5

วิทยาภูมิคุ้มกันของโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS immunology) และการวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS diagnosis)

สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะสร้างแอนติบอดี (Antibody) ต่อไวรัส ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา (Serology) ต่างๆ โดยระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral response) สามารถพบได้เร็วที่สุดภายใน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อจนสูงสุดประมาณ 5 - 6 สัปดาห์ จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงในเวลา 2 - 3 เดือน ส่วนมากจะพบผลบวกในสุกรขุนจนกระทั่งส่งขาย ในขณะที่แอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพชนิดทำลายไวรัส หรือแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่ง (Neutralizing antibody) จะพบในช่วงประมาณ 4 สัปดาห์หลังติดโรค สูงสุดประมาณสัปดาห์ที่ 10 และอยู่ได้นานหลายเดือน (Yoon et al., 1995) ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำสามารถตรวจและเฝ้าดูการเปลี่ยนแปลงได้จากการทดสอบหลายวิธี เช่น วิธีไอเอฟเอ (Indirect fluorescent antibody test) วิธีไอพีเอ็มเอ (Immunoperoxidase monolayer assay) วิธีอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assay) และ วิธีเอสเอ็น (Serum neutralization test) แต่ที่น่าสนใจก็คือ ไม่พบการตอบสนองแบบ Anamnestic response เมื่อสุกรได้รับเชื้อซ้ำจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ชนิดเดียวกัน (Homologous strains) กล่าวคือ จะไม่พบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี เมื่อติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรนเดียวกัน หรือการได้รับวัคซีนพีอาร์อาร์เอส ชนิดเชื้อเป็นซ้ำๆ กัน ซึ่งต่างจากการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น แต่ถ้ามีการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอส ต่างสายพันธุ์ (Heterologous strains) จะพบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี แต่อยู่ในระดับที่ไม่สูงมากเหมือนกับการตอบสนองแบบ Anamnestic response ของไวรัสชนิดอื่น การขาดความคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ (Cross-protection) ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทำให้สุกรที่ติดเชื้อซ้ำจากสายพันธุ์ที่ต่างไป และมีอาการทางคลินิกได้ เช่นเดียวกับการติดเชื้อครั้งแรกในสุกรปลอดเชื้อ

ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำมักสร้างจากการตอบสนองต่อแอนติเจน (Antigen) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักๆ ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ประกอบด้วย โปรตีนนิวคลีโอแคปซิด (Nucleocapsid protein) ที่สร้างมาจากยีนส่วน Open reading frame (ORF) 7 โปรตีนที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มไวรัส (Integral membrane

protein) ที่สร้างมาจากยีนส่วน ORF 6 โปรตีนเอ็นวีลอปชนิดไกลโคโปรตีน (Envelop glycoprotein) ที่สร้างมาจากยีนส่วน ORF5 และโปรตีนที่สร้างมาจากยีนส่วน ORF 2 ORF 3 และ ORF 4 ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อโปรตีนนิวคลีโอแคปซิด ไม่มีผลต่อการทำลายไวรัส ในขณะที่ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อโปรตีนที่อยู่ที่เยื่อหุ้ม เช่นโปรตีนที่สร้างมาจาก ORF 3 ORF 4 และ ORF 5 มีผลในการทำลาย และยับยั้งการติดเชื้อในเซลล์ (Meulenberg et al., 1997; Plana Duran et al., 1997) โดยเฉพาะโปรตีนที่สร้างมาจาก ORF 5 ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มไวรัส ซึ่งมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ของเซลล์ได้ (Suarez et al., 1996) ส่วนโปรตีนที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มไวรัส ที่สร้างมาจากยีนส่วน ORF 6 มีความคงตัวมากที่สุด (Kapur et al., 1996)

การทดสอบทางซีรัมวิทยามีความสำคัญสำหรับแผนการควบคุม และป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส ชุดตรวจสอบที่นิยมใช้ คือ ชุดตรวจสอบชนิดอีไลซ่า (PRRS HerdCheck, IDEXX, Maine, USA) กล่าวคือ ถ้าค่าอัตราส่วน S/P มากกว่า 0.4 แสดงว่า ให้ผลเป็นบวกจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส แต่อย่างไรก็ตาม สุกรที่ติดเชื้อแบบเรื้อรัง ค่าอัตราส่วน S/P อาจจะลดลงต่ำกว่า 0.4 ภายในเวลา 2 - 3 เดือน ในกรณีนี้ ถ้าทราบประวัติของตัวอย่างและฟาร์ม อาจจะคาดคะเนได้ว่า ซีรัมดังกล่าวมาจากสุกรที่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน ซึ่งช่วงอัตราส่วน S/P ของผลลบลวง (False negative) จะมีค่าระหว่าง 0.1-0.4 ในทางปฏิบัติชุดตรวจสอบอีไลซ่าของ IDEXX มีค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบอยู่ที่ร้อยละ 97.4 และค่าความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจสอบอยู่ที่ร้อยละ 99.6 (อธิบายในบทที่ 9)

ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate or non-specific immune response)

การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยธรรมชาติจะผ่าน 2 ช่องทางหลัก คือ ระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในบริเวณเยื่อเมือกของระบบดังกล่าว จะมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ ถึงแม้ภูมิคุ้มกันชนิดนี้ไม่มีความสามารถในการจดจำหรือความจำเพาะต่อแอนติเจน แต่ก็สามารถจำกัดการเพิ่มปริมาณ และการแพร่กระจายของไวรัสได้ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในระบบเยื่อเมือกดังกล่าว

หลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะพบการเพิ่มจำนวนขึ้นของเซลล์เอ็นเค (Natural Killer cells, NK cells) ในกระแสเลือดในวันที่ 5 ก่อนที่จะเริ่มพบที่ปอดในวันที่ 7 หลังติดเชื้อ (Samsom et al., 2000) ร่างกายสุกรจะมีการตอบสนองโดยการหลั่งไซโตไคน์ (Cytokines) กลุ่มต่อต้านไวรัส และกลุ่มสารสื่ออักเสบ (Proinflammatory mediators) ซึ่งประกอบไปด้วย อินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 (Type I interferon) ได้แก่ อินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า (IFN-α) และอินเตอร์เฟียรอน เบต้า (IFN-β) (Van Reeth et al., 1999) ทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า (Tumor necrosis factor, TNF-α) และอินเตอร์ลิวคิน 1 (Interleukins, IL-1) อินเตอร์ลิวคิน 6 (IL-6) อินเตอร์ลิวคิน 8 (IL-8) อินเตอร์ลิวคิน 10 (IL-10) และอินเตอร์ลิวคิน 12 (IL-12) (Thanawongnuwech et al., 2004)

อินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า สร้างจากเซลล์กลืนกินชนิดมาโครฟาจเป็นหลัก และอินเตอร์เฟียรอน เบต้า สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสเป็นหลัก มีฤทธิ์ในการต่อต้านไวรัสในเซลล์ข้างเคียง กระตุ้นการทำงานของ เซลล์เอ็นเค เหนี่ยวนำให้มีการแสดงเอ็มเอชซี คลาสที่ 1 (Class I major histocompatibility complex, MHC class I) ในเซลล์

ที่มีการติดเชื้อไวรัส และนำไปสู่การตอบสนองแบบจำเพาะ เช่น การเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 2 (Type II interferon) หรืออินเตอร์เฟียรอนแกมม่า (IFN-γ) แต่การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส พบว่า มีการตอบสนองของอินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งการตอบสนองของอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 นี้จะมีปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Murtaugh et al., 2002; Chung and Chae, 2003)

สารสื่ออักเสบชนิด ทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า สร้างจากเซลล์มาโครฟาจเป็นหลัก มีฤทธิ์ส่งเสริมปฏิกิริยาการอักเสบ กระตุ้นการทำงานของเซลล์กลืนกิน และเหนี่ยวนำให้มีการแสดง เอ็มเอชซีคลาสที่ 1 (MHC class 1) และ 2 ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute phase protein) ออกมาจากตับ นอกจากนี้สารสื่ออักเสบชนิดทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า ที่หลั่งจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์มาโครฟาจข้างเคียงที่ไม่ได้ติดเชื้อ (Choi and Chae, 2002) แต่จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส พบว่า มีการตอบสนองของสารสื่ออักเสบชนิดทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า จากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสต่ำกว่าไวรัสอื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน (Lopez-Fuertes et al., 2000) รวมทั้งยังพบปริมาณของอินเตอร์ลิวคิน 1 ที่ลดลงด้วย (Choi et al., 2002)

