกลไกได้อย่างชัดเจนนัก

2.5 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร

ในกระแสเลือดของสุกรประกอบด้วยเซลล์หลายๆ ชนิดจากการศึกษาโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆ ของเซลล์ พบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรประกอบด้วยเซลล์ชนิด monocytes macrophage กลุ่มเซลล์ polymorphor nuclear cells T cells B cells NK cells และ Null ดังแสดงในรูปที่ 2 (Samsom et al., 2000)

2.5.1 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ที ลิมโฟไซต์ในสุกร

โดยทั่วไปประชากรเซลล์ชนิด T cells จะมีแอนติเจนที่ผิวเซลล์ชนิด CD3 (cluster of differentiation 3) ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ประชากรเซลล์ชนิดนี้ นอกจากนี้ยังมี TCR ที่เป็นตัวส่งสัญญาณ (signal transduction) และกระตุ้นเซลล์หลังจากรับรู้แอนติเจนผ่านโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) ซึ่ง TCR ประกอบด้วย heterodimer ของ α และ β หรือ γ และδ ในกระแสเลือดส่วนใหญ่จะพบชนิด α และ β สำหรับ γ และδ มักพบที่บริเวณเยื่อบุ นอกจากนี้เซลล์แสดง $\gamma\delta$TCR สามารถรับรู้แอนติเจนโดยไม่ต้องอาศัย MHC ปัจจุบันมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกลุ่มประชากรของ ที ลิมโฟไซต์ต่อการติดเชื้อมากขึ้น และมีการพัฒนาแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์มากขึ้นเพื่อให้มีการศึกษาที่ชัดเจน จากการแบ่งชนิดเซลล์ลิมโฟไซต์โดยใช้แอนติเจนชนิด CD4 และ CD8 และการรับรู้แอนติเจนโดยการนำเสนอผ่าน MHC เป็น 4 กลุ่ม คือ $CD4^+CD8^-$ $CD4^-CD8^+$ $CD4^-CD8^-$ และ $CD4^+CD8^+$ (Saalmuller et al., 1999)

2.5.1.1 $CD4^+CD8^-$ และ $CD4^+CD8^+$ ที ลิมโฟไซต์

เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4 โมเลกุล มีลักษณะเป็น monomeric glycoprotein ที่มีขนาด 55 kD เซลล์ $CD4^+$ สามารถรับรู้แอนติเจนผ่าน MHC class II เซลล์ชนิดนี้จะแสดงแอนติเจนบนผิวเซลล์ชนิด CD2 (Saalmuller et al., 1989) CD3 (Yang and Parkhouse, 1996) CD5 และ CD6 (Saalmuller et al., 1994) ร่วมด้วย ในสุกรพบว่าประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+$ แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ $CD4^+CD8^-$ ซึ่งเป็น T cells ชนิดต้นแบบของ T helper cells พบประมาณร้อยละ 2-18 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีหน้าที่หลักคือการสร้างไซโตไคน์และ growth factor ที่กระตุ้นกลุ่มประชากรเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์ที่จำเพาะ โดยเฉพาะการกระตุ้น B cell ให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อจุลชีพ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันรวมถึงการทำงานของเซลล์ชนิด CTL, NK cells และมาโครฟาจ อีกด้วย เซลล์อีกกลุ่มคือเซลล์ที่เสนอแอนติเจนชนิด $CD4^+CD8^+$ พบประมาณร้อยละ 8-60 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสุกร แม้ว่าเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้ แต่ในกรณีที่ได้รับเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมอีกครั้งเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม (Summerfield et al., 1996) จึงเรียกกลุ่มประชากรเซลล์ชนิดนี้ว่า memory T helper cells และพบว่าประชากรเซลล์ของ $CD8^+$ ที่อยู่ใน $CD4^+CD8^+$ นั้นเป็นประชากรชนิด $CD8^{low}$

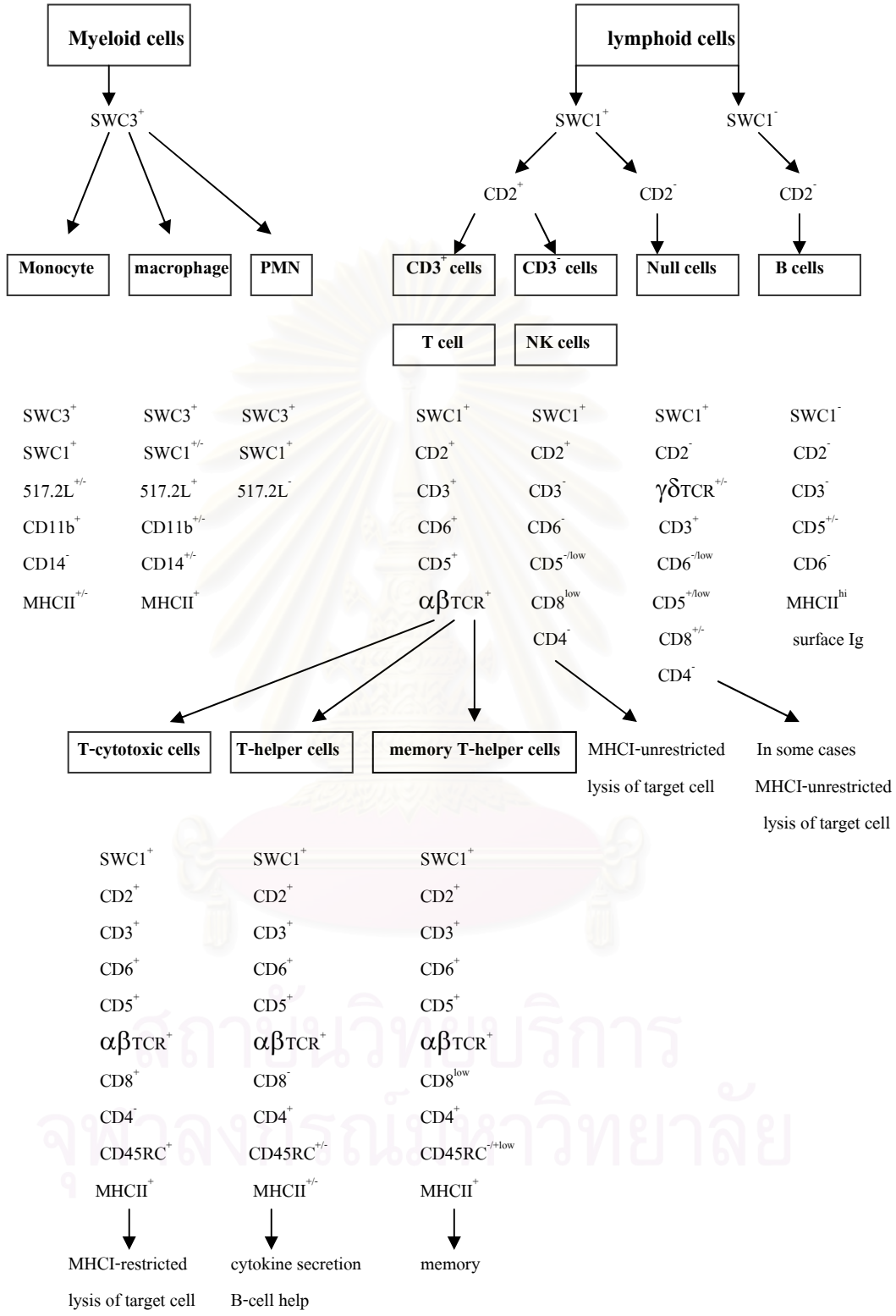
2.5.1.2 $CD4^-CD8^+$ ที ลิมโฟไซต์

CD8 โมเลกุล (Cytotoxic T cell; CTL) เป็น dimeric molecule มีขนาด 70 kD เซลล์ $CD8^+$ รับรู้แอนติเจนผ่าน MHC class I (Pescovitz et al., 1984) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและกำจัดการติดเชื้อไวรัสหลายชนิด แบ่งประชากรเซลล์เป็น 2 กลุ่มตามความหนาแน่นของแอนติเจน คือกลุ่มที่มีความหนาแน่นต่ำ ($CD8^{low}$) จะไม่มี CD6 และกลุ่มที่มีความหนาแน่นสูง ($CD8^{high}$) พบว่าเซลล์จะแสดง CD6 ในกระแสเลือดประมาณร้อยละ 3-20 ประชากรเซลล์กลุ่มนี้รับรู้แอนติเจนผ่าน MHC class I และมีหน้าที่ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อภายในเซลล์ จากการศึกษาหน้าที่ของเซลล์นี้ พบว่า $CD8^{low}$ สามารถทำงานได้โดยไม่ผ่าน MHC หรือผ่าน MHC class II และมี TCR เป็นชนิด $\alpha\alpha$ TCR (Parel and Chizzolini, 2004) ในขณะที่กลุ่มประชากร $CD8^+$ จะทำงานผ่านการรับรู้ของ MHC class I นอกจากแอนติเจนแสดง $CD8^+$ สามารถบ่งชี้ประชากรเซลล์ชนิด CTL แล้ว ยังอาจพบบนเซลล์ชนิด NK cells และ lymphokine activated killer (LAK) ได้ด้วย

2.5.1.3 $CD4^-CD8^-$ ที ลิมโฟไซต์

ประชากรเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์ที่แสดงแอนติเจน $CD4^-CD8^-$ ซึ่งมีประมาณร้อยละ 5-30 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Saalmuller et al., 1989) อาจจะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น NK cells, Null cells, B cells เป็นต้น (Saalmuller et al., 1999) ปัจจุบันยังมีข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้ไม่มากนัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงการจำแนกประเภทของเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรโดยใช้แอนติเจนต่างๆ (Samsom et al., 2000)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

MARC-145 (African green monkey kidney cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University ประเทศอเมริกา

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Corning Incorporated, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด modified Eagle's medium (MEM) ที่เติม 10% fetal calf serum (GIBCO/BRL, USA) amphotericin B (GIBCO/BRL, USA) 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร penicillin G (GIBCO/BRL, USA) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin (GIBCO/BRL, USA) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (GIBCO/BRL, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS ย่อยเซลล์ด้วย trypsin versine (GIBCO/BRL, USA) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 นาน 2-3 นาที เพื่อแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงใหม่

3.2 ไวรัส

ในการทดลองใช้ไวรัสทั้งหมด 6 ชนิด คือ

3.2.1ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา คือ

3.2.1.1 01NP1 เป็นไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทย (Thanawongnuwech et al., 2004)

3.2.1.2 US vaccine (RespPRRS/Repro®; Boehringer Ingelheim) เป็นไวรัสวัคซีนได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1.2 SVI-25 เป็นไวรัสมาตรฐานได้รับความอนุเคราะห์จาก สพ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

3.2.2 ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป คือ

3.2.2.1 02SB3 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2.2 EU vaccine (AMERVAC-PRRS®; Laboratories Hipra ; V1) (Mateu et al., 2003) ได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2.3 I10 เป็นสายพันธุ์ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (Conzelmann et al., 1993) ได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสโดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 โดยใช้เชื้อไวรัสที่ความเข้มข้น 0.1 multiplicity of infection (moi) อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM (GIBCO/BRL, USA) ที่มี 2% fetal bovine serum ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และอบที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 นาน 4-5 วัน หลังจากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส และทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง เก็บเซลล์ใส่หลอดนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นไวรัสที่พร้อมใช้งาน

3.3 Virus titration และการย้อม Indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

3.3.1 นำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MARC-145 ที่ย่อยด้วย trypsin versine แล้ว ใส่ในเพลทพลาสติกชนิด 96 หลุมปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม และอบที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 จนได้เซลล์เป็นชั้นเดียวเต็มหลุม

3.3.2 เติมตัวอย่างไวรัสที่ต้องการตรวจ และอบที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 นาน 48 ชั่วโมง

3.3.3 สะบัดเอาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดทำการตรึงสภาพเซลล์ด้วย 4% ฟอร์มาลิน (เจือจางโดยใช้ 0.5% PBS Tween; PBST) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.3.4 สะบัดเพลทเอาฟอร์มาลีนออกให้หมด ล้างด้วย 0.5% PBST ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 3 ทิ้งไว้ 3 นาที

3.3.5 เติม anti-PRRS monoclonal antibody (เจือจาง 1:300 ด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% bovine serum albumin; BSA) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% PBST เช่นเดียวกับข้อ 4

3.3.6 เติม monoclonal anti-mouse IgG conjugate (DAKO, USA) (เจือจาง 1:300 ด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% PBST เช่นเดียวกับข้อ 4

3.3.7 เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรทุกหลุม ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง

3.3.8 สะบัดเพลทให้แห้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว

3.4 สัตว์ทดลอง

ก่อนทำการทดลอง experimental protocol ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

<u>การทดลองที่ 1</u>

สุกร 3 สายอายุ 3 สัปดาห์ เพศผู้ จากฟาร์มสุกรเอกชนที่ปลอดต่อโรคอหิวาต์สุกร โรคพิษสุนัขบ้าเทียม และให้ผลลบต่อการตรวจแอนติบอดีต่อโรคพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA แบ่งสุกรเป็น 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ขนาด 5 มิลลิลิตร ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$/ml) โดยการหยอดจมูก

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม ได้รับ mock infected MARC-145 lysate ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยการหยอดจมูกในวันเดียวกับการให้เชื้อไวรัสในกลุ่มที่ 1

เก็บตัวอย่างเลือดสุกรหลังจากได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา 3 สัปดาห์ พร้อมกับกลุ่มควบคุมเพื่อนำมาศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ เมื่อกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3

<u>การทดลองที่ 2 3 และ 4</u>

1. สุกรหย่านมอายุ 3 สัปดาห์ เพศผู้ จากฟาร์มสุกรเอกชนที่ปลอดต่อโรคอหิวาต์สุกร โรคพิษสุนัขบ้าเทียม และให้ผลลบต่อการตรวจแอนติบอดีต่อโรคพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA แบ่งสุกรเป็น 5 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ mock infected MARC-145 lysate ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยการหยอดจมูก ในวันที่ 42 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ขนาด 5 มิลลิลิตร ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$/ml) โดยการหยอดจมูก ในวันที่ 42 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 3 ให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ขนาด 5 มิลลิลิตร ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$/ml) โดยการหยอดจมูก ในวันที่ 42 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนเชื้อเป็นป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (V1) เข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 2 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง และให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ขนาด 5 มิลลิลิตร ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$/ml) โดยการหยอดจมูก ในวันที่ 42 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 5 ให้วัคซีนเชื้อเป็นป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (V1) เข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 2 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 และ 21 ของการทดลอง และให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ขนาด 5 มิลลิลิตร ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$/ml) โดยการหยอดจมูก ในวันที่ 42 ของการทดลอง

2. เก็บตัวอย่างเลือดสุกรดังนี้

2.1 การทดลองที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดสุกรกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 หลังจากให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) 3 สัปดาห์

2.2 การทดลองที่ 3 เก็บตัวอย่างเลือดสุกรกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 4 หลังจากทำวัคซีนครั้งแรก 3 สัปดาห์

2.3 การทดลองที่ 4 เก็บตัวอย่างเลือดสุกรทุกกลุ่มการทดลองในวันที่ 42 45 48 51 54 60 66 และ 75 ของการทดลอง

ตารางที่ 2 สรุปการแบ่งกลุ่มสุกรที่ใช้ในการทดลองที่ 2 3 และ 4

กลุ่มที่	วัคซีน (V1) D0, D21	PRRSV (01NP1) D42	PRRSV (02SB3) D42
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	+	-	+
5	+	+	-

3.5 สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง

ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองติดเชื้อ ชั้น 3 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีระบบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ ด้วยระบบประตูล็อค 2 ชั้น ร่วมกับระบบระบายอากาศเข้าออก ด้วยพัดลมดูดอากาศ และทำการปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศอัตโนมัติ

ในขณะทำการทดลองสุกรจะได้รับการให้ น้ำ อาหาร และกำจัดสิ่งปฏิกูล 2 ครั้งต่อวัน โดยในแต่ละครั้งของการเข้าเลี้ยง ผู้เลี้ยงสุกรจะต้องทำการ อาบน้ำ สระผม เปลี่ยนชุด ก่อนและหลังเข้าปฏิบัติงาน เมื่อเข้าสู่ห้องทดลองแต่ละห้องจะต้องทำการสวม หน้ากาก หมวก ถุงมือ และชุดปลอดเชื้อแบบใช้แล้วทิ้งก่อนปฏิบัติงาน และพนักงานเลี้ยงสุกรจะรับผิดชอบการเลี้ยงสุกรแต่ละห้องแยกออกจากกัน

3.6 วิธีการเก็บตัวอย่างและแยกเม็ดเลือดขาว

3.6.1 เก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากการทดลองข้างต้น โดยเจาะเลือดสุกรด้วยเข็มเบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว จากเส้นเลือด jugular vien ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อครั้ง เก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวที่มี heparin sodium (Vaccutte®,Greiner Bio-one, Austria)

3.6.2 นำเลือดมาปั่นแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.6.2.1 เจือจางเลือดด้วย phostphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 จากทำการ overley เลือดบนสารแยกเม็ดเลือด Isoprep® (Robbins Scientific Cooperation, USA) ปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.6.2.1 ทำการดูดเอาเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ใส่ในหลอด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร ล้างด้วย PBS โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.6.2.2 เก็บตะกอนของเม็ดเลือดขาวมาเติมน้ำเพื่อทำลายเม็ดเลือดแดง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และตามด้วย PBS ความเข้มข้น 2 เท่าทันที ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.6.2.4 ทำการล้างอีกครั้งมาเช่นเดียวกับข้อ 2

