รายงานการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนในภาคสนามเพื่อควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอส

A field trial evaluating the efficacy of DNA vaccine in PRRSV control

โดย

คณะผู้วิจัย

เดชฤทธิ์	**นิลอุบล**	**(หัวหน้าโครงการ)**
อังคณา	**ตันติธุวานนท์**	**(นักวิจัย)**
ธิติมา	**ไตรพิพัฒน์**	**(นักวิจัย)**
นายอรรถพล	**มาดาป้อง**	**(นักวิจัย)**

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557

(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2557

ทีมผู้วิจัยขอขอบพระคุณฟาร์มสุกรในเครือบริษัทมิตรภาพโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรเพื่อดำเนินการวิจัย ตลอดจน ภญ.ดร. จิตติมา พิริยะพงศา และนางสาวปาวิตา ทิพย์สมบัติบุญ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยอนุเคราะห์ในด้านวิเคราะห์ข้อมูล และบุคคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรอื่นๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

บทคัดย่อ

การดำเนินงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยดีเอ็นเอต้นแบบที่ผลิตขึ้นมีส่วนประกอบของยีน ORF5 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีการแทรกยีน PADRE ระหว่าง decoy epitope และ neutralizing epitope และศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนต้นแบบนั้นในการกระตุ้นสร้าง neutralizing antibody แบ่งการวิจัยออกเป็น 3 ส่วนประกอบด้วย การผลิตดีเอ็นเอวัคซีน การทดสอบขนาดที่ใช้และการทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มทั้งโดยวัดจาก serum neutralization และ lymphocyte proliferative assays ในภาคสนาม ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอวัคซีนที่พัฒนาขึ้นสามารถกระตุ้นสร้างแอนติบอดีและกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อวัดโดยวิธี serum neutralization และ lymphocyte proliferative assays แต่ผลการตอบสนองช้าและไม่สูง ดังนั้นจึงอาจต้องดำเนินการวิจัยต่อเพื่อพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น

ABSTRACT

The objectives of the study were to develop a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome. The DNA vaccine was developed using ORF5 gene. PADRE was inserted into positions between decoy and neutralizing epitopes. The study was divided into 3 parts including the development and production of the plasmid DNA, dosage determination and a field trial. The results of the study demonstrated that the plasmid DNA was successfully developed and produced. However, the immune responses induced as measured by serum neutralization and lymphocyte proliferation assay were low and delayed. In conclusion, although the DNA vaccine was successfully developed, the further development including the aspects of increased robust and higher magnitude of immune response is needed.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

เรื่อง	หน้า
บทนำ	**1**
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	7
ฟาร์มทดลอง	7
การเก็บตัวอย่างซีรั่ม	7
การตรวจสอบไวรัสและการถอดรหัสพันธุกรรมยีนโออาร์เอฟห้า และ Nsp2	8
วิเคราะห์ข้อมูล	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	**10**
วิธีดำเนินงานวิจัย	**18**
การดำเนินงานวิจัย	18
ฟาร์มดำเนินการวิจัย	18
การเก็บตัวอย่างซีรั่ม	20
การตรวจสอบไวรัส	21
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เลสReverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)	21
การถอดรหัสพันธุกรรมยีน ORF5 และ Nsp2	23
การวิเคราะห์ข้อมูล	24
ผลการทดลอง	**25**
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่วนยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสภายในฟาร์ม	25
จำนวนตัวอย่าง	25
วิเคราะห์ยีนส่วนโออาร์เอฟห้า โดยแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ	27
การจัดกลุ่มของไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม	34
การเปลี่ยนแปลงไวรัสภายในฝูง (Dynamic of PRRSV in a herd)	35
การผสมสารพันธุกรรมระหว่างไวรัส(Recombination)	37
วิเคราะห์ยีนส่วน Nsp2 บางส่วน	39

เรื่อง **หน้า**

เอกสารอ้างอิง **41**

วิจารณ์และสรุปผล **44**

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย **49**

ภาคผนวก **50**

1. ลำดับกรดอะมิโนของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 50
2. ลำดับกรดอะมิโนของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 51
3. ลำดับกรดอะมิโนของยีน Nsp2 บางส่วนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 54

สารบัญตาราง (List of Contents)

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละครั้งในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 26
2. แสดงจำนวนไวรัสที่แยกในแต่ละครั้งในแต่ละคลัสเตอร์ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 26
3. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป 32
4. แสดงความเหมือนส่วนนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรธรรมดา) และกรดอะมิโน (ตัวอักษรเอียงเข้ม) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ 33
5. แสดงตำแหน่งการเกิด N-linked glycosylation ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ต่างๆ 35

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่ **หน้า**

1. แผนภูมิต้นไม้แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั่วโลก และคลัสเตอร์จำเพาะของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยกได้ในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็นคลัสเตอร์ I (สีแดง) และคลัสเตอร์ II (สีน้ำเงิน) 5
2. แผนภูมิต้นไม้แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนส่วน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั่วโลก และคลัสเตอร์จำเพาะของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยกได้ในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็นคลัสเตอร์ I-IV และคลัสเตอร์ II เป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง 6
3. แสดงแผนผังฟาร์มที่ดำเนินการวิจัย 19
4. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์ อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์ยุโรป ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 2 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 และ 2 29
5. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนโออาร์เอฟห้าของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์สายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แบ่งไวรัสออกเป็น 4 คลัสเตอร์ประกอบด้วยคลัสเตอร์ 1 2 3 และ4 31
6. การเกิดขนาดของแต่ละกลุ่มไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU, genotype 1) และอเมริกาเหนือ (US, genotype 2) ในแต่ละเดือน 36
7. การผสมข้ามสายของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 2 ที่เป็นไวรัสพีอาร์ อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรงและไวรัสในคลัสเตอร์ที่ 1 38
8. แสดงการผสมข้ามสายของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในคลัสเตอร์ที่ 1 และ 4 38
9. แสดงแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีนNsp2 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ 40

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพีอาร์อาร์เอส เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย โดยก่อให้เกิดอาการผิดปรกติของระบบสืบพันธุ์ในฝูงสุกรแม่พันธุ์ เช่น แท้ง กลับสัด ในสุกรอุ้มท้อง จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดและอัตราตายก่อนหย่านมสูง และโรคระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (Porcine respiratory disease complex) ในฝูงสุกรอนุบาลและขุน

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสในตระกูล *Arteriviridae* มีจีโนมประกอบด้วย Open reading frames (ORFs) จำนวน 10 ORFs โดยมียีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นสร้างภูมิคุ้มกันคือยีน ORF5 ที่สร้าง glycoprotein 5 มีส่วน neutralizing epitope อยู่ (Wissink et al., 2003) จึงเป็นยีนสำคัญที่นำมาผลิตเป็นวัคซีน (Ansari et al., 2006) และนอกจากนั้น ยีน ORF5 ส่วนนี้ยังเป็นยีนส่วนที่พบการกลายพันธุ์สูง จึงเป็นยีนหลักที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั่วโลก (Stadejek et al., 2006)

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์หลัก (genotype) ประกอบด้วยสายพันธุ์ยุโรป (European genotype หรือ genotype I) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype หรือ genotype II) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก โดยพบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปในประเทศทวีปยุโรปเป็นหลัก และในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา พบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และพบฟาร์มติดเชื้อทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรป ประมาณ 66.42% ซึ่งมีความชุกมากกว่าสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่จากรายงานในปี พ.ศ. 2554 (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่นที่พบการติดเชื้อสายพันธุ์เดียวเป็นหลัก

