

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพอร์อาร์เอส เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย โดยก่อให้เกิดอาการผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในฝูงสุกรแม่พันธุ์ เช่น แท้ง กลั่บสัด ในสุกรอุมท้อง จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดและอัตราการตายก่อนหย่านมสูง และโรกระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (Porcine respiratory disease complex) ในฝูงสุกรอนุบาลและขุน

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสในตระกูล *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)

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์หลัก (genotype) ประกอบด้วยสายพันธุ์ยุโรป (European genotype หรือ genotype I) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype หรือ genotype II) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก โดยพบการระบาดของไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปในประเทศทวีปยุโรปเป็นหลัก และในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา พบการระบาดของไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และพบฟาร์มติดเชื้อทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ยุโรป 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) พบว่าฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสพอร์

อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสของประเทศอื่นที่พบการติดเชื้อสายพันธุ์เดียวเป็นหลัก

ในประเทศสหรัฐอเมริกานั้นพบว่าโรคพอร์อาร์เอส สร้างความเสียหายถึงปีละ 560.32 ล้านดอลลาร์ (Neumann et al., 2005) แม้ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างเป็นทางการแต่ก็พบว่าฟาร์มสุกรในประเทศไทยมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เป็นฟาร์มที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส ด้วยความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น ทำให้เกษตรกรตระหนักถึงวิธีการที่สามารถควบคุม และป้องกันโรคพอร์อาร์เอสอย่างมีประสิทธิภาพ เกษตรกรจึงได้มีการนำวัคซีนเช่น วัคซีนพอร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV[®], Boehringer Ingelheim, USA) มาใช้ในการควบคุมโรค แต่เกษตรกรกลับพบว่า วัคซีนพอร์อาร์เอสที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันไม่ให้ผลคุ้มโรคเท่าที่ควร เนื่องจากพบลักษณะอาการคล้ายโรคพอร์อาร์เอส เช่น การแท้ง ลูกตาย แรกคลอด มัมมี และพบความเสียหายเช่นลูกสุกรแรกคลอดอ่อนแอ การเพิ่มขึ้นของปัญหาโรคทางเดินหายใจ อาการทางระบบประสาทเช่นชัก และข้อบวมในสุกรก่อนหย่านมและอนุบาล อย่างต่อเนื่อง ในฟาร์มที่มีการใช้วัคซีนพอร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น เป็นประจำ

สาเหตุที่วัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสไม่สามารถใช้ป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างวัคซีนที่จำหน่ายและเชื้อที่เกิดการระบาดในฟาร์ม และคุณสมบัติการเป็น quasi-species ของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส (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)

จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง ทีมผู้วิจัยจึงได้สำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยมามากกว่า 6 ปี (พ.ศ. 2549 – 2555) โดยแยกเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจำนวนมากกว่า 500 ไอโซเลตจากฟาร์มจำนวนมากกว่า 200 ฟาร์มในประเทศไทย (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพอร์อาร์

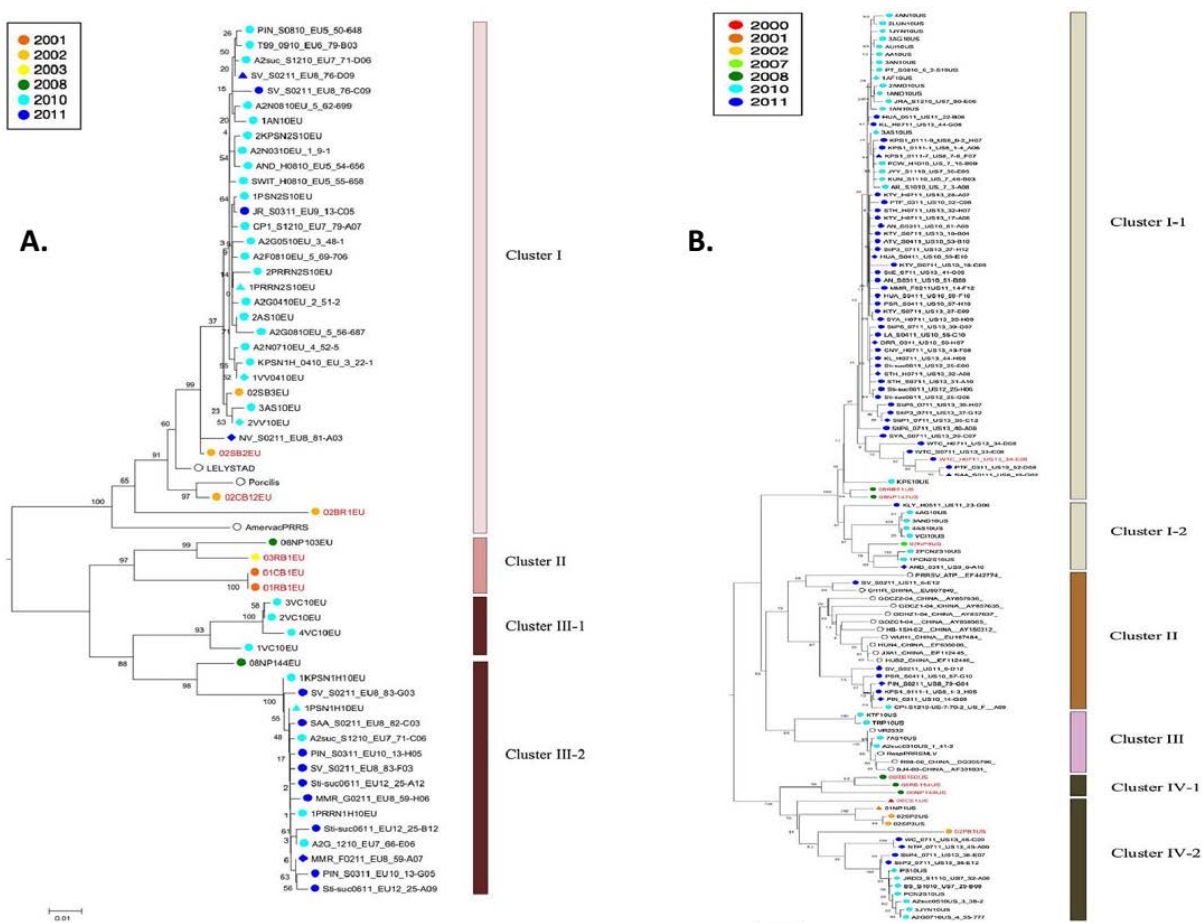
เอสที่รายงานในปีพ.ศ. 2547 โดยเฉพาะไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 คลัสเตอร์ จากเดิมที่ในปีพ.ศ. 2547 พบเพียง 1 คลัสเตอร์ (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013)