อินเตอร์ลิวคิน 1 สร้างจากเซลล์มาโครฟาจเป็นหลัก มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์เอ็นเค และเซลล์ลิมโฟไซต์ ทั้งชนิดที และชนิดบี โดยทำให้เกิดการแบ่งตัว และเพิ่มความสามารถในการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน 6 ซึ่งเป็นโปรตีนอักเสบแบบเฉียบพลันชนิดหนึ่งที่สร้างจากเซลล์มาโครฟาจ เป็นหลักเช่นกัน มีบทบาทสำคัญในการทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี พัฒนาไปเป็นพลาสมาเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่สร้างสารภูมิต้านทานส่วนอินเตอร์ลิวคิน 8 สร้างจากเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการอักเสบ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์กลืนกินชนิดนิวโทรฟิล ในขณะที่อินเตอร์ลิวคิน 10 สร้างจาก เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด ที แบบ Th2 มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการอักเสบโดยลดการทำงานของเซลล์มาโครฟาจและเซลล์ลิมโฟไซต์ ส่วนอินเตอร์ลิวคิน 12 สร้างจาก เซลล์มาโครฟาจเป็นหลัก มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เอ็นเค ซึ่งจากการศึกษาพบว่า หลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สุกรมีการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าว ในปริมาณที่ต่ำ ส่งผลให้มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อไวรัสค่อนข้างช้า ทำให้ไวรัสคงอยู่ในร่างกายสุกรได้นาน (Van Reeth and Nauwynck, 2000; Murtaugh et al., 2002) แต่พบว่า ไซโตไคน์ ชนิด อินเตอร์ลิวคิน 10 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน มีปริมาณค่อนข้างสูงหลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ซึ่งกลไกที่ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 ออกมาเร็วกว่าที่ควรนั้น อาจเพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร (Thanawongnuwech et al., 2001; Chung and Chae, 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003; Suradhat et al., 2003) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถตรวจพบอินเตอร์ลิวคิน 10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว ได้ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึง วันที่ 28 ของการติดเชื้อ (Feng et al., 2003) แต่ในลูกสุกรที่ติดเชื้อจากแม่ขณะอุ้มท้อง จะพบปริมาณอินเตอร์ลิวคิน 10 สูงสุดในเซลล์จากน้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage fluid) เมื่อลูกสุกรอายุ 2 สัปดาห์ จนถึงอายุ 4 สัปดาห์ (Johnsen et al., 2002) จากการทดลองในประเทศไทย

โดยใช้ไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบการเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน 10 ในเซลล์จากน้ำล้างปอด ตั้งแต่วันที่ 9 แต่ไม่พบความแตกต่างในการเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์ลิวคิน10 ในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสที่ทดสอบ (เพิ่มศักดิ์ และคณะ, 2547) ซึ่งจากกลไกนี้การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 ออกมาเร็วกว่าที่ควร อาจส่งผลถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ ทำให้ร่างกายสัตว์ไม่สามารถกำจัดไวรัสพีอาร์อาร์เอส ออกจากร่างกายได้ หรืออาจส่งผลกระทบต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทำวัคซีนชนิดอื่นๆ เช่น พบว่า การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่งผลในทางลบต่อระบบภูมิคุ้มกันและการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะหลังจากการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร (Li and Yang, 2003; Suradhat et al., 2006) นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน 10 เร็วเกินไปยังจะมีผลทำให้เกิดความไวต่อการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน เนื่องจากการกดการทำงาน ของอินเตอร์เฟียรอนที่จำเป็นต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Feng et al., 2003) ซึ่งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจด้วยโปรตีนชนิดรีคอมบิแนนต์ของอินเตอร์ลิวคิน 12 จะไปมีผลในการกระตุ้นการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ได้สูง และยังลดปริมาณของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ที่ติดเชื้อได้ด้วย (Carter and Curiel, 2005)

ปัจจัยที่อาจมีอิทธิพลต่อความรุนแรงของโรคพีอาร์อาร์เอส คือ ภาวะที่มีแอนติบอดีแบบไม่จำเพาะ ร่วมกับมีการติดเชื้อซ้ำจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ต่างสเตรน แอนติบอดีสามารถจับกับอนุภาคไวรัสได้ แต่ไม่สามารถทำลายไวรัสได้ และให้ผลในทางตรงกันข้ามในการเพิ่มโอกาสให้เซลล์กลืนกินชนิดมาโครฟาจมาเก็บกิน และนำไวรัสพีอาร์อาร์เอส เข้าสู่เซลล์มาโครฟาจได้เร็วขึ้น เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ชอบที่จะเจริญในเซลล์กลืนกินชนิดมาโครฟาจอยู่แล้ว จึงก่อให้มีการเพิ่มจำนวนไวรัสพีอาร์อาร์เอส อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้สุกรที่ติดเชื้อซ้ำ และมีอาการทางคลินิกรุนแรงกว่าเดิม เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าเอดีอี (Antibody dependent enhancement, ADE) ซึ่งปรากฏการณ์เอดีอีนี้ ได้รับการทดสอบว่า เกิดขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ และตัวสัตว์ทดลอง (Yoon et al., 1996; Cancel-Tirado et al., 2004) แต่ยังไม่มีรายงานปรากฏการณ์เอดีอี ในภาคสนาม หรือสุกรในฟาร์ม

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or specific immune response)

ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral immune response)

หลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถตรวจพบอิมมูโนกลอบูลินชนิด เอ็ม (Immunoglobulin M) ได้เร็วภายใน 5 ถึง 7 วันหลังการติดเชื้อ และสามารถตรวจพบอิมมูโนกลอบูลินชนิด จี ได้ภายใน 7 ถึง 14 วัน หลังติดเชื้อ (Murtaugh et al., 2002) การทดสอบด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่า จะมีระดับแอนติบอดีสูงสุดที่ 5 ถึง 6 สัปดาห์หลังติดเชื้อ และจะคงอยู่เป็นระยะเวลานานกว่า 300 วัน (Horter et al., 2002) อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่สร้างขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อพบว่าไม่สามารถทำลายไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดได้ ส่วนแอนติบอดีชนิดที่มีความสามารถในการทำลายไวรัสพีอาร์อาร์เอส หรือแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่ง จะมีการตอบสนองที่ค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่น โดยจะเริ่มพบที่ 2 ถึง 3 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Murtaugh et al., 2002) หรือโดยทั่วไปประมาณ 4 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Meier et al., 2003) จากการทดลองใน

ประเทศไทยพบว่า แอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่ง จะเริ่มสูงขึ้นที่ 6 สัปดาห์ หลังจากได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป (ระพี, 2547) ส่วนการปรากฏของแอนติบอดีชนิดที่ทำลายไวรัสได้ จะสัมพันธ์กับการกำจัดเชื้อไวรัสออกจากระบบไหลเวียนเลือด อย่างไรก็ตามยังสามารถพบการคงอยู่ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้ เนื่องจากเป็นการติดเชื้อแบบแฝงเรื้อรัง (Persistent infection) ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ซึ่งสุกรบางตัวสามารถพบได้นานมากกว่า 150 วัน หลังจากได้รับเชื้อ และสุกรยังคงสามารถขับเชื้อไวรัสได้เป็นระยะๆ (Allende et al., 2000) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในทอนซิล และเลือดด้วยวิธีพีซีอาร์ ที่ระยะเวลามากกว่า 251 วัน หลังการติดเชื้อ (Wills et al., 2003) โดยแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อสายพันธุ์หนึ่ง จะไม่ให้ความคุ้มกันโรคต่อไวรัสต่างสายพันธุ์หรือต่างสเตรน (ระพี, 2547) และมีการให้ความคุ้มกันโรคในปริมาณที่ต่ำ เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของไวรัสที่เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่งที่ต่างกัน บางการศึกษาพบว่า มีสาเหตุมาจากส่วนของโปรตีนนิวคลีโอแคปซิดของไวรัส (Rowland and Yoo, 2003) ในขณะที่บางรายงานบ่งชี้ว่า เกิดจากความแตกต่างในส่วนของไกลโคโปรตีนที่แสดงออกจากส่วนยีน ORF5 ซึ่งเป็นเป้าหมายสำคัญในการสร้างแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่ง (Jiang et al., 2003)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีบทบาทสำคัญในการกำจัดไวรัสที่ติดเชื้อภายในเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำไม่สามารถเข้าถึงได้ ประกอบไปด้วย เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที ที่มี $CD4^+$ โดยทั่วไป คือ helper T cells (Th) และเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที ที่มี $CD8^+$ หรือเซลล์ซีทีแอล (Cytotoxic T lymphocytes, CTL)

เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที แบบ Th จะทำงานผ่านการกระตุ้นจากเอ็มเอชซี คลาสที่ 2 ทำหน้าที่สร้างไซโตไคน์ กระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด บี ให้มีการสร้างแอนติบอดี และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ ซีทีแอล เซลล์เอ็นเค และเซลล์มาโครฟาจ ส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที สามารถแบ่งออกเป็นสองแบบตามลักษณะของไซโตไคน์ ที่สร้างขึ้น คือ แบบ Th1 ที่สร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า และอินเตอร์ลิวคิน 12 ซึ่งจะสนับสนุนการตอบสนองภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์และแบบ Th2 ที่สร้าง อินเตอร์ลิวคิน 4 อินเตอร์ลิวคิน 5 อินเตอร์ลิวคิน 6 อินเตอร์ลิวคิน 10 และอินเตอร์ลิวคิน 13 ซึ่งมีผลในการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ ส่วนเซลล์ซีทีแอล จะทำงานผ่านการกระตุ้นจากเอ็มเอชซี คลาสที่ 1 ทำหน้าที่กำจัดไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์ และสามารถพบการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ โดยจะพบการเพิ่มปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด ที ที่จำเพาะต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ทั้งชนิด Th และชนิดซีทีแอล ในช่วง 4 ถึง 12 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ และคาดว่าโปรตีนเมทริกซ์ (Matrix protein) เป็นเป้าหมายสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Bautista and Molitor, 1997; Bautista and Molitor, 1999; Murtaugh et al., 2002)

อินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 2 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น มีฤทธิ์คล้ายกับอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 แต่มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยนอกจากจะสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เอ็นเค ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสภายในเซลล์ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดง เอ็มเอชซี คลาสที่ 1 แล้ว ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดง เอ็มเอชซี คลาสที่ 2 ได้

นอกจากนี้ยังมีส่วนทำให้เซลล์ซีทีแอล ที่ยังไม่ถูกกระตุ้น (Resting) เจริญไปเป็นเซลล์ซีทีแอล ที่สมบูรณ์เต็มที่ จึงเป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ อย่างไรก็ตามพบว่า การตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ค่อนข้างใช้เวลานานกว่าปกติ ถึงแม้จะมีการทดลองกระตุ้นการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่าด้วยสื่อวัคซีนก็ตาม (Meier et al., 2003)

การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะสามารถตรวจพบการพัฒนาการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด ที หลังจากติดเชื้อไปแล้ว 4 สัปดาห์ (Bautista and Molitor, 1997) แต่การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสจะพบได้ในสัปดาห์ที่ 5-9 หลังจากติดเชื้อ และพบว่า เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด $CD4^+$ เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองหลังจากติดเชื้อไปแล้วประมาน 10 สัปดาห์ (Lopez-Fuertes et al., 2000) สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวในกระแสเลือด (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ของสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนด้วยเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน 12 พบว่า เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด $CD8^+$ และ $CD4^+$ $CD8^+$ เป็นกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้น (Zuckermann and Husmann,1996) จากการศึกษาเซลล์ในน้ำล้างปอด พบว่า มีประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด $CD8^+$ ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์เอ็นเค และเซลล์ซีทีแอล ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดวันที่ 4 และ 21 หลังจากติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Samsom et al., 2000)

ผลของไวรัสพีอาร์อาร์เอสต่อการสร้างไซโตไคน์ (Effect of PRRSV on cytokine production)

ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับไซโตไคน์ ที่มีบทบาทเกี่ยวกับวิทยาภูมิคุ้มกัน พยาธิวิทยา และ สรีรวิทยาทั้งในคนและสัตว์ รวมทั้งสุกรมากขึ้น โดยพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะมีบทบาทเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ

ไซโตไคน์ที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ อินเตอร์เฟียรอน ชนิดที่ 1 ทีเอ็นเอฟ อัลฟา อินเตอร์ลิวคิน 1 อินเตอร์ลิวคิน 6 อินเตอร์ลิวคิน 10 และอินเตอร์ลิวคิน 12 ซึ่งไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะลดระดับการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายในเซลล์มาโครฟาจ โดยเฉพาะอินเตอร์เฟียรอน ชนิดที่ 1 ทั้งในการศึกษาในห้องปฏิบัติการและตัวสัตว์ (Albina et al., 1998; Van Reeth et al., 1999) อินเตอร์เฟียรอน อัลฟา เป็นไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์มาโครฟาจ ส่วนอินเตอร์เฟียรอน เบต้า สร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์สร้างเส้นใยชนิด Fibroblasts โดยไซโตไคน์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโดยกระบวนการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น 2', 5' oligoadenylate synthetase ซึ่งไปขัดขวางกระบวนการถอดรหัสของ อาร์เอ็นเอ หรือดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสก่อโรค เป็นต้น โดยเฉพาะอินเตอร์เฟียรอน อัลฟา เป็นไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะในระบบทางเดินหายใจ (Van Reeth et al., 1999; Thanawongnuwech et al., 2001) และสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เอ็นเคในการติดเชื้อไวรัสโดยอินเตอร์เฟียรอน อัลฟา ที่ถูกเหนี่ยวนำจะเป็น

ตัวกระตุ้น Nuclear transcription factor (NF) **K**B ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ โดยควบคุมการแปลรหัส (Transcription) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า 100 ชนิด นอกจากนี้ อินเตอร์เฟียรอน ชนิดที่ 1 ยังมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถการแสดงโมเลกุลเอ็มเอชซี คลาสที่ 1 ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนให้กับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะสามารถตรวจพบ อินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า ในบริเวณที่ติดเชื้อ ได้ในช่วง 3-10 วันหลังติดเชื้อ ซึ่งช้ากว่าการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine influenza virus) และไวรัสพีอาร์ซีวี (Porcine respiratory coronavirus) และยังพบปริมาณของอินเตอร์เฟียรอน อัลฟ่า จากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในระดับที่ต่ำกว่าอีกด้วย (Van Reeth et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Chung et al., 2004) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไซโตไคน์และความรุนแรงของไวรัสยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้แล้วเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ยังไปมีผลในการกดสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์ลิวคิน 1 และทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า (Choi et al., 2002) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบที่สร้างมาจากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นจากการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการทำลายเชื้อ และกระตุ้นขบวนการ Apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย (Van Reeth et al., 2002) ดังนั้นการขาดไซโตไคน์ที่จำเป็น ร่วมกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ ที่ไม่มีประสิทธิภาพ อาจส่งผลให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพีอาร์อาร์เอส ได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง อินเตอร์ลิวคิน 6 (Thanawongnuwech et al., 2001) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาททั้งการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ และไม่จำเพาะต่อการติดเชื้อ โดยพบว่า ไซโตไคน์ชนิดนี้สร้างมาจากเซลล์มาโครฟาจ เซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือด เซลล์สร้างเส้นใยชนิด Fibroblasts และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อจุลชีพโดยผ่านไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์ลิวคิน 1 และทีเอ็นเอฟ อัลฟ่า นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 12 เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้จากน้ำล้างปอด (Thanawongnuwech et al., 2001) โดยอินเตอร์ลิวคิน 12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ โดยกระตุ้นการ พัฒนาของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที โดยเฉพาะเซลล์ naive Th เป็น Th1 และกระตุ้นการทำงานของเซลล์นำเสนอแอนติเจน (Antigen presenting cells) ทั้งเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เดนไดรติคได้ด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอส นั้นสามารถเหนี่ยวนำลักษณะการสร้างไซโตไคน์ทั้งในรูปแบบที่ลดความสามารถ และเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกหรือการทำงานร่วมกันของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ หลังจากได้รับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้ชัดเจนนัก

นอกจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จะมีผลต่อการสร้างไซโตไคน์ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแล้ว ยังไปมีผลต่อไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย โดยเฉพาะอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ซึ่งเป็นอินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 2 ที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์

ต่อการติดเชื้อไวรัสในสุกร (Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001) และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของกระบวนการอักเสบ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัสแล้ว อินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ยังเป็นตัวประสานการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย (Biron, 1997) จากการศึกษาถึงชนิดของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า โดยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวด้วย PMA และ Iodomycin และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Flow cytometry พบว่า อินเตอร์เฟียรอน แกมม่า สร้างจากเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที แบบอัลฟ่าเบต้า ($\alpha\beta$ T cells) และเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที แบบแกมม่าเดลต้า ($\gamma\delta$ T cells) และ เซลล์โมโนไซต์เท่ากับร้อยละ 70 ร้อยละ 1 และร้อยละ 2 ตามลำดับ (Rodriguez-Carreno et al., 2002) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถตรวจพบการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ในเซลล์ที่ต่อมน้ำเหลือง และปอด (Rowland et al., 2001) และในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (Lopez-Fuertes et al. 2000; Thanawongnuwech et al., 2001) โดยพบเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ที่จำเพาะต่อเชื้อในวันที่ 14 หลังจากติดเชื้อและสูงที่สุด ในวันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ (Olin et al., 2005) ซึ่งช้ากว่าการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น สุกรที่ได้รับเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าเทียม จะสามารถตรวจวัดไซโตไคน์ชนิดนี้ต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมได้ในวันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ (Hoegen et al., 2004) และในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สามารถตรวจพบอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ได้ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ (Suradhat et al., 2001) นอกจากนี้พบว่า ลูกสุกรที่คลอดจากแม่ที่ได้รับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ผ่านทางช่องคลอดแม้ว่าสามารถตรวจพบอินเตอร์เฟียรอน แกมม่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว สูงขึ้นหลังคลอด 2 สัปดาห์ แต่กลับลดลงที่ 4 สัปดาห์หลังคลอด (Aasted et al., 2002) จากการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่า อินเตอร์เฟียรอน แกมม่า สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ภายในเซลล์ได้ (Bautista and Molitor, 1999) ซึ่งในการศึกษาให้เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรนเดิม ในสุกรที่เคยได้รับเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรนนั้นมาก่อน สุกรจะไม่แสดงอาการป่วยใดๆ และสามารถลดปริมาณไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในกระแสเลือดได้ เมื่อให้ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรนเดิมซ้ำ แสดงให้เห็นว่า สุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมาก่อนน่าจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ แต่ในหลายการทดลองกลับพบว่าการติดเชื้อครั้งแรกในสุกร สามารถป้องกันการติดเชื้อครั้งที่สองได้เพียงบางส่วน และป้องกันได้ดีเฉพาะในสายพันธุ์ที่เคยได้รับมาก่อนเท่านั้น (Lager et al., 1997; Mengeling et al., 2003) ซึ่งแม้การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ได้ แต่ก็ไม่ดีเท่าที่ควร จึงส่งผลให้สุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำ (Lager et al., 1999)