ในประเทศสหรัฐอเมริกานั้นพบว่าโรคพีอาร์อาร์เอส สร้างความเสียหายถึงปีละ 560.32 ล้านดอลล่าร์ (Neumann et al., 2005) แม้ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างเป็นรูปธรรม แต่ก็พบว่าฟาร์มสุกรในประเทศไทยมากกว่า 80 เปอร์เซนต์เป็นฟาร์มที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ด้วยความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น ทำให้เกษตรกรตระหนักถึงวิธีการที่สามารถควบคุม และป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสอย่างมีประสิทธิภาพ เกษตรกรจึงได้มีการนำวัคซีนเช่น วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV®, Boehringer Ingelheim, USA) มาใช้ในการควบคุมโรค แต่เกษตรกรกลับพบว่า วัคซีนพีอาร์อาร์เอสที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันไม่ให้ผลคุ้มโรคเท่าที่ควร เนื่องจากพบลักษณะอาการคล้ายโรคพีอาร์อาร์เอส เช่น การแท้ง ลูกตายแรกคลอด มัมมี่ และพบความเสียหายเช่นลูกสุกรแรกคลอดอ่อนแอ การเพิ่มขึ้นของปัญหาโรคทางเดินหายใจอาการทางระบบประสาทเช่นชัก และข้อบวมในสุกรก่อนหย่านมและอนุบาล อย่างต่อเนื่อง ในฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น เป็นประจำ

สาเหตุที่วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสไม่สามารถใช้ป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างวัคซีนที่จำหน่ายและเชื้อที่เกิดการระบาดในฟาร์ม และคุณสมบัติการเป็น quasi-species ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Goldberg et al., 2003) ที่ไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตั้งต้น โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงส่วนยีน ORF 5 (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998) ที่ทำหน้าที่สร้าง Glycoprotein 5 และมีส่วน Neutralizing epitope อยู่ (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002)

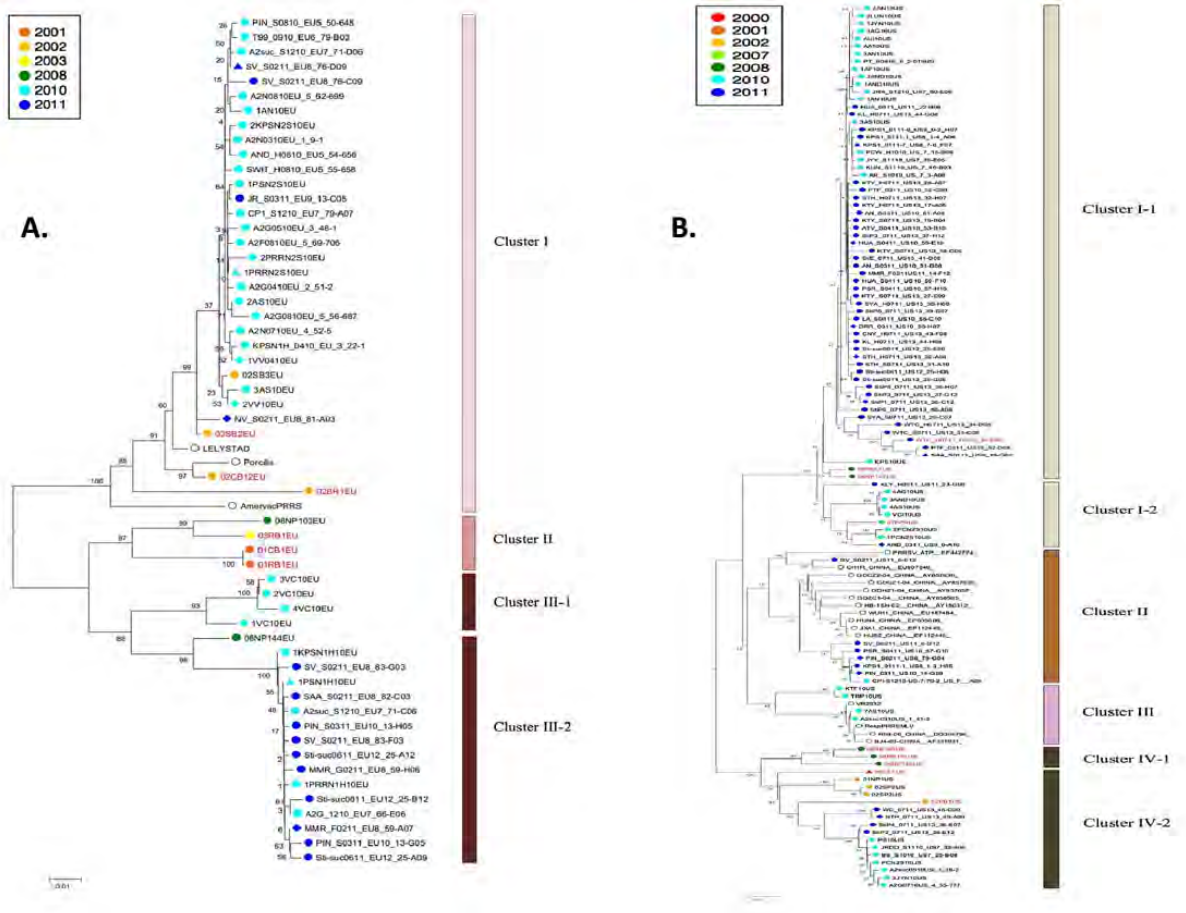
จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง ทีมผู้วิจัยจึงได้สำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยมามากกว่า 6 ปี (พ.ศ. 2549 – 2555) โดยแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจำนวนมากกว่า 500 ไอโซเลตจากฟาร์มจำนวนมากกว่า 200 ฟาร์มในประเทศไทย (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่รายงานในปีพ.ศ. 2547 โดยเฉพาะไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 คลัสเตอร์ จากเดิมที่ในปีพ.ศ. 2547 พบเพียง 1 คลัสเตอร์ (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013)

จากการสำรวจพบว่านอกจากสายพันธุ์หลักสองสายพันธุ์แล้ว เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก โดยสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) และสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ถึง 4 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) โดยภายในแต่ละคลัสเตอร์จะมีความต่างกันอยู่ที่ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ของลำดับนิวคลี

โอไทด์ และจากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizaing epitope น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการคือการเปลี่ยนตำแหน่ง N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วน Glycoprotein 5 ทำให้ neutralizing epitope มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลโดยตรงต่อภูมิคุ้มข้ามสายพันธุ์ (cross protection)

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสทั้ง 4 คลัสเตอร์ พบที่ส่วน decoy epitope และ N-liked glycosylation site เท่านั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วน primary neutralizing epitope ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสตั้งต้นมาก จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน decoy epitope และ N-liked glycosylation site มาก การมี decoy epitope และการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ อาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการสร้างแอนติบอดี้แบบ non-neutralizing antibody แทน neutralizing antibody ทำให้ไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสได้ ถ้ามีการตัดส่วน decoy epitope ออกหรือมีการแทรกด้วยสายพันธุกรรมบางอย่างทำให้ decoy epitope อยู่ห่างจาก neutralizing epitope อาจทำให้ร่างกายมีการกระตุ้น neutralizing antibody ได้ดีขึ้น

จากเหตุผลและข้อมูลการสำรวจดังกล่าว จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทีมผู้วิจัยสนใจที่จะผลิตวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส รูปแบบใหม่ ที่เป็นพลาสมิคดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่ส่วนระหว่าง decoy epitope, N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope เพื่อเป็นต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับใช้ทดลองในสุกร อนึ่งทางทีมผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปีพ.ศ. 2555 เพื่อทำการผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และ PADRE และปัจจุบันทางทีมผู้วิจัยได้ต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่พร้อมนำไปใช้ในการทดลองในสุกรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ทางทีมผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่มีไปเพิ่มจำนวนและทดลองใช้ในฟาร์มสุกรเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพีอาร์อาร์เอสต่อไป ผู้วิจัยคาดว่าผลการศึกษานี้จะได้มาซึ่งวัคซีนรุ่นใหม่เพื่อป้องกันหรือและการควบคุมโรค PRRS รูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น



ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย A) สายพันธุ์ยุโรป B) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วง โดยช่วงที่ 1 เป็นการผลิตและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอวัคซีน ช่วงที่ 2 เป็นการทดลองหาปริมาณ และช่วงที่ 3 เป็นการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพ

ช่วงที่ 1 การผลิตและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอวัคซีน

พลาสมิดดีเอ็นเอและการเตรียม

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มาเพิ่มจำนวน โดยมีการเตรียมโดยย่อนี้ นำเชื้อไวรัสแยกได้มาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (MARC145, ATCC) สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อไวรัสที่แยกได้ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยเปลี่ยนส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็น cDNA ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ Random primer และนำ cDNA ที่ได้ มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อยีนORF 5 ของเชื้อไวรัสโดยใช้ high fidelity polymerase enzyme นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ (PCR product) มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ส่วนพันธุกรรมของยีน ORF5 และตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง automated sequencer

นำส่วนพันธุกรรมของยีน ORF 5 ที่แยกได้ มาเตรียมเป็น plasmid DNA โดยนำส่วนยีน ORF5 มา ligate เข้า cloning vector เพื่อเพิ่มจำนวนโดยการ transform เข้า *E.coli* สายพันธุ์ JM109 และเพาะเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ตัดยีนส่วนที่ต้องการโดยใช้เอ็มไซม์ (restricted enzymes) และนำยีนส่วนตัดมา insert เข้า mammalian expression vector และเพิ่มจำนวนด้วยการ transform เข้า Top10® E.coli แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง automated sequencer แล้ววัดปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอวัคซีนที่แทรก PADRE (Alexander et al., 2000; del Guercio et al., 1997)

ช่วงที่ 2 การทดลองในสุกรเพื่อหาปริมาณการฉีด

ทำการทดลองในฟาร์ม โดยแบ่งสุกรหย่านมอายุ 28 วัน ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่ 1 ทำการให้ฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งเป็น transfer vector เปล่าเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 ไมโครกรัม ส่วนกลุ่มที่ 2 – 4 ทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน โดยเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 250 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการฉีดพลาสมิดดีเอ็น

เอ นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ฉีดต้องเป็นเท่าไรจึงให้การกระตุ้นสูงที่สุด

ช่วงที่ 3 การทดลองประสิทธิภาพในสุกร

ทำการทดลองในฟาร์ม โดยแบ่งสุกรอายุ 28 วัน ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) สุกรในกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสารละลาย PBS กลุ่มที่ 2 ทำการให้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสเชื้อเป็น เข้ากล้ามเนื้อ และทำการฉีดซ้ำอีกครั้งในอีก 14 วันถัดมา และกลุ่มที่ 3 ทำการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าใต้ผิวหนัง และทำการฉีดซ้ำทุกกลุ่มอีกครั้งใน 14 และ 28 วันถัดมา ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปสกัดซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- ผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE ระหว่าง decoy epitope, N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope
- ศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนในการกระตุ้นสร้าง neutralizing antibody
- ศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกรอนุบาลฟาร์ม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE ระหว่าง decoy epitope, N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope
- ทดลองศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนในด้านการกระตุ้นสร้าง neutralizing antibody และการควบคุมการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกรอนุบาลในฟาร์ม

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

โรคพีอาร์อาร์เอส เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ก่อให้เกิดอาการผิดปรกติของระบบสืบพันธุ์ในฝูงสุกรแม่พันธุ์ เช่น แท้ง กลับสัด ในสุกรอุ้มท้อง จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดและอัตราตายก่อนหย่านมสูง และโรคระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (Porcine respiratory disease complex) ในฝูงสุกรอนุบาลและขุน โดยในประเทศสหรัฐอเมริกานั้นพบว่าโรคพีอาร์อาร์เอส สร้างความเสียหายถึงปีละ 560.32 ล้านดอลล่าร์สหรัฐ (Neumann et al., 2005)

โรคพีอาร์อาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดียวและมีเปลือกหุ้มที่จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) จีโนมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีมวลโมเลกุล 15 kDa ประกอบไปด้วย 10 Open reading frames (ORFs) คือ ORFs 1-7 ORFs 1a และ 1b เป็นส่วนของ non-structural protein (Nsp) ทำหน้าที่เป็น replicase-related protein ควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัส ส่วน ORFs 2-7 เป็นส่วนของ structural protein โดยมีรายละเอียดดังนี้ ORF 2 มีขนาด 29-50 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น glycoprotein (GP) 2 ORF 3 มีขนาด 45-50 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น GP3 ORF 4 มีขนาด 31-35 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น GP4 ORF 5 มีขนาด 25 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น GP5 ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ เป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญที่ไวรัสใช้ในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ นอกจากนั้นโปรตีน GP5 ส่วนนี้จึงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบนิวทรัลไลซ์ซิ่งแอนติบอดี (Pirzadeh and Dea, 1998) ORF 6 มีขนาด 18 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น matrix (M) protein ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการประกอบตัวของไวรัส (virus assembly) ORF 7 มีขนาด 15 kDa มีการแสดงออกของยีนเป็น nucleocapsid (N) protein (Meulenberg, 2000; Meulenberg et al., 1997)

เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype) และสายพันธุ์ยุโรป (European genotype) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา พบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก มีรายงานการแยกเชื้อสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ไม่ได้สร้างความเสียหายมากนัก และหลังจากนั้นก็ไม่เคยมีการค้นพบอีกเลย และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด ในประเทศแถบทวีปยุโรปพบการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศเช่น เดนมาร์ก ที่

พบไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ซึ่งมีสาเหตุมาจากการนำวัคซีนโรคพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็นไปใช้ในฝูงพ่อพันธุ์และเชื้อไวรัสวัคซีนได้แพร่กระจายไปตามฟาร์มต่างผ่านทางน้ำเชื้อ (Botner et al., 1994; Botner et al., 1997)

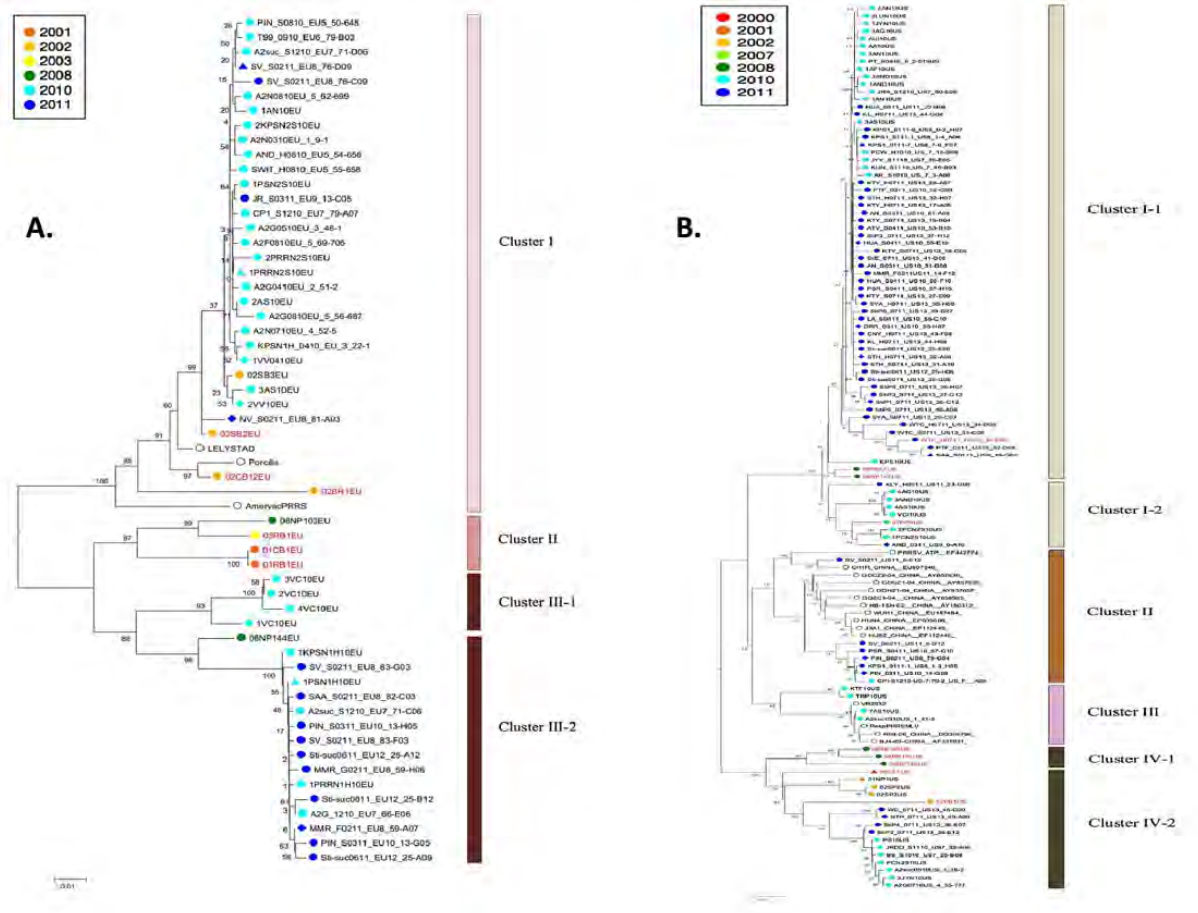
ประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และสามารถแยกเชื้อไวรัส ได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ยุโรป โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรป อยู่ประมาณ 66.42% และมีสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่ในปัจจุบันความชุกของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปเพราะพบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง (Nilubol et al., 2013) ส่วนสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงที่พบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด และการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรไทย พบว่าฟาร์มส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมากกว่า 1 สายพันธุ์ และมากกว่าครึ่งเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ลักษณะการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศไทย ที่พบทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสของประเทศอื่น

จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง ทีมผู้วิจัยจึงได้สำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยมามากกว่า 6 ปี (พ.ศ. 2549 – 2555) โดยแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจำนวนมากกว่า 500 ไอโซเลตจากฟาร์มจำนวนมากกว่า 200 ฟาร์มในประเทศไทย (ภาพที่ 2) (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่รายงานในปีพ.ศ. 2547 โดยเฉพาะไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 คลัสเตอร์ จากเดิมที่ในปีพ.ศ. 2547 พบเพียง 1 คลัสเตอร์ (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013)

จากการสำรวจพบว่านอกจากสายพันธุ์หลักสองสายพันธุ์แล้ว เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก โดยสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 2) และสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ถึง 4 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 2) โดยภายในแต่ละคลัสเตอร์จะมีความต่างกันอยู่ที่ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizaing epitope น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการคือการเปลี่ยนตำแหน่ง N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วน Glycoprotein 5 ทำให้ neutralizing epitope มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลโดยตรงต่อภูมิคุ้มข้ามสายพันธุ์ (cross protection)

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งอาร์เอ็นเอไวรัสนี้เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอไวรัสแล้ว จะไม่มีขบวนการ Proof-reading ที่ใช้ในการตรวจสอบการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้การแปลรหัสนิวคลีโอไทด์มีโอกาสที่จะเกิดความผิดผลาดสูง ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ได้ง่ายและไวรัสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ความสามารถในการกลายพันธุ์ที่สูงนี้สามารถพบได้ทั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป ส่วนทางพันธุกรรมของไวรัสที่พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือส่วนของ ORF 5 ที่แปรเป็นส่วนประกอบของโปรตีนบนผนังเซลล์ (Glycoprotein 5, GP5) (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998) ส่วน GP5 นี้เองที่พบว่ามี neutralizing epitope และเป็นส่วนที่กระตุ้นในเกิดแอนติบอดี้ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเข้าสู่เซลล์ (Neutralizing antibodies) (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002) ส่งผลในการป้องกันการติดเชื้อ

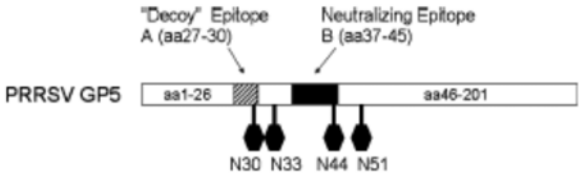
ไวรัสพีอาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมี RNA polymerase enzyme ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสคือ GP5 โดยใน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Meulenberg et al., 1997) โครงสร้าง GP5 ประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ด้านนอกของไวรัส (ectodomain) และทางด้าน N-terminal ประกอบไปด้วย signal



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย A) สายพันธุ์ยุโรป B) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมี RNA polymerase enzyme ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสคือ GP5 โดยใน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Meulenberg et al., 1997) โครงสร้าง GP5 ประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ด้านนอกของไวรัส (ectodomain) และทางด้าน N-terminal ประกอบไปด้วย signal peptide sequence ถัดมาจะมีส่วนของ การเกิด glycosylation ที่เรียกว่า N-linked glycosylation site

โดยที่จะมีไกลโคเจนมาเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน asparagine มีประมาณ 2-4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 3) รวมทั้งมีส่วนของ epitope ส่วนที่เป็น non-neutralizing epitope (decoy epitope A) และส่วนของ neutralizing epitope B โดยที่ส่วน decoy epitope A จะอยู่ส่วนหน้าของ neutralizing epitope B (ภาพที่ 3) (Ostrowski et al., 2002) พบว่า decoy epitope A อยู่บริเวณตำแหน่ง 27-30 และ neutralizing epitope B อยู่ที่ตำแหน่ง 37-45



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของ GP5 ectodomain ; N-liked glycosylation site (N30 , N33 , N44 และ N51) ; decoy epitope A , neutralizing epitope B **(อ้างอิงจาก Meulenberg., j. 1997)**

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีคุณสมบัติเป็น Quasi-species (Goldberg et al., 2003) คือ ทุกครั้งที่ไวรัสเพิ่มจำนวน ส่วนของ Progeny viruses ที่เกิดขึ้น จะมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตัวตั้งต้น มากหรือน้อยแตกต่างกันไป (Domingo, 1992) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า Progeny viruses ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีการดำรงอยู่ในรูปแบบใด เช่น Progeny viruses ทุกตัวสามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ หรือจะมี progeny viruses เพียงบางตัวเท่านั้นที่อยู่รอดและพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ ที่กลายไปเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้ ทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยระบาดจากโรคพีอาร์อาร์เอสก็ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อตัวเดิมหรือต่างชนิดทำให้โรคพีอาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่กล่าวมาข้างต้น มีสาเหตุหลักจากขบวนการ proof reading ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ง่าย แต่ในเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสยังมีอีกขบวนการ recombination ที่สามารถทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของ

ไวรัสสายพันธุ์เดียวกันแต่มากกว่า 2 ไอโซเลต เช่น ไอโซเลตจากสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ พบว่า Progeny viruses ของทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวน สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกกันและจะมีบางส่วนที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ (Genetic recombination) (Yuan et al., 1999)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยการให้เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสแก่สุกรในห้องทดลอง โดยแบ่งสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย NEG US EU และ MIX กลุ่ม NEG เป็นกลุ่มควบคุมลบ กลุ่ม US และ EU เป็นกลุ่มติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) และสายพันธุ์ยุโรป (EU) ตามลำดับ กลุ่ม MIX เป็นกลุ่มติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสร่วมทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แยก progeny viruses และถอดรหัสพันธุกรรม ผลการศึกษาผลว่าสุกรกลุ่ม MIX เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากกว่าสุกรกลุ่มที่ติดเชื้อเดี่ยว และการตรวจ ลำดับเบสยีนส่วน Open reading frame 5 ได้แสดงให้เห็นว่า ภายหลังการให้เชื้อสุกรหนึ่งตัวสามารถตรวจพบไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้หลายสายพันธุ์ (multiple isolates) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) จากไวรัสตั้งต้น และยังพบว่าผลการถอดรหัสพันธุกรรมพบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มสุกรที่ติดเชื้อร่วม (MIX) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อเดี่ยว (สายพันธุ์ยุโรปหรืออเมริกาเหนือเพียงอย่างเดียว) และความแตกต่างทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อร่วมช่วงวันที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบ น้อยกว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ เชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้ช่วงวันที่ 10 และพบไวรัสลูกหลานที่เกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ทุกช่วงเวลา (genetic recombination) ทำให้สรุปผลได้ว่าการติดเชื้อร่วมสองสายพันธุ์สามาถเร่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลาน แต่ละสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงโดยตัวเองแต่จะมีไวรัสที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ตลอดเวลา และไวรัสลูกหลานที่แยกได้หลังจากการให้เชื้อพบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก และ progeny viruses บาง clade จะโดดเด่นออกมา (dominant mutants) (นิลอุบล, โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ progeny viruses ที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับการ

เปลี่ยนแปลงของ neutralizing epitope ของ progeny viruses ที่แยกได้และ cross neutralizing activity ของซีรั่มที่เก็บหลังจากการระบาดต่อ progeny viruses เหล่านี้

ทางทีมผู้วิจัยสนใจรายงานการผลิตวัคซีน ที่ใช้ PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ซึ่งเป็น short linear peptides มา construct กับ plasmodium-derived B-cells epitope (Alexander et al., 2000) ซึ่งสามารถกระตุ้นระดับ neutraling antibody และ cell mediated immune immunity ได้ดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัย

การเตรียมยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน OFR5 ของเชื้อไวรัส PRRS จากฐานข้อมูลใน GenBank มาหาตำแหน่งของ decoy epitope (A) และ neutralizing epitope (B) จากนั้นแทรกชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ของ PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ระหว่าง decoy epitope และ neutralizing epitope จะได้เป็น **modified-ORF5-gene** ที่ใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) อยู่ที่ปลายด้าน 5’ เป็น *Kpn* I และปลายด้าน 3’ เป็น *Xba* I หลังจากนั้นส่งสังเคราะห์ชิ้นส่วนยีนนี้จากบริษัทต่อไป

การเตรียม plasmid DNA จากยีน ORF5

นำส่วนพันธุกรรมของ Modified-ORF5-gene ที่สังเคราะห์ได้ มาเตรียมเป็น plasmid DNA โดยโคลนเข้า vector ที่ชื่อว่า pcDNA 3.1 /CT-GFP-TOPO® อันดับแรก modified-ORF5-gene และ vector จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I และ *Xba* I ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำชิ้นส่วนของ modified-ORF5-gene ที่ถูกตัดแล้ว insert เข้าไปบริเวณ multiple cloning site ของ vector แล้วทำการ ligate เชื่อมระหว่างชิ้นส่วน modified-ORF5 gene กับ vector ได้เป็น plasmid DNA ต่อจากนั้น ทำการเพิ่มจำนวน plasmid DNA ด้วยกระบวนการ bacterial expression system เริ่มจาก นำ vector ที่ได้ transform เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* (JM 109) ด้วยวิธี heat-shock protocol แล้วนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 6 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5,500 rpm แล้วนำแบคทีเรียที่เก็บได้ไปสกัดเอา plasmid DNA และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit สำเร็จรูป (EndoFee® Plasmid Giga Kit, Qiagen) และพัฒนาเป็นดีเอ็นเอวัคซีนที่แทรกชิ้นส่วน PADRE (Alexander et al., 2000; del Guercio et al., 1997) สำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองในสุกรเพื่อหาปริมาณการฉีด

แบ่งสุกรหย่านมปลอดโรค PRRSV ที่อายุ 28 วัน ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่ 1 ทำการให้ฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งเป็น transfer vector เปล่าเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 ไมโครกรัม ส่วนกลุ่มที่ 2 – 4 ทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน โดยเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 250 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ฉีดต้องเป็นเท่าไรจึงให้การกระตุ้นสูงที่สุด

การทดลองประสิทธิภาพในสุกร

แบ่งสุกรหย่านมปลอดโรค PRRSV ที่อายุ 28 วัน ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) สุกรในกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสารละลาย PBS กลุ่มที่ 2 ทำการให้วัคซีนพีอาร์อาร์เอสเชื้อเป็น เข้ากล้ามเนื้อ และทำการฉีดซ้ำอีกครั้งในอีก 14 วันถัดมา และกลุ่มที่ 3 ทำการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าใต้ผิวหนัง และทำการฉีดซ้ำทุกกลุ่มอีกครั้งใน 14 และ 28 วันถัดมา ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และ Periperal blood mononuclear cells (PBMCs) ที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปสกัดซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

การวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำ (Humoral immune response)

วัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำของสุกรจากซีรั่มที่ได้จากการเจาะเลือดโดยวิธี ELISA และ serum neutralization assay

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำโดยวิธี ELISA ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Herdchek®, Idexx, USA) โดยนำซีรั่มที่ได้จากการเจาะเลือด ปล่อยให้เลือดเกิดกระบวนการแข็งตัวแยกเป็นซีรั่มออกมา แล้วนำตัวอย่างมาเจือจางโดยใช้ซีรั่ม 5 ไมโครลิตร ต่อ น้ำยาละลาย 195 ไมโครลิตร นำมาใส่ลงใน plate หลังจากนั้นทำการดูดซีรั่มมาใส่ใน strip coated plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในการทำแต่ละครั้งจะต้องมีตัวควบคุมบวก และตัว

ควบคุมลบ อย่างละ 2 หลุมใน strip หลุมละ 100 ไมโครลิตรต่อหนึ่ง plate ทำการ incubate ไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจะทำการล้าง strip ด้วย washing solution 3 ครั้ง ครั้งละ 300 ไมโครลิตร แล้วเติม substrate (TMB substrate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร incubate ไว้ 15 นาทีจึงใส่ stop solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตรและทำการแปลผล

ซีรั่มนิวทรัลไลเซชั่น (Serum neutralization assay)

นำซีรั่มมาทำซีรั่มนิวทรัลไลเซชั่นต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือตามวิธีของ Nilubol et al., 2004 (Nilubol et al., 2004) โดยย่อนำซีรั่มปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาเจือจางด้วยวิธี 2-fold dilution ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ MEM เขย่าให้เข้ากัน และดูดสารละลายปริมาณ 100 ไมโครลิตรมาใส่ใน microculture 96-well plate ที่มีไวรัสปริมาณ 10^2 $TCID_{50}$/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO_2 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงถ่ายสารละลายลงบน microculture 96-well plate ได้เลี้ยงเซลล์ MARC-145 เตรียมไว้ก่อนหน้านี้เป็นเวลา 2 วันหรือจนกระทั่งมีปริมาณเซลล์สมบูรณ์เต็มพื้นที่ และทำการบ่ม microculture 96-well plate ทั้ง 2 เพลทไว้ ที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO_2 5% เป็นเวลา 2 วัน นำเพลทมาทำการตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยฟอร์มาลีนและย้อมเซลล์ด้วยวิธี direct fluorescent assay (FA) โดยใช้ monoclonal antibody SDOW17 อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน และคิดค่า geometric mean titer เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือดสุกรที่มี Heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็ง มาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) ด้วยวิธี Density gradient centrifugation มีวิธีทำดังนี้

ผสมเลือดที่เก็บมากับ Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 1x อย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยๆปล่อยเลือดที่ผสมกับ Phosphate Buffer Saline (PBS) ลงใน Isoprep® (Sigma, USA) ที่เตรียมไว้ใน 10 มิลลิลิตร พอใส่ครบทุกหลอดจึงนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำออกมาแล้วใช้ Pasteur pipette ดูดเซลล์ PBMCs ทีแยกชั้นอยู่ตรงกลาง