3.6.2.5 หลังจากได้ PBMC เก็บเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (GIBCO/BRL, USA) ที่มี 10% calf serum (Starrate, Australia) L-glutamine 2 มิลลิโมล (GIBCO/BRL, USA) non-essential amino-acid 100 ไมโครโมล (GIBCO/BRL, USA) sodium pyruvate 1 มิลลิโมล (GIBCO/BRL, USA) 2-mercaptoethanol 50 ไมโครลิตร (Sigma Chemical Co., USA) และ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของ penicillin G 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ของ Streptomycin และ 0.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของ amphotericin B (GIBCO/BRL,USA)

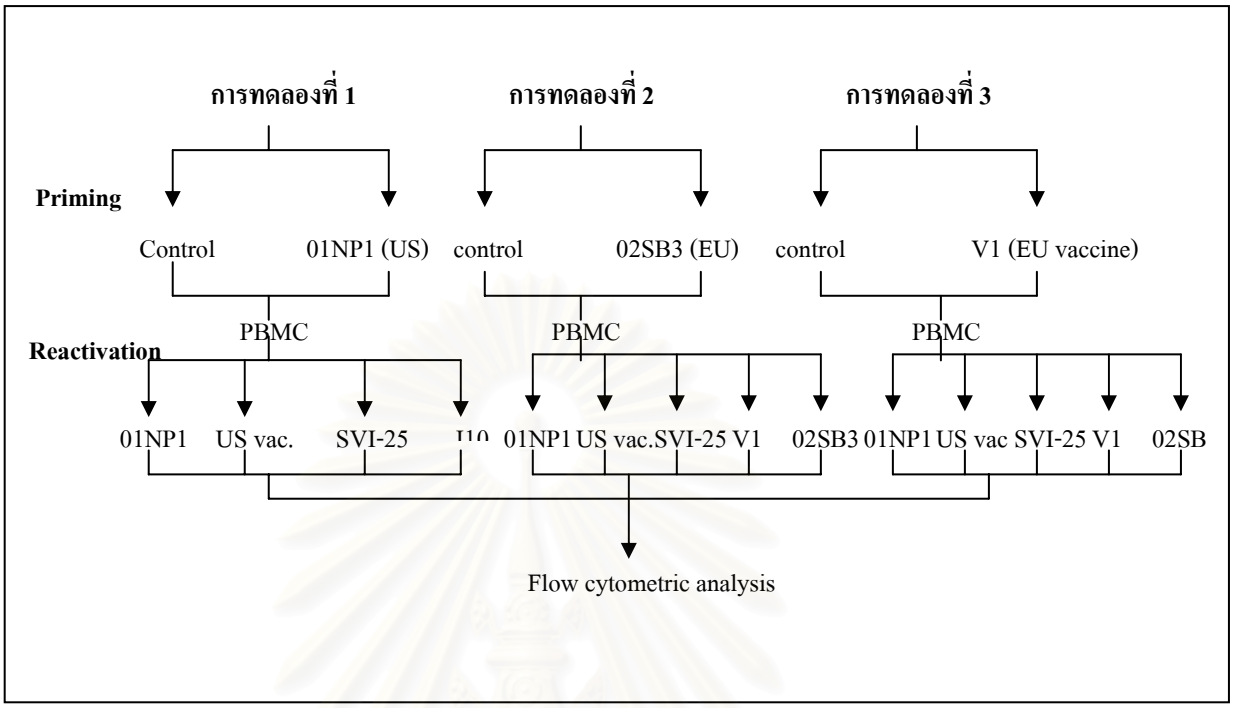
3.6.2.6 นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการย้อม trypan blue (GIBCO/BRL,USA)

3.6.2.7 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในเพลทพลาสติกชนิด 24 หลุม โดยใช้เซลล์ปริมาณ 6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม

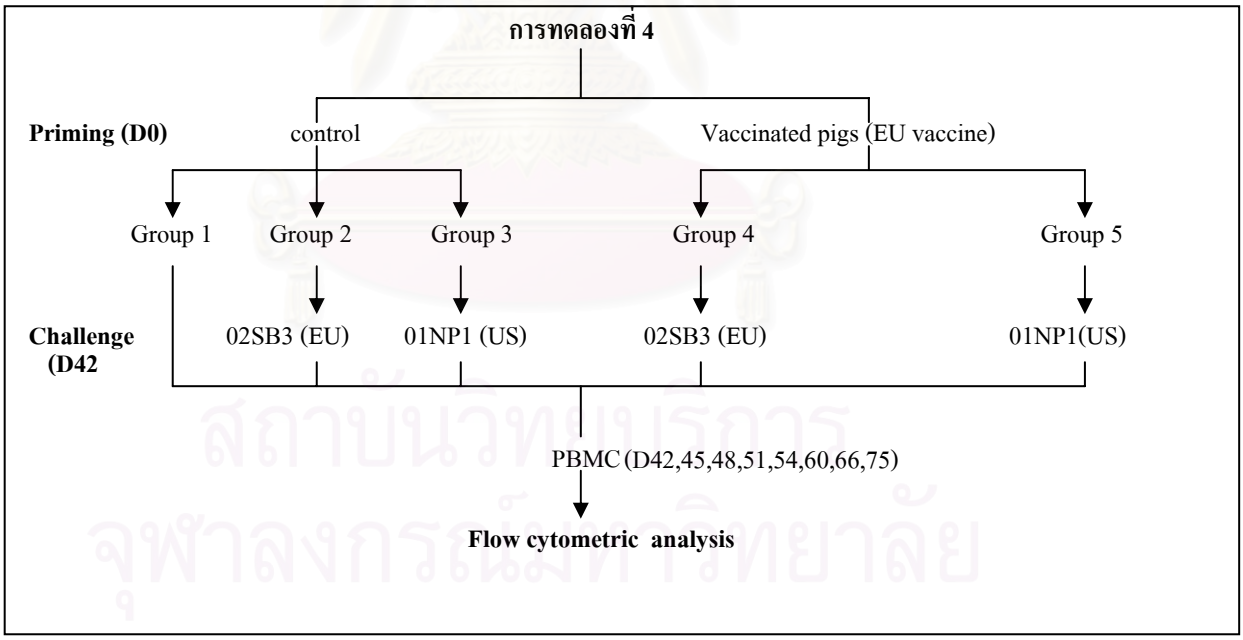
3.6.3 กระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ความเข้มข้น 0.01 moi ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 ยกเว้นการทดลองที่ 4 นำเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ไปศึกษาต่อในขั้นถัดไป

3.6.4 ศึกษาอัตราส่วนกลุ่มประชากรของเซลล์เม็ดเลือดขาว ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ และ $CD4^-CD8^-$) และย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 และ IFN-γ ด้วยวิธี intracellular cytokine staining ตรวจวัดและวิเคราะห์ผลด้วย FACSCAN cytometer (BD Bioscience, USA)

***In vitro* activation**



***In vivo* activation**



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3 แสดงแผนผังสรุปวิธีการทดลอง

3.7 แอนติบอดี

3.7.1 anti-swine CD8-PE-Cy5 conjugated mAb (76-2-11, IgG_{2a}) anti-swine CD25-PE conjuagted mAb (PGBL25A, Ig_{G1}) และ anti-swine γδTCR-FITC conjugate mAb (PGBL 22A-F1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. J. A. Roth จาก Iowa States University

3.7.2 anti-swine CD4-FITC conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}) anti-swine CD4-PE conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}) และ Biotinylated anti-swine IFN-γ mAb (P2C11, IgG_{2a}) จากบริษัท BD Biosciences (USA)

3.7.3 streptavidin conjugated FITC จากบริษัท Serotec (UK)

3.7.4 anti-swine IL-10 mAb (954A4C437B1) จากบริษัท Biosource (USA)

3.7.5 goat anti-mouse IgG_1 FITC conjugate จากบริษัท Serotec (UK)

3.8 ขั้นตอนการย้อมผิวเซลล์ (surface staining)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

3.8.1 ทำการเก็บเซลล์และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง และล้างด้วย PBS ที่มี sodium azide 0.1% และ 5% bovine serum albumin (FACS buffer; FB)

3.8.2 ใช้เม็ดเลือดขาวประมาณ $2x10^6$ เซลล์ ใส่ในเพลทพลาสติกชนิด 96 หลุม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.8.3 เติม mAb ที่เจือจางในปริมาณที่เหมาะสม (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE-Cy-5 และ anti-CD25-PE หรือ anti-CD8-PE-Cy-5 anti-γδTCR-FITC และ anti-CD25-PE) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ในที่มืด นำไปปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย FACS buffer ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อครั้ง

3.8.4 fix เซลล์ด้วย 2% formaldehyde ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และวิเคราะห์ผลด้วย Facscan cytometer (BD Biosciences, USA)

3.9 ขั้นตอนการย้อมภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining)

ประยุกต์จากวิธีการตรวจของ Pala และคณะ ในปี 2000 โดยมีขั้นตอนดังนี้

เพื่อตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ ก่อนการเก็บเซลล์ 12 ชั่วโมง ทำการเติมสารยับยั้งการหลั่งสารออกนอกเซลล์ monensin (GolgiStop™; BD Biosciences, USA) และ incubate จนครบ 40 ชั่วโมงในการทดลองที่ 1 2 และ 3

สำหรับการทดลองที่ 4 เติมสารยับยั้งการหลั่งสารออกนอกเซลล์ monensin ลงใน PBMC และทำการ incubate จนครบ 4 ชั่วโมงก่อนทำการตรวจ จากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนต่อไปนี้

เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวและทำการย้อมผิวเซลล์ (CD4 และ CD8) ตามขั้นตอนย้อมผิวเซลล์ข้างต้นหลังจากล้างครั้งสุดท้ายทำการ fix และ permeabilize เซลล์ด้วยสาร Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 3 ชั่วโมง

3.9.1 ย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ชนิด IFN-γ โดยใช้ biotinylated anti-swine IFN-γ mAb หรือ IL-10 ใช้ anti-swine IL-10 mAb ที่เจือจางใน Perm wash (BD Biosciences) ในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.9.2 นำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย Perm/wash ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง

3.9.3 ย้อมด้วย streptavidin-FITC conjugate สำหรับ IFN-γ หรือ goat anti-mouse IgG_1 – FITC Conjugated mAb สำหรับ IL-10 ที่เจือจางใน Perm wash (BD Biosciences, USA) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.9.4 ล้างด้วย Perm wash 3 ครั้ง และขั้นสุดท้าย fix เซลล์ด้วย 2% formaldehyde วิเคราะห์ผลด้วย Facscan cytometer (BD Biosciences, USA)

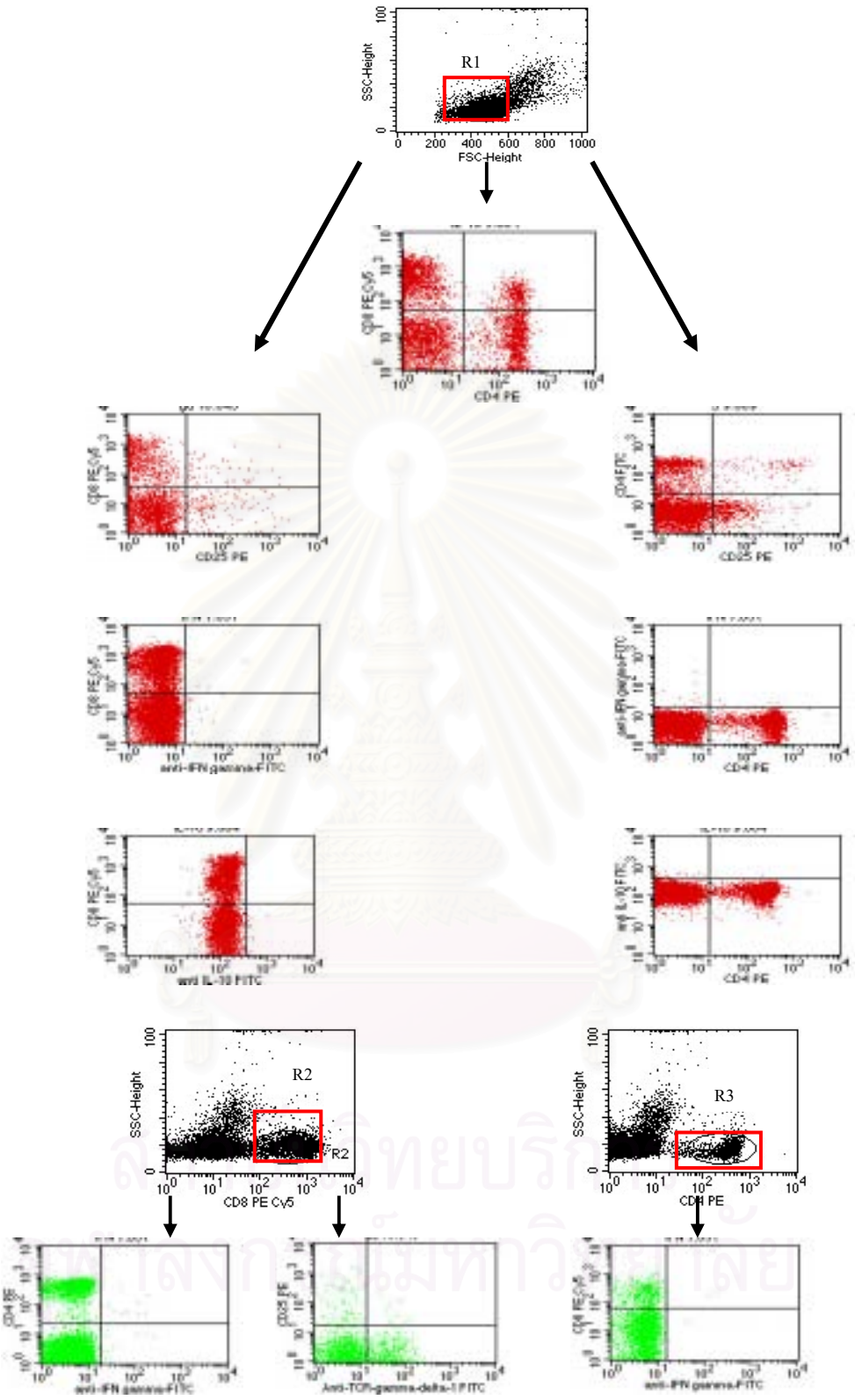
3.10 วิธีการเลือกศึกษาประชากรเซลล์

การศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์และประชากรย่อยที่สร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์ ทำการวิเคราะห์จากเซลล์จำนวน 10,000 และ 100,000 เซลล์ ตามลำดับ โดยการเลือกศึกษาประชากรเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์จะพิจารณาจากขนาดเซลล์ (FSC) และความหนาแน่นภายในเซลล์ (SSC) ใน gate 1 (R1) ซึ่งพบว่าในกลุ่มประชากรที่เลือกมาศึกษานั้นประกอบด้วบเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์เป็นส่วนใหญ่และมีประชากรเซลล์ชนิดโมโนไซต์ ($SWC3^+$)รวมอยู่ประมาณร้อยละ 3 ของประชากรทั้งหมด (ไม่แสดงข้อมูล)

การศึกษาชนิดประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์ ($CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ และ $CD4^+CD8^+$) จะพิจารณาจากร้อยละของประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+$ และ/หรือ $CD8^+$ จาก R1 สำหรับการศึกษาแอนติเจนสีที่สาม (triple positive) จะเลือกศึกษาจากประชากรเซลล์จากความหนาแน่นภายในเซลล์และ $CD8^+$ (gate 2; R2) หรือ $CD4^+$ (gate 3; R3) โดยพิจารณาประชากรเซลล์ที่แสดง $CD4^+$ หรือ $CD8^+$ และสีที่สาม คือ CD25 หรือไซโตไคน์ (IFN-γ หรือ IL-10) เนื่องจากประชากรเซลล์ชนิด $CD8^+$ ของสุกรมี 2 ชนิด คือ $CD8^{low}$ และ $CD8^{hi}$ (Zuckermann, 1999) ดังนั้นการศึกษาประชากรเซลล์ที่แสดง $CD4^+CD8^+CD25^+$ หรือ $CD4^+CD8^+cytokine^+$ จึงเลือกพิจารณาจาก R3 ดังแสดงในรูปที่ 4

3.11 การวิเคราะห์ผลและสถิติที่ใช้

วิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณการสร้างไซโตไคน์ระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี ANOVA โปรแกรม SPSS version 10.0 (Chicago, USA) โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ $p<0.05$



ภาพที่ 4 แสดงตัวอย่างการเลือกประชากรเซลล์ในการศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์ และการสร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