จากการสำรวจพบว่านอกจากสายพันธุ์หลักสองสายพันธุ์แล้ว เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก โดยสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) และสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ถึง 4 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 1) โดยภายในแต่ละคลัสเตอร์จะมีความต่างกันอยู่ที่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizing epitope น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการคือการเปลี่ยนตำแหน่ง N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วน Glycoprotein 5 ทำให้ neutralizing epitope มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลโดยตรงต่อภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ (cross protection)

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสทั้ง 4 คลัสเตอร์ พบที่ส่วน decoy epitope และ N-linked glycosylation site เท่านั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วน primary neutralizing epitope ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสตั้งต้นมาก จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน decoy epitope และ N-linked glycosylation site มาก การมี decoy epitope และการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ อาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการสร้างแอนติบอดีแบบ non-neutralizing antibody แทน neutralizing antibody ทำให้ไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรคพาร์อาร์เอสได้ ถ้ามีการตัดส่วน decoy epitope ออกหรือมีการแทรกด้วยสายพันธุ์บางอย่างทำให้ decoy epitope อยู่ห่างจาก neutralizing epitope อาจทำให้ร่างกายมีการกระตุ้น neutralizing antibody ได้ดีขึ้น

จากเหตุผลและข้อมูลการสำรวจดังกล่าว จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทีมผู้วิจัยสนใจที่จะผลิตวัคซีนป้องกันโรคพาร์อาร์เอส รูปแบบใหม่ ที่เป็นพลาสมิดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่ส่วนระหว่าง decoy epitope, N-linked glycosylation site และ neutralizing epitope เพื่อเป็นต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับใช้ทดลองในสุกร อนึ่งทางทีมผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนการ

วิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปีพ.ศ. 2555 เพื่อทำการผลิตต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และ PADRE และปัจจุบันทางทีมผู้วิจัยได้ต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่พร้อมนำไปใช้ในการทดลองในสุกรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ทางทีมผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนที่มีไปเพิ่มจำนวนและทดลองใช้ในฟาร์มสุกรเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพาร์วไวรัสต่อไป ผู้วิจัยคาดว่าผลการศึกษานี้จะได้มาซึ่งวัคซีนรุ่นใหม่เพื่อป้องกันหรือและการควบคุมโรค PRRS รูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น



ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพาร์วไวรัสในประเทศไทย 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 มาทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน ORF 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 ตัดยีนส่วนที่ต้องการโดยใช้เอนไซม์ (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 เปลาเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 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 นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรัมเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ฉีดต้องเป็นเท่าไรจึงให้การกระตุ้นสูงที่สุด

ช่วงที่ 3 การทดลองประสิทธิภาพในสุกร

ทำการทดลองในฟาร์ม โดยแบ่งสุกรอายุ 28 วัน ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) สุกรในกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสารละลาย PBS กลุ่มที่ 2 ทำการให้วัคซีนพ็อรอาร์เอส เชื้อเป็น เขากล้ามเนื้อ 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 เพื่อนำไปสกัดซีรัมเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