ออกมาใส่ในหลอดรูปทรงกรวย (conical tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละตัวอย่างไว้ในหลอด 1 หลอด หลังแยกเสร็จทุกตัวอย่างนำเซลล์ PBMCs ที่แยกมาไปปั่นล้างด้วย PBS โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,300×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเทส่วนใสทิ้ง แล้วเคาะเซลล์ให้แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนมาโดยการเติมน้ำเปล่าบริสุทธิ์ 2 มิลลิลิตร และ PBS ความเข้มข้น 2x เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม PBS ความเข้มข้น 1x จนเต็มหลอด ทำการปั่นแยก PBMCs อีกรอบที่ความเร็ว 1300×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำออกมาเทส่วนใสทิ้ง เคาะเซลล์ให้แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RMPI complete medium ลงไป 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI, ซีรั่มลูกโค (Invitrogen, USA) 10%, โซเดียมไพรูเวต (Invitrogen, USA) 1mM, 2-เมอแคปโตเอทานอล(2-Mercaptoethanol) (Sigma, USA) 5 มิลลิโมล, เพนิซิลลิน (Invitrogen, USA) 50000, สเตร็ปโตมัยซิน (Invitrogen, USA) 50 มิลลิกรัม โดยกระบวนการเหล่านี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากแต่ละตัวอย่างโดยการย้อมสี Typhen Blue ความเข้มข้น 0.4% เพื่อประเมินปริมาณเม็ดเลือดที่ได้หลังจากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้นำไปใช้ในการวัด การตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาว (proliferative responses) ต่อไป

การวัดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte proliferative assay)

นำเซลล์ PBMCs ที่แยกได้จำนวน 10^7 เซลล์ มาทำการย้อมด้วยสี Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) โดยล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) ออกด้วย PBS ความเข้มข้น 1x ร่วมกับการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 × g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเติม PBS 1 มิลลิลิตร แล้วย้อมด้วยสี Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) ที่เจือจางด้วย FACs (Fluorescene activated cell sorting) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2,000 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นทำการเขย่าทุก 1 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการใส่ซีรั่มลูกโค 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นล้างสี CFSE ออกด้วย PBS และอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ เจือจางเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร และแบ่งเซลล์ plate หลุมละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลุม ต่อ 1 ตัวอย่าง ซึ่งแต่ละหลุมจะมี PBMCs ประมาณ 2.5 x 10^6เซลล์ และมีการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต่างกัน โดยหลุมที่ 1 กระตุ้นด้วย Mock หลุมที่ 2 กระตุ้นด้วย PHA-P หลุมที่ 3 กระตุ้นด้วยไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ PBMCs ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 6 วัน เพื่อวัดการตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferative responses)

การหาค่าดัชนีการเพิ่มจำนวน (proliferative indices)

นำค่าการตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferative responses) จากสุกรแต่ละตัว ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอสแต่ละไอโซเลตมาคำนวณเทียบกับค่าการตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์สุกรตัวเดียวกันที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เพื่อหาค่าดัชนีการเพิ่มจำนวน (proliferative indices) ดังสมการ

$$\text{ดัชนีการเพิ่มจำนวน (proliferative indices)} = \frac{\text{ค่าการเพิ่มจำนวนที่กระตุ้นด้วยไวรัสแต่ละไอโซเลต}}{\text{ค่าการเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้กระตุ้นจากสุกรตัวเดียวกัน}}$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเตรียมยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS

ลำดับเบสของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS แสดงตำแหน่งของ decoy epitope (A) และ neutralizing epitope (B) ดังต่อไปนี้

ATG TTG GAG AAA TGC TTG ACC GCG GGC TGT TGC TCG CGA TTGCTT TCT TTG TGG TGT ATC GTG CCG TTC TGT TTT GCT GTG CTC GCC AAC GCC AGC AAC GAC AGC AGC TCC CAT CTA CAG CTG ATT TAC AAC TTG ACG CTA TGT GAG CTG AAT GGC ACA GAT TGG CTAGCT AAC AAA TTT GAT TGG GCA GTG GAG AGT TTT GTC ATC TTT CCC GTT TTG ACT CAC ATT GTC TCC TAT GGT GCC CTC ACT ACC AGC CAT TTC CTT GAC ACA GTC GCT TTA GTC ACT GTG TCT ACCGCC GGG TTT GTT CAC GGG CGG TAT GTC CTA AGT AGC ATC TAC GCG GTC TGT GCC CTG GCT GCG TTG ACT TGC TTC GTC ATT AGGTTT GCA AAG AAT TGC ATG TCC TGG CGC TAC GCG TGT ACC AGA TAT ACC AAC TTT CTT CTG GAC ACT AAG GGC AGA CTC TAT CGTTGG CGG TCG CCT GTC ATC ATA GAG AAA AGG GGC AAA GTT GAG GTC GAA GGT CAT CTG ATC GAC CTC AAA AGA GTT GTG CTT GATGGT TCC GTG GCA ACC CCT ATA ACC AGA GTT TCA GCG GAA CAATGG GGT CGT CCT TAG

โดยตำแหน่งของ decoy epitope (A) อยู่ลำดับเบสที่ 79 – 90 (ขีดเส้นใต้คู่) และตำแหน่งของ neutralizing epitope (B) อยู่ลำดับเบสที่ 109 – 135 (ขีดเส้นใต้)

ลำดับเบสของ PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่จะถูกแทรกเข้าไประหว่าง decoy epitope (A) และ neutralizing epitope (B) แสดงดังต่อไปนี้

GCC AAG TTC GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT

ภาพรวมของ Modified-ORF5-gene

ที่ปลายด้าน 5’ และ 3’ จะถูกเติมด้วยลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I และ *Xba* I ดังภาพ โดยชิ้นส่วนของ PADRE จะแทรกอยู่ระหว่าง amino acid (aa) ในตำแหน่งที่ 33 และ 34 แสดงดังภาพที่ 4

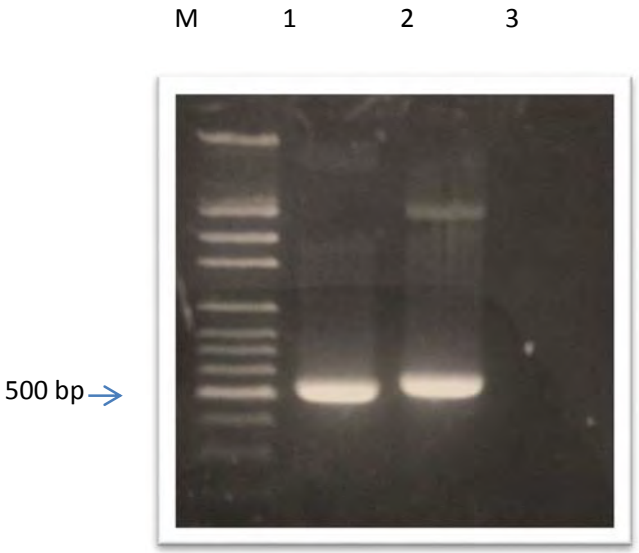
ORF	Protected sites	Protected areas	Motifs to avoid
7-648 [ATG...TAG]	1-6 KpnI [GGTACC] 649-654 XbaI [TCTAGA]		KpnI [GGTACC] XbaI [TCTAGA]

```
        M  L  E  K  C  L  T  A  G  C  C  S  R  L  L  S  L  W  C  I  V
1.  GGTACCATGTTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGGTGTATCGTG
    P  F  C  F  A  V  L  A  N  A  S  N  A  K  F  V  A  A  W  T  L  K  A
70. CCGTTCTGTTTTGCTGTGCTCGCCAACGCCAGCAACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCT
    A  A  D  S  S  S  H  L  Q  L  I  Y  N  L  T  L  C  E  L  N  G  T  D
139. GCCGCTGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGATTTACAACTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGAT
    W  L  A  N  K  F  D  W  A  V  E  S  F  V  I  F  P  V  L  T  H  I  V
208. TGGCTAGCTAACAAATTTGATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTCATCTTTCCCGTTTTGACTCACATTGTC
    S  Y  G  A  L  T  T  S  H  F  L  D  T  V  A  L  V  T  V  S  T  A  G
277. TCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCCTTGACACAGTCGCTTTAGTCACTGTGTCTACCGCCGGG
    F  V  H  G  R  Y  V  L  S  S  I  Y  A  V  C  A  L  A  A  L  T  C  F
346. TTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTGACTTGCTTC
    V  I  R  F  A  K  N  C  M  S  W  R  Y  A  C  T  R  Y  T  N  F  L  L
415. GTCATTAGGTTTGCAAAGAATTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTACCAGATATACCAACTTTCTTCTG
    D  T  K  G  R  L  Y  R  W  R  S  P  V  I  I  E  K  R  G  K  V  E  V
484. GACACTAAGGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTC
    E  G  H  L  I  D  L  K  R  V  V  L  D  G  S  V  A  T  P  I  T  R  V
553. GAAGGTCATCTGATCGACCTCAAAAGAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGCAACCCCTATAACCAGAGTT
    S  A  E  Q  W  G  R  P  *
622. TCAGCGGAACAATGGGGTCGTCCTTAGTCTAGA
```