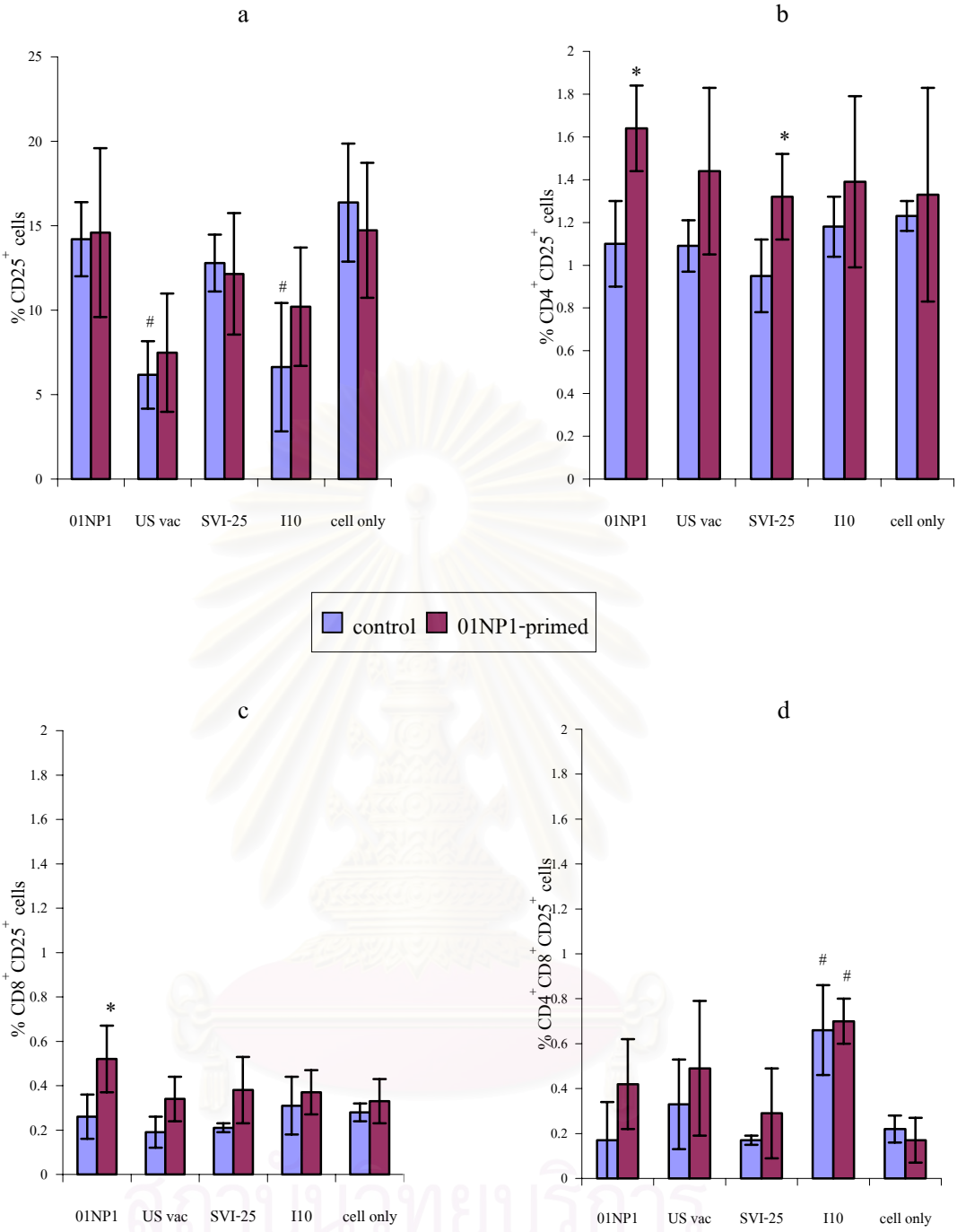
4.1 การทดลองที่ 1

ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ของสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดในห้องปฏิบัติการ

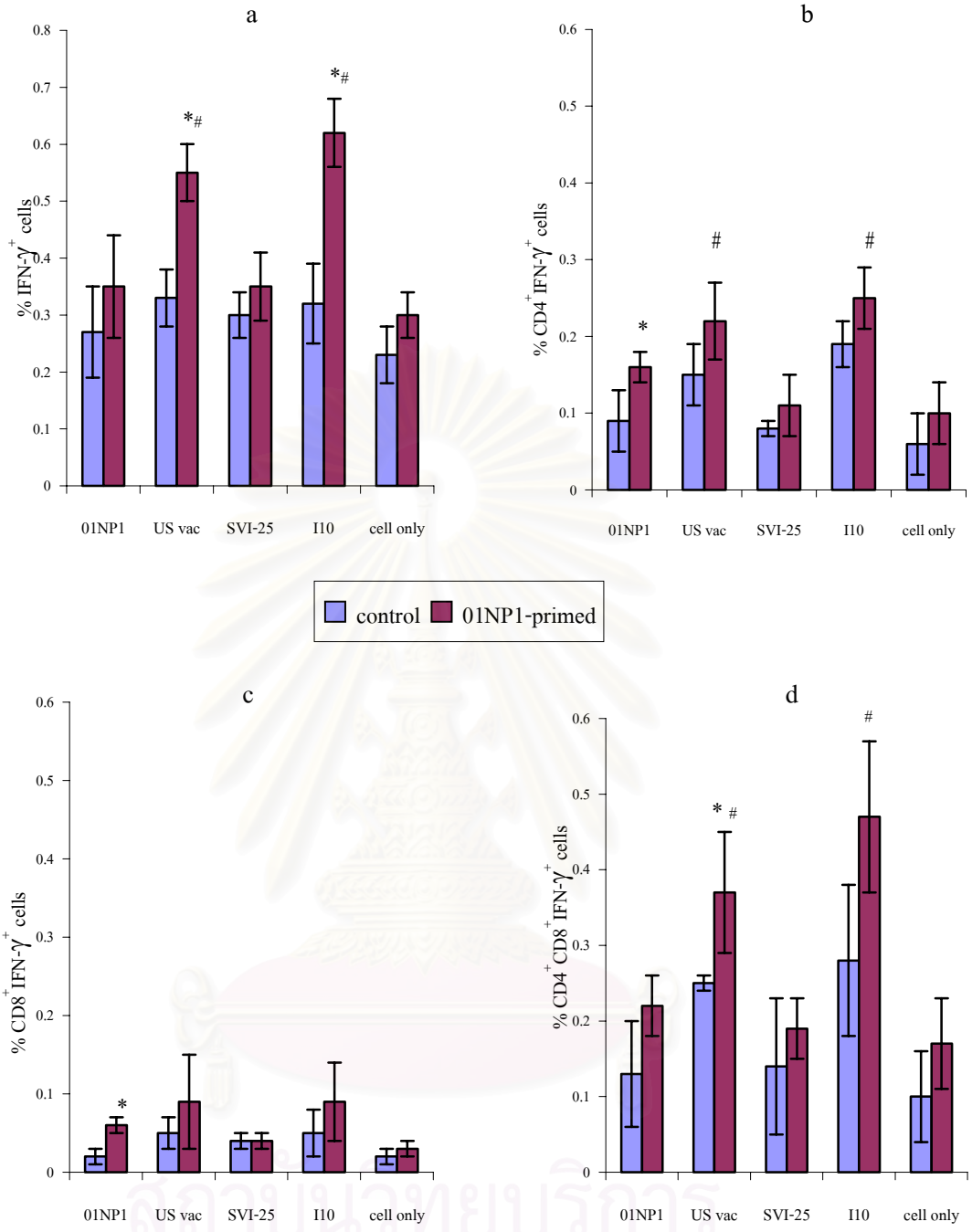
หลังจากทำการให้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) โดยการหยอดจมูก พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อแสดงอาการซึม หายใจลำบาก หอบ เยื่อตาขาวอักเสบ ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ตลอดการทดลอง

ภายหลังทำการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรด้วยเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ในสุกรกลุ่มควบคุมกับสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน (ภาพที่ 5a) จากการศึกษาประชากรเซลล์ที่แสดง CD25 พบว่าเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^-$ เป็นประชากรหลักที่แสดง CD25 ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน โดยกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ SVI-25 จะพบระดับร้อยละของเซลล์ชนิด $CD4^+CD25^+$ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 5b-d)

สำหรับการศึกษาปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 มาก่อนและกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ I10 และ US vaccine สร้าง IFN-γ ได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสูงกว่าการกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ SVI-25 ในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ SVI-25 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (รูปที่ 6a) ประชากรเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนเป็นชนิด $CD4^+CD8^+$ ในขณะที่กลุ่มควบคุมประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+$ และ $CD4^+CD8^+$ เป็นประชากรที่สร้าง IFN-γ (ภาพที่ 6b-d)



ภาพที่ 5 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อยCD4$^+$ (b) CD8$^+$(c) CD4$^+$CD8$^+$ (d) ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) (01NP1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่แสดง CD25 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only

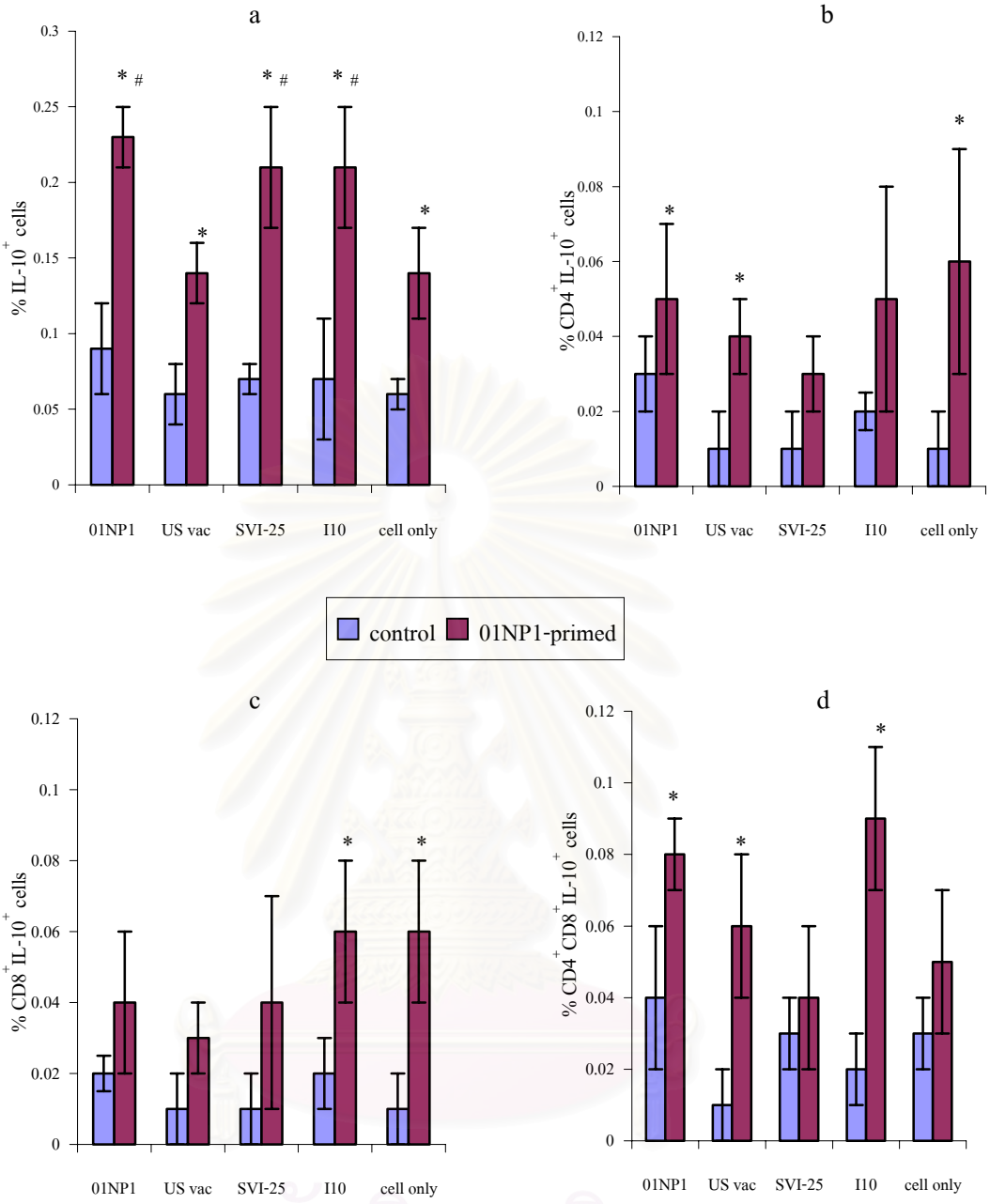


ภาพที่ 6 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) (01NP1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ PBMC ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ มีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่สร้าง IL-10 ในระดับที่สูงกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์นั้นๆในกลุ่มควบคุม เมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนด้วยกันพบว่าการกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ US vaccine ไม่มีความแตกต่างในระดับเซลล์ที่สร้าง IL-10 กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ (01NP1 SVI-25 และ I10) เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-10 ในระดับที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 7a) โดยพบว่าประชากรเซลล์ทุกชนิด ($CD4^+$, $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$) สามารถสร้าง IL-10 ได้ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน (ภาพที่ 7b-d)

โดยสรุปจากผลการศึกษาการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกามาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ไม่ว่าจะกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใดก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ PBMC ของสุกรควบคุม จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าเซลล์จากสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและเชื้อไวรัสต่างกลุ่มสายพันธุ์มีการสร้าง IFN-γ ได้ดี โดยประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ เป็นประชากรหลักที่สร้าง สำหรับการสร้าง IL-10 พบว่าการกระตุ้นเซลล์จากสุกรที่ได้รับเชื้อมาก่อนไม่ว่าจะด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใดก็ตาม สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างไซโตไคน์ชนิด IL-10 ได้สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม จากประชากรเซลล์ทุกชนิดที่ทำการศึกษา นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ชนิดรุนแรงสามารถเพิ่มการสร้าง IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) (01NP1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IL-10 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only

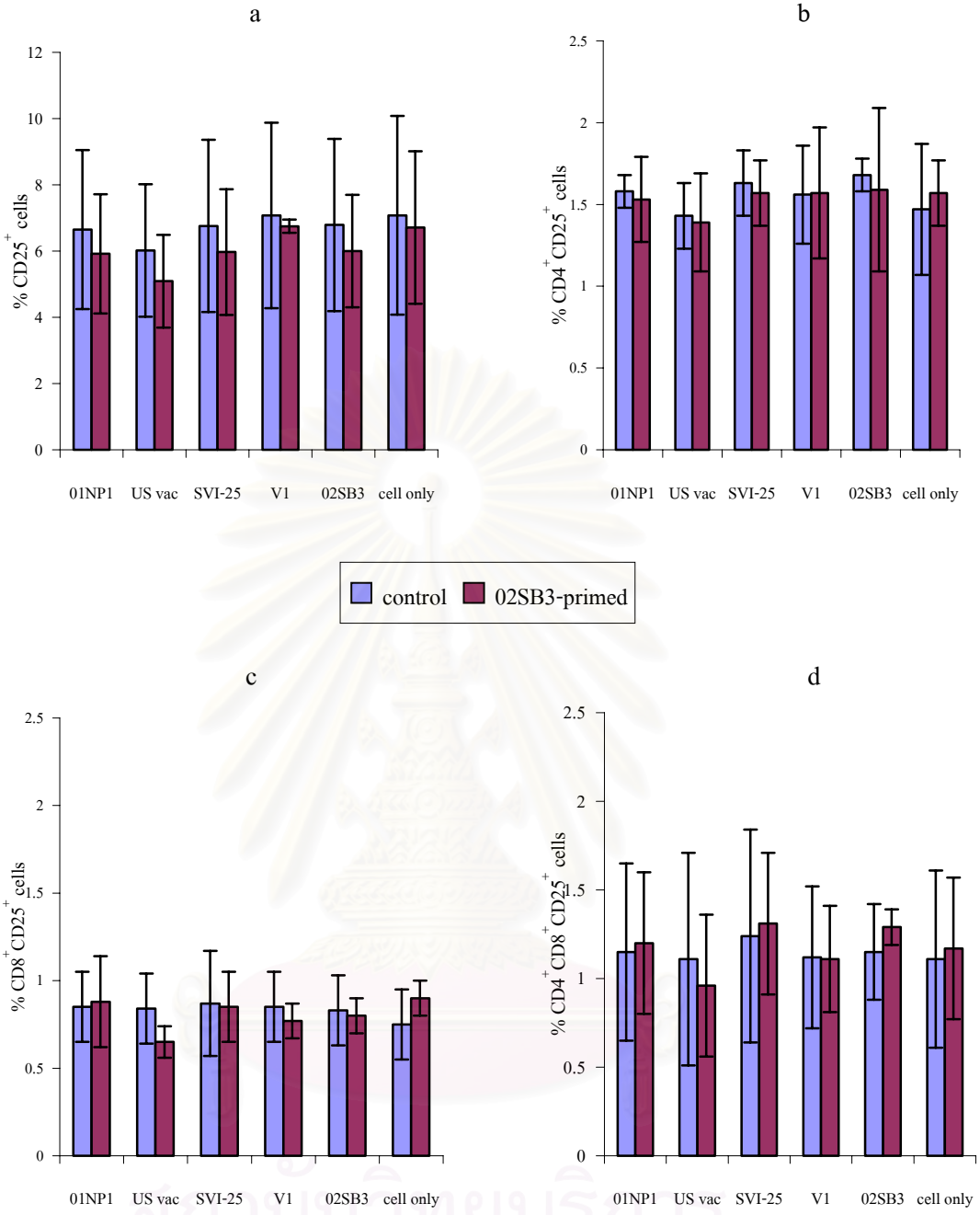
4.2 <u>การทดลองที่ 2</u>

ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ของสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป (02SB3) และกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดในห้องปฏิบัติการ