ขอบเขตของโครงการวิจัย

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

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

โรคพอร์อาร์เอส เกิดจากการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ก่อให้เกิดอาการผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในฝูงสุกรแม่พันธุ์ เช่น แท้ง กลั๊บสัด ในสุกรอุ้มท้อง จำนวนลูกสุกรตาย แรกคลอดและอัตราการตายก่อนหย่านมสูง และโรกระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อน (Porcine respiratory disease complex) ในฝูงสุกรอนุบาลและขุน โดยในประเทศสหรัฐอเมริกาพบโรคพอร์อาร์เอส สร้างความเสียหายถึงปีละ 560.32 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Neumann et al., 2005)

โรคพอร์อาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อ ไวรัสพอร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดี่ยวและมีเปลือกหุ้มที่จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) จีโนมของไวรัสพอร์อาร์เอสมีมวลโมเลกุล 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 ส่วนนี้จึงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบนิวทรัลไลซ์ซึ่งแอนติบอดี (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 (Meulenbergh, 2000; Meulenbergh et al., 1997)

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American genotype) และสายพันธุ์ยุโรป (European genotype) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก ในประเทศแถบทวีป

อเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา พบการระบาดของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก มีรายงานการแยกเชื้อสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ไม่ได้สร้างความเสียหายมากนัก และหลังจากนั้นก็ไม่เคยมีการค้นพบอีกเลย และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด ในประเทศแถบทวีปยุโรปพบการระบาดของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศเช่น เดนมาร์ก ที่พบไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ซึ่งมีสาเหตุมาจากการนำวัคซีนโรคพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็นไปใช้ในฝูงพ่อพันธุ์และเชื้อไวรัสวัคซีนได้แพร่กระจายไปตามฟาร์มต่างผ่านทางน้ำเชื้อ (Botner et al., 1994; Botner et al., 1997)

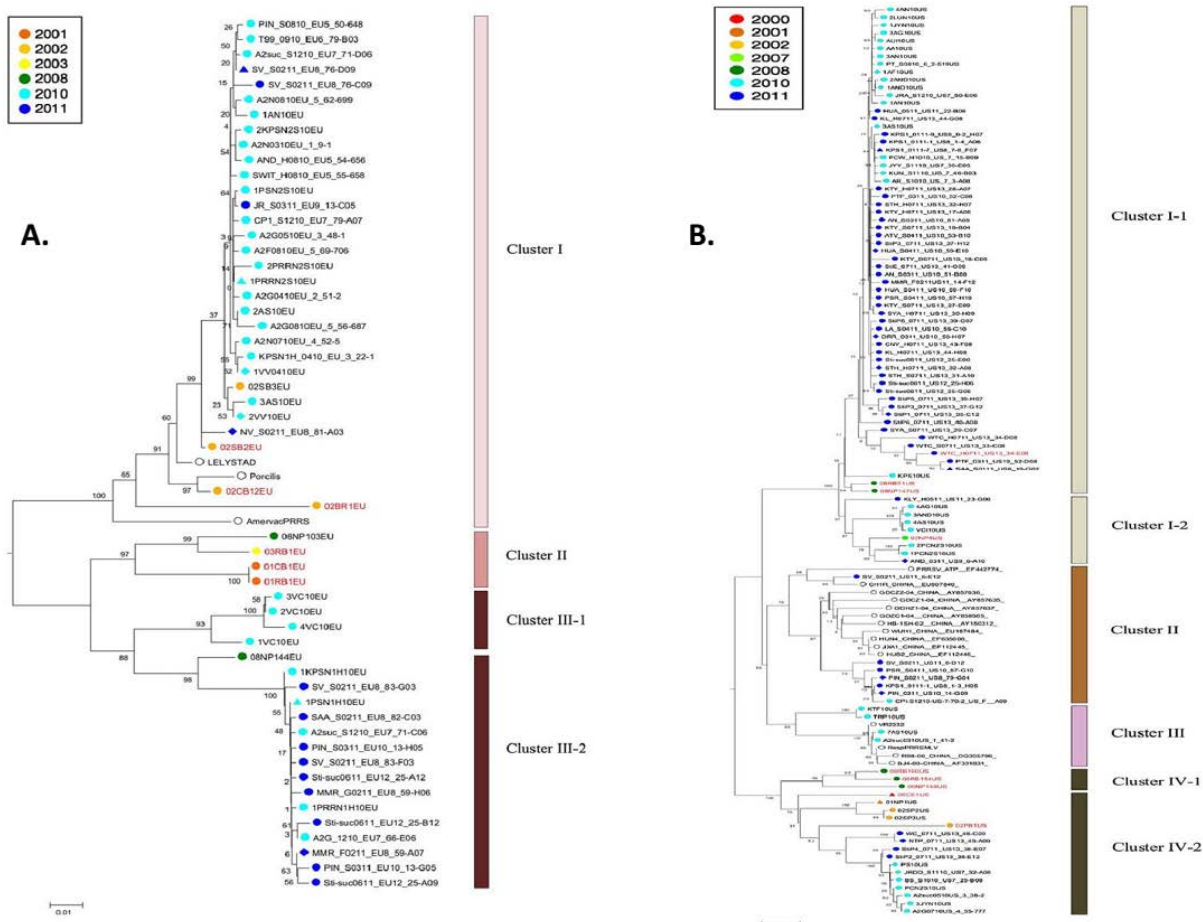
ประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และสามารถแยกเชื้อไวรัส ได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ยุโรป โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรป อยู่ประมาณ 66.42% และมีสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่ในปัจจุบันความชุกของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปเพราะพบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง (Nilubol et al., 2013) ส่วนสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงที่พบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด และการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรไทย พบว่าฟาร์มส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมากกว่า 1 สายพันธุ์ และมากกว่าครึ่งเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ลักษณะการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสของประเทศไทย ที่พบทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกัน แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสของประเทศอื่น

จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง ทีมผู้วิจัยจึงได้สำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทยมามากกว่า 6 ปี (พ.ศ. 2549 – 2555) โดยแยกเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสจำนวนมากกว่า 500 ไอโซเลตจากฟาร์มจำนวนมากกว่า 200 ฟาร์มในประเทศไทย (ภาพที่ 2) (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่รายงานในปีพ.ศ. 2547 โดยเฉพาะไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่ปัจจุบัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 คลัสเตอร์ จากเดิมที่ในปีพ.ศ. 2547 พบเพียง 1 คลัสเตอร์ (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013)

จากการสำรวจพบว่านอกจากสายพันธุ์หลักสองสายพันธุ์แล้ว เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก โดยสามารถแบ่งเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 2) และสามารถแบ่งเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือออกได้ถึง 4 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 2) โดยภายในแต่ละคลัสเตอร์จะมีความต่างกันอยู่ที่ประมาณ 10 เพอร์เซนต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizing epitope น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ทำให้ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่สำรวจจึงยังพบไวรัสสายพันธุ์นี้แค่ 2 คลัสเตอร์ ในทางตรงข้ามไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีกลไกการกลายพันธุ์ที่สำคัญ 2 ประการคือการเปลี่ยนตำแหน่ง N-linked glycosylation ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 31-35 ของส่วน Glycoprotein 5 ทำให้ neutralizing epitope มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลโดยตรงต่อภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ (cross protection)

ไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งอาร์เอ็นเอไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอไวรัสแล้ว จะไม่มีขบวนการ Proof-reading ที่ใช้ในการตรวจสอบการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้การแปลรหัสนิวคลีโอไทด์มีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดสูง ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ได้ง่ายและไวรัสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง ความสามารถในการกลายพันธุ์ที่สูงนี้สามารถพบได้ทั้งไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป ส่วนทางพันธุกรรมของไวรัสที่พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือส่วนของ ORF 5 ที่แปรเป็นส่วนของโปรตีนบนผนังเซลล์ (Glycoprotein 5, GP5) (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998) ส่วน GP5 นี้เองที่พบว่ามี neutralizing epitope และเป็นส่วนที่กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเข้าสู่เซลล์ (Neutralizing antibodies) (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002) ส่งผลในการป้องกันการติดเชื้อ

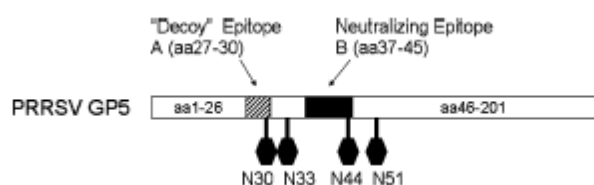
ไวรัสพาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมี RNA polymerase enzyme ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพาร์อาร์เอสคือ GP5 โดยใน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Meulenbergh et al., 1997) โครงสร้าง GP5 ประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ด้านนอกของไวรัส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



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์การแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสใน ประเทศไทย A) สายพันธุ์ยุโรป B) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ไวรัสพาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายพันธุกรรมเนื่องจากตัวไวรัสเองมี RNA polymerase enzyme ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของไวรัสพาร์อาร์เอสคือ GP5 โดยใน GP5 พบว่าส่วนของ ectodomain จะเป็นส่วนที่มีความแตกต่างมากที่สุด (Meulenber 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-linked glycosylation site (N30 , N33 , N44 และ N51) ; decoy epitope A , neutralizing epitope B (อ้างอิงจาก Meulenbergh, j. 1997)