ภาพที่ 4 แสดงลำดับเบสของ Modified-ORF5-gene

การเตรียม plasmid DNA จาก ORF5

การตรวจสอบการแทรก modified-ORF5 gene หลังจากการ ligate เข้ากับ vector (ภาพที่ 6) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ต่อยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าขนาดของ PCR product ของ modified-ORF5 gene แทรกอยู่มีขนาดใหญ่กว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ ORF5 ปกติดังแสดงในภาพที่ 5



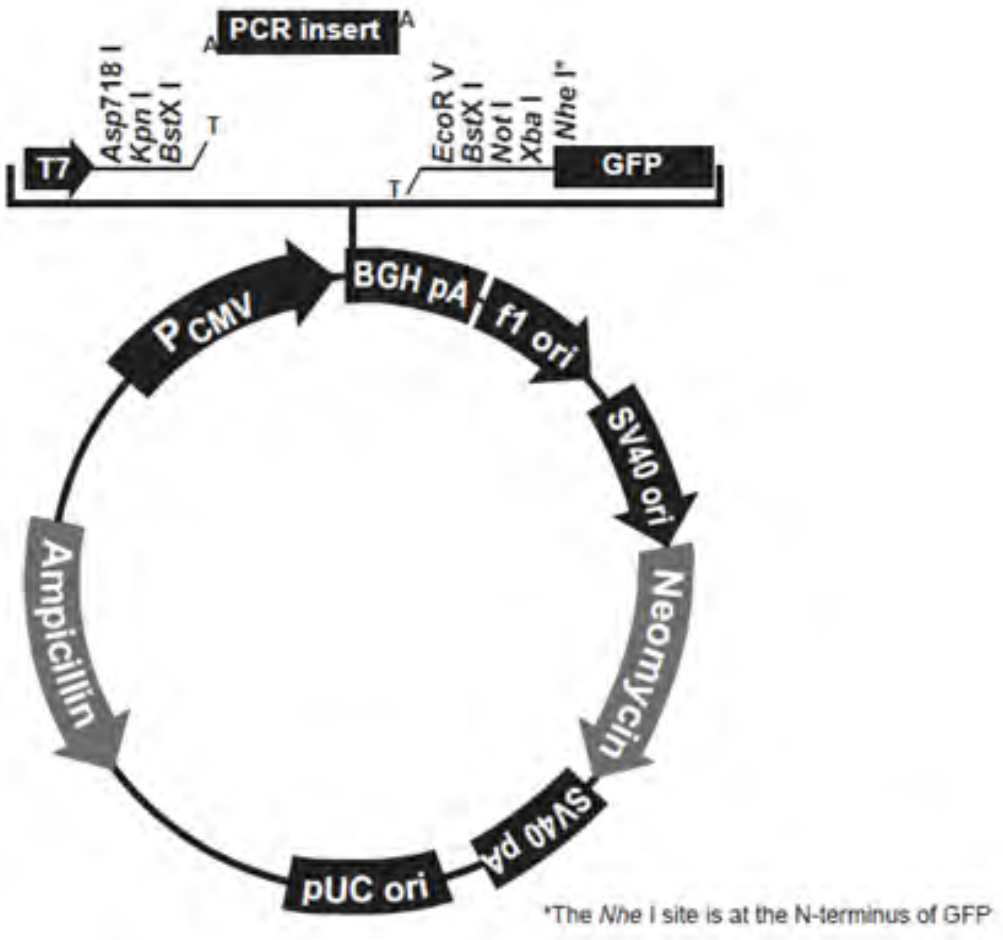
ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาด PCR product ของ modified-ORF5 gene ที่ได้จากการเตรียม recombinant plasmid ด้วย 2% gel electrophoresis

ช่อง M คือ ladder

ช่อง1 คือ ORF5 gene

ช่อง2 คือ plasmid ที่มียีน modified-ORF5 gene

ช่อง 3 คือ ตัวอย่างควบคุมลบ (Negative control)



ภาพที่ 6 แสดง transfer vector ที่ใช้ในการผลิต plasmid DNA

ผลการทดลองในสุกรเพื่อหาปริมาณการฉีด

แบ่งสุกรหย่านมอายุ 28 วัน ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่ 1 ทำการให้ฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งเป็น transfer vector เปล่าเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 ไมโครกรัม ส่วนกลุ่มที่ 2 – 4 ทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน โดยเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 250 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่าง

เลือดที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ฉีดต้องเป็นเท่าไรจึงให้การกระตุ้นสูงที่สุด

จากการทดลองพบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนทั้งสามขนาดไม่ให้ผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำเมื่อวัดโดยวิธี ELISA แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวัดโดยวิธี นิวทรัลไลเซชั่น ต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส Homologous isolate พบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนให้ผลในการกระตุ้นแอนติบอดี และนิวทรัลไลซิ่งไตเตอร์ ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอวัคซีนที่ให้ โดยกลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีนขนาด 500 ไมโครกรัมให้ผลบวกที่ 35 วันหลังจากให้วัคซีน (SN titer > 4) แต่ดีเอ็นเอวัคซีนขนาด 250 ไมโครกรัมให้ผลบวกที่ 42 วันหลังจากให้วัคซีน และมีนิวทรัลไลซิ่งไตเตอร์ที่ SN titer > 4 ส่วนการให้ดีเอ็นเอวัคซีนขนาด 100 ไมโครกรัม ไม่ให้ผลบวกที่ 42 วันหลังจากให้วัคซีน

การทดลองประสิทธิภาพในสุกร

แบ่งสุกรอายุ 28 วัน ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) สุกรในกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสารละลาย PBS กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดวัคซีนพีอาร์อาร์เอสเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) เข้ากล้ามเนื้อ และทำการฉีดซ้ำอีกครั้งในอีก 14 วันถัดมา และกลุ่มที่ 3 ทำการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าใต้ผิวหนัง และทำการฉีดซ้ำทุกกลุ่มอีกครั้งใน 14 และ 28 วันถัดมา ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและ Periperal blood mononuclear cells (PBMCs) ที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปสกัดซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

จากการทดลองพบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนไม่ให้ผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำเมื่อวัดโดยวิธี ELISA แตกต่างจากกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นที่ให้ผลการตอบสนองเมื่อวัดโดยวิธีนี้ตั้งแต่ 7 วันหลังฉีดวัคซีน

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อวัดโดยวิธีนิวทรัลไลเซชั่นจากตารางที่ 1 พบว่ากลุ่มควบคุมลบมีค่าผลเลือดเป็นลบตลอดการทดลอง กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเพิ่มขึ้นของค่า SN titer ที่วัดโดยวิธี serum neutralization assay ตั้งแต่วันที่ 21 หลังได้รับวัคซีน และมีการตอบสนองที่สูงกว่า ในขณะเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีน มีการเพิ่มขึ้นของค่า SN titer ที่วัดโดยวิธี serum neutralization assay ตั้งแต่วันที่ 42 หลังได้รับวัคซีน และมีการตอบสนองที่ต่ำกว่า (วันที่ 35 มี SN titer ที่ต่ำมาก)