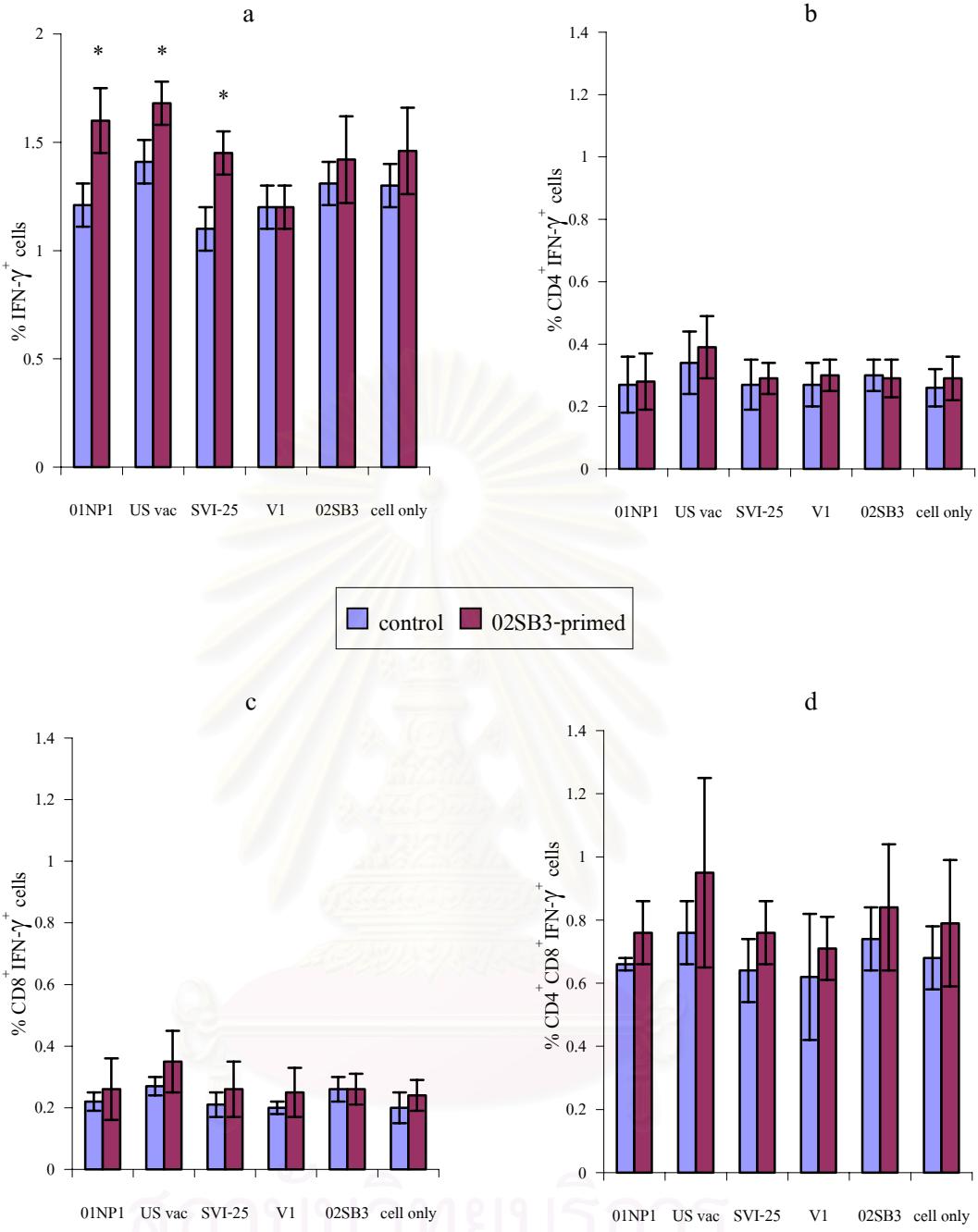
ภายหลังจากสุกรได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) 3 สัปดาห์ สุกรไม่แสดงอาการป่วยใดๆ ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสและกลุ่มควบคุม แต่สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในกระแสเลือดหลังจากได้รับเชื้อ 6 วัน และสามารถตรวจพบรอยโรคที่ปอดทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาได้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

เมื่อนำเซลล์ PBMC มากระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดในห้องปฏิบัติการ ศึกษาปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนมีปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ในเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน (ภาพที่ 8a) เมื่อพิจารณาประชากรย่อยของเซลล์ที่แสดง CD25 ในแต่ละกลุ่ม พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนมีประชากรเซลล์ที่แสดง CD25 ส่วนใหญ่เป็น $CD4^+$ และ $CD4^+CD8^+$ โดยพบว่าในทุกกลุ่มมีปริมาณเซลล์ที่เป็นชนิด $CD4^+$ ในระดับที่สูงกว่าเซลล์ชนิด $CD8^+$ อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างกับเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ และไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบชนิดของประชากรเซลล์ในแต่ละชนิดระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน (ภาพที่ 8b-d)

จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในกลุ่มควบคุม พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SVI-25 มีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine และ 02SB3 และยังพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ V1 เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IFN-γ ต่ำกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสจากแต่ละสายพันธุ์เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IFN-γ ไม่แตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น สำหรับกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน พบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 US vaccine และ SVI-25 เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IFN-γ สูงกว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ V1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 02SB3 และเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 US vaccine และ SVI-25 มีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 9a) เมื่อพิจารณาประชากรเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าเป็นชนิด $CD4^+CD8^+$ ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อมาก่อน (ภาพที่ 9b-d)



ภาพที่ 8 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) (02SB3-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่แสดง CD25 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม

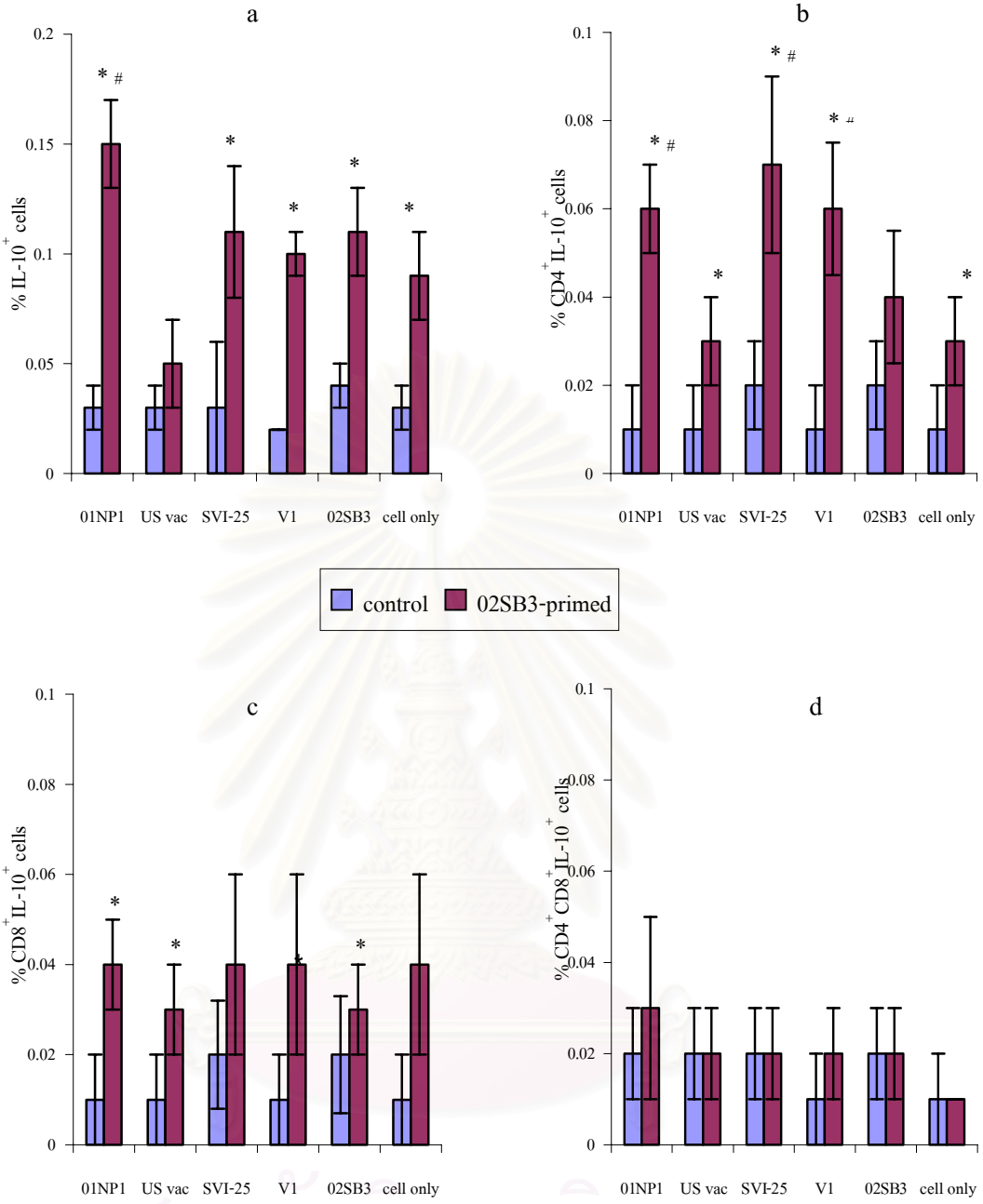


ภาพที่ 9 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) (02SB3-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สำหรับปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่กระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine มีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ต่ำกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และการกระตุ้นเซลล์ด้วยไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 เหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-10 สูงกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยไวรัสสายพันธุ์ US vaccine V1 และเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้พบว่าเซลล์จากกลุ่มทดลองเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสทุกๆ สายพันธุ์ ยกเว้น US vaccine รวมทั้งเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น มีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10a) เมื่อพิจารณาประชากรเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน พบว่าส่วนใหญ่เป็นเซลล์ชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ (ภาพที่ 10b-d)

โดยสรุปจากการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ไม่ว่าจะกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใดก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าเมื่อนำเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนมาทำการกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสจากต่างกลุ่มสายพันธุ์จะสร้าง IFN-γ ได้สูงขึ้น โดย IFN-γ ส่วนใหญ่สร้างจากประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ สำหรับการศึกษาการสร้าง IL-10 พบว่า เซลล์จากสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสจากทุกสายพันธุ์ ยกเว้นไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา มีการสร้าง IL-10 ได้สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+$ เป็นเซลล์หลักที่สร้างไซโตไคน์ โดยไวรัสสายพันธุ์ชนิดรุนแรงกระตุ้นเซลล์ CD4+ จากสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 02SB3 มาก่อนมีการสร้าง IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) (02SB3-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IL-10 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only

4.3 <u>การทดลองที่ 3</u>

ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป (V1) และกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดในห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำเซลล์ PBMC ของสุกรภายหลังได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป 3 สัปดาห์ มากระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดในห้องปฏิบัติการ พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาก่อนมีปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาก่อน (ภาพที่ 11a) เมื่อพิจารณาชนิดประชากรย่อยของเซลล์ในแต่ละกลุ่มพบว่าประชากรเซลล์ที่แสดง CD25 เป็นเซลล์ชนิด $CD4^+$ ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีน (ภาพที่ 11b-d)

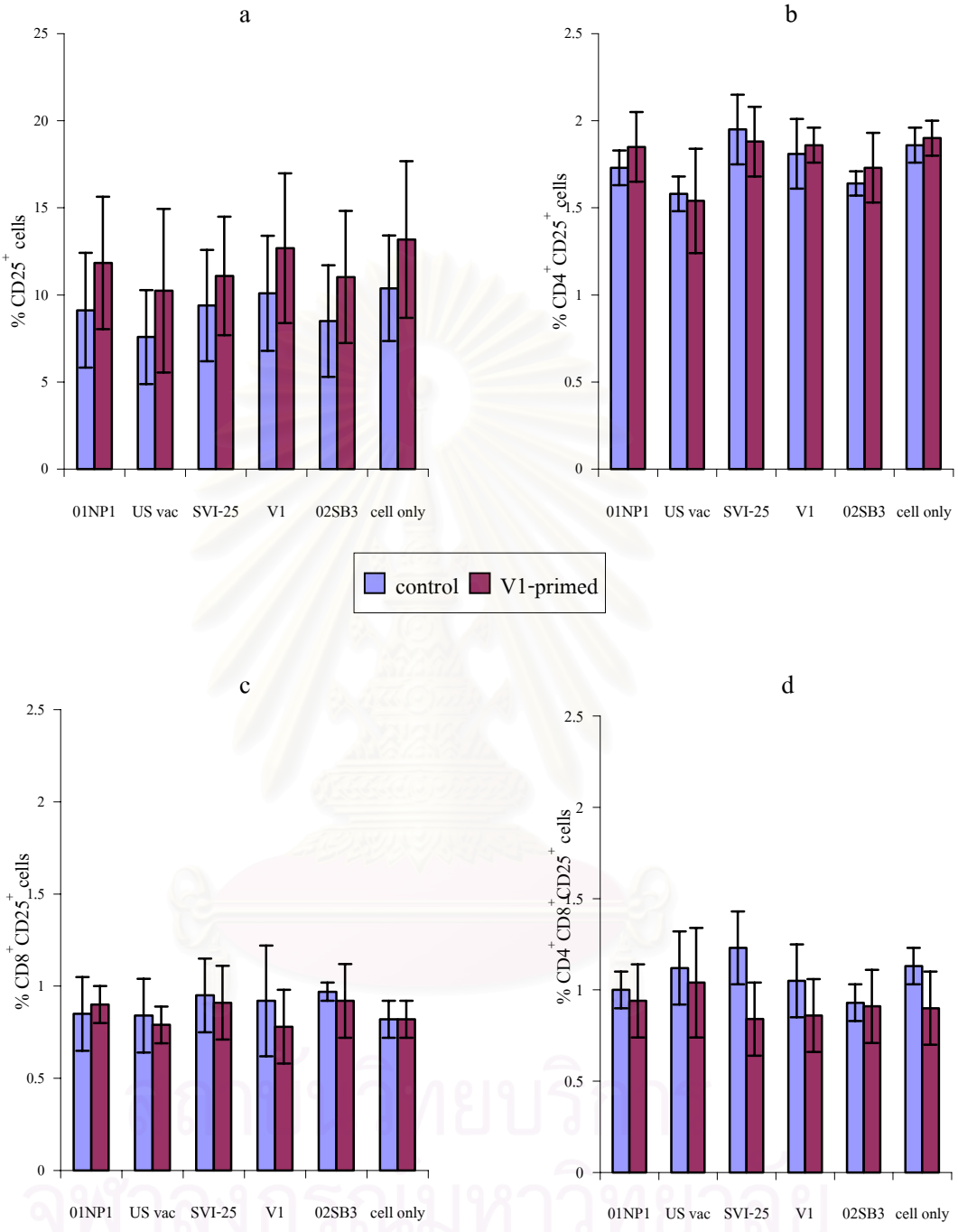
เมื่อนำเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมมากระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย US vaccine สร้าง IFN-γ ในระดับที่สูงกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SVI-25 V1 และเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สำหรับการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดิมเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IFN-γ ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นหรือเมื่อกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ SVI-25 แต่พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในระดับที่ต่ำกว่าการกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ US vaccine และ 02SB3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาก่อน พบว่าการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 และ US vaccine จะมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ภาพที่ 12a) จากการศึกษาประชากรเซลล์พบว่าเซลล์ทุกชนิดเป็นเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีน (ภาพที่ 12b-d)

สำหรับการสร้าง IL-10 พบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมที่นำมากระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine มีการสร้าง IL-10 สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SVI-25 V1 02SB3 และ ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สำหรับเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่ามีการสร้าง IL-10 ในระดับที่ต่ำกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเช่นกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสจากทุกสายพันธุ์มีการสร้าง IL-10 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยพบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ US vaccine และ SVI-25 มีการสร้าง IL-10 สูงกว่าการกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ V1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