ไวรัสพาร์อาร์เอส 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 ที่กลายไปเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้ ทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยระบาดจากโรคพาร์อาร์เอสก็ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อตัวเดิมหรือต่างชนิดทำให้โรคพาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสพาร์อาร์เอสที่กล่าวมาข้างต้น มีสาเหตุหลักจากขบวนการ proof reading ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ง่าย แต่ในเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมียีกขบวนการ recombination ที่สามารถทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของไวรัสสายพันธุ์เดียวกันแต่มากกว่า 2 ไอโซเลต เช่น ไอโซเลตจากสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ พบว่า Progeny viruses ของทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวน สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกกันและจะมีบางส่วนที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ (Genetic recombination) (Yuan et al., 1999)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยการให้เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสแก่สุกรในห้องทดลอง โดยแบ่งสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย NEG US EU และ MIX กลุ่ม NEG เป็นกลุ่มควบคุมลบ กลุ่ม US และ EU เป็นกลุ่มติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ แยก progeny viruses และถอดรหัสพันธุกรรม ผลการศึกษาพบว่าสุกรกลุ่ม MIX เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากกว่าสุกรกลุ่มที่ติดเชื้อเดี่ยว และการตรวจ ลำดับเบสในส่วน Open reading frame 5 ได้แสดงให้เห็นว่า ภายหลังการให้เชื้อสุกรหนึ่งตัวสามารถตรวจพบไวรัสพาร์อาร์เอสได้หลายสายพันธุ์ (multiple isolates) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) จากไวรัสตั้งต้น และยังพบว่าผลการถอดรหัสพันธุกรรมพบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มสุกรที่ติดเชื้อร่วม (MIX) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อเดี่ยว (สายพันธุ์ยุโรปหรืออเมริกาเหนือเพียงอย่างเดียว) และความแตกต่างทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อร่วมช่วงวันที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบ น้อยกว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ เชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้ช่วงวันที่ 10 และพบไวรัสลูกหลานที่เกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ทุกช่วงเวลา (genetic recombination) ทำให้สรุปผลได้ว่าการติดเชื้อร่วมสองสายพันธุ์สามารถเร่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลาน แต่ละสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงโดยตัวเองแต่จะมีไวรัสที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ตลอดเวลา และไวรัสลูกหลานที่แยกได้หลังจากการให้เชื้อพบที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก และ progeny viruses บาง clade จะโดดเด่นออกมา (dominant mutants) (นิลอุบล, โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ

progeny viruses ที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสต้นแบบมาก ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ neutralizing epitope ของ progeny viruses ที่แยกได้และ cross neutralizing activity ของซีรัมที่เก็บหลังจากการระบาดต่อ progeny viruses เหล่านี้

ทางทีมผู้วิจัยสนใจรายงานการผลิitวัคซีน 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 neutralizing antibody และ cell mediated immune immunity ได้ดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัย

การเตรียมยีน ORF5 ของเชื้อไวรัส PRRS

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF5 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) อยู่ปลายด้าน 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 (EndoFree[®] 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 เปลาเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 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 นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรัมเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน 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 เพื่อนำไปสกัดซีรัมเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

การวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำ (Humoral immune response)

วัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำของสุกรจากซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดโดยวิธี ELISA และ serum neutralization assay

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำโดยวิธี ELISA ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Herdchek[®], Idexx, USA) โดยนำซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด ปั่นให้เลือดเกิดกระบวนการแข็งตัวแยกเป็นซีรัมออกมา แล้วนำตัวอย่างมาเจือจางโดยใช้ซีรัม 5 ไมโครลิตร ต่อ น้ำยาละลาย 195 ไมโครลิตร นำมาใส่ลงใน plate หลังจากนั้นทำการดูซีรัมมาใส่ใน strip coated plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งในการทำแต่ละครั้งจะต้องมีตัวควบคุมบวก

และตัวควบคุมลบ 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

ซีรัมนิวทรัลไลเซชัน (Serum neutralization assay)

นำซีรัมมาทำซีรัมนิวทรัลไลเซชันต่อเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือตามวิธีของ Nilubol et al., 2004 (Nilubol et al., 2004) โดยย่นำซีรัมปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาเจือจางด้วยวิธี 2-fold dilution ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ MEM เขย่าให้เข้ากัน และดูดสารละลายปริมาณ 100 ไมโครลิตรมาใส่ใน microculture 96-well plate ที่มีไวรัสปริมาณ 10^2 TCID₅₀/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO₂ 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 CO₂ 5% เป็นเวลา 2 วัน นำเพลทมาทำการตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยฟอร์มาลีนและย้อมเซลล์ด้วยวิธี direct fluorescent assay (FA) โดยใช้ monoclonal antibody SDOW17 อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน และคิดค่า geometric mean titer เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือดสุกที่มี 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 ที่แยกชั้นอยู่ตรงกลางออกมาใส่ในหลอดรูปทรงกรวย (conical tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละตัวอย่างไว้ในหลอด 1 หลอดหลังแยกเสร็จทุกตัวอย่างนำเซลล์ PBMCs ที่แยกมาไปปั่นล้างด้วย PBS โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,300×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเทส่วนใสทิ้ง แล้วเคาะเซลล์ให้แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนมาโดยการเติมน้ำเปล่าบริสุทธิ์ 2 มิลลิลิตร และ PBS ความเข้มข้น 2x เข้าไปให้เข้ากันแล้วเติม PBS ความเข้มข้น 1x จนเต็มหลอด ทำการปั่นแยก PBMCs อีกรอบที่ความเร็ว 1300×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำออกมาเทส่วนใสทิ้ง เคาะเซลล์ให้แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 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, สเตรปโตมัยซิน (Invitrogen, USA) 50 มิลลิกรัม โดยกระบวนการเหล่านี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากแต่ละตัวอย่างโดยการย้อมสี Typhen Blue ความเข้มข้น 0.4% เพื่อประเมินปริมาณเม็ดเลือดที่ได้ หลังจากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการวัด การตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาว (proliferative responses) ต่อไป

การวัดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซท์ (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 (Fluorescence activated cell sorting) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2,000 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เข้าไปให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 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 2.5×10^6 เซลล์ 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 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยไวรัสพาร์อาร์เอสแต่ละไอโซเลตมาคำนวณเทียบกับค่าการตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์สุกรตัวเดียวกันที่ไม่ได้รับการกระตุ้น 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 โดย
 ชิ้นส่วนของ PADRE จะแทรกอยู่ระหว่าง amino acid (aa) ในตำแหน่งที่ 33 และ 34 แสดงดังภาพที่ 4

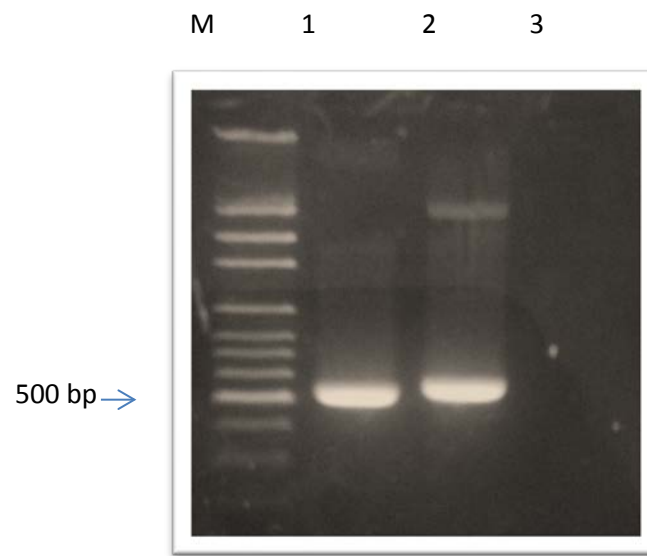
ORF	Protected sites	Protected areas	Motifs to avoid
7-648 [ATG...TAG]	1-6 <i>Kpn</i> I [GGTACC] 649-654 <i>Xba</i> I [TCTAGA]		<i>Kpn</i> I [GGTACC] <i>Xba</i> I [TCTAGA]

1.	M L E K C L T A G C C S R L L S L W C I V
70.	P F C F A V L A N A S N A K F V A A W T L K A
139.	A A D S S S H L Q L I Y N L T L C E L N G T D
208.	G C C G C T G A C A G C A G C T C C C A T C T A C A G C T G A T T T A C A A C T T G A C G C T A T G T G A G C T G A A T G G C A C A G A T
277.	W L A N K F D W A V E S F V I F P V L T H I V
346.	T G G C T A G C T A A C A A A T T T G A T T G G G C A G T G G A G A G T T T T G T C A T C T T T C C C G T T T T G A C T C A C A T T G T C
415.	S Y G A L T T S H F L D T V A L V T V S T A G
484.	T C C T A T G G T G C C C T C A C T A C C A G C A T T T C C T T G A C A C A G T C G C T T T A G T C A C T G T G T C T A C C G C C G G G
553.	F V H G R Y V L S S I Y A V C A L A A L T C F
622.	T T T G T T C A C G G G C G G T A T G T C C T A A G T A G C A T C T A C G C G G T C T G T G C C C T G G C T G C G T T G A C T T G C T T C
	V I R F A K N C M S W R Y A C T R Y T N F L L
	G T C A T T A G G T T T G C A A G A A T T G C A T G T C C T G G C G C T A C G C G T G T A C C A G A T A T A C C A A C T T T C T T C T G
	D T K G R L Y R W R S P V I I E K R G K V E V
	G A C A C T A A G G G C A G A C T C A T C G T T G G C G G T C G C C T G T C A T C A T A G A G A A A A G G G G C A A G T T G A G G T C
	E G H L I D L K R V V L D G S V A T P I T R V
	G A A G G T C A T C T G A T C G A C C T C A A A G A G T T G T G C T T G A T G G T T C C G T G G C A A C C C C T A T A A C C A G A G T T
	S A E Q W G R P *
	T C A G C G G A A C A A T G G G G T C G T C C T T A G T C T A G A

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



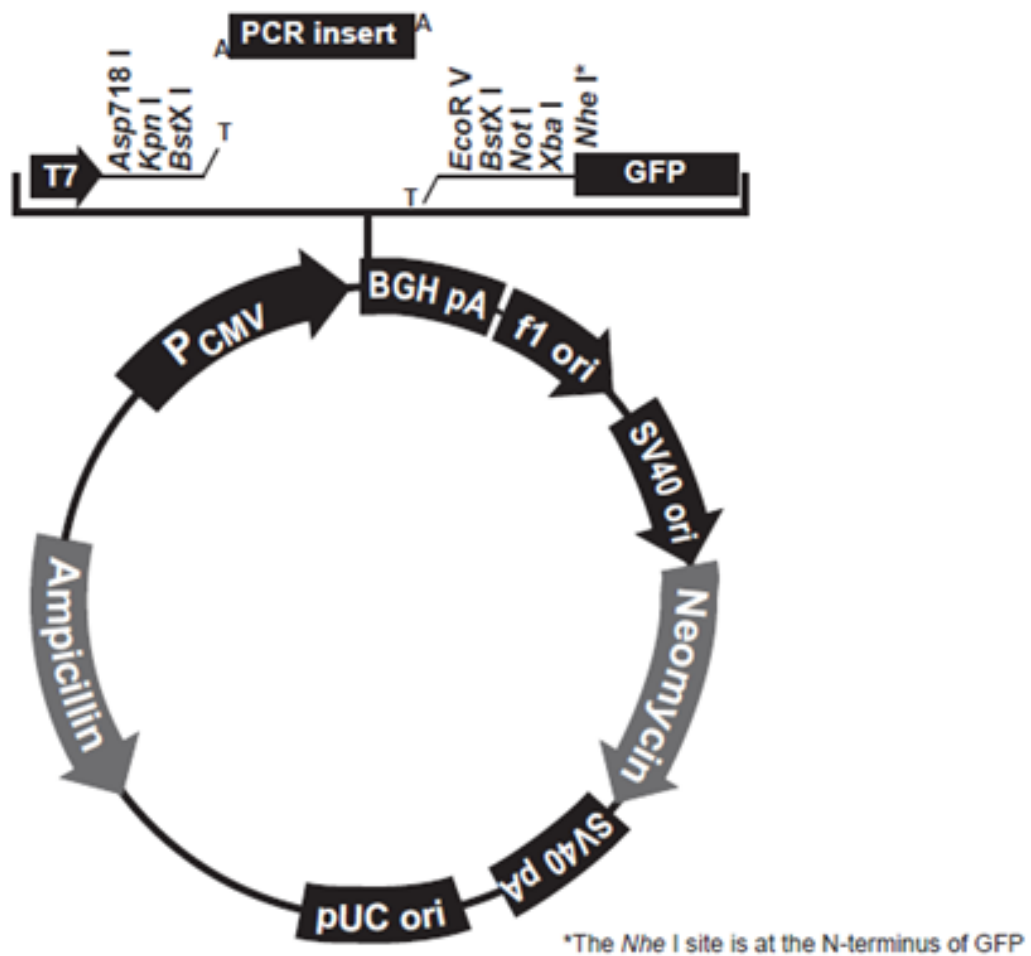
ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาด PCR product ของ modified-ORF5 gene ที่ได้จากการเตรียม recombinant plasmid ด้วย 2% gel electrophoresis

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 เปลา่เข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 ไมโครกรัม ส่วนกลุ่มที่ 2 – 4 ทำการให้พลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน โดยเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 100 250 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่วันที่ 0, 14, 28 และ 42 วันหลังทำการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดไปแยกซีรัมเพื่อใช้

ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณพลาสมิดีเอ็นเอที่ฉีดต้องเป็นเท่าไรจึงให้การกระตุ้นสูงที่สุด

จากการทดลองพบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนทั้งสามขนาดไม่ให้ผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำเมื่อวัดโดยวิธี ELISA แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวัดโดยวิธี นิวทรัลไลเซชัน ต่อเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส Homologous isolate พบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนให้ผลในการกระตุ้นแอนติบอดี และนิวทรัลไลซิงไตเตอร์ ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอวัคซีนที่ให้ โดยกลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีนขนาด 500 ไมโครกรัมให้ผลบวกที่ 35 วันหลังจากให้วัคซีน (SN titer > 4) แต่ดีเอ็นเอวัคซีนขนาด 250 ไมโครกรัมให้ผลบวกที่ 42 วันหลังจากให้วัคซีน และมีนิวทรัลไลซิงไตเตอร์ที่ 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 ทำการฉีดวัคซีนพาร์อาร์เอสเชื้อเป็น (Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim, USA) 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 วันหลังทำการให้พลาสมิดีเอ็นเอ เพื่อนำไปสกัดซีรัมเพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธีนิวทรัลไลเซชัน และนำ PBMCs มาตรวจสอบ cell mediated immunity โดยวิธี Lymphocyte proliferation assay

จากการทดลองพบว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนไม่ให้ผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำเมื่อวัดโดยวิธี ELISA แตกต่างจากกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นที่ให้ผลการตอบสนองเมื่อวัดโดยวิธีนี้ตั้งแต่ 7 วันหลังฉีดวัคซีน

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อวัดโดยวิธีนิวทรัลไลเซชันจากตารางที่ 1 พบว่ากลุ่มควบคุมลบมีค่าผลเลือดเป็นลบตลอดการทดลอง กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเพิ่มขึ้นของค่า SN titer ที่วัดโดยวิธี serum neutralization assay ตั้งแต่วันที่ 21 หลังได้รับวัคซีน และมีการตอบสนองที่สูง

กว่า ในขณะที่เดียวกัน 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 เป็นกลุ่มฉีดวัคซีนไวรัสฟิอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดฟังก์ชันเซลล์ที่วัดโดยวิธี Lymphocyte Proliferative assay โดยใช้ CFSE พบว่ากลุ่มควบคุมลบมีค่าผลเลือดเป็นลบตลอดการทดลอง กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีการเพิ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 14 หลังได้รับวัคซีน และมีการตอบสนองที่สูง ในขณะเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอวัคซีน ไม่พบการตอบสนอง ส่วนการตอบสนองที่พบในวันที่ 42 หลังได้รับวัคซีน มีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 2

แสดงผลการคำนวณการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMCs ในสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นและดีเอ็นเอวัคซีนโดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลาต่างๆหลังการให้เชื้อ

กลุ่ม	จำนวนวันหลังการติดเชื้อ (วัน)						
	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 เป็นกลุ่มฉีดวัคซีนไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผล

จากสาเหตุที่เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์สูง และผลการวิจัยที่ทางทีมผู้วิจัยได้สำรวจ และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของของยีน ORF5 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในฟาร์มสุกรของประเทศไทย มานาน (Nilubol et al., 2012; Nilubol et al., 2013) พบว่าเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย มีการกลายพันธุ์ที่สูงมาก นอกจากนั้นเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยแต่ละสายพันธุ์ยังสามารถแบ่งออกเป็นคลัสเตอร์ย่อยๆได้อีก แต่จากการวิเคราะห์พบว่าไวรัสทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีกลไกการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง neutralizing 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-linked glycosylation site เท่านั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วน primary neutralizing epitope ส่วนไวรัสในคลัสเตอร์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไวรัสตั้งต้นมาก จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วน decoy epitope และ N-linked glycosylation site มาก การมี decoy epitope และการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ อาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการสร้างแอนติบอดีแบบ non-neutralizing antibody แทน neutralizing antibody ทำให้ไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรคพาร์อาร์เอสได้ ถ้ามีการตัดส่วน decoy epitope ออกหรือมีการแทรกด้วยสายพันธุกรรมบางอย่างทำให้ decoy epitope อยู่ห่างจาก neutralizing epitope อาจทำให้ร่างกายมีการกระตุ้น neutralizing antibody ได้ดีขึ้น จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทีมผู้วิจัยสนใจที่จะผลิตวัคซีนป้องกันโรคพาร์อาร์เอส รูปแบบใหม่ ที่เป็นพลาสมิดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PAN DR helper T-cell epitope (PADRE) ที่ส่วนระหว่าง decoy epitope, N-linked glycosylation site และ neutralizing epitope เพื่อเป็นต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับใช้ทดลองในสุกร

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการฉีดดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ยังให้ผลได้ไม่ดีในกรณีที่ฉีดเข้าใดผิวหนัง เนื่องจากไม่พบการกระตุ้นภูมิที่สูงเมื่อวัดโดยวิธี serum neutralization assay และ lymphocyte proliferation assay การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกิดช้าเมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนเชื้อเป็น การไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทสารน้ำของดีเอ็นเอ PADRE เมื่อวัดโดยวิธี ELISA ถือเป็นเรื่องปกติ เนื่องแอนติบอดีที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ELISA นั้นผลิตมาจากนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน แต่ดีเอ็นเอวัคซีน PADRE ผลิตต่อโปรตีนในส่วน GP5 ทำให้ไม่เกิดการตอบสนอง การตอบสนองเมื่อวัดโดยวิธี 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 หรือภูมิคุ้มกันแบบพั้งเซลล์ นอกจากนั้นการเพิ่มสารเสริมฤทธิ์หรือ Adjuvant ก็เป็นอีกปัจจัยที่สามารถส่งผลในการเพิ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

สรุป

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

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

1. ต้นแบบดีเอ็นเอวัคซีน ที่มีส่วนประกอบของยีน ORF5 และมีการแทรก PADRE ระหว่าง N-linked 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.
- Meulenbergh, J.J., 2000. PRRSV, the virus. *Vet Res* 31, 11-21.
- Meulenbergh, 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., Piriyaopongsa, 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., Meulenbergh, 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.