อินเตอร์ลิวคิน 10 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทกับการทำงานของเซลล์ ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ รวมถึงการสร้างไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุชนิด Keratinocytes เซลล์โมโนไซต์ เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี และเซลล์ลิมโฟไซต์ ชนิดที เป็นต้น สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะพบว่าอินเตอร์ลิวคิน 10 มีบทบาทในระยะแรกของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ดังจะเห็นได้จากการกระตุ้นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจนด้วยสารแอลพีเอส (Lipopolysaccharide, LPS) พบว่า เซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน 10

ในระยะแรกๆ จะมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด อินเตอร์ลิวคิน 12 และทีเอ็นเอฟ อัลฟา จากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น เนื่องจากอินเตอร์ลิวคิน 12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า อินเตอร์ลิวคิน 10 มีบทบาทสำคัญทางอ้อมในการกดการสร้างอินเตอร์เฟียรอน แกมม่า ด้วย (Labarque et al., 2003) นอกจากนี้พบว่า อินเตอร์ลิวคิน 10 ยังมีบทบาทในการยับยั้งการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เดนไดรติค (Wu et al., 1993) ซึ่งส่งผลให้สุกรที่ติดเชื้อมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ไม่มีประสิทธิภาพ (Mocellin et al., 2003) แม้อินเตอร์ลิวคิน 10 จะมีบทบาทสำคัญในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ แต่ก็มีรายงานว่า อินเตอร์ลิวคิน 10 สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี ได้ นอกจากนี้ อินเตอร์ลิวคิน 10 ยังสามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเซลล์ เอ็นเค ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้อีกด้วย (Mocellin et al., 2003)

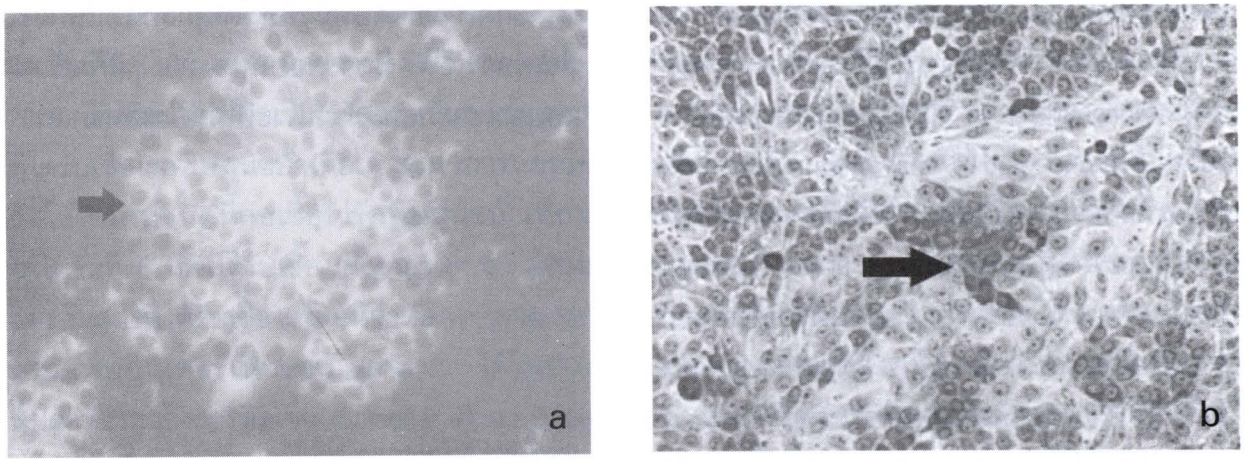
ปัจจุบันมีรายงานว่า สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สร้าง อินเตอร์ลิวคิน 10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของสุกรได้ ทั้งจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการและตัวสุกร (Thanawongnuwech et al., 2001; Suradhat et al., 2003; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) การเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 ส่งผลให้ความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มาโครฟาจลดลง โดยไปมีผลยับยั้งการนำเสนอ เอ็มเอชซี คลาสที่ 2 ที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน 10 นั้น สัมพันธ์กับการลดลงของกระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์มาโครฟาจอีกด้วย (Pampusch et al., 1998; Johnsen et al., 2002) โดยสุกรที่ติดเชื้อสามารถตรวจพบอินเตอร์ลิวคิน 10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวตั้งแต่วันที่ 1 ของการติดเชื้อ และพบได้นานถึง 28 วันหลังการติดเชื้อ (Feng et al., 2003) สำหรับในเซลล์ที่ได้จากน้ำล้างปอดจะพบได้ในวันที่ 9 และวันที่ 15 หลังการติดเชื้อ โดยไม่พบความแตกต่างในการเหนี่ยวนำการสร้าง อินเตอร์ลิวคิน 10 จากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกา (เพิ่มศักดิ์และคณะ, 2547) นอกจากการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแล้ว ยังพบว่าอินเตอร์ลิวคิน 10 มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด โดยในระยะหลังนี้มีรายงานว่า สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี ในระยะต้นของการติดเชื้อได้เช่นกันโดยเฉพาะในทอนซิล ดังนั้นจึงพบแอนติเจนต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงในระยะแรกๆ และพบได้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีการติดเชื้อแฝงในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lamontagne et al., 2003) ซึ่งความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อนี้ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะ และไม่จำเพาะที่ไม่มีประสิทธิภาพ

การวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS diagnosis)

การวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอสค่อนข้างที่จะเป็นความรู้สึกเชิงจิตวิสัย (Subjective) จากประสบการณ์ในภาคสนาม ซึ่งการวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส ตามหลักวิชาการประกอบด้วย การซักประวัติ อาการทางคลินิก รอยโรคทางพยาธิวิทยา การวิเคราะห์ผลผลิต ผลทางซีรัมวิทยา และการตรวจพบการปรากฏของไวรัสพีอาร์อาร์เอส อย่างไรก็ตามโรคพีอาร์อาร์เอส ควรเป็นโรคหนึ่งในการวินิจฉัยแยกแยะ (Differential diagnosis) เมื่อพบอาการของโรคระบบทางเดินหายใจในลูกสุกรทุกอายุ รวมทั้งรอยโรคสมองอักเสบ (Thanawongnuwech et al., 1997) รอยโรคจุดเลือดออกที่ผิวไต (ศศิวิมล และคณะ, 2547) ความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกร และประสิทธิภาพของผลผลิตต่ำกว่าที่ควรจะเป็นบางครั้งอาจไม่พบอาการทางคลินิกใดๆ ในฝูงสุกร มิได้หมายความถึงการปลอดจากโรคพีอาร์อาร์เอส เนื่องจากมีปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 4

การวิเคราะห์ประวัติและผลผลิตมีส่วนช่วยในการวิเคราะห์โรคพีอาร์อาร์เอส โดยทั่วไปมักพบประวัติการแท้ง คลอดก่อนกำหนด จำนวนลูกต่อครอกลดลง อัตราการตายก่อนหย่านมสูงขึ้น อัตราการผสมติด และอัตราการเข้าคลอดลดลง ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอัตราการแพร่กระจายของเชื้อในฝูง ร่วมกับลักษณะการจัดการของแต่ละฟาร์ม ความหนาแน่น และการเคลื่อนย้ายสุกร (Pig flow) ตามช่วงอายุ การระบาดในฝูงครั้งแรกของไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ใหม่ มักพบอาการทางคลินิกในแม่สุกรทุกอายุของการให้ผลผลิต เนื่องจากไม่มีภูมิคุ้มกันมาก่อน ในฟาร์มที่มีโรคพีอาร์อาร์เอส เป็นโรคประจำถิ่น (Endemic disease) ปัญหาระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกรสาว มักเกิดในกรณีของการปรับสภาพแม่สุกรสาว (Gilt acclimation) กับไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ไม่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นปัญหาของการจัดการในฟาร์ม (Bierk et al., 2001)

สำหรับการตรวจและการวิเคราะห์ผลทางซีรัมวิทยา มีการกล่าวไว้ในบทที่ 9 โดยสามารถตรวจหาแอนติบอดีจากการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้หลายวิธี เช่น วิธีไอเอฟเอ (Immunofluorescent antibody test, IFA) (รูปที่ 5.1a) (Yoon et al., 1992) วิธีไอพีเอ็มเอ (Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) (รูปที่ 5.1b) (Wensvoort et al., 1991) วิธีอีไลซ่า (Cho et al., 1997) และวิธีเอสเอ็น (Serum neutralization, SN) (ระพี, 2547; Yoon et al., 1994)) วิธีที่นิยมในการตรวจทางซีรัม