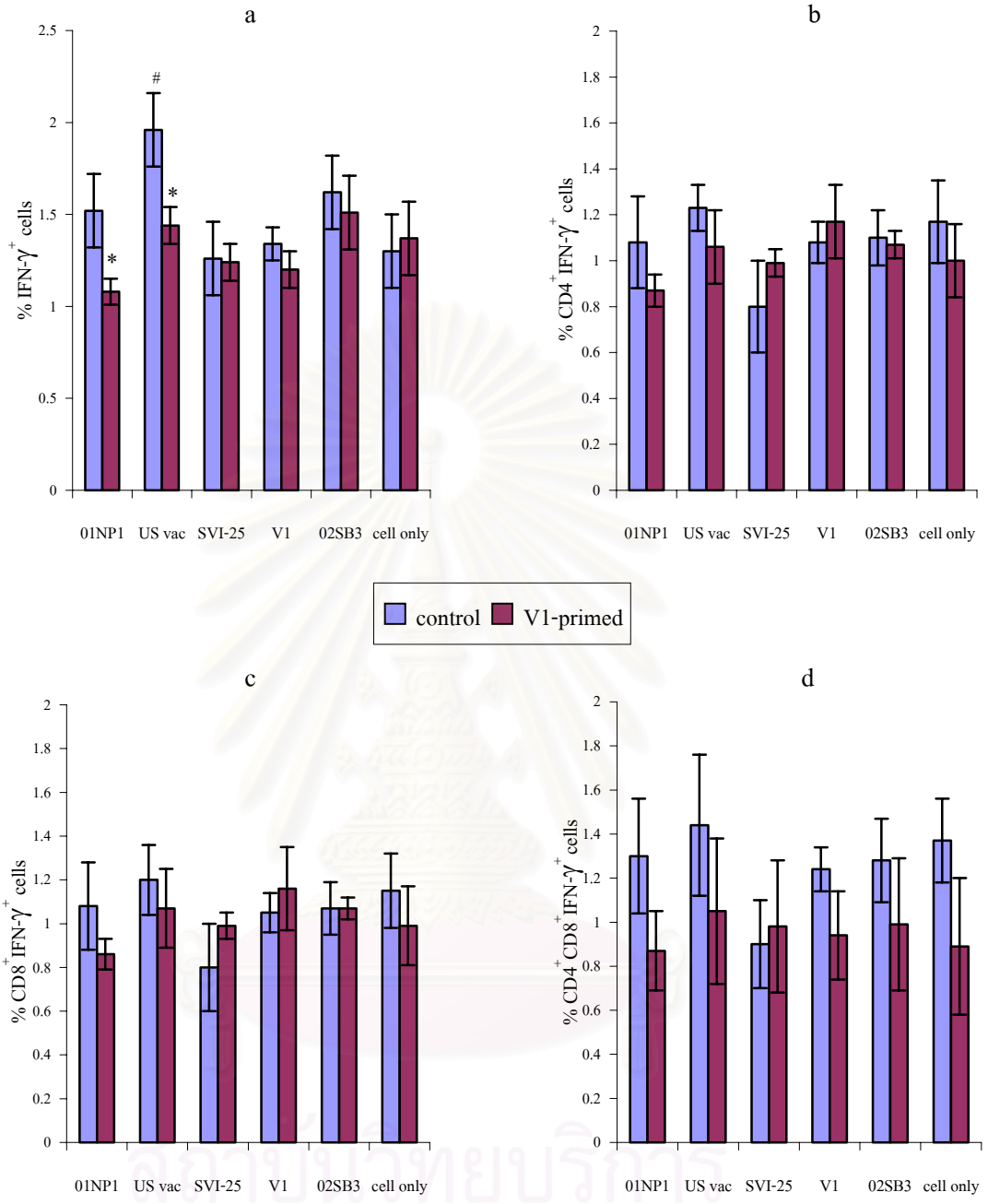
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาก่อน พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine และ V1 ของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-10 น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ภาพที่ 13a) โดยพบว่าประชากรย่อยของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ส่วนใหญ่เป็นประชากรชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ และเป็นที่น่าสนใจว่าในกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ US vaccine และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นของสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนมีปริมาณเซลล์ชนิด $CD4^+IL\text{-}10^+$ และ $CD8^+IL\text{-}10^+$ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนสายพันธุ์ V1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมมีปริมาณร้อยละของเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ ที่สร้าง IL-10 ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่การกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ SVI-25 ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีระดับของ $CD4^+CD8^+$ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 13b-d)

โดยสรุปจากการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ไม่ว่าจะกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใดก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสวัคซีนมาก่อนและทำการกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 มีการสร้าง IFN-γ ลดลง สำหรับการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 พบว่า การได้รับเชื้อไวรัสวัคซีนสายพันธุ์ V1 มาก่อนไม่เพิ่มการสร้าง IL-10 (เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยไวรัสทุกสายพันธุ์สามารถเพิ่มการสร้าง IL-10 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์ PBMC ของสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสวัคซีนสายพันธุ์ V1 มาก่อน (เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น) โดย IL-10 ส่วนใหญ่สร้างจากประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ เป็นหลัก

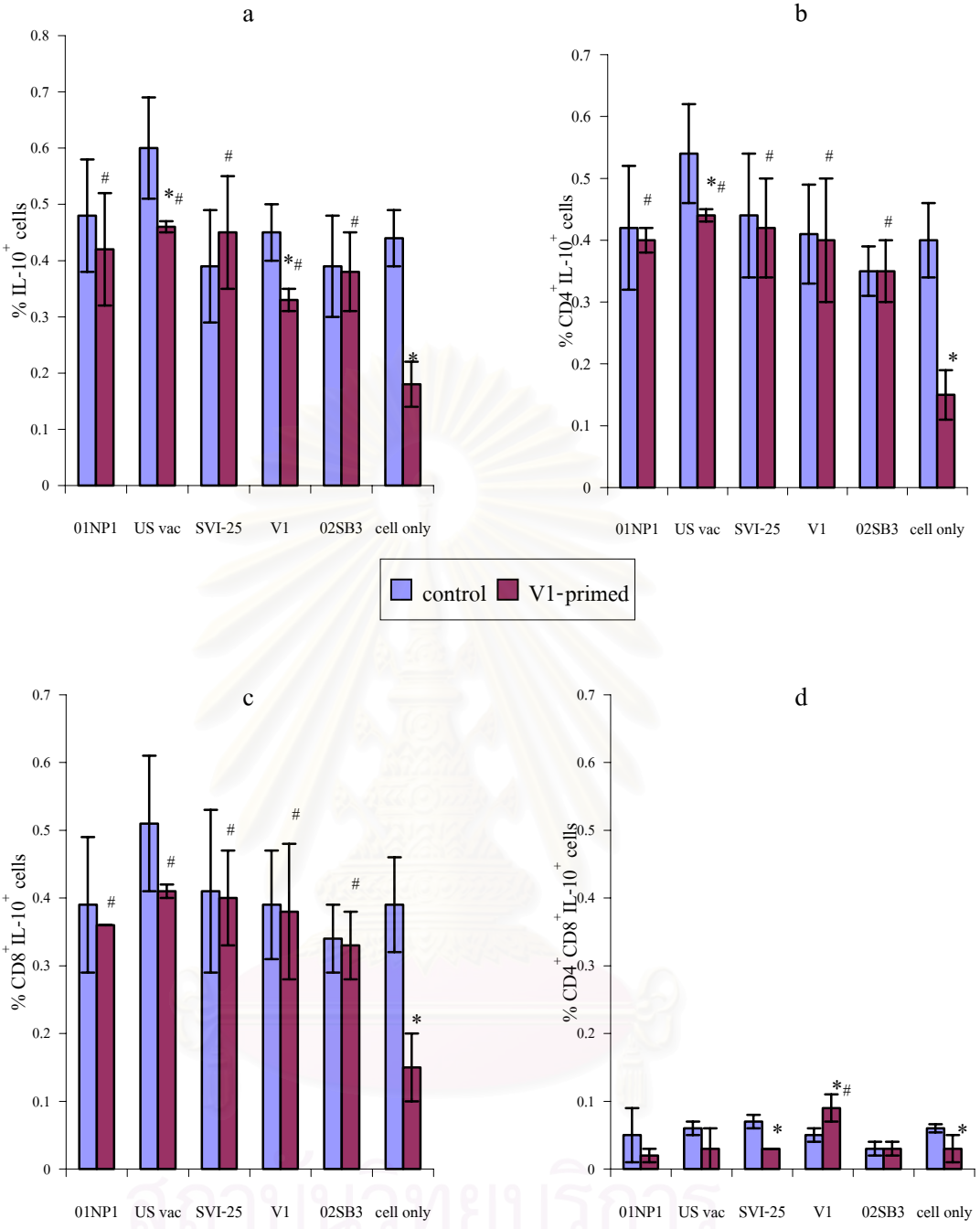
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่แสดง CD25 จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (V1) (V1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับวัคซีน 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่แสดง CD25 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม



ภาพที่ 12 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (V1) (V1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับวัคซีน 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only



ภาพที่ 13 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ทั้งหมด (a) และกลุ่มประชากรย่อย $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (V1) (V1-primed) และสุกรควบคุม (control) ภายหลังจากได้รับวัคซีน 3 สัปดาห์ นำเซลล์ PBMC มากระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.01 moi เป็นเวลา 40 ชั่วโมง กราฟแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของเซลล์ที่สร้าง IL-10 จากสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม # มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ cell only

ตารางที่ 3 แสดงสรุปผลการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

re-activation / primed	virulent US genotype		attenuated US genotype	virulent EU genotype		attenuated EU genotype	cell only
	01NP1	SVI-25	US vaccine	I10	02SB3	V1	
virulent US genotype (01NP1)	–	–	↑	–	↑	**ND**	–
virulent EU genotype (02SB3)	↑	↑	↑	**ND**	–	–	–
attenuated EU genotype (V1)	↓	–	↓	**ND**	–	–	–

หมายเหตุ

— หมายถึง ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุมไม่เกิน 2 เท่า

↑↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุม 2-2.5 เท่า

↑↑↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุมมากกว่า 2.5 เท่า

↓ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงสรุปผลการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

re-activation / primed	virulent US genotype		attenuated US genotype	virulent EU genotype		attenuated EU genotype	cell only
	01NP1	SVI-25	US vaccine	I10	02SB3	V1	
virulent US genotype (01NP1)	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	**ND**	**ND**	↑↑
virulent EU genotype (02SB3)	↑↑	↑↑↑	–	**ND**	↑↑	↑↑	↑↑
attenuated EU genotype (V1)	–	–	↓	**ND**	–	↓	↓↓

หมายเหตุ

— หมายถึง ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุมไม่เกิน 2 เท่า

↑↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุม 2-2.5 เท่า

↑↑↑ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มควบคุมมากกว่า 2.5 เท่า

↓ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมไม่เกิน 2 เท่า

↓↓ หมายถึง ปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมมากกว่า 2 เท่า

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 <u>การทดลองที่ 4</u>

ลักษณะการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป (V1) และกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) หรือ สายพันธุ์ยุโรป (02SB3)

หลังจากที่สุกรอายุ 3 สัปดาห์ ได้รับวัคซีนไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปไม่พบสุกรที่แสดงอาการไข้หรือมีปัญหาระบบทางเดินหายใจทั้งจากการได้รับวัคซีนครั้งแรกและครั้งที่สอง เมื่อให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) หรือ กลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) เมื่ออายุ 9 สัปดาห์ หลังจากการได้รับวัคซีนครั้งที่ 2 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนไม่แสดงอาการป่วยใดๆ เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสทุกกลุ่มสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้หลังจากได้รับเชื้อ 3 วันและอยู่นานถึง 18 วัน และสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสในช่วง 6 ถึง 12 วัน หลังจากได้รับเชื้อ นอกจากนี้พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาจะมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงหลังจากได้รับเชื้อไวรัสอีกด้วย

เมื่อนำเซลล์ PBMC มาศึกษาปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีระดับเซลล์ที่แสดง CD25 ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระดับเซลล์ที่แสดง CD25 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนพบว่า สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปชนิดรุนแรงอย่างเดียวมีปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปในวันที่ 12 หลังได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในขณะที่สุกรได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาชนิดรุนแรงหลังจากได้รับวัคซีนจะพบปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 สูงกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนในวันที่ 18 หลังจากได้รับเชื้อ (ภาพที่ 14)

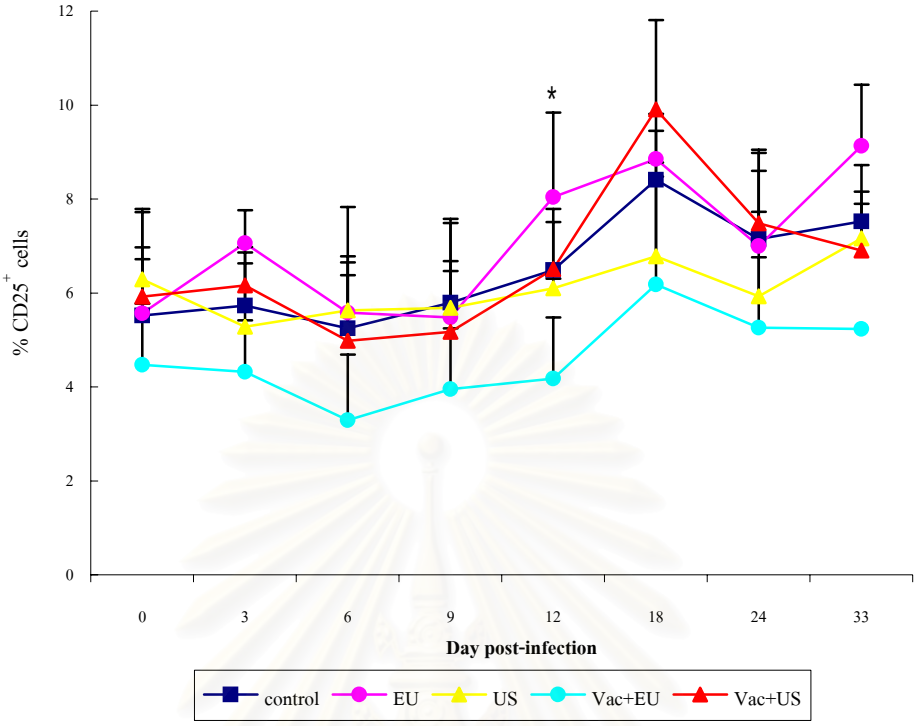
เมื่อศึกษาแยกกลุ่มประชากรเซลล์ พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีระดับเซลล์ชนิด $CD4^+$ ที่แสดง CD25 ที่ต่ำกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 18 หลังจากได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) นอกจากนี้พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีปริมาณเซลล์ที่แสดง $CD4^+CD25^+$ ในระดับที่ต่ำกว่าสุกรกลุ่มควบคุมอีกด้วย สุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกามีปริมาณเซลล์แสดง $CD4^+CD25^+$ ในระดับที่สูงกว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเพียงอย่างเดียวในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ (ภาพที่ 15a)

ในการศึกษาปริมาณประชากรเซลล์ย่อยชนิด $CD8^+$ ที่แสดง CD25 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างสุกรทุกกลุ่มการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าประชากรเซลล์ชนิดนี้มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ หลังจากได้รับเชื้อ 6 วัน (ภาพที่ 15b) สำหรับประชากรย่อยเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ ที่แสดง CD25 พบว่าในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง สุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและ

ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีระดับต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 15c) และพิจารณาประชากรย่อยของเซลล์ $\gamma\delta TCR^+$ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในสุกรแต่ละกลุ่มทดลอง แต่พบว่าประชากรย่อยเซลล์ชนิดนี้มีปริมาณที่ต่ำกว่าประชากรเซลล์ชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 15d) เมื่อเปรียบเทียบระดับปริมาณเซลล์แต่ละชนิดที่แสดง CD25 ในสุกรพบว่าประชากรเซลล์ย่อยชนิด $CD4^+$ และ $CD4^+CD8^+$ เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่แสดง CD25

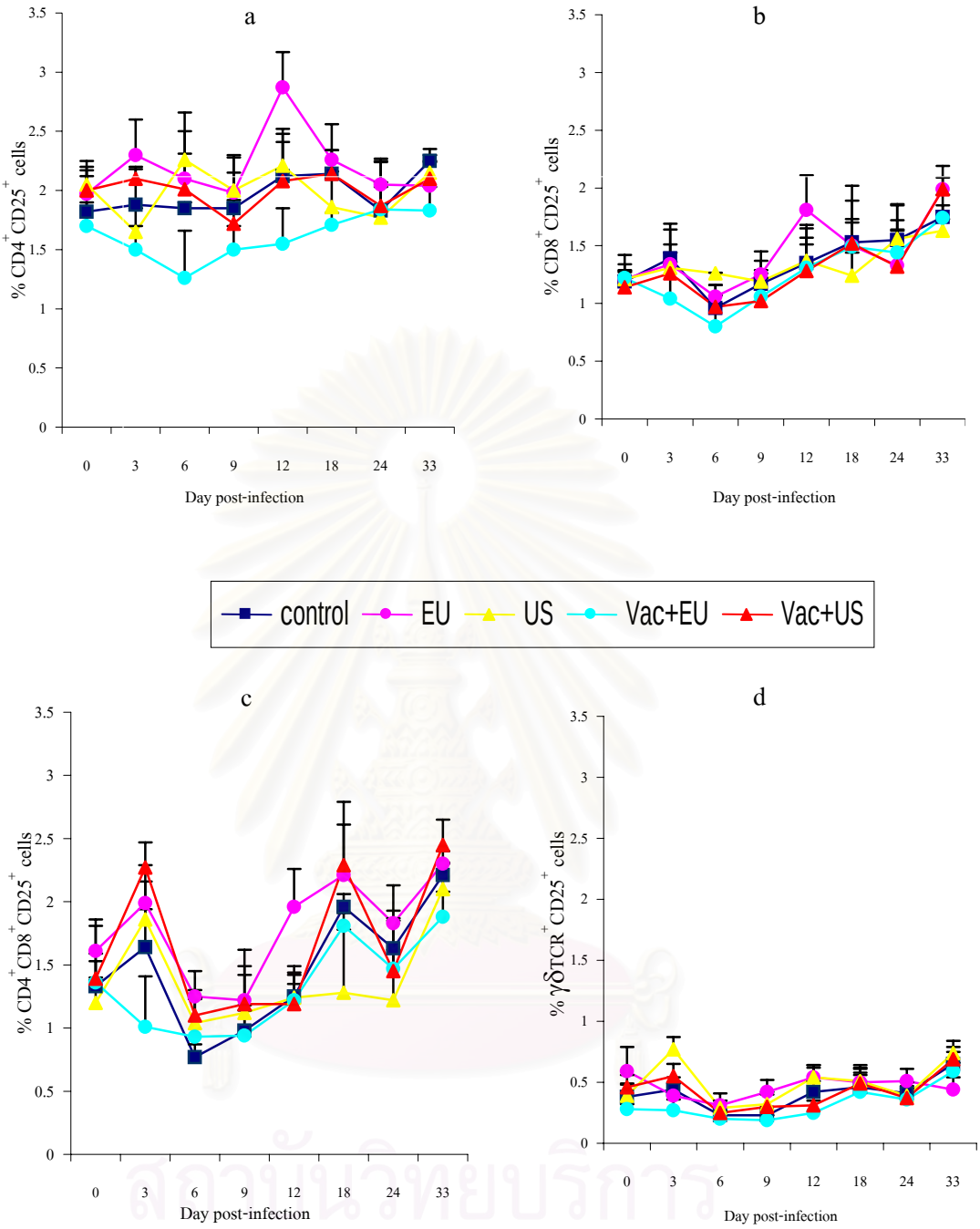
สำหรับการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในระดับที่ต่ำกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงเพียงอย่างเดียวตั้งแต่วันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อตลอดจนเสร็จสิ้นการทดลอง แต่ไม่พบความแตกต่างในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริการะหว่างสุกรที่ได้รับและไม่ได้รับวัคซีน ยกเว้นในวันที่ 6 หลังได้รับเชื้อพบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในระดับที่สูงกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงเพียงอย่างเดียวพบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ในวันที่ 6 24 และวันที่สิ้นสุดการทดลองในระดับที่สูงกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (ภาพที่ 16a) จากการพิจารณาประชากรย่อยของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าประชากรเซลล์ทุกชนิดสามารถสร้าง IFN-γ ได้ (ภาพที่ 16b-d)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