ตารางที่ 1

แสดงผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำของสุกรโดยวิธี Serum neutralization assay แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (GMT) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

กลุ่มทดลอง*	จำนวนวันหลังการติดเชื้อ (วัน)						
	0	7	14	21	28	35	42
NEG	0	0	0	0	0	0	0
DNA	0	0	0	0	0	1.00$\pm$0.00	2.20$\pm$1.10
MLV	0	0	0	0.40$\pm$0.49	1.25$\pm$0.50	1.86$\pm$0.70	3.66$\pm$0.58

* กลุ่ม NEG คือกลุ่มควบคุมลบ ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนใด กลุ่ม DNA เป็นกลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีน และกลุ่ม MLV เป็นกลุ่มฉีดวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ที่วัดโดยวิธี Lymphocyte Proliferative assay โดยใช้ CFSE พบว่ากลุ่มควบคุมลบมีค่าผลเลือดเป็นลบตลอดการทดลอง กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 14 หลังได้รับวัคซีน และมีการตอบสนองที่สูง ในขณะเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีน ไม่พบการตอบสนอง ส่วนการตอบสนองที่พบในวันที่ 42 หลังได้รับวัคซีน มีปริมาณที่ค่อยข้างต่ำ

ตารางที่ 2

แสดงผลการค่าดัชนีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMCs ในสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นและดีเอ็นเอวัคซีนโดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลาต่างๆหลังการให้เชื้อ

กลุ่ม	จำนวนวันหลังการติดเชื้อ (วัน)						
ทดลอง	0	7	14	21	28	35	42
NEG	1.15 ± 0.28	1.59 ± 0.23	1.97 ± 0.89	1.16 ± 0.54	1.72 ± 0.24	1.84 ± 0.44	1.84 ± 0.44
DNA	1.67 ± 0.42	1.63 ±1.50	1.63 ± 2.98	1.70 ± 5.16	1.67 ± 3.66	1.45 ± 2.16	2.1 ± 2.16
MLV	1.12 ± 0.24	1.40 ±0.59	5.98 ± 3.55	5.66 ± 4.45	8.11 ± 2.97	7.46 ± 3.47	7.46 ± 3.47

* กลุ่ม NEG คือกลุ่มควบคุมลบ ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนใด กลุ่ม DNA เป็นกลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีน และกลุ่ม MLV เป็นกลุ่มฉีดวัคซีนไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผล

จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง และผลการวิจัยที่ทางทีมผู้วิจัยได้สำรวจ และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยมานาน (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมาก นอกจากนั้นเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก แต่จากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizaing epitope น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการคือการเปลี่ยนตำแหน่ง N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วน Glycoprotein 5 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสทั้ง 4 คลัสเตอร์ พบที่ส่วน decoy epitope และ N-liked glycosylation site เท่านั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วน primary neutralizing epitope ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสตั้งต้นมาก จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน decoy epitope และ N-liked glycosylation site มาก การมี decoy epitope และการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ อาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการสร้างแอนติบอดี้แบบ non-neutralizing antibody แทน neutralizing antibody ทำให้ไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสได้ ถ้ามีการตัดส่วน decoy epitope ออกหรือมีการแทรกด้วยสายพันธุกรรมบางอย่างทำให้ decoy epitope อยู่ห่างจาก neutralizing epitope อาจทำให้ร่างกายมีการกระตุ้น neutralizing antibody ได้ดีขึ้น จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทีมผู้วิจัยสนใจที่จะผลิตวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส รูปแบบใหม่ ที่เป็นพลาสมิคดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่ส่วนระหว่าง decoy epitope, N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope เพื่อเป็นต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับใช้ทดลองในสุกร

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ยังให้ผลได้ไม่ดีในกรณีที่ฉีดเข้าใดผิวหนัง เนื่องจากไม่พบการกระตุ้นภูมิที่สูงเมื่อวัดโดยวิธี serum neutralization assay และ lymphocyte proliferation assay การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกิดช้าเมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อเป็น การไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำของดีเอ็นเอ PADRE เมื่อวัดโดยวิธี ELISA ถือเป็นเรื่องปรกติ เนื่องแอนติบอดีที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ELISA นั้นผลิตมาจากนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน แต่ดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ผลิตต่อโปรตีนในส่วน GP5 ทำให้ ไม่เกิดการตอบสนอง การตอบสนองเมื่อวัด

โดยวิธี serum neutralization assay เป็นตัวบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอวัคซีน PADRE สามารถกระตุ้นสร้างแอนติบอดีได้ แต่อาจต้องหาวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม นอกจากนั้นการฉีดดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ยังให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแม้จะช้าและไม่สูง อาจจะต้องการดำเนินการวิจัยต่อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

งานวิจัยที่ต้องดำเนินการต่อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ประกอบด้วย การเพิ่ม neutralizing epitope หรือ T-cell epitope ลงไปบน Plasmid DNA เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นทั้ง serum neutralizing titer หรือภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ นอกจากนั้นการเพิ่มสารเสริมฤทธิ์หรือ Adjuvant ก็เป็นอีกปัจจัยที่สามารถส่งผลในการเพิ่มกระตุ้มภูมิคุ้มกัน

สรุป

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ยังให้ผลได้ไม่ดีในกรณีที่ฉีดเข้าใดผิวหนัง เนื่องจากไม่พบการกระตุ้นภูมิที่สูงเมื่อวัดโดย serum neutralization assay และ lymphocyte proliferation assay การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกิดช้าเมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อเป็น อย่างไรก็ตามการฉีดดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ยังให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแม้จะช้าและไม่สูง อาจจะต้องการดำเนินการวิจัยต่อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

1. ต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE ระหว่าง N-liked glycosylation site และ neutralizing epitope B

เอกสารอ้างอิง

Alexander, J., del Guercio, M.F., Maewal, A., Qiao, L., Fikes, J., Chesnut, R.W., Paulson, J., Bundle, D.R., DeFrees, S., Sette, A., 2000. Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. J Immunol 164, 1625-1633.

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

Botner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. Vet Microbiol 40, 351-360.

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

Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch Virol 142, 629-633.

Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. J Virol 76, 4750-4763.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., 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 Diagn Invest 4, 117-126.

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

del Guercio, M.F., Alexander, J., Kubo, R.T., Arrhenius, T., Maewal, A., Appella, E., Hoffman, S.L., Jones, T., Valmori, D., Sakaguchi, K., Grey, H.M., Sette, A., 1997. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. Vaccine 15, 441-448.

Domingo, E., 1992. Genetic variation and quasi-species. Curr Opin Genet Dev 2, 61-63.

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

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1995a. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. Arch Virol 140, 745-755.

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

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

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

Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., Laber, J., Elam, M., Kapur, V., 1998. Genetic variation in the PRRS virus. Adv Exp Med Biol 440, 787-794.

Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. J Am Vet Med Assoc 227, 385-392.

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

Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Kortheerakul, K., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Thailand, 2010-2011. Emerg Infect Dis 18, 2039-2043.

Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., Piriyapongsa, J., 2013. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand. Arch Virol 158, 943-953.

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

Pirzadeh, B., Dea, S., 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 79 (Pt 5), 989-999.

Plagemann, P.G., 2004. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. Virus Res 102, 225-230.

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

Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Potapchuk, D., Podgorska, K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. J Gen Virol 87, 1835-1841.

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

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

Wissink, E.H., van Wijk, H.A., Kroese, M.V., Weiland, E., Meulenberg, J.J., Rottier, P.J., van Rijn, P.A., 2003. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. J Gen Virol 84, 1535-1543.

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