รูปที่ 5.1 5.1a. การติดสีฟลูออเรสเซนต์เรืองแสง ของแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในไซโทพลาซึม (ลูกศร) ของเซลล์ MARC-145 ด้วยวิธีไอเอฟเอ 5.1b. การติดสีน้ำตาลแดงของแอนติเจน ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (ลูกศร) ในเซลล์ MARC-145 ด้วยวิธีไอพีเอ็มเอ

วิทยาในปัจจุบันคือวิธีอีไลซ่า ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด และพัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ เช่นที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในประเทศไทยมีการใช้ชุดตรวจสอบอีไลซ่าที่มีขายในท้องตลาดอยู่ 3 ชนิด คือ บริษัท IDEXX Laboratories (Westbrook, Maine, USA) บริษัท Laboratorios Hipra (Girona, Spain) และ บริษัท Bommeli Diagnostics (Switzerland) ซึ่งการอ่านผลจะคล้ายกัน ในแง่การให้ผลบวกต่อการปรากฏของแอนติบอดีที่สามารถตรวจได้ทั้งสองสายพันธุ์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส แต่วิธีการตรวจ การอ่านผล ความไว และความจำเพาะของชุดตรวจสอบ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรายละเอียดของแต่ละบริษัท ข้อดีของการตรวจด้วยวิธีอีไลซ่าคือ สามารถตรวจตัวอย่างครั้งละจำนวนมากๆ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีในการช่วยตรวจคัดกรองโรค (Screening test) ในขณะที่วิธีไอเอฟเอ และวิธีไอพีเอ็มเอ มีข้อจำกัดที่สามารถตรวจได้เฉพาะไวรัสที่มีแอนติเจนใกล้เคียงกับไวรัสที่ใช้ในการเตรียมสำหรับการทดสอบ นอกจากนี้ยังต้องตระหนักถึงแอนติบอดีที่ตรวจพบ ซึ่งชุดตรวจสอบอีไลซ่าส่วนมากไม่สามารถแยกแอนติบอดีที่ได้รับมาจากแม่ (Maternal antibody) หรือแอนติบอดีที่ได้จากการทำวัคซีนออกจากแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ ซึ่งแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่สามารถพบอยู่ได้นานประมาณ 5 - 10 สัปดาห์หลังคลอด (Houben et al., 1995) ส่วนวิธีไอเอฟเอ วิธีไอพีเอ็มเอ และวิธีอีไลซ่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีครั้งแรกหลังจากติดเชื้อประมาณ 7-14 วัน และมีปริมาณสูงสุดภายใน 30-50 วัน ก่อนที่จะค่อยๆ ลดลง จนตรวจให้ผลเป็นลบภายใน 4-6 เดือน แต่แม่สุกรบางตัวอาจให้ผลบวกจากการตรวจโดยวิธีอีไลซ่านานกว่า 2-3 ปี โดยการตรวจโดยวิธีเอสเอ็นไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากไม่มีความคุ้มข้ามสายพันธุ์ และมีความไวของการทดสอบต่ำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสที่ใช้ตรวจ (ระพี, 2547) และต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 21-42 วัน ในการตรวจพบแอนติบอดีชนิดนิวทรัลไลซิ่ง การตรวจโดยใช้ตัวอย่างซีรัมคู่ (Paired sera) ที่เก็บจากสุกรตัวเดียวกันที่ติดเชื้อเฉียบพลันและเมื่อหายป่วยแล้ว มีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยโรคเช่นเดียวกับโรคติดเชื้ออื่นๆ ร่วมกับการตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยการแยกเชื้อ หรือโดยวิธีพีซีอาร์

วิธีไอเอฟเอค่อนข้างมีความจำเพาะสูง แต่ความไวของการทดสอบไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับตัวสุกรเอง (Yoon et al., 1992) ข้อได้เปรียบของวิธีไอเอฟเอเมื่อเทียบกับวิธีอีไลซ่า คือ สามารถวัดระดับปริมาณของแอนติบอดีเป็นไตเตอร์ได้ วิธีไอเอฟเอสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้นานประมาณ 2-3 เดือน หลังจากได้รับเชื้อ (Yoon et al., 1995) ข้อจำกัดการแปลผลของวิธีไอเอฟเอค่อนข้างเป็นแบบจิตวิสัย คือ ขึ้นอยู่กับจุดยุติของการทำให้เจือจางของซีรัมของผู้ปฏิบัติงานแต่ละคน และแต่ละห้องปฏิบัติการ ความใกล้เคียงของสายพันธุ์ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ใช้ในการทดสอบกับไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ก่อให้เกิดโรคในฟาร์ม และผลบวกลวงที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากการติดสีฟลูออเรสเซนต์แบบไม่จำเพาะของการทดสอบ

วิธีไอพีเอ็มเอค่อนข้างมีความจำเพาะและความไวสูง (Wensvoort et al., 1991) สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้นานประมาณ 2-3 เดือน หลังจากได้รับเชื้อ และมีข้อจำกัดต่างๆ เช่นเดียวกับวิธีไอเอฟเอ แต่มีข้อดีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ เช่น กล้องฟลูออเรสเซนต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอีไลซ่า พบว่า มีความไวมากกว่า (Drew et al., 1995)

วิธีอีไลซ่าเป็นวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างซีรัมได้เป็นจำนวนมากในเวลารวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะค่อนข้าง

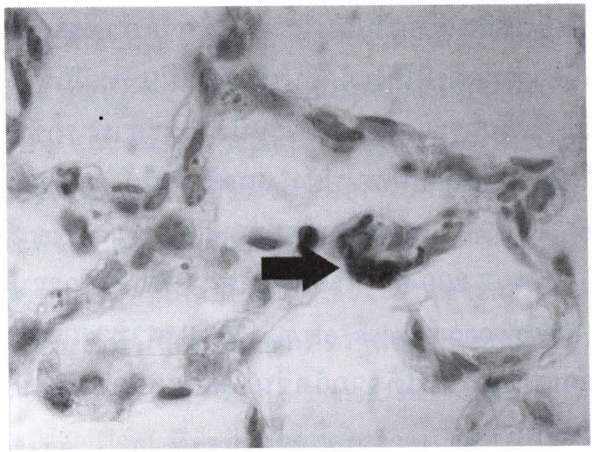
สูงเป็นที่ยอมรับได้ แต่ข้อด้อยของวิธีอีไลซ่า คือ การติดสีพื้นหลังทำให้ได้ผลบวกลวงในสุกรที่เป็นลบ และไม่สามารถแยกแอนติบอดีที่ได้จากการติดเชื้อโดยธรรมชาติออกจากแอนติบอดีที่ได้จากแม่ และแอนติบอดีที่ได้รับจากการฉีดวัคซีน ชุดตรวจสอบอีไลซ่าของโรคพีอาร์อาร์เอสที่นิยมใช้ทั่วโลก คือ ชุดตรวจสอบ HerdChek® PRRS ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) ที่อ่านค่าผลการตรวจเป็นบวก เมื่ออัตราส่วน S/P มากกว่า 0.4 สามารถตรวจพบแอนติบอดีหลังจากลูกสุกรทดลองติดเชื้อภายใน 10-14 วัน และมีปริมาณแอนติบอดีสูงสุด 2-3 เดือน (Yoon et al., 1995) ปัจจุบันมีการจำหน่ายชุดตรวจสอบอีไลซ่า HerdChek® 2XR ที่มีการอ่านค่าอัตราส่วนคล้ายกับในอดีต แต่จากการสังเกตในห้องปฏิบัติการพบว่า ค่าอัตราส่วน S/P ที่ได้มีค่าสูงกว่าชุดตรวจสอบที่เคยมีจำหน่าย ในขณะที่ค่าความไวของชุดตรวจสอบและความจำเพาะของชุดตรวจสอบยังไม่มีการรายงาน

ส่วนวิธีเอสเอ็น เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเมื่อใช้ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรนที่ก่อโรคในการทดสอบ แต่วิธีเอสเอ็นมีความไวในการทดสอบน้อยกว่าวิธีทางซีรัมวิทยาอื่นๆ เนื่องจากแอนติบอดีชนิดทำลายไวรัสพีอาร์อาร์เอส พัฒนาค่อนช้า โดยใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 1-2 เดือน จึงจะตรวจพบ (Nelson et al., 1994) และปริมาณไตเตอร์มากกว่า 1:4 จึงจะถือว่าให้ผลเป็นบวก จากข้อมูลข้างต้นเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของวิธีเอสเอ็น ชนิดของไวรัสที่ใช้ทดสอบวิธีการปฏิบัติที่ค่อนข้างยุ่งยาก และเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ทำให้วิธีเอสเอ็นไม่ได้รับความนิยมในการตรวจทางซีรัมวิทยาของโรคพีอาร์อาร์เอส อย่างไรก็ตามข้อมูลอ้างอิงของแอนติบอดีชนิดเอสเอ็น ในการขจัดไวรัสจากกระแสเลือด หรือป้องกันการติดโรคซ้ำยังไม่ได้รับการยืนยันแน่นอน (Nelson et al., 1994; Yoon et al., 1995) เนื่องจากยังมีการพบไวรัสจากกระแสเลือด ร่วมกับการพบแอนติบอดีชนิดเอสเอ็นในสุกรที่ติดเชื้อ จึงยังเป็นหัวข้อที่ยังไม่มีข้อสรุป (Horter et al., 2002)

การตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นขบวนการที่สำคัญที่จะยืนยันการปรากฏของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในตัวอย่างที่ส่งตรวจ การเก็บตัวอย่าง (บทที่ 8) ที่ถูกต้องเป็นหัวใจสำคัญในการวินิจฉัยโรค ตัวอย่างที่เก็บในช่วงที่มีการติดเชื้อแบบเฉียบพลันโดยเฉพาะภายใน 7-10 วันแรกหลังจากพบอาการทางคลินิก เป็นตัวอย่างที่ดีที่สามารถตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้ง่าย โดยสามารถพบไวรัสได้มากกว่าตัวอย่างที่เก็บหลังจากผ่านระยะเฉียบพลันไปแล้ว ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถแยกได้จากซีรัมภายใน 3-4 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อในลูกสุกร (ศศิวิมล และคณะ, 2547) แต่ในสุกรอายุมากภาวะมีไวรัสในเลือดจะสั้นกว่า (Mengeling et al., 1996) อย่างไรก็ตามตัวอย่างของเหลวจากการล้างปอด เป็นตัวอย่างที่ดีในการเพาะแยกไวรัส เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีความชอบที่จะเพิ่มจำนวนในเซลล์มาโครฟาจในปอดอยู่แล้ว (Mengeling et al., 1995) ดังนั้นอาจทำการส่งสุกรทั้งตัวหรือปอดสุกรที่สมบูรณ์มายังห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่างของเหลวจากการล้างปอด สำหรับการเพาะแยกไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นวิธีที่ดีในการตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส จากสุกรที่ติดเชื้อแบบแฝงเรื้อรัง โดยตัวอย่างจากทอนซิล การขูดคอหอยบริเวณทอนซิล และจากของเหลวจากการล้างปอด เป็นตัวอย่างที่ดีกว่าตัวอย่างจากซีรัม และปอด (Mengeling et al., 1995; Wills et al., 1997; Horter et al., 2002) ในกรณีของการเก็บตัวอย่างจากการแท้งระยะท้าย ควรเก็บตัวอย่างจากซีรัมแม่สุกรที่เพิ่งแท้งไม่เกิน 1 สัปดาห์ และตัวอย่างจากลูกสุกรอ่อนแอก่อนดูดนมไม่

ควรเก็บตัวอย่างจากลูกกรอก หรือลูกที่แท้งตาย เนื่องจากลูกที่แท้งตายเป็นตัวอย่างที่ไม่ควรส่งตรวจเพราะไวรัสพีอาร์อาร์เอสจะถูกทำลาย ได้ง่ายในตัวอย่างที่เน่า และลูกสุกรที่ได้รับนมน้ำเหลือง (Colostrum) จากการดูดนมแม่แล้วแอนติบอดีที่ได้จากนมแม่ จะรบกวนการเพาะแยกไวรัส นอกจากนี้การเพาะแยกไวรัสควรใช้ทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MA-104 หรือ Marc-145 และเซลล์มาโครฟาจที่ได้รับการทดสอบแล้วว่า มีความไวต่อการติดเชื้อ (Susceptibility) ต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส แต่ละสเตรนมีความชอบในการเจริญในเซลล์ต่างกัน (Molitor et al., 1997) และเซลล์มาโครฟาจที่ได้รับจากสุกรแต่ละตัวก็มีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ไม่เท่ากัน (Thanawongnuwech et al., 1997) ทั้งนี้หลอดเก็บเลือดไม่ควรมีการปนเปื้อนด้วยสารเฮปาริน (Heparin) เพราะสารเฮปารินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Jusa et al., 1997) การตรวจเพาะแยก ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถทำได้ในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองทั่วไป โดยเฉพาะทอนซิล จะมีโอกาสแยกไวรัสได้มากที่สุด (ศศิวิมลและคณะ, 2547; Thanawongnuwech et al., 1998) ส่วนเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ไขกระดูก ไธมัส ม้าม หัวใจ สมอง ตับ และเนื้อเยื่อจากอวัยวะสืบพันธุ์ รวมทั้งสิ่งคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก และน้ำลาย น้ำเชื้อ ปัสสาวะ และ อุจจาระ มีรายงานการแยกไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้จากตัวอย่างดังกล่าว โดยตัวอย่างจะต้องสดใหม่ และเก็บรักษาอย่างถูกต้องในอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 วัน และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ได้นานหลายเดือน แต่ไม่ควรเก็บใน -20 องศาเซลเซียส เนื่องจากตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส มีระบบละลายน้ำแข็งอัตโนมัติทำให้ไวรัสตายได้ อย่างไรก็ตามการเพาะแยกเชื้อไวรัส ไม่สามารถบอกความแตกต่างของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ได้จากวัคซีนชนิดเชื้อเป็นกับไวรัสที่ได้จากภาคสนาม เนื่องจากสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็น จะมีภาวะมีไวรัสในกระแสเลือดระยะหนึ่ง และสามารถขับไวรัสวัคซีนถ่ายทอดไปยัง สุกรตัวอื่นได้ (Nielsen et al., 1997) การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Punprapa et al., 2004) หรือการถอดรหัสพันธุกรรม (Thanawongnuwech et al., 2004) สามารถช่วยจำแนกไวรัสที่ได้จากวัคซีน ออกจากไวรัสในภาคสนามได้

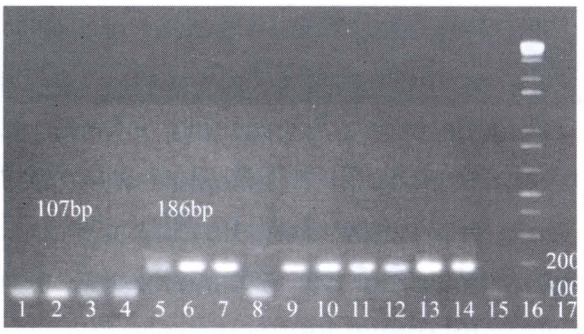
การทดสอบทางซีรัมวิทยาดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ไม่สามารถแยกแยะไวรัสพีอาร์อาร์เอส จากวัคซีนชนิดเชื้อเป็นออกจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส สเตรน ที่ก่อโรคในภาคสนาม อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะของไวรัสที่แยกได้ สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น การใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (Monoclonal antibody) มาใช้แยกแยะกลุ่มของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เพาะแยกได้ โดยจัดกลุ่มตามคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแต่ละชุดของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล ทำให้สามารถแยกไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรปออกจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาได้ (Nelson et al., 1993; Yang et al., 2000) และยังสามารถแยกชนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่ได้จากวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกา ออกจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาจากภาคสนามได้ (Yang et al., 2000) แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลบางชนิด เช่น SDOW-17 (Nelson et al., 1993) สามารถให้ผลบวกต่อทั้งไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ แต่กลับไม่ให้การตอบสนองต่อไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อเป็นบางตัว เช่น PrimePac PRRS (Schering-Plough Animal Health, USA) ดังนั้นการใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล เพื่อแยกแยะชนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในภาคสนาม ควรใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลหลายๆ ชนิด เพื่อความแม่นยำในการทดสอบ (Tatsanakit et al., 2003)



รูปที่ 5.2 การติดสีน้ำตาลเข้มของแอนติเจน ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ Pulmonary intravascular macrophages หรือ PIMs ในปอด (ลูกศร) ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) (พรทิพย์ และคณะ, 2547) จำเป็นต้องเลือกใช้แอนติบอดีจำเพาะที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็น Monoclonal antibody หรือ Polyclonal antibodies ที่สามารถตรวจจับกับแอนติเจนได้ (รูปที่ 5.2) เนื่องจากถ้ามีไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเนื้อเยื่อบางสายพันธุ์ เช่น ไวรัสสายพันธุ์ยุโรป ที่ไม่มีคุณสมบัติจับกับแอนติบอดีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนที่ได้จากไวรัสสายพันธุ์อเมริกา นอกจากนี้การตรึงสภาพเนื้อเยื่อในสารละลายฟอร์มาลินนานเกินไป จะทำให้ความไวในการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีลดลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนจากการตรึงสภาพ จึงควรเปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (Absolute alcohol) หลังจากตรึงสภาพเนื้อเยื่อในสารละลายฟอร์มาลินแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถตรวจพบในเนื้อเยื่อปอด หัวใจ ไต ตับ ต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองทั่วไป ม้าม ไธมัส และทอนซิล ในเซลล์มาโครฟาจ รวมทั้งในสมอง (Thanawongnuwech et al., 1997) การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธีอินไซตูไฮบริไดเซชั่น (In situ hybridization) (Sirinarumitr et al., 1998) ในเนื้อเยื่อปอด เนื้อเยื่อน้ำเหลือง ทอนซิล หัวใจ ไต ตับ ม้าม และ สมอง เป็นวิธีที่นิยมใช้หลังจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะที่มีรอยโรค และเป็นการยืนยันการปรากฏของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในอวัยวะนั้นๆ การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธีอินไซตูไฮบริไดเซชั่นนั้นใช้ Non-radiolabeled RNA probe ที่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมส่วน ORF 7 ในเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจหาไวรัส จะมีความไวมากกว่าการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Sur et al., 1996) โดยทั้งการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธีอินไซตูไฮบริไดเซชั่น มีประโยชน์ในการศึกษาย้อนหลังในเนื้อเยื่อ ดังกล่าว

การตรวจโดยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่นวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction) เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่อาจให้ผลบวกลวง (False positive) จากการปนเปื้อนได้ โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการในประเทศสหรัฐอเมริกาจะใช้ชุดสารตั้งต้น (Primers) ที่จำเพาะต่อการตรวจ ORF 7 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกา (Horter et al., 2001) แต่ในประเทศไทยที่มีการระบาดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ การตรวจจำเป็นต้องตรวจหาไวรัสแต่ละสายพันธุ์จึงมีการพัฒนาการตรวจพีซีอาร์โดยใช้ชุดสารตั้งต้น (Primers) 3 คู่ สารตั้งต้นคู่แรกสำหรับตรวจ ORF1b ร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ (Nested) ส่วนชุดสารตั้งต้นอีก 2 คู่จะมีความจำเพาะต่อ ORF1b ของแต่ละสายพันธุ์ เรียกการทดสอบนี้ว่า Nested multiplex RT-PCR (รูปที่ 5.3) ซึ่งมีความไวที่สามารถตรวจไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในตัวอย่างได้ที่ความเข้มข้น 10^1 $TCID_{50}$ ต่อมิลลิลิตร (Thanawongnuwech et al., 2004) ตัวอย่างที่ดีสำหรับการตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา



รูปที่ 5.3 แสดงการอ่านผลการตรวจโรคพีอาร์อาร์เอส ด้วยวิธี Nested multiplex RT-PCR ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกา ให้ Band ขนาด 107 bp ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรป ให้ Band ขนาด 186 bp

คือ ซีรัมที่เก็บจากสุกรที่มีไวรัสในเลือด เช่น ลูกอ่อนแอแรกคลอด หรือสุกรหย่านมที่ป่วยตาบวม (Chemosis) รวมทั้งแม่สุกรที่แท้งลูกหลายๆ ตัว มารวมเป็นหนึ่งตัวอย่าง (Pooled sample) ในแต่ละช่วงอายุ ซึ่งสามารถเพิ่มโอกาสการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ได้มาก ส่วนลูกสุกรที่แท้ง หรือตายเป็นตัวอย่างที่ไม่ดีในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ และวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เนื่องจากไวรัสจะถูกทำลายจากการเน่าของลูกที่ตายในท้องมาก่อนที่จะแท้ง (Benson et al., 2001) นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ เป็นวิธีการที่นิยมใช้สำหรับตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในน้ำเชื้อพ่อสุกร และจากมูลสุกร เพราะวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากน้ำเชื้อและมูลสุกรทำได้ยาก เนื่องจากความเป็นพิษของน้ำเชื้อและมูลสุกรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Christopher-Hennings et al., 1995) การรวมตัวอย่างน้ำเชื้อหลายตัวอย่างเป็นหนึ่งตัวอย่างสามารถทำได้เช่นเดียวกับการรวมตัวอย่างซีรัม ซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มความไวในการทดสอบวิธีตรวจหาไวรัสพีอาร์อาร์เอส ด้วยวิธีพีซีอาร์ ยังมีประโยชน์ในการทดสอบคัดทิ้งสุกร (Test and removal) ที่มีเชื้อออกจากฟาร์มที่ต้องการให้ปลอดจากโรคพีอาร์อาร์เอส อย่างไรก็ตามผลทดสอบที่เป็นบวกจากวิธีพีซีอาร์ เป็นวิธีที่ตรวจหาสารพันธุกรรม การแปลผลต้องตระหนักถึงผลบวกที่ได้เพราะอาจจะเป็นไวรัสที่ไม่มีคุณสมบัติในการทำให้ติดเชื้อก็ได้ นอกจากนี้ความไวในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ ในแต่ละห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ขบวนการเตรียมตัวอย่าง เทคนิคการสกัดสารพันธุกรรม ชนิดของสารเริ่มที่ใช้ สภาวะที่ใช้ในเครื่องพีซีอาร์ และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction fragment length polymorphism) (Wesley et al., 1998; Punprapa et al., 2004) และการถอดรหัสของ ORF5 มาวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (Kapur et al., 1996; Thanawongnuwech et al., 2004) สามารถนำมาใช้จัดกลุ่มและแยกชนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่เพาะแยกได้จากภาคสนามได้ วิธีดังกล่าวมักปฏิบัติหลังจากมีการเพาะแยกไวรัสได้จากภาคสนาม หรือในบางกรณีอาจใช้ตัวอย่างที่ได้จากภาคสนามโดยตรง แต่จะมีความไวค่อนข้างต่ำกว่าการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่แยกและเพิ่มจำนวนแล้วในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการตัดสายพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะตัดที่ตำแหน่งจำเพาะในสายพันธุกรรมของ ORF 5 ดังนั้นไวรัสพีอาร์อาร์เอสแต่ละสายพันธุ์ ที่มีลำดับของสายพันธุกรรมต่างกันเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่กำหนด จะได้ความยาวของสายพันธุกรรมต่างๆ กัน การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้รับความนิยมในประเทศสหรัฐอเมริกาในการเปรียบเทียบรูปแบบของไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อเป็น กับไวรัสสายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้จากภาคสนาม (Wesley et al., 1999) การใช้เอนไซม์หลายชนิดจะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการจัดกลุ่มของรูปแบบการตัดมากขึ้น แต่มีข้อจำกัดของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ ไม่สามารถบอกความรุนแรงของไวรัสที่ต้องการทดสอบได้ และไม่สามารถบอกความแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลง

ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่ไม่ตรงกับตำแหน่งที่ถูกตัดได้ ในทางตรงกันข้าม การถอดรหัสของสายพันธุกรรม ORF 5 สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบความใกล้เคียง และความแตกต่างของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ที่แยกได้จากภาคสนามโดยตรง ทำให้ทราบถึงการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่ง รวมทั้งสามารถทำนายการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสายโปรตีนได้ นอกจากนี้การถอดรหัสสายพันธุกรรม ORF 5 ยังสามารถใช้คาดคะเนและทำนายการติดต่อของไวรัสพีอาร์อาร์เอสภายในฟาร์มและระหว่างฟาร์ม จากระบบการผลิตของฟาร์มที่มีการเคลื่อนย้ายสุกรทั้งภายในและภายนอกฟาร์ม รวมทั้งสามารถใช้ในการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของไวรัสที่เคยมีอยู่ในฟาร์มหรือมีการติดต่อของไวรัสสายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ฟาร์ม โดยใช้การวิเคราะห์แผนภูมิเดนโดรแกรม (รูปที่ 3.2) (Andreyev et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2004)

จากการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการ และภาคสนามพบว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีการกลายพันธุ์ได้ง่ายจากวิวัฒนาการของตัวไวรัสต่อความกดดันทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Kapur et al., 1996; Andreyev et al., 1997; Meng, 2000; Thanawongnuwech et al., 2004) ในสภาวะของห้องปฏิบัติการมีรายงานว่า มีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุกรรมน้อยกว่าร้อยละ 1 ในช่วงเวลา 100 วัน ถึง 1 ปี (Rowland et al., 1999; Chang et al., 2002) ดังนั้นการพบความแตกต่างของสายพันธุกรรม ORF 5 มากกว่าร้อยละ 0.5-1 ให้หมายถึงมีความแตกต่างของสายพันธุกรรมของไวรัสที่ได้รับการเปรียบเทียบ

การตรวจโดยวิธีทางอณูชีววิทยาที่นิยมใช้ในงานวิจัย และสามารถบอกปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ คือ วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real time PCR) ซึ่งใช้ตัวจับจำเพาะที่มีสารเรืองแสง (Fluorescent probes) มาจับกับผลิตผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR products) ที่ถูกเพิ่มจำนวนมาพร้อมๆ กัน ทำให้สามารถบอกปริมาณของไวรัสที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ นอกจากนี้ยังสามารถหลีกเลี่ยงผลบวกลวง ประหยัดเวลาและแรงงานในการตรวจหาผลิตผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เจลได้ ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ที่สามารถตรวจไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้ทั้งสองสายพันธุ์ในเวลาเดียวกันมากขึ้น (Kleiboeker et al., 2005)

บรรณานุกรม

ราชบัณฑิตยสถาน 2548 ศัพท์บัญญัติ อังกฤษ-ไทย และไทย-อังกฤษ ฉบับราชบัณฑิตยสถาน รุ่น 1.1 ในรูปแบบซีดีรอม http://www.royin.go.th

ระพี ปัญญาทอง 2547 ประสิทธิผลของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นในสุกรหย่านม วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 60 หน้า

พรทิพย์ เลาหสิทธิกุล ณัฐพล บุญอาภา ยงยุทธ พงษ์ประภาชื่น สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ สุประดิษฐ์ หวังในธรรม และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช 2547 การกระจายของแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี เวชชสารสัตวแพทย์ 34(1):39-48.

เพิ่มศักดิ์ ธนะวัง ชนิดา แย้มกลีบบัว กฤษณ์ก้อง ศรียันต์ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ สุประดิษฐ์ หวังในธรรม และ สันนิภา สุรทัตต์ 2547 การศึกษาปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 จากเซลล์น้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อพีอาร์อาร์เอส เวชชสารสัตวแพทย์ 34(1):29-38.

ศศิวิมล ตลุ่มมุข จักรี รัตนารามิก นิดา นพรัตน์ไกรลาศ สว่าง เกษแดงสกลวุฒิ สุประดิษฐ์ หวังในธรรม และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช 2547 การศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในอนุบาล เวชชสารสัตวแพทย์ 34(3):33-44.

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(6): 1229-1234.

Albina, E., Carrat, C. and Charley, B. 1998. Interferon - alpha response to swine arterivirus (POAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Interferon Cytokine Res. 18: 485-490.

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

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

Bautista, E. and Molitor, T. 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. Arch. Virol. 144(6): 1191-1200.

Bautista, E.M. and Molitor, T.W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. Viral Immunol. 10(2): 83-94.

Benson, J.E., Yaeger, M.J. and Ford, S.P. 2001. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the ovary and progesterone levels in third trimester pregnant sows. Theriogenology. 56(5): 777-785.

Bierk, M.D., Dee, S.A., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E. and Molitor, T.W. 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. Can. J. Vet. Res. 65(4): 261-266.

Biron, C.A. 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. Curr. Opin. Immunol. 9(1): 24-34.

Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B. and Yoon, K.J. 2004. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. Vet. Immunol. Immunopath. 102(3): 249-262.

Carter, Q.L. and Curiel, R.E. 2005. Interleukin-12 (IL-12) ameliorates the effects of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) infection. Vet. Immunol. Immunopath. 107(1-2): 105-118.

Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M. and Murtaugh, M.P. 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. J. Virol. 76(10): 4750-4763.

Cho, H.J., Entz, S.C., Magar, R. and Joo, H.S. 1997. Performance of ELISA antigens prepared from 8 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with homologous and heterologous antisera. Can. J. Vet. Res. 61: 299-304.

Choi, C. and Chae, C. 2002. Expression of tumour necrosis factor-alpha is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Res. Vet. Sci. 72(1): 45-49.

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. Pathol. 127(2-3): 106-113.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C. L. and Benfield, D.A. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory wyndrome virus in boar semen by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(7): 1730-1734.

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. Pathol. 129(2-3): 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(4): 299-305.

Drew, T.W., Meulenberg, J.J., Sands, J.J. and Paton, D.J. 1995. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 76 (Pt 6): 1361-1369.

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. Immunopath. 94(1-2): 35-45.

Halbur P.G. and Bush, E.J. 1997. Update on abortion storm and sows mortality. Swine Health and Production. 5(2):73.

Hoegen, B., Saalmuller, A., Rottgen, M., Rziha, H.J., Geldermann, H., Reiner, G., Pfaff, E. and Buttner, M. 2004. Interferon-gamma response of PBMC indicates productive pseudorabies virus (PRV) infection in swine. Vet. Immunol. Immunopath. 102(4): 389-397.

Horter, D., Chang, C.C., Pogranichnyy, R., Zimmerman, J. and Yoon, K.J. 2001. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome in pigs. Adv. Exp. Med. Biol. 494: 91-94.

Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J. and Zimmerman, J.J. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet. Microbiol. 86(3): 213-228.

Houben, S., van Reeth, K. and Pensaert, M.B. 1995. Pattern of infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in Belgium. Zentralbl Veterinarmed. B 42(4): 209-215.

Hurd, H.S., Bush, E.J., Losinger, W. 2001. Outbreaks of porcine reproductive failure: Report on a collaborative field investigation. Swine Health and Production. 9(3):103-108.

Jiang, Z., Zhou, E.M., Ameri-Mahabadi, M., 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. Immunopath. 92(3-4): 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-gamma and IL-10 after viral clearance. Viral. Immunol. 15(4): 549-556.

Jusa, E.R., Inaba, Y., Kouno, M. and Hirose, O. 1997. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am. J. Vet. Res. 58(5): 488-491.

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

Kleiboeker, S.B., Schommer, S.K., Lee, S.M., Watkins, S., Chittick, W. and Polson, D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. J. Vet. Diagn. Invest. 17(2): 165-170.

Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K. and Pensaert, M. 2003. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. Vet. Res. 34(3): 249-260.

Lager, K., Mengeling, W. and Brockmeier, S. 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 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. Am. J. Vet. Res. 60(8): 1022-1027.

Lamontagne, L., Page, C., Larochelle, R. and Magar, R. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells. Viral Immunol. 16(3): 395-406.

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(4): 295-301.

Lopez-Fuertes, L., Campos, E., Domenech, N., Ezquerra, A., Castro, J.M., Do, 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.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M. and Zuckermann, F. A. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. Virol. 309(1): 18-31.

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

Mengeling, W.L., Lager, K.M. and Vorwald, A.C. 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 3-16.

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(1): 25-38.

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

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

Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D. and Marincola, F.M. 2003. The dual role of IL-10. Trends Immunol.24(1): 36-43.

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

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

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

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E. and Benfield, D. A. 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Monoclonal Antibodies. J. Clin. Microbiol. 31: 3184-3189.

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

Olin, M.R., Batista, L., Xiao, Z., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Pijoan, C.C. and Molitor, T.W. 2005. Gammadelta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Viral Immunol. 18(3): 490-499.

Pampusch, M.S., Bennaars, A.M., Harsch, S. and Murtaugh, M.P. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet. Immunol. Immunopath. 61(2-4): 279-289.

Plana Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortes, E., Vela, C. and Casal, J.I. 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. Virus Genes. 14(1): 19-29.

Punprapa, N., Rungsipipat, A., Tatsanakit, A., Wongyanin, P. and Thanawongnuwech, R. 2004. PCR-RFLP analysis in an open reading frame 5 of variants of PRRSV isolated in Thailand. Thai J. Vet. Med. 34 (2): 47-56.

Rodriguez-Carreno, M.P., Lopez-Fuertes, L., Revilla, C., Ezquerra, A., Alonso, F. and Dominguez, J. 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. J. Immunol. Methods 259(1-2): 171-179.

Rowland, R.R., Robinson, 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(3): 539-555.

Rowland, 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. Virol. 259(2): 262-266.

Rowland, R.R. and Yoo, D. 2003. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. Virus Res. 95(1-2): 23-33.

Samsom, J.N., de Bruin, T.G., Voermans, J.J., Meulenberg, J.J., Pol, J.M. and Bianchi, A.T. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. J. Gen. Virol. 81 Pt 2: 497-505.

Sirinarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, J.P., Halbur, P.G. and Paul, P.S. 1998. A pneumo-virulent United States .isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. J. Gen. Virol. 79(Pt 12): 2989-2995.

Suarez, P., Diaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, J.M., Nieto, A. and Ortin, J. 1996. Open reading frame of 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. J. Virol. 70: 2876-2882.

Sur, J.H., Cooper, V.L., Galeota, J.A., Hesse, R.A., Doster, A.R. and Osorio, F.A. 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. J. Clin. Microbiol. 34(9): 2280-2286.

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. Immunopath. 83(3-4): 177-189.

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(Pt 10): 2755-2760.

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 84(Pt 2): 453-459.

Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. Vaccine 24(14): 2634-2642.

Tatsanakit, A., Kesdaengsakonwut, S. and Thanawongnuwech, R. 2003. Evaluation of monoclonal antibodies for PRRSV detection of the selected Thai isolates using immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). Proceedings of the 11th International symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. Sofitel Central Plaza, Bangkok, Thailand. November 9-13, 2003. pp. 78-79.

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

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 (PRRSV) on pulmonary clearance of copper particles in pigs. Vet. Pathol. 35(5): 398-406.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G. and Andrews, J.J. 1997. Immunohistochemical detection of porcine reproductive syndrome virus antigen in neurovascular lesions. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 334-337.

Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P. and Thacker, E.L. 2004. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Mycoplasma hyopneumoniae. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11(5): 901-908.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1997. Influence of pig age and strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on virus titer and bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): In vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). Vet. Microbiol. 63(2-4): 177-187.

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. Immunopath. 79(1-2): 115-127.

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

Van Reeth, K. and Nauwynck, H. 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. Vet. Res. 31: 187-213.

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. Immunopath. 87(3-4): 161-168.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., deJong, M.F., van't Veld, P., Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M. and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine diesease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13: 121-130.

Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Clouser, D.F., Landgraf, J.G. and Frey, M.L. 1998. Differentiation of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North America field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 140-144.

Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Roof, M.B. 1999. Evidence for divergence of restriction fragment length polymorphism patterns following in vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am. J. Vet. Res. 60(4): 463-467.

Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J.H. and Osorio, F.A. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Clin. Microbiol. 41(1): 58-62.

Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet. Microbiol. 55(1-4): 231-240.

Wu, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y. and Weiser, W.Y. 1993. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. J. Immunol. 151(8): 4325-4332.

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

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

Yoon, I.L., Joo, H.S., Christianson, W.T., Kim, H.S., Collins, J.E., Morrison, R.B. and Dial, G.D. 1992. an indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 144-147.

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

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., McGinley, M.J., Landgraf, J., Frey, M.L., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1995. Failure to consider the antigenic diversity of prcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may lead to misdiagnosis. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 386-387.

Zuckermann, 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.

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