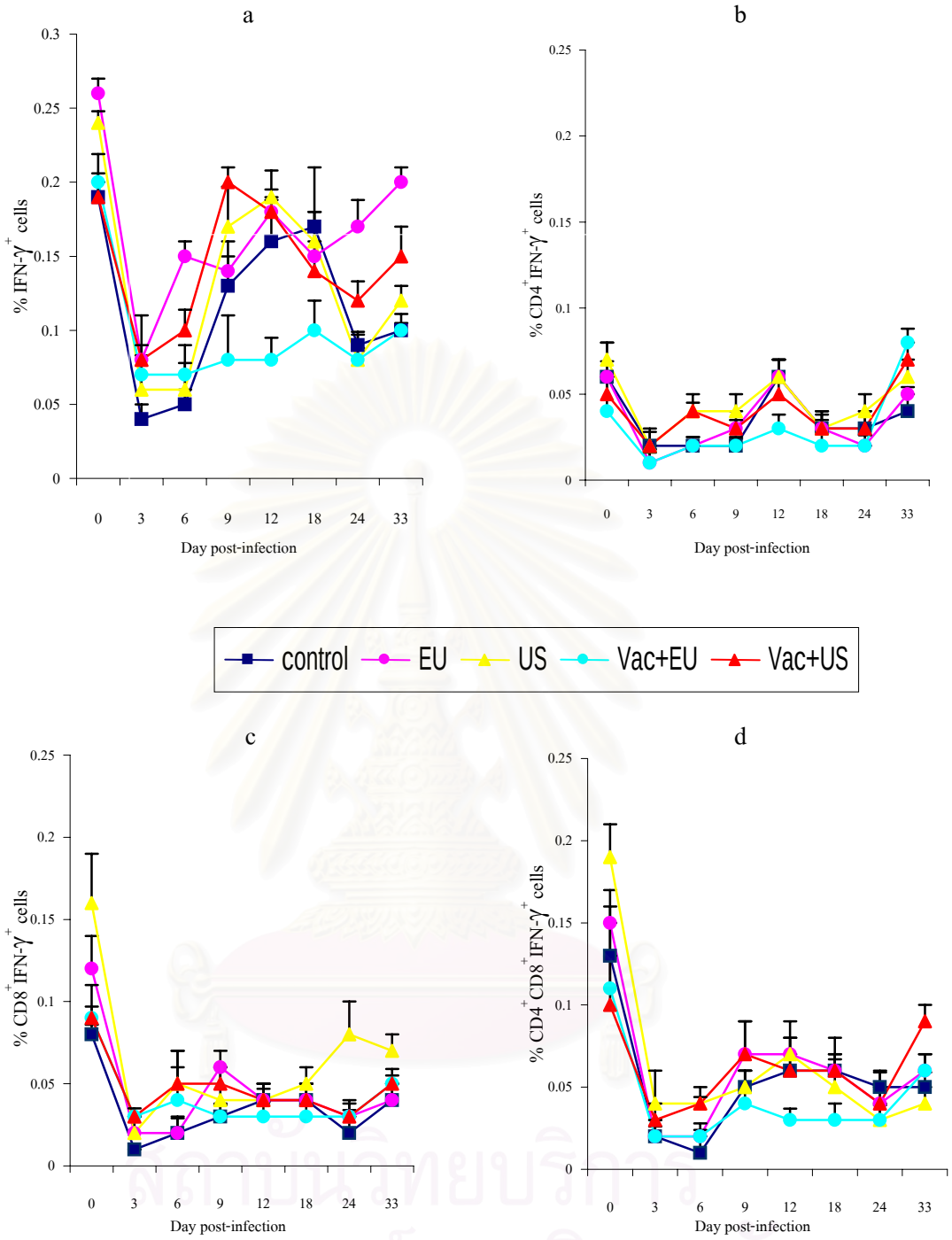


ภาพที่ 14 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เปรียบเทียบกับสุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



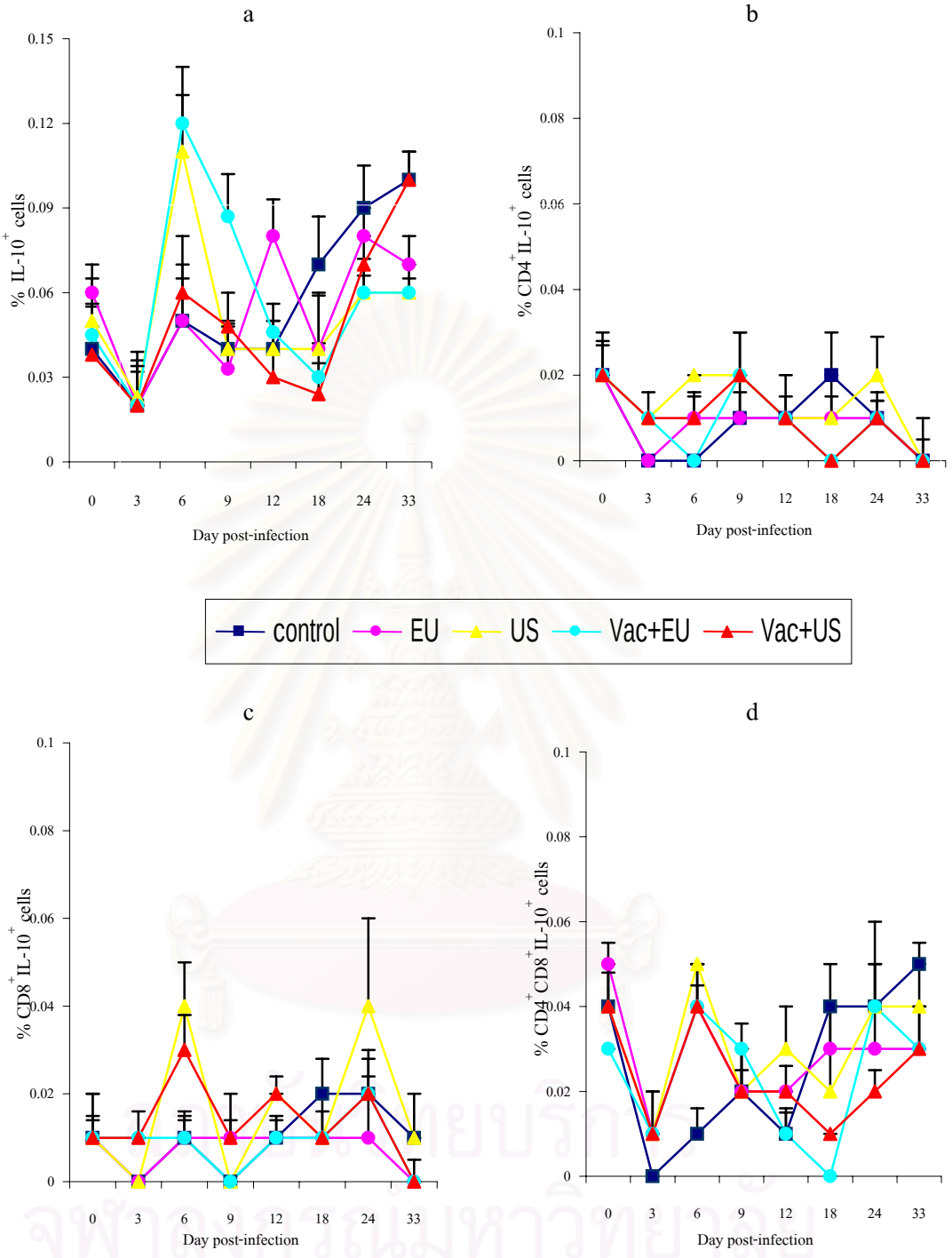
ภาพที่ 15 ปริมาณร้อยละของประชากรย่อยของเซลล์ $CD4^+$ (a) $CD8^+$ (b) $CD4^+CD8^+$ (c) $\gamma\delta TCR^+$ (d) ที่แสดง CD25 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม



ภาพที่ 16 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ทั้งหมด (a) และประชากรย่อยชนิด $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ของเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3)หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม

การศึกษาลักษณะการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดรุนแรงทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์ พบว่ามีระดับที่สูงขึ้นในวันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ โดยสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกามีระดับที่สูงกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการสร้าง IL-10 ระหว่างสุกรที่ได้รับวัคซีนและเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปกับสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงเพียงอย่างเดียว พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนจะสร้าง IL-10 ในระดับที่สูงกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับเชื้อ ในขณะที่สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในระดับที่ต่ำกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน ในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ นอกจากนี้พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 สูงกว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาในวันที่ 6 และวันที่ 9 หลังได้รับเชื้อ (ภาพที่ 17a)

จากการศึกษากลุ่มประชากรย่อยชนิด $CD4^+$ ที่สร้าง IL-10 ไม่พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 17b) สำหรับประชากรเซลล์ย่อยชนิด $CD8^+IL\text{-}10^+$ พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาทั้งที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนมีปริมาณที่สูงกว่าสุกรกลุ่มอื่นๆ ในวันที่ 6 และ 24 หลังจากได้รับเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 17c) เมื่อพิจารณาประชากรย่อยชนิด $CD4^+CD8^+$ ที่สร้าง IL-10 พบว่าสุกรทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงมีปริมาณเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+IL\text{-}10^+$ สูงกว่าสุกรกลุ่มควบคุมในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ (ภาพที่ 17d) เมื่อเปรียบเทียบประชากรย่อยของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในแต่ละชนิดพบว่าประชากรเซลล์ชนิด $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$ เป็นประชากรที่สร้าง IL-10 ส่วนใหญ่ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนจะมีปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ในระดับต่ำเมื่อให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงซ้ำจากกลุ่มสายพันธุ์สายพันธุ์เดียวกัน ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ในสุกรที่ให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงซ้ำจากต่างกลุ่มสายพันธุ์ ในการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ พบว่าการให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์เดียวกับเชื้อไวรัสวัคซีนแก่สุกรจะกดการสร้าง IFN-γ แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในสุกรที่ได้รับวัคซีนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงจากต่างกลุ่มสายพันธุ์ สำหรับปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันจะมีการสร้าง IL-10 ที่สูงขึ้น ในขณะสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงต่างกลุ่มสายพันธุ์มีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ลดลง แต่พบเฉพาะในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อเท่านั้น



ภาพที่ 17 ปริมาณร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ทั้งหมด (a) และประชากรย่อยชนิด $CD4^+$ (b) $CD8^+$ (c) $CD4^+CD8^+$ (d) ที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) หรือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (±SD) ของสุกรจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยไวรัสต่างสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อไวรัสในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งสุกรด้วย (Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001) เมื่อกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) มาก่อนด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ (การทดลองที่ 1 และ 2) ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสจากต่างกลุ่มสายพันธุ์เหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ในระดับที่สูงกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์เดิม โดยส่วนใหญ่สร้างมาจากประชากรเซลล์ชนิด $CD4^+CD8^+$ ซึ่งเป็น memory T helper cell แสดงว่าสุกรสร้าง IFN-γ สูงขึ้นในการตอบสนองต่อการติดเชื้อในครั้งที่สองจากเชื้อไวรัสต่างกลุ่มสายพันธุ์ ทั้งๆที่พบว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสในครั้งที่สองมีการสร้าง IL-10 ในระดับที่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อไวรัสที่ใช้ในการกระตุ้นมีส่วนของ epitope ที่คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่สุกรได้รับมาก่อนแม้จะเป็นต่างกลุ่มสายพันธุ์กันก็ตาม แต่ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลว่า epitope ใดเป็น epitope ที่สำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะชนิดพึ่งเซลล์ แต่มีรายงานว่า ORF 2 5 และ 6 เป็นยีนที่มีหน้าที่เป็น T cells epitope และพบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร้อยละ 65-77 61-63 และ 70-81 ตามลำดับ ระหว่างสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป (Yoon et al., 2002)

สำหรับการศึกษาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการกดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนได้ (Suradhat et al., 2003 Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนในห้องปฏิบัติการนั้นไม่มีความแตกต่างของระดับ IL-10 กับเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากอายุหรือการจัดการสุกร ระยะเวลาที่กระตุ้นเซลล์ อีกทั้งวิธีการศึกษาที่แตกต่างกันด้วยจึงทำให้ได้ผลที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสังเกตพบว่าปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 จาก PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนมีระดับสูงกว่าสุกรกลุ่มควบคุม โดยสร้างจากประชากรเซลล์ทุกชนิด ($CD4^+$ $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$) แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ติดเชื้อได้จริงเช่นเดียวกับ

การศึกษาในน้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสจากทั้งสองสายพันธุ์ (Thanawang et al., 2004) ดังนั้นน่าจะมีปัจจัยอื่นที่มีผลในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการสร้างไซโตไคน์ในสุกรต่างจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ หรือระยะเวลาการได้รับเชื้อไวรัสที่แตกต่างกัน เป็นต้น

การศึกษาในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนนั้นจะพบการสร้าง IL-10 สูงขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 แต่ไม่มีผลเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าสุกรที่ใช้ในการศึกษากลุ่มนี้มีอายุมากกว่าการศึกษาในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกามาก่อน การจัดการที่แตกต่างกัน ความสามารถในการกระจายตัวของเชื้อไวรัสและความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อไวรัสสองกลุ่มสายพันธุ์ (Meng et al., 2000; Laohasittikul et al., 2004) หรือความใกล้เคียงทางลักษณะพันธุกรรมของเชื้อไวรัส เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงจากทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์มาก่อนด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกานั้นเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ลดลง ทั้งอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่นำมาใช้เป็นวัคซีน ซึ่งมีรายงานการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกานั้นสามารถลดการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ได้ในห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2004) ยืนยันได้ว่า IL-10 น่าจะเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ซ้ำ และอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีการกดการสร้าง IFN-γ ที่สังเกตได้จากผลการทดลองในครั้งนี้

สำหรับการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อน พบว่าแม้เชื้อไวรัสวัคซีนจะสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้แต่ก็ไม่ดีเท่ากับเชื้อไวรัสจากธรรมชาติเช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา (Cheon and Chae, 2004; Xiao et al., 2004) และกระตุ้นเซลล์ PBMC กลุ่มนี้ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ (การทดลองที่ 3) พบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนสร้าง IFN-γ ลดลงเมื่อถูกกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับ IFN-γ จากการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ อีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แสดงว่าเชื้อไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อเป็นนั้นไม่ได้ช่วยเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสซ้ำในห้องปฏิบัติการไม่ว่าจะด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใดก็ตาม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาในสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนและได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงที่แยกได้ในประเทศไทย (การทดลองที่ 4) พบว่าการได้รับวัคซีนมาก่อนไม่สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้เมื่อได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงต่างกลุ่มสายพันธุ์ซ้ำ อีกทั้งยังลดการสร้าง IFN-γ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันกับวัคซีนนั้น ซึ่งอาจเกิดจากการกดการสร้าง IFN-γ ของ IL-10 โดยพบว่าเซลล์ที่ได้รับวัคซีนมาก่อนและกระตุ้นซ้ำด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการมีการสร้าง IL-10 สูงขึ้น และการศึกษาในสุกรทดลองที่ได้รับ

วัคซีนมาก่อนตามด้วยเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์เดิมมีการสร้าง IL-10 ที่สูงขึ้นเช่นกัน แม้จะพบว่าเชื้อไวรัสวัคซีนจะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้าง IL-10 ลดลงในห้องปฏิบัติการก็ตาม จากผลการทดลองนี้น่าจะบ่งชี้ได้ว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนป้องโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นนั้นมีผลต่อการติดเชื้อซ้ำโดยเฉพาะจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดิม ดังนั้นอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนการศึกษาที่พบว่าแม้เชื้อไวรัสวัคซีนจะเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของอาการทางคลินิกน้อยกว่าการติดเชื้อจากธรรมชาติ (Cheon and Chae, 2004) แต่การทำวัคซีนส่งผลให้สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ (Halbur et al., 2000)

แม้เชื้อไวรัสจะสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ แต่การสร้าง IFN-γ จะเป็นไปค่อนข้างช้าคือหลังจากได้รับเชื้อซ้ำ 6 ถึง 9 วัน และค่อยๆ ลดลง ซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาของ Meier และคณะ (2003) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ในระยะแรกๆ หลังจากได้รับเชื้อ ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยกลไกต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการลดความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ซึ่งจะทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ในการสร้างไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะลดลงไม่ว่าจะเป็นทางตรงหรือทางอ้อม

ผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในสุกรที่ได้รับวัคซีนและเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปในครั้งนี้สอดคล้องกับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกระแสเลือดด้วยวิธี RT-PCR ที่พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนและเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดก่อนสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนหลังจากได้รับเชื้อและพบว่ามีจำนวนตัวสุกรที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดที่มากกว่าอีกด้วย และเมื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในต่อมน้ำเหลืองและทอนซิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนตรวจพบเชื้อไวรัสมากกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน นอกจากนี้แล้วยังพบอีกว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนแสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยามากกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนอีกด้วย ในขณะที่สุกรที่ได้รับวัคซีนและตามด้วยเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาแม้จะพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกระแสเลือดนานกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน แต่พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่เนื้อเยื่อปอดและทอนซิลจำนวนตัวน้อยกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน และยังพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่น้อยกว่าอีกด้วย (Panyathong et al., personal communication) จากสองการทดลองนี้จะเห็นว่าการทำวัคซีนมีผลต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์เดิม แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงต่างกลุ่มสายพันธุ์ซ้ำนั้น แม้การทำวัคซีนจะมีแนวโน้มเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ดีขึ้นกลับพบว่าจำนวนสุกรที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของสุกรในกลุ่มนี้สูงกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Xiao และคณะ (2004) พบว่าระดับของ IFN-γ ในกระแสเลือดที่ไม่

สัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อไวรัสนั้น อาจจะบ่งชี้ได้ว่าภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นนั้นสามารถป้องกันหรือกำจัดเชื้อได้เฉพาะที่เท่านั้น ดังนั้นการตรวจปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในกระแสเลือดเพียงอย่างเดียวในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส อาจจะไม่สามารถบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณที่มีการติดเชื้อได้ (local tissue) เนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง ไม่ว่าจะเป็นการวางแผนการทดลอง อายุสุกร พันธุ์สุกร สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัส รวมถึงการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่ค่อนข้างซับซ้อนในแต่ละระยะของการเกิดโรค เป็นต้น (Horter et al., 2002) หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีกลไกในการหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในรูปแบบที่เรียกว่า original antigenic sin ที่พบได้ในไวรัสชนิดอื่น เช่น เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เชื้อไวรัสไข้เลือดออก หรือ เชื้อไวรัส เอช ไอ วี เป็นต้น โดยมีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่ตำแหน่ง epitope ของเชื้อไวรัสที่สำคัญต่อการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Singh et al., 2002; Mongkolsapaya et al., 2003) แม้จะสามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองต่อเซลล์ชนิด T cells แต่ก็ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้หรือกำจัดเชื้อไวรัสได้ช้าลง

จากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า การกระตุ้นเซลล์ PBMC ด้วยไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาของสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์มาก่อนนั้นสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์ชนิดรุนแรงและจากไวรัสวัคซีนสายพันธุ์ยุโรป ในขณะที่มีการสร้าง IL-10 ที่ต่ำกว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Suradhat และคณะ (2004) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้าง IFN-γ และ IL-10 ในเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา พบว่าเชื้อไวรัสวัคซีนกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนี่ยวนำการการแสดงออกของยีนที่สร้าง IFN-γ ได้และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ต่ำกว่าวัคซีนสายพันธุ์ยุโรปและเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง จากผลการศึกษานี้อาจจะเป็นไปได้ว่าการให้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาหลังจากสุกรเคยได้รับเชื้อมาก่อนสามารถลดการแสดงอาการทางคลินิกและปริมาณเชื้อไวรัสในร่างกายได้ (Juillard et al., 2004)

ผลจากการศึกษาเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนและกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 ในห้องปฏิบัติการพบว่ามีการสร้าง IFN-γ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาในสุกรทดลองที่พบว่าเมื่อให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ 01NP1 หลังจากได้รับวัคซีนมีระดับการสร้าง IFN-γ ที่สูงกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสอย่างเดียว ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของอายุสุกรที่ศึกษาโดยการศึกษากระตุ้นเซลล์ในห้องปฏิบัติการสุกรมีอายุ 6 สัปดาห์ ในขณะที่การให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงในสุกรเมื่อสุกรอายุ 12 สัปดาห์ จำนวนครั้งที่สุกรได้รับวัคซีนซึ่งการกระตุ้นในห้องปฏิบัติการสุกรได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียว แต่สุกรได้รับวัคซีน 2 ครั้งก่อนเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงในสุกร เนื่องจากมี

รายงานว่าหลังจากที่สุกรได้รับวัคซีนครั้งที่สองนั้น สุกรมีการสร้าง IFN-γ ในระดับที่สูงขึ้นไม่ถึง 2 เท่าของระดับ IFN-γ ก่อนทำการให้วัคซีนครั้งที่สอง ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นลดการสร้าง IFN-α ในเซลล์มาโครฟาจ ซึ่งการลดลงของไซโตไคน์ชนิดนี้ อาจจะส่งผลให้เซลล์มีการสร้าง IFN-γ ในระดับที่ต่ำ (Royaee et al., 2004)

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งชนิดรุนแรงและวัคซีนมาก่อนจะสร้าง IL-10 ในระดับที่สูงขึ้นเมื่อได้รับเชื้อซ้ำไม่ว่าจะเป็นกลุ่มสายพันธุ์ใดก็ตาม ซึ่งจะพบในระยะแรกๆ ของการได้รับเชื้อ บ่งชี้ได้ว่า IL-10 น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในระยะต้นๆ ของการติดเชื้อหรือการทำวัคซีน โดยอาจมีผลในการกดการสร้าง IFN-γ แต่ก็เป็นที่น่าแปลกใจว่าในการกระตุ้นเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงมาก่อนด้วยไวรัสต่างสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการนั้น แม้จะมีการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ในระดับที่สูงแต่เซลล์ PBMC ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ได้ในระดับที่สูง โดยเฉพาะในการทดลองที่ 1 ดังนั้นอาจจะมีปัจจัยอื่น ที่ทำให้สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีความบกพร่องในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน หรือเกิดจากการกดการทำงานแบบจำเพาะของ IL-10 ต่อสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่ได้รับ

จากการศึกษาปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 ซึ่งบ่งชี้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มการศึกษา แต่เมื่อพิจารณาประชากรย่อยของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่แสดง CD25 นั้นรวมกันแล้วยังมีระดับที่ต่ำกว่าปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 จากประชากรลิมโฟไซต์ทั้งหมด อาจจะเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ เช่น B cells หรือ NK cells เช่นเดียวกับการศึกษาประชากรเซลล์ที่แสดง CD25 ในสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสอหิวาต์สุกรและสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรพบว่าเซลล์ที่แสดงแอนติเจนชนิด CD25 นั้นไม่สัมพันธ์กับประชากรเซลล์ที่สร้าง IFN-γ ในเซลล์ลิมโฟไซต์ในสุกร (Suradhat et al., 2005, in press)

จากศึกษากลุ่มประชากรย่อยของเซลล์ที่สร้าง IL-10 พบว่าประชากรเซลล์ทุกชนิด ($CD4^+$ $CD8^+$ และ $CD4^+CD8^+$) สร้าง IL-10 ได้ แต่ในการศึกษาการกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนนั้น พบว่าประชากรส่วนใหญ่เป็นชนิด $CD4^+$ ที่สร้าง IL-10 ร่วมกับการศึกษาเซลล์ที่แสดง CD25 พบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิด $CD4^+$ เช่นกัน โดยเซลล์ที่แสดงแอนติเจนชนิด $CD25^+CD4^+$ บนผิวเซลล์ ซึ่งมีประมาณร้อยละ 5-10 ในกระแสเลือดของคนนั้นจัดเป็นเซลล์ชนิด regulatory T cells (Baecher-Allen et al., 2004) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์และการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์กลุ่มอื่นๆ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นี้ มีลักษณะการตอบสนองที่คล้ายกับการติดเชื้อไวรัส HIV ในคน (Kinter et al., 2004) พบว่าคนที่ติดเชื้อ HIV มีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเซลล์ชนิดนี้ในสุกรยังเคยไม่มีรายงานมาก่อน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสพี อาร์

อาร์ เอส สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิด regulatory T cells ได้เช่นกัน แต่การบ่งชี้กลุ่มประชากรเซลล์ชนิดนี้อาจจะต้องศึกษาโดยใช้แอนติเจนหลายๆ อย่างร่วมกัน เช่น ศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์ ซึ่งนอกจาก CD25 ซึ่งในสุกรพบว่ามีเซลล์ที่แสดง CD25 บน ที เซลล์ ใน PBMC ในระดับที่ต่ำ (Saalmuller et al., 2002) แล้วอาจใช้แอนติเจนชนิด CD45R, CD38, CD62L หรือ CD103 ร่วมด้วย รวมทั้งไซโตไคน์ที่เซลล์สร้าง ได้แก่ IL-5, IL-10, IL-13 หรือ TGF-β เป็นต้น เป็นตัวบ่งชี้ประชากรเซลล์ชนิด regulatory T cells (Mills and McGuirk, 2004) หรือมีการพัฒนาวิธีการตรวจเพื่อบ่งชี้ชนิดของเซลล์ให้มีความแน่ชัดมากขึ้น เช่น วิธี classical MHC-peptide tetramers เป็นต้น

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อนหรือการทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมาก่อนนั้นไม่สามารถตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อซ้ำจากสายพันธุ์เดิมได้ ดังนั้นมาตรการการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นในการควบคุมและป้องกันโรคยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม แม้ปัจจุบันมีการพัฒนาวัคซีนโดยเฉพาะ DNA วัคซีนโดยเลือกยีนที่สามาถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เพื่อเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ร่วมกับมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสในระดับโมเลกุลมากขึ้น โดยพบว่ายีนส่วน ORF2 และ ORF4 มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ (Wan Welch et al., 2004) ORF5 เป็นยีนที่ให้โปรตีนที่เป็นเป้าหมายที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน (Jaing, 2003) ORF 6 เป็นยีนที่ให้โปรตีนที่สำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ได้ดี (Bautista et al., 1999) อีกทั้งมาตรการการหมัก (acclimatization) สุกรสาวทดแทนก่อนขึ้นผสมเพื่อเหนี่ยวนำการสร้างภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำหรือลดปัญหาการแท้งนั้นยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านภูมิคุ้มกันวิทยาที่เกิดขึ้น เนื่องจากสุกรมีโอกาสที่จะได้รับเชื้อไวรัสซ้ำๆ อาจจะมีจะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้ยืนยันการศึกษาที่ผ่านมาว่า เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งชนิดรุนแรงและวัคซีนสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ได้และน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ายีนส่วนใดของเชื้อไวรัสที่เป็นตัวสำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าถ้ามีข้อมูลนี้จะสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาวัคซีนที่สามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยที่สุกรที่ได้รับวัคซีนจะลดสร้าง IL-10 หรือลดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิด regulatory T cell ได้และสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แต่พบว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ชนิดเชื้อเป็นมาก่อนนั้นนอกจากไม่สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IFN-γ ต่อการได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงต่างกลุ่มสายพันธุ์แล้วยังกดการสร้าง IFN-γ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงจากสายพันธุ์เดิมอีกด้วย ซึ่งอาจจะเกิดจากผลของการเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 ของเชื้อไวรัสไปกดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิดไม่

จำเพาะและจำเพาะ ดังนั้นการจะนำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมาใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรนั้นควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้งชนิดรุนแรงและวัคซีนส่งผลต่อการสร้างไซโตไคน์การติดเชื้อซ้ำ อาจจะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิด regulatory T cell เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดของแอนติบอดีและวิธีการตรวจวัดที่ใช้ในการศึกษา ดังนั้นควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจเพื่อจะบ่งชี้ว่าประชากรเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำจากเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส นั้นเป็นชนิด regulatory T cell จริงหรือไม่

ในการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปมาก่อนและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงสายพันธุ์อเมริกาหรือสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทยเท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวลักษณะการสร้างไซโตไคน์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้นอาจจะทำการศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและวัคซีนชนิดเชื้อตายมาก่อนและให้เชื้อไวรัสชนิดรุนแรงสายพันธุ์ต่างๆ หรือศึกษาลักษณะการสร้างไซโตไคน์ในสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดต่างๆ หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงมาก่อน และศึกษาร่วมกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

ผลการศึกษาประชากรเซลล์และลักษณะการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ในครั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าปริมาณของ IFN-γ ที่ตรวจพบนั้นสัมพันธ์กับความสามารถในการป้องกันหรือทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อได้จริงหรือไม่ หรือจำเพาะต่อเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส หรือไม่ ดังนั้นควรมีการศึกษาการทำงานของเซลล์ด้วยวิธี Cytotoxicity assay ร่วมด้วยเพื่อสามารถบ่งชี้ความสามารถของเซลล์ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้จริง หรือทำการศึกษาความสัมพันธ์ของวิธีการนี้กับปริมาณเซลล์ชนิด $CD8^{+}$ IFN-γ^{+} ด้วยวิธีโฟลไซโตมิทรี

กลไกการหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส อย่างหนึ่งอาจจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า original antigenic sin ดังนั้นการศึกษา epitope ที่สำคัญของเชื้อไวรัสที่สามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่ว่าจะเป็นทั้งชนิดสารน้ำหรือชนิดพึ่งเซลล์น่าจะมีประโยชน์ เนื่องจากจะเป็นข้อมูลในการพัฒนาวัคซีนที่สามารถแก้ปัญหาการหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสได้ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ ดี เอ็น เอ วัคซีนที่สร้างจากส่วน epitope ที่จำเพาะ

รายการอ้างอิง

Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J. and Lind, P. 2002. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 1229-1234.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 2000. Cytokines. In cellular and molecular immunology, 4th edn, Philadelphia : W.B. Saunders. 235-269.

Albina, E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory disease syndrome (PRRS): an overview. Vet. Microbiol. 55 : 309-316.

Albina, E., Piriou, L., Hutet H., Cariolet, R. and Hospitalier, R.L. 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Immunol. Immunopathol. 61: 49-66.

Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R. and Osorio, F.A. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in non-structural protein coding regions. J. Gen. Virol. 80: 307-315.

Andreyev, V.G., Wesley, W.L., 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 : 993-1001.

Baecher-Allen, C., Viglietta, V. and Hafler, D.A. 2004. Human $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells. Sem. Immunol. 16: 89-97.

Balasuriya, U.B.R. and MacLachlan, N.J. 2004. The immune response to equine arteritis virus : potential lessons for other arteriviruses. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 107-129.

Bautista, E.M. and Molitor, T.W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. Viral Immunol. 10: 83-94.

Bautista, E.M., Suarez, P. and Molitor, T.W. 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 144: 117-134.

Bayer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E. and Wege, H. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) : kinetics of infection in lymphatic organs and lung. J. Vet. Med. 47: 9-25.

Benfield, D.A., Collin, J.E., Dee, S.A., Halbur, P.G., Joo, H.S., Lager, K.M., Mengeling, W.L., Murtaugh, M.P., Rossow, K.D., Stevenson, G.W. and Zimmerman, J.J. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Disease of swine. 8th edition, Leman AD.(ed): Iowa state press. USA :Ames, Iowa. 212-213.

Biron, C.A. 1998. Role of early cytokine, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Sem. Immunol. 10: 383-390.

Botner, A., Nielsen, J., Oleksiewicz, B.M. and Storgad, T. 1999. Heterologous challenge with PRRS vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. Vet. Microbiol. 68: 187-195.

Bruin, M.G.M., Samsom, J.N., Voermans, J.J.M., Van Rooij, E.M.A., De Visser, Y.E. and Bianchi, A.T.J. 2000. Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. Vet. Immuno. Immunopathol. 76: 125-135.

Chang, C.C., Yoon, K.J. and Zimmerman, J.J. 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. J. Virol. 76: 4750-4763.

Choen, D.S. and Chae, C. 2004. Comparison of the pathogenicity of two strains (wild type and vaccine-like) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in experimentally infected sows. J. Comp. Path. 130: 105-111.

Chiou, M.T., Jeng, C.R., Chueh, C.H., Cheng, C.H. and Pang V.F. 20002. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. Vet. Microbiol. 71: 9-25.

Choi, C., Christianson, W., Collin, J. 1992. Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 4: 30.

Choi, C., Cho, W-S., Kim, B. and Chae, C. 2002. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J. Comp. Path. 127: 106-113.

Christainson, W.T., Collin, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., Morrison, R.B. and Joo, H.S. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. Am. J. Vet. Res. 53: 485-488.

Christopher-Henning, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J. and Benfield, D.A. 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 456-464.

Chung, H.K. and Chae, C. 2003. Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J. Comp. Path. 129: 205-212.

Chung, H.K., Lee, J.H., Kim, S.H. and Chae, C. 2004. Expression of interferon-alpha and Mx1 protein in pigs acutely infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J. Comp. Pathol. 130: 299-305.

Collin, J.E., Benfield, D.A., Christainson, W.T., Harris, L., Gorcyca, D.E. and Chladek, D.W. et.al 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diag. Invest. 4: 117-126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P. and Thiel, H.J. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. Virology. 193: 329-339.

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: 659-688.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996[a]. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47: 19-31.

Damrongwatanapokin, S., Patchimasiri, T., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996[b]. Experimental inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus (local strain) in weaning pigs. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47: 23-34.

De Bruin, M.G.M., De Visser, Y.E., Kimman, T.G. and Bianchi, A.T.J. 1998. Time course of the porcine cellular and humoral immune responses in vivo against pseudorabies virus after inoculation and challenge: significance of in vitro antigenic restimulation. Vet. Immunol. Immunopathol. 65: 75-87.

Dee, S.A. and Joo, H. 1997. Strategies to control PRRS : a summary of field and research experiences. Vet. Microbiol. 55: 347-353.

Dee, S.A., Joo, H.S., Park, B.K. 1998. Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. Vet. Rec. 142: 569-572.

Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S and Nauwynck, H.J. 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 179-188.

Feng, W-H., Tompkins, M.B., Xu, J.S., Zhang, H-X. and McCaw, M.B. 2003. Analysis of constitutive cytokine expression by pigs infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 94: 35-45.

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. 95: 23-33.

Halbur, P., Thanawongnuwech, R., Brown, G., Kinyon, J., Roth, J., Thacker, E. and Thacker, B. 2000. Efficacy of antimicrobial treatments and vaccination regimens for control of orcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pigs. J. Clin. Microbiol. 38(3): 1156-1160.

Halbur, P., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Andrews, J.J., Lum, M.A. and Rathje, J.A. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 33: 159-170.

Hoegen, B., Saalmüller, A., Röttgen, M., Rziha, H.J., Geldermann, H., Reiner, G., Pfaff, E., Büttner, M. 2004. Interferon-gamma response of PBMC indicates productive pseudorabies virus (PRV) infection in swine. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 389-397.

Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J. and Zimmerman, J.J. 2001. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet. Microbiol. 86: 213-228.

Jaing, Z., Zhou, E.M., Mahabadi, M.A., Zimmerman, J.J. and Platt, K.B. 2003. Identification and characterization of auto-anti-idiotypic antibodies specific for antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope glycoprotein (GP5). Vet. Immunol. Immunopathol. 92: 125-135.

Johnsen, C.K., Botner, A., Kamstrup, S., Lind, P. and Nielsen, J. 2002. Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected *in utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus : association of sustained expression of IFN-γ and IL-10 after viral clearance. 15: 549-556.

Juillard, V., Piras, F., Andreoni, C., Charreyre, C. and Joisel, F. 2004. PRRS-specific cells response following PRRSV infection and/or vaccination with inactivated PRRS vaccine: (2) characterization of the PRRSV-specific response cells. 18th IPVS congress, Hammburg, Germany. 1: 138.

Key, K.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Swenson S.L., Toth, T.E. and Meng, X.J. 2001. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. Vet. Microbiol. 83: 249-263.

Kinter, A.L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., Ziegler, S.F. and Fauci, A.S. 2004. $CD25^{+}CD4^{+}$ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. J. Exp. Med. 200(3): 331-343.

Labarque, G.G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J. and Pensaert, M. 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. Vet. Microbiol. 95: 187-197.

Labarque, G.G., Nauwynck, H.J. and Van Reeth, K. 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: 1327-1334.

Lager, K.M., Mengeling, W.J. and Brockmeier, S.L. 1997. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. Vet. Microbiol. 58: 113-125.

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

Lager, K. and Mengeling, W.L. 2000. PRRS: nature of RNA virus and how it causes disease. In proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. Melbourne, Australia. 538-543.

Lager, K.M., Mengeling, W.L. and Wesley, R.D. 2003. Strain predominance following exposure of vaccinated and naïve pregnant gilts to multiples strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Res. 67:121-127.

Lamontagne, L., Page, C., Larochelle., R., D. and Magar, R. 2001. Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 82: 165-182.

Laohasittikul, P., Boonarpha, N., Pongprapachuen, Y., Kesdangsakonwut, S., Wangnaitham, S. and Thanawongnuwech, R. 2004. Antigen distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thai crossbred pigs using immunohistochemistry. Thai J. Vet. Med. 34: 39-48.

Li, H. and Yang, H. 2003. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. Vet. Microbiol. 95: 295-301.

Linden, I.F.A., Voermans, J.J.M., Linde-Bril, E.M., Bianchi, A.T.J. and Steverink, P.J.G.M. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. Vaccine. 21: 1952-1957.

Lopez-Fuertes, L., Domenech, N., Avarez, B., Ezquerra, A., Dominguez, J., Castro, J.M. and Alonso, F. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine reproductive and respiratory syndrome infection. Virus Res. 64: 33-42.

Lopez-Fuertes, L., Campos, E., Domenech, N., Ezquerra, A., Castro, J.M., Dominguez, J. and Alonso, F. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. Virus Res. 69: 41-46.

Mardassi, H., Massie, B. and Dea, S. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of protein encoded by ORFs 5-7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology. 221: 98-122.

Mateu, E., Martin, M. and Vidal, D. 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. J. Gen. Virol. 84: 529-534.

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

Meulenberg, J.J.M. 2000. PRRSV, the virus. Vet. Res. 31: 11-21.

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: 3181-3188.

Meng, X.J. 2000. Heterogeniety of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implication for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet. Microbiol. 74: 309-329.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Clouser, D.F. 2003. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet. Microbiol. 93: 25-38.

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

Mills, K.H.G. and McGuirk, P. 2004. Antigen-specific regulatory T cells- their induction and role in infection. Sem. Immunol. 16: 107-117.

Miller, L.C. and Fox, J.M. 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 131-142.

Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D. and Marincola, F.M. 2003. The dual role of IL-10. Trends in Immunol. 24: 36-43.

Molitor, T.W., Bautista, E.M. and Choi, C.S. 1997. Immunity to PRRSV : double-edged sword. Vet. Microbiol. 55: 265-276.

Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., et al. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Nature Med. 9: 921-927.

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

Morel, A.S., Coulton, G. and Londei, M. 2002. Regulation of major histocompatibility complex class II synthesis by interleukin-10. Immunology. 106:229-236.

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

Nauwynck, H.J., Duan, X., Favoreel, H.W., van Oostveldt, P. and Pensaert, M.B. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. J. Gen. Virol. 80: 297-305.

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

Nielsen, L., Botner, A., Tingstedt, J.E., Aasted, B., Johnsen, C.K., Riber, U. and Lind, P. 2003. In utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates leukocyte subpopulations in peripheral blood and bronchoalveolar fluid of surviving piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 93: 135-151.

Neilsen T.L., Neilsen J., Have P., Bakbo, P., Jorgensen, H. and Botner, R. 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. 81: 101-112.

Oleksiewicz, M.B. and Nielsen, J. 1999. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar macrophage survival and function. Vet. Microbiol. 66: 15-27.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yoon, K.J., Pogranichniy, R.M., Harmon, K.M., Evans, R., Key, K.F., Pallares, F.J., Thomas, P. and Meng, X.J. 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2358, and two recent field isolates of PRRSV. J. Virol. 76: 11837-44.

Osario, 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 established sterilizing immunity. Virology. 302: 9-20.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D. and Pijoan, C. 2002. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes; *Aedes vexans*. Can. J. Vet. Res. 66: 191-195.

Pampusch, M.S., Bennaars, A.M., Harsh, S. and Murtaugh, M.P. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 61: 279-289.

Pala, P., Hussell T. and Openshaw P.J.M. 2000. Flow cytometry mearsurement of intracellular cytokines. J. Immunol. Methods. 243: 107-124.

Parel, Y. and Chizzolini, C. 2004. $CD4^+CD8^+$ double positive (DP) T cells in health and disease. Autoim Rev. 3: 215-220.

Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N. and Snijder, E.J. 1999. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicle which carry the viral replication complex. J. Virology. 73: 2016-2026.

Pescovitz, M.D., Lunney, J.K. and Sachs, D.H. 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. J. Immunol. 133: 368-375.

Plana-Dura, J., Baston, M., Urniza, A., Vayreda, M., Vilax, X. and Manelt, T. 1997. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Microbiol. 55: 361-370.

Riber, U., Nielsen, J. and Lind, P. 2004. In utero infection with PRRS virus modulates cellular functions of blood monocytes and alveolar lung macrophages in piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 99: 169-177.

Rodriguze-Carrino, M. P., Lopez-Fuertes, L., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F. and Dominguez, J. 2002. Phenotype characterization of porcine IFN-γ producing lymphocytes by flow cytometry. J. Immunol. Method. 259: 171-179.

Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P. and Morrison, R.B. 1998. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in 1-, 4- and 10-week-old pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 3-12.

Rossow, K.D., Collin, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Benfield, D.A. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet. Pathol. 32: 361-373.

Rossow, K.D., Laube, K.L., Goyal, S.M. and Collins, J.E. 1996. Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. Vet. Pathol. 33: 95-99.

Rowland, R.R.R., Steffen, M., Ackerman, T. and Benfield, D.A. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus : quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. Virology. 259: 262-266.

Rowland, R.R.R., Robibson, B., Stefanick, J., Kim, T.S., Guanghua, L., Lawson, S.R. and Benfield, D.A. 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. Arch Virol. 146: 539-555.

Rowland, R.R.R., Lawson, S., Rossow, K. and Benfield, D.A. 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. Vet. Microbiol. 96: 219-235.

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 involement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 199-216.

Saalmuller, A., Hirt, W. and Reddehase, M.J. 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic $CD4^{-}CD8^{-}$ and $CD4^{+}CD8^{+}$ porcine T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 19: 2011-2016.

Saalmuller, A., Hirt, W., Maurer, S. and Weiland, E. 1994. Discrimination between two subsets of porcine $CD8^{+}$ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. Immunology. 81: 578-583.

Saalmuller, A., Pauly, T., Hohlich, B.J. and Pfaff, E. 1999. Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens. J. Biotech. 73: 223-233.

Saalmuller, A., Werner, T. and Fachinger, V. 2002. T-helper cells from naïve to commited. Vet. Immunol. Immunopathol. 87: 137-145.

Samsom, J.N., de Bruin, T.G.M., Voermans, J.J.M., Meulenberg, J.J.M., Pol, J.M.A. and Bianchi, A.T.J. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the bronchoalveolar lavage of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus : a role for $CD8^+$ cells. J. Gen. Virol. 81: 497-505.

Singh, R.A., Rodgers, J.R. and Barry, M.A. 2002. The role of T cell antagonism and original antigenic sin in genetic immunization. J. Immunol. 169: 6779-6786.

Sirriyah, J., Dean, G.A., LaVoy, A. and Burkhard, M.J. 2004. Assessment of $CD4^+$ and $CD8^+$ IFN-gamma producing cells by ELISPOT in naïve and FIV-infected cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 77-84.

Shibata, I., Mori, M. and Yazawa, S. 2000. Experimental re-infection with homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus in SPF pigs. J. Vet. Med. Sci. 62: 105-108.

Shibata, L., Mori, M., Uruno, K., Samegal Y. and Okada, M. 1997. In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection. J. Vet. Med. Sci. 59: 539-543.

Snijder, E.J. and Meulenberg, J.J.M. 1998. The molecular biology of Arterivirus. J. Gen. Virol. 79: 961-979.

Summerfield, A., Rziha, H.J. and Saalmuller, A. 1996. Functional charaterization of porcine $CD4^+CD8^+$ extrathymic T lymphocytes. Cell. Immunol. 168: 291.

Sur, J.H., Christian, A.R., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J. and Osorio, F.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. J. Virol. 71: 9170-9179.

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

Suradhat, S., Sada, W., Buranapraditkun, S. and Damrongwatanapokin, S. 2005. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). Vet. Immunol. Immunopathol. In press.

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

Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2004. Efeect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), vaccine strains, on the level of porcine IL-10 gene expression. International pig Veterinary Society Congress, proceeding, (cd rom).

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

Thanawang, P., Yamkleebbua, C., Shiyun, K., Thanawongnuwech, R., Kesdangsakonwut, S., Wangnaitham, S. and Suradhat, S. 2004. Semiquantitative analysis of IL-10 production in bronchoalveolar lavage leukocytes of PRRSV infected pigs. Thai. J. Vet. Med. 34: 29-38.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Ackermann, M.R., Thacker, E.L. and Royer, R.L. 1998. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. Vet. Pathol. 35: 389-406.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)(isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs) : In vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). Vet. Immunol. Immunopathol. 59: 323-335.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1998. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). Vet. Microbiol. 63: 177-187.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G. and Thacker, E.L. 2000. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Anim. Health Res. Rev. 1: 95-102.

Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J. and Thacker, E.L. 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: In vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. Vet. Immunol. Immunopathol. 79: 115-127.

Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A. and Damrongwatanapokin, S. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. In Proceeding of the 17th International Pig veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. 410.

Thanawongnuwech, R., Amornsin, A., Tatsanakit, A. and Damrongwatanapokin, S. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet. Microbiol. 101: 9-21.

Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Damme, V.J., Woensel, P.A. and Nauwynk, H.J. 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophage. J. Virol. 77: 8207-8215.

Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. and Pensaert, M. 1999. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infection : correlations with pathogenicity. Res. Vet. Sci. 67: 47-52.

Van Reeth, K., Van Gucht, S. and Pensaert, M. 2002. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. Vet. Immunol. Immunopathol. 87: 161-168.

wan Welch, S.K., Jolie, R., Pearce, D.S., Koertje, W.D., Fuog, E., Shield, S.L., Yoo, D. and Calvert, J.G. 2004. Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 277-290.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, S.L., Sweenson, M.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Chritopher-Hennings, J. and Nelson, E.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet. Microbiol. 55: 231-240.

Xiao, Z., Bautista, S. Dee, P., Halbur, P. and Murtaugh, M.P. 2004. The level of virus-specific T cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. J. Virol. 78: 5923-5933.

Xiao, Z., Murtaugh, M.P., Johnson, C.R., Bautista, L. and Dee, S.A. 2003. Immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): systemic and local responses in acute and persistent infection. 4th International Symposium on Emerging and re-emerging pig diseases, ROME. 45-46.

Yahara, Y., Ohkubo, Y.K. and Takashima, I. 2002. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent antibody (IFA) test for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibody in pigs from conventional farmes. J. Vet. Med. Sci. 64: 583-588.

Yang, H. and Parkhouse, R.M.E. 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissue. Immunology. 89: 76.

Yoon, K.J. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus : Virology. Trends in emerging viral infections of swine. In Morillaa, A., Yoon, K.J. and Zimmerman, J.(ed.) Iowa state press. 331-338.

Yoon, K.J. and Stevenson, G.W. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Diagnosis. In: Trends in emerging viral infections of swine. Morilla A, Yoon K.J. and Zimmerman J.J.(eds). Iowa state press. 347-354.

Yoon, K.J., Zimmermann, 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. Charaterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 305-312.

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: 51-63.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M. and McGinley, M.J. 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. Vet. Res. 30: 629-638.

Zimmermann , J.J. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus : Edpidemiology. Trends in emerging viral infections of swine. In Morillaa, A., Yoon, K.J. and Zimmerman, J. (ed.) Iowa state press. 331-338.

Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu, E. and Martin, S. 1998. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. Vet. Immunol. Immuopathol. 63: 57-67.

Zuckerman, F.A. and Husmann, R.J. 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. Immunology. 87: 500-512.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)(10x)

Sodium Chloride (NaCl)	80.0	กรัม
Potassium Chloride (KCl)	2.0	กรัม
Sodium phosphate ,dia, anhy (Na2HPO4)	11.5	กรัม
Potassium phosphate, mono (Kh2PO4)	2.0	กรัม
เติม Distilled water จนครบ	1000	มิลลิลิตร

หลังจากผสมแล้วปรับ pH 6.7

การเตรียม phosphate buffered saline-Tween 0.5% (PBST)

10x PBS	160	มิลลิลิตร
Tween20 (polyoxyethaylene 20 sorbitan monolauratal	10	มิลลิลิตร
เติม Distilled water จนครบ	2000	มิลลิลิตร

การเตรียม RPMI-1640 complete media

Calf serum (free-anti-BVD, BVDV และ anti-SFV)	50	มิลลิลิตร
100X L-glutamine	5	มิลลิลิตร
100X antibiotic/antimycotic	5	มิลลิลิตร
100X non-essential amino acid	5	มิลลิลิตร
100X sodium pyruvate	5	มิลลิลิตร
50 mM 2-mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
เติม RPMI-1640 จนครบ	500	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม acetate buffer

Stock A 0.1 M acetic acid

Glacial acetic acid	5.75	มิลลิลิตร
Distilled water จนครบ	1000	มิลลิลิตร

Stock B 0.1 M sodium acetate

Sodium acetate	13.16	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำ Stock A ปริมาณ 21 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock B ปริมาณ 79 มิลลิลิตร

การเตรียม Amino acid –9- ethyl-carbazole (AEC)

AEC	4	กรัม
Dimethyl formalin	100	มิลลิลิตร

การเตรียม FACS buffer

NaNH3	0.5	กรัม
BSA	2.5	กรัม
เติม PBS จนครบ	500	มิลลิลิตร

การเตรียม 2% formaldehyde

37% formaldehyde	54	มิลลิลิตร
เติม PBS จนครบ	1000	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย วีระศักดิ์ สะดะ เกิดวันที่ 11 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2519 ณ จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ทำงานตำแหน่งนายสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหวิทยาลัย เป็นเวลา 2 ปี และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย