PDF/97/2544 ดร.สันนิภา สุรทัตต์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

โดย

สันนิภา สุรทัตต์ และคณะ

สิงหาคม ๒๕๔๕

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

โดย

สันนิภา สุรทัตต์ และคณะ

- 9 มิ.ย. 2546
วันที่.....
เลขทะเบียน.....00015
เลขเรียกหนังสือ.....PDF 44 ส
ว๕๙๖

สนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ห้องสมุด

สัญญาเลขที่ PDF/97/2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ต่อการสร้าง cytokines ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร

คณะผู้วิจัย

สันนิภา สุรทัตต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ยง ภู่วรวรรณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทคัดย่อ 1

ABSTRACT 2

หน้าสรุปโครงการ (EXECUTIVE SUMMARY) 3

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา 3
2. วัตถุประสงค์ 4
3. ระเบียบวิธีวิจัย 4
4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในช่วงแต่ละ 6 เดือน 5
5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 5
6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน) 5

บทนำ 6

อุปกรณ์และวิธีการ 8

1. ไวรัส 8
2. สุกรทดลอง 8
3. การปั่นแยกและเพาะเลี้ยง PBMC 8
4. การสกัด RNA และ Reverse transcription 8
5. Multiplex PCR 9
6. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ cytokine gene โดยวิธี densitometric analysis 9
7. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้ 9

ผลการวิจัย 11

1. การพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR) 11
2. อิทธิพลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของ cytokine gene ของ porcine PBMC 13

วิจารณ์ 16

OUTPUT ที่ได้จากโครงการ 19

REFERENCES 20

ภาคผนวก 23

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR) เพื่อนำมาใช้ศึกษาบทบาทของเชื้อไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ต่อระดับการแสดงออกของ gene ที่สร้างไซโตคายน์ชนิดต่างๆ ได้แก่ interferon-γ (IFN-γ), Interleukin 2 (IL-2), IL-4 และ IL-10 ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร ผลจากการศึกษาผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค MPCR ได้เป็นผลสำเร็จ และแสดงให้เห็นว่าเชื้อ PRRSV มีอิทธิพลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene จาก PBMC ของสุกรได้อย่างเด่นชัดเมื่อเทียบกับ cytokine gene ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เชื้อ PRRSV ยังมีผลรบกวนการตอบสนองต่อ recall antigen โดยเมื่อนำ PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมา culture ร่วมกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (recall antigen) และ PRRSV จะพบว่ามีการแสดงออกของ IFN-γ gene ที่ต่ำลง และมีการแสดงออกของ IL-10 gene ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ PBMC จากสุกรตัวเดียวกันที่นำมา culture ร่วมกับเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อ PRRSV มีผลน้อยมากต่อการแสดงออกของ IL-2 และ IL-4 gene ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นการสร้าง IL-10 อาจเป็นกลไกหนึ่งซึ่งเชื้อ PRRSV ใช้ในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อ

ABSTRACT

The objective of this work is to establish the multiplex polymerase chain reaction (MPCR) assay, which allowed a semi-quantitative analysis of porcine cytokine, IFN-γ, IL-2, IL-4, and IL-10 gene expressions simultaneously from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Once established, the assay was used to study the role of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on porcine cytokine gene expression. In the presence of PRRSV, the IL-10 gene expression in porcine PBMC was prominently upregulated. In a separate experiment, in which PBMC from pigs previously vaccinated with the classical swine fever virus (CSFV) vaccine were used in the study, *in vitro* stimulation with CSFV enhanced the IFN-γ gene expression in the primed PBMC. However, significant reduction of IFN-γ and upregulation of IL-10 gene expression were observed when PRRSV were co-cultured with CSFV. This finding indicated that the presence of PRRSV enhanced the IL-10 gene expression in porcine PBMC, and could significantly interfere with the recall antigen response. In both experiments, the changes in IL-2 and IL-4 gene expression were minimal. Our results implied that enhanced IL-10 production might be one of the strategies used by PRRSV to regulate the host immune system.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา จนกระทั่งเมื่อปี พ.ศ. 2534 ได้มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นผลสำเร็จครั้งแรก โดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996) สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี่ Arteriviridae เนื่องจากเป็นเชื้อที่เพิ่งค้นพบใหม่ การศึกษาเกี่ยวกับ PRRSV จึงมักเป็นการศึกษาข้อมูลในด้านระบาดวิทยาและไวรัสวิทยาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและความสัมพันธ์ของเชื้อ PRRSV กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคของสุกร (viral-host relationship) มีอยู่จำกัดและยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก จากรายงานการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan et al., 1997) ภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV สามารถคงอยู่ในตัวสัตว์ได้เป็นระยะเวลานานแม้ว่าสัตว์จะไม่แสดงอาการของโรคแล้ว (persistent infection) และมีการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยการมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager and Mengeling, 2000) แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานโดยตรงถึงอิทธิพลของ PRRSV ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่านทาง cytokine network แต่อย่างใด

สาเหตุที่การศึกษาด้านวิทยาการภูมิคุ้มโรคในสุกรที่เกี่ยวข้องกับ PRRSV ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักแม้แต่ในต่างประเทศ อาจเนื่องมาจาก 1) ความยุ่งยากในการเลี้ยงเชื้อ PRRSV ในห้องปฏิบัติการและ 2) ความจำกัดของ reagent และ monoclonal antibody สำหรับที่จะใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามในช่วงปีที่ผ่านมาได้มีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการที่สามารถแยกและเพาะเลี้ยง PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้จากภายในประเทศ ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผลสำเร็จ (รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, ข้อมูลส่วนตัว) และเป็นที่มาของการวางแผนงานวิจัยเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับ PRRSV ในครั้งนี้

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และ cytokine ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบ ภูมิคุ้มโรคมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่า cytokine เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค cytokine จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น และ cytokine แต่ละชนิดก็จะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือกดการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันไป cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T lymphocyte จัดเป็น cytokine กลุ่มที่สำคัญที่สุดกลุ่มหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคโดยรวม ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและแบบแผน (pattern) ของการสร้าง cytokine ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ทดลอง สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา (Zuckermann et al., 1999; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2000) แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถศึกษาถึงระดับ cytokine ได้ทีละหลายชนิด เนื่องจากขาด monoclonal antibody ซึ่งมีราคาแพงและมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค RT-PCR เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของ cytokine ของ gene ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่สร้างขึ้นได้ (Dozois et al., 1997) โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบ

ภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการตรวจวัดการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี multiplex RT-PCR คณะผู้วิจัยเชื่อว่าข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการทำความเข้าใจในด้านพยาธิกำเนิดของโรค PRRS และเป็นพื้นฐานไปสู่งานวิจัยในแนวลึกที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในลำดับต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค multiplex RT-PCR ไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ ในสุกรที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ ของ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ที่แยกได้จากสุกร โดยวิธี multiplex RT-PCR

3. ระเบียบวิธีวิจัย

1) คัดเลือกเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และทำการเพิ่มจำนวน เพื่อใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์ PBMC (ณ ห้องปฏิบัติการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
2) คัดเลือก primer ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของ cytokine genes ได้แก่ IL-2, IFN-gamma, IL-4 และ IL-10 ของสุกร (โดยทั่วไป cytokine เหล่านี้จะถูกสร้างโดยเซลล์กลุ่ม T lymphocyte) เนื่องจากผู้วิจัยต้องการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการ express ของ cytokine genes ทั้ง 4 ชนิดภายใต้ condition เดียวกัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ชุด primer ที่มีการ optimize ให้สามารถใช้ร่วมกันในสภาวะเดียวกัน และมี positive control ที่เหมาะสม ในการทดลองเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยจะเลือกใช้ commercial multiplex RT-PCR set ที่ได้มีการ optimize primer set ไว้แล้วโดยบริษัทผู้ผลิต
3) คัดเลือกสุกรที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) และเก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) เพื่อนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation
4) นำ PBMC ที่ได้มา culture ร่วมกับ PRRSV (*in vitro* stimulation) ในระยะเวลาที่เหมาะสมแล้วนำเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาตรวจหา cytokine gene expression โดยวิธี multiplex RT-PCR (โดยใช้ห้องปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ ร่วมกับห้องปฏิบัติการที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยสามารถแยกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

   - *In vitro* culture and RNA extraction: ทำการ culture PBMC ร่วมกับ PRRSV ที่เวลาและขนาด (multiplicity of infection) ต่าง ๆ กัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดแยก mRNA
   - Production of cDNA: นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดย reverse transcriptase
   - PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวนของ cytokine gene จาก cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้นโดยวิธี multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ cytokine gene ได้แก่ IL-2, IFN-gamma, IL-4 และ IL-10
   - ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis และเนื่องจาก amplification efficiency ของ primer ทุกคู่มีค่าเท่ากัน ดังนั้นความเข้มของ band ของแต่ละ amplicon จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประเมินความแตกต่างของระดับการสร้าง mRNA ของแต่ละยีนได้
5) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผลการทดลอง รวมระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 1 ปี

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในช่วงแต่ละ 6 เดือน

กิจกรรมการดำเนินงาน	เดือนที่ 1					6						12
1) คัดเลือก primer และสภาวะที่เหมาะสม สำหรับวิธี multiplex PCR และเตรียมพร้อมในห้องปฏิบัติการ	←		→									
2) เตรียม PRRSV สำหรับนำมาใช้ในการกระตุ้น PBMC			←			→						
3) พัฒนาและปรับปรุง multiplex PCR				←		→						
4) ส่งรายงานความก้าวหน้า						★						
5) ศึกษาผลของ PRRSV ต่อการสร้าง cytokine และ PBMC						←					→	
6) สรุป วิเคราะห์และรายงานผล										←	→	★

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: An *in vitro* effect of PRRSV on the level of cytokine production by porcine PBMC

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Veterinary Immunology and Immunopathology หรือ Viral immunology

6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน)

1) ค่าตอบแทน (10,000 บาทต่อเดือน)	120,000 บาท
2) ค่าวัสดุ (72,000 บาท)	
- วัสดุและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับ multiplex RT-PCR และ gel electrophoresis	65,000 บาท
- วัสดุและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับ PBMC isolation และ tissue culture อื่น ๆ	7,000 บาท
3) ค่าใช้สอย (3,000 บาท)	
- ค่าถ่ายเอกสารและจัดทำรายงาน	2,000 บาท
- ค่าพาหนะและน้ำมัน เพื่อเก็บตัวอย่าง	1,000 บาท
4) ค่าสุกรทดลอง 5,000 บาท	
รวม	**200,000 บาท**

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา โดยมีรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2534 โดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996) สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี่ Arteriviridae

PRRSV ติดเข้าสู่สุกรโดยการหายใจผ่านเข้าทาง nasal epithelial cells จากนั้นเข้าสู่ต่อมทอนซิล และปอด แล้วกระจายไปทั่วร่างกายภาย แม้ว่า PRRSV จะเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการ infect สุกรที่มีประสิทธิภาพสูงมาก กล่าวคือต้องการเชื้อปริมาณน้อยมากในการที่จะทำให้สัตว์เป็นโรค แต่จากการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan et al., 1997) แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม lymphocytes ได้ (Molitor et al., 1997) เชื้อ PRRSV ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ทั่วร่างกาย อาทิเช่น pneumonia, myocarditis, encephalitis, vasculitis (Rossow et al., 1995) พยาธิสภาพสำคัญที่เกิดอย่างหนึ่งหลังการติดเชื้อ PRRSV คือ พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lymphadenopathy) โดยจะพบ follicular hypertrophy และ hyperplasia ตั้งแต่วันที่ 10-14 หลังการติดเชื้อและจะปรากฏอาการอยู่ต่อไปนานหลายสัปดาห์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพนั้นมักไม่สอดคล้องกับปริมาณ viral antigen ที่ตรวจพบในบริเวณนั้น (reviewed in Lager and Mengeling, 2000) โดยทั่วไปอาการของ PRRS จะเริ่มปรากฏขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และอาการจะค่อย ๆ หายไปภายในเวลา 1 เดือน จากนั้นเชื้อ PRRSV จะยังคงสามารถอยู่ในตัวสัตว์ที่หายป่วยแล้วได้เป็นเวลานานถึง 4 เดือน (persistent infection) โดยพบว่าสัตว์ที่มีการติดเชื้อจะสามารถปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอกและแพร่กระจายไปสู่สัตว์ตัวอื่นในระยะนี้ได้ (Meng, 2000) การติดเชื้อ PRRSV ถือเป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่ง ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแทรกซ้อนภายในปอด นำไปสู่ปัญหา porcine respiratory disease complex (PRDC) ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก (Halbur, 1998) และถือเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญในลำดับต้นๆ ของการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย

PRRSV เป็นเชื้อที่เชื่อว่ามีการวิวัฒนาการขึ้นมาในช่วงระยะเวลาไม่กี่สิบปีที่ผ่านมา และที่มีความหลากหลายในระหว่างสายพันธุ์สูงมาก PRRSV มักก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนในระยะหลัง จนบางครั้งมีผู้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกันของลักษณะของเชื้อและการเกิดโรคกับ human immunodeficiency virus ในมนุษย์ (Wardley et al., 1996) จากข้อมูลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อ PRRSV มีการยืนยันว่าสัตว์ที่ติดเชื้อสามารถสร้างภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น lymphoproliferation cytotoxic activity หากแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจะสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันเหล่านี้ภายหลังสัตว์ได้รับเชื้อไปแล้วอย่างน้อย 4 สัปดาห์ (Bautista and Molitor, 1997; Lopez Fuertes et al., 1999) ซึ่งโดยทฤษฎีแล้วการทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้อ จะเกิดขึ้นในภายในระยะเวลาอันสั้น และมักจะสามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Janeway et al., 1999) นอกจากนี้เมื่อศึกษาการสร้างแอนติบอดีต่อ PRRSV ในสัตว์ที่ได้รับเชื้อ พบว่าแม้ว่าสัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีภายในสัปดาห์แรกแต่จะสามารถตรวจวัด neutralizing antibody ได้ก็ต่อเมื่อ 4 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อไปแล้ว (Yoon et al., 1995) ซึ่งสอดคล้องกับเวลาที่สามารถตรวจพบการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้มีการตั้งข้อสังเกตว่า การสร้างแอนติบอดีในระยะแรกน่าจะเป็นประโยชน์ต่อเชื้อ PRRSV มากกว่า โดยการใช้ immune complex พาไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายทาง Fc receptor โดยเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า Antibody-dependent enhancement (Yoon et al., 1996)

จากการประมวลข้อมูลเบื้องต้นทั้งในแง่กลุ่มเซลล์เป้าหมายของ PRRSV ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อและยังมีความสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ specific immunity ในแง่การเป็น antigen presenting cell พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองที่พบทั่วร่างกาย ความล่าช้าของการสร้างภูมิคุ้มโรคในตัวสุกรที่ติดเชื้อ ความสามารถของเชื้อ PRRSV ที่คงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานาน และจากรายงานที่มักพบการติดเชื้ออื่นๆแทรกซ้อนภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV อยู่เสมอ ทำให้อาจเชื่อได้ว่า PRRSV น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์ (interaction) ใกล้ชิดกับในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับเซลล์ เพื่อประโยชน์ต่อการอยู่รอดของเชื้อในตัวสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยการมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager and Mengeling, 2000)

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และ cytokine ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่า cytokine เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไป cytokine จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น และ cytokine แต่ละชนิดก็จะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือกดการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันไป cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T lymphocyte จัดเป็น cytokine กลุ่มที่สำคัญที่สุดกลุ่มหนึ่งในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรคโดยรวม ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและแบบแผน (pattern) ของการสร้าง cytokine ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ทดลอง สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา (Zuckermann et al., 1999; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2000) แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถศึกษาถึงระดับ cytokine ได้ทีละหลายชนิด เนื่องจากขาด monoclonal antibody ซึ่งมีราคาแพงและมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค RT-PCR เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของ cytokine ของ gene ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่สร้างขึ้นได้ (Dozois et al., 1997) โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการตรวจวัดการสร้าง cytokine ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี multiplex RT-PCR คณะผู้วิจัยเชื่อว่าข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการทำความเข้าใจในด้านพยาธิกำเนิดของโรค PRRS และเป็นพื้นฐานไปสู่งานวิจัยในแนวลึกที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการภูมิคุ้มกันต่อโรค PRRS ในลำดับต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค multiplex RT-PCR ไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ ในสุกรที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ไวรัส

เชื้อไวรัส PRRSV (wild-type US strain) และเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (ALD strain) ได้รับอภินันทนาการจาก สพ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

2. สุกรทดลอง

การทดลองที่ 1 เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติของการได้รับเชื้อ PRRSV อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว สุกรดังกล่าวยังไม่เคยได้รับวัคซีนใดๆ ในวันที่เก็บตัวอย่างเลือด

การทดลองที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรอายุ 16 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว จากศูนย์ฝึก คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ซึ่งไม่มีประวัติของการได้รับเชื้อ PRRSV ในฝูงมาก่อน สุกรดังกล่าวเคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมาแล้วเมื่ออายุ 5 และ 7 สัปดาห์

3. การปั่นแยกและเพาะเลี้ยง PBMC

การปั่นแยก PBMC จากตัวอย่าง heparinized blood ใช้หลักการ gradient centrifugation ตามวิธีและขั้นตอนที่เคยรายงานไว้ก่อนแล้ว (Suradhat et al., 2001) ในขั้นสุดท้ายเตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้น $1x10^6$ cells/ml เพื่อทำการ *in vitro* stimulation ร่วมกับไวรัส หรือ Con A ภายใน 24-well-tissue cultured plate ที่ 37°C ภายใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง สำหรับปริมาณของ antigen ที่ใช้สำหรับ *in vitro* stimulation ได้แก่ ConA ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เชื้อ PRRSV ที่ 0.01 multiplicity of infection (m.o.i.) และเชื้อ CSFV ที่ 1 m.o.i. ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษในรูปประกอบ ภายหลัง incubating period ทำการ harvest เซลล์โดยการปั่นให้ตกตะกอน ที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้าง cell pellet 1 ครั้งด้วย phosphate-buffered saline แบ่งตัวอย่างเป็น 3 microcentrifuge tube ปั่นแยกและเก็บ cell pellet โดยเติมสาร RNAlater (Ambion, Austin, TX) จำนวน 200 µl/หลอด เก็บ pellet ไว้ที่ –20°C จนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

4. การสกัด RNA และ reverse transcription

นำตัวอย่างเซลล์มาสกัดแยก total RNA โดยใช้ Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Easton, PA) ตามคู่มือของผู้ผลิต ปริมาณ PBMC ตั้งต้นต่อการสกัดแต่ละครั้งจะมีประมาณ $2x10^6$ เซลล์ โดยระหว่างขั้นตอนการสกัด จะมีการกำจัด DNA ที่ปนมากับตัวอย่างโดย Dnase I enzyme อยู่ด้วย ในขั้นตอนสุดท้าย elute RNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างด้วย 60 µl Rnase-free water เก็บตัวอย่าง total RNA ที่ –80°C จนกว่าจะนำมาสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

นำตัวอย่าง total RNA ที่ได้จำนวน 10 µl มาทำการสังเคราะห์ cDNA โดยขบวนการ reverse transcription (RT) โดยใช้ Omniscript RT kit (Qiagen, Hilden, Germany) ซึ่งมีส่วนประกอบของ reverse transcriptase enzyme reaction buffer และ dNTPs ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ร่วมกับ random hexamer primer (Promega, Madison, WI) จำนวน 0.5 µg และ ribonuclease inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen, Carlsbad, CA) จำนวน 40 U ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 20 µl นำตัวอย่างไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ตามด้วยการหยุดปฏิกิริยาของ reverse transcriptase enzyme ที่ 93°C เป็นเวลา 5 นาที

5. Multiplex PCR

Primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา MPCR แสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา MPCR ที่มีปริมาตรรวม 50 µl ได้แก่ cDNA template 2 µl primer mix 10 µl dNTPs (Biobasic, Ont., Canada) ในความเข้มข้น 10mM Taq DNA polymerase 2.5 U (HotstarTaq DNA polymerase, Qiagen) 1.5x PCR buffer (Qiagen) การเพิ่มความเข้มข้นของ buffer ในปฏิกิริยา มีจุดประสงค์เพื่อปรับปริมาณของ $MgCl_2$ ให้เหมาะสมตามที่ได้มีการ optimize ไว้ก่อนหน้านี้ โดยใน 1.5x buffer มี $MgCl_2$ เป็นส่วนประกอบเท่ากับ 2.25 mM สำหรับความเข้มข้น (final concentration) ของ primer ได้แก่ 0.05 µM สำหรับ GAPDH primer 0.2 µM สำหรับ IL-10 primer และ 0.6 µM สำหรับ IL-2 และ IL-4 primer กำหนดอุณหภูมิและขั้นตอนของปฏิกิริยา MPCR ดังนี้

1)	Hotstart	95°C	15 min
2)	Denaturation	94°C	30 sec
3)	Annealing	55°C	45 sec
4)	Extension	72°C	45 sec
5)	Repeat 2-4	33 cycles	
6)	Final extension	72°C	5 min
7)	Cooling	4°C	

สำหรับจำนวนรอบของ PCR reaction ได้มีการ optimize มาก่อนล่วงหน้าเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี amplicon ใดๆ ที่เข้าสู่ plateau phase ในระหว่างการปฏิกิริยา MPCR

ภายหลังปฏิกิริยา นำ PCR product ปริมาณ 10 µl มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2.5% Agarose gel ใน TBE buffer (GIBCO/BRL) ที่มีส่วนผสมของ ethidium bromide (Research Organics, Cleveland, OH) 0.5 µg/ml โดยทุกครั้งจะ run DNA molecular weight marker (100 bp ladder, GIBCO/BRL) ร่วมด้วยเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของขนาดของ product ตรวจดูผลด้วยแสง ultraviolet และทำการบันทึกภาพด้วย Photo Documentation System (Vilber Lourmat, France)

6. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ cytokine gene โดยวิธี densitometric analysis

นำภาพ (digital image) ของ gel ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของ product โดยใช้ Scion Image software (Scion Corporation, USA) ซึ่งใช้หลักการของ densitometry ในการคำนวณปริมาณของ PCR product โดยแสดงผลเป็นปริมาณ pixel ที่อ่านได้ของแต่ละ peak (product) จากนั้นนำค่า pixel value ที่อ่านได้ของ cytokine transcript มาทำการ normalize กับปริมาณของ Housekeeping gene transcript (GAPDH) จากตัวอย่างเดียวกัน เพื่อตัดปัญหาความไม่สม่ำเสมอของปริมาณ template ตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา โดยใช้สูตร

% expression level = (sample pixel value/ GAPDH pixel value)x100

7. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้

PCR product ที่ได้จาก MPCR จะถูกนำมาวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับเบส โดยวิธี sequencing โดยตัด product จาก agarose gel แล้ว purify โดยใช้ Nucleospin® Extract kit (Mancherey-Nagel) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นนำ product ที่ได้มาใช้เป็น template สำหรับปฏิกิริยา sequencing (DNA sequencing kit, Big dye terminator cycle sequencing, ABI Prism PE Applied Biosystems, USA) และอ่านวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย ABI prism 310 genetic analyser จากนั้นทำการวิเคราะห์ sequence identity โดยใช้ NCBI Blast software

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer ข้อมูลอ้างอิง และขนาดของ PCR product ที่ได้จาก primer แต่ละคู่ที่ใช้ในการศึกษานี้

Gene specificity	Oligonucleotide sequences (5'-3')	GenBank Acc. No.	Product (bp)
GAPDH	F-TTCCACGGCACAGTCAA R-GCAGGTCAGGTCCACAA	AF017079	576
IFN-γ	F-CTCTCCGAAACAATGAGTTATACAA R-GCTCTCTGGCCTTGGAA	X53085	503
IL-10	F- AGCCAGCATTAAGTCTGAGAA R-CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA	L20001	394
IL-2	F-TCTTGTGTTGCATTGCACTAA R-TCAGAGTTTTTGCTTTGACCTAA	X56750	280
IL-4	F- GGACACAAGTGCGACATCA R- GCACGTGTGGTGTCTGTA	X68330	186

F = forward, R=reverse

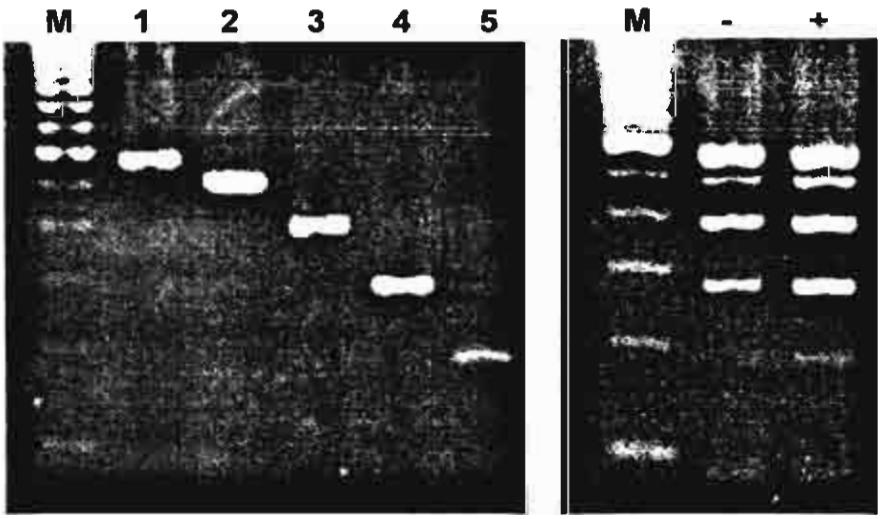
ผลการวิจัย

1. การพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction (MPCR)

ตามข้อเสนอโครงการที่ได้เสนอในระเบียบวิธีวิจัยเดิมไว้ว่า "...เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออก ของ cytokine genes ทั้ง 4 ชนิด รวมทั้ง reference gene (GAPDH) ภายใต้ condition เดียวกัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ชุด primer ที่มีการออกแบบให้สามารถใช้ร่วมกันในสภาวะเดียวกัน และมี positive control ที่เหมาะสม..." ในการทดลองเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยจะเลือกใช้ commercial multiplex RT-PCR set (Cytoexpress™ Multiplex PCR Swine Th1/Th2 switch cytokine) ของบริษัท Biosource (Camarillo, CA) ที่ได้มีการ optimize primer set ไว้แล้วโดยบริษัทผู้ผลิต และผู้วิจัยได้เสนอผลการวิจัยไปบ้างแล้วในช่วงรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน โดยพบว่าชุด primer set นี้มีปัญหาในแง่ที่ว่าไม่สามารถทำการ amplify housekeeping gene (GAPDH) จากตัวอย่างจริงได้ แม้ว่าได้มีการปรับ condition ให้สามารถเพิ่มจำนวนของ product ทั้ง 5 ชนิดจาก positive control ที่ให้มาพร้อมกับชุด primer ได้ ต่อมาภายหลังเมื่อผู้วิจัยไม่สามารถแก้ปัญหาได้และได้ติดต่อสอบถามกลับไปยังส่วน technical service ของบริษัท Biosource ได้มีการตอบกลับมาโดยทางบริษัทยอมรับว่าชุดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีปัญหาจริง และได้มีการร้องเรียนปัญหาเช่นเดียวกันนี้จากผู้ซื้อหลายๆราย และในขณะที่ตอบจดหมายนั้นทางบริษัทยังไม่ทราบสาเหตุและวิธีการแก้ไข ดังนั้นจึงเป็นอันสรุปว่าไม่สามารถใช้ primer set ดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้ได้

แม้ว่าจะมีรายงานลำดับเบสของ primer สำหรับใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวกับการแสดงออกของ cytokine gene ของสุกรอยู่บ้าง (Dozois et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2001) แต่ primer เหล่านี้ได้รับการออกแบบมาสำหรับการใช้งานในเทคนิค PCR สำหรับการตรวจหา product เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งและมีค่า melting temperature (Tm) ที่แตกต่างกันอยู่ค่อนข้างมาก จึงไม่เหมาะสมกับเทคนิค multiplex PCR ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการออกแบบ primer ทั้งหมดใหม่เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้ sequence อ้างอิง ที่ได้จาก GenBank และได้ออกแบบโดยมุ่งเน้นให้ primer ทุกสายมี Tm เท่ากัน (ในที่นี้เท่ากับ 60°C) เพื่อลดปัญหาความแตกต่างกันของ amplification efficiency ของแต่ละ primer และนอกจากนี้ primer เหล่านี้จะต้องให้ PCR product ที่มีขนาดที่แตกต่างกัน และสามารถมองเห็นแยกออกจากกันได้ชัดเจนเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณของ product โดยวิธี agarose gel electrophoresis และ densitometry ต่อไป จากการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ออกแบบ primer set ที่สามารถใช้สำหรับ MPCR (ตารางที่ 1) ทำการปรับองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับของ PCR reaction ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของ primer template และ $MgCl_2$ จำนวนรอบและอุณหภูมิของ MPCR จนในที่สุดสามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ได้เป็นผลสำเร็จ โดยในช่วงของการ optimization นี้ได้ใช้ตัวอย่าง total RNA ที่สกัดจาก PBMC ของสุกรที่ culture ร่วมกับ 10 μg/ml ConA มาใช้เป็น positive control เพื่อดูระดับการแสดงออกของ cytokine gene ได้ (รูปประกอบที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product ที่ได้จาก MPCR โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencer โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และพบว่า product ที่ได้มีความถูกต้องของลำดับเบสตามที่ควรจะเป็น

อนึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่า % expression level จากตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นนี้ ผู้วิจัยพบว่าในเซลล์ปกติ ที่ culture โดยไม่เติม mitogen ก็สามารถพบการแสดงออกของ cytokine gene (background expression) ได้อยู่ในระดับหนึ่ง (รูปประกอบที่ 1) และนอกจากนี้สุกรแต่ละตัวจะมีค่า background expression ที่ค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้นในการแสดงผลในลำดับถัดไป จะใช้ค่า % expression level ที่ได้ทำการหักลบ background expression ของสุกรตัวเดียวกันออกไปแล้ว ก่อนที่จะนำมาคำนวณค่า mean ± SEM ต่อไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในบางครั้งค่า% expression level มีค่าเป็นลบ ซึ่งหมายความว่าการแสดงออกของ cytokine gene ในตัวอย่างนั้นมี



รูปประกอบที่ 1 **รูปซ้าย)** แสดง product ของcytokine gene แต่ละชนิด ได้แก่ 1) GAPDH 2) IFN-γ. 3) IL-10, 4) IL-2, 5) IL-4 ที่ได้จาก PCR จากตัวอย่าง PBMC ที่ culture ร่วมกับ ConA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **รูปขวา)** แสดงผลของ MPCR จากตัวอย่าง PBMC control (-) และ PBMC ที่ culture ร่วมกับ ConA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (+) lane M คือ 100 bp molecular weight DNA ladder

ค่าต่ำกว่าการแสดงออกของ cytokine gene เดียวกันใน control PBMC จากสุกรตัวเดียวกัน

2. อิทธิพลของ PRRSV ต่อการแสดงออกของ cytokine gene ของ porcine PBMC

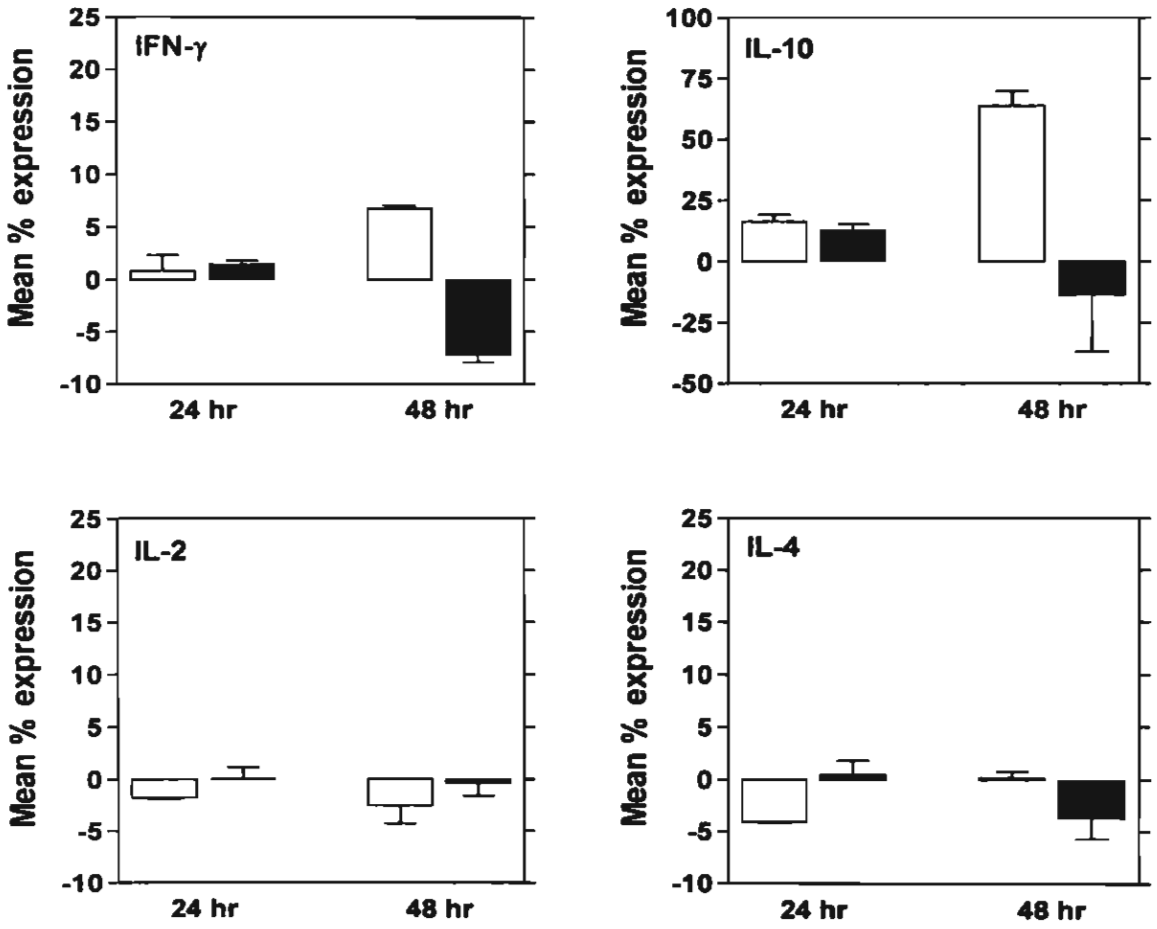
ตามที่ผู้วิจัยได้เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการว่าจะใช้ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามในระหว่างช่วงที่ดำเนินการศึกษาได้เกิดปัญหาตู้แช่แข็งขัดข้อง และมีการสูญเสียของ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย รวมทั้งเซลล์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง จนทำให้ไม่สามารถจัดหา และเพิ่มจำนวนเชื้อได้ทันก่อนสิ้นสุดโครงการ ในการนี้ผู้วิจัยจึงต้องใช้เชื้อ reference strain ซึ่งเป็นสายพันธุ์ US จากต่างประเทศ ที่มีความรุนแรงสูง ซึ่งก็พบว่ามีระบาดอยู่ในประเทศไทยเช่นเดียวกัน (รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช ข้อมูลส่วนตัว) มาใช้ในการทดลองนี้แทน

ผลจากการศึกษาในการทดลองที่ 1 เมื่อทำการ culture เชื้อร่วมกับ PBMC ที่แยกได้จาก naïve pig เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ PRRSV ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene อย่างเห็นเด่นชัดเมื่อเทียบกับ cytokine gene อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene อย่างต่อเนื่องเมื่อทำการ culture เซลล์กับไวรัสต่อไปถึง 48 ชั่วโมง โดยพบว่าเชื้อที่ระดับ 0.01 m.o.i. มีผลต่อการสร้าง IL-10 transcript ที่ดีกว่าที่ระดับ 0.001 m.o.i. (รูปประกอบที่ 2) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มการแสดงออกของ IFN-γ gene อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า IL-10 ส่วน IL-2 และ IL-4 gene นั้นพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ gene ที่น้อยมากหรือไม่มีเลย ส่วนสาเหตุที่ใช้ปริมาณของไวรัสที่ระดับสูงสุดแค่ 0.01 m.o.i. ก็เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่อง titer ของไวรัสที่ได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มักจะได้ไม่สูงนัก โดยทั่วไปอยู่ในระดับ 10^6 $TCID_{50}$/ml (รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช, ข้อมูลส่วนตัว) อย่างไรก็ดีจากรายงานที่ผ่านมา ปริมาณไวรัสที่ 0.01 m.o.i. นั้น เพียงพอที่จะใช้สำหรับการศึกษาผลของไวรัสต่อการสร้าง cytokine (Thanawongnuwech et al., 2001)

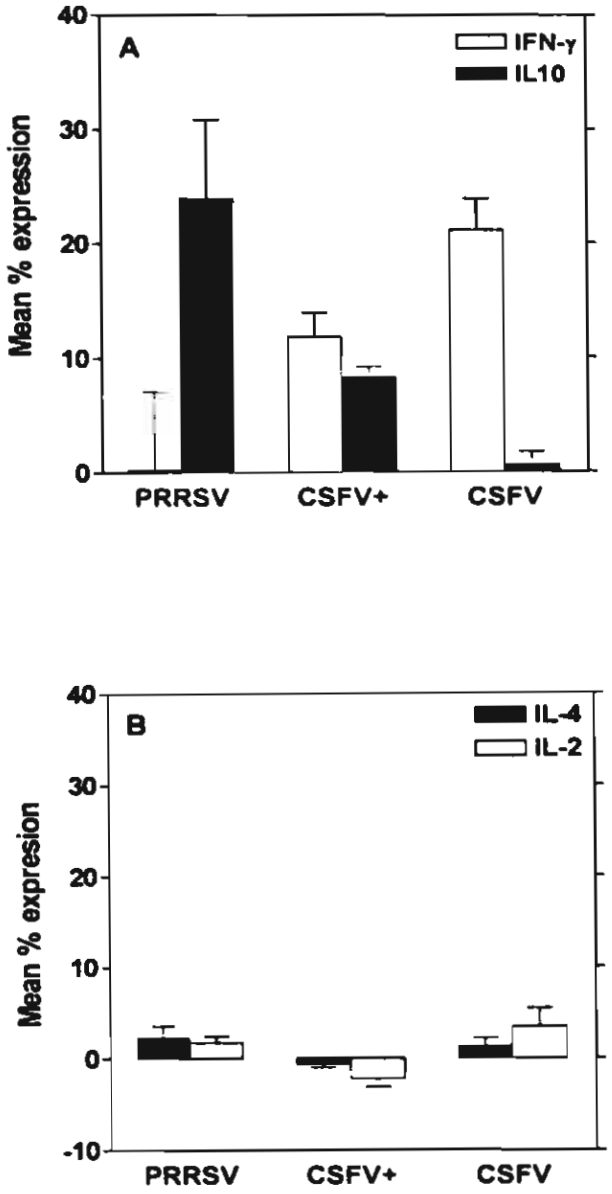
ผลจากการทดลองในการศึกษาแรก แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อระดับการแสดงออกของ cytokine gene โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-10 gene ถือเป็นการค้นพบที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน อย่างไรก็ดีผู้วิจัยตระหนักดีว่า เทคนิค MPCR นั้นเป็นเทคนิคที่เริ่มพัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งถึงแม้ว่าจะ optimize จนเป็นผลสำเร็จในระดับหนึ่ง แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าอาจมีการ bias ของการ amplify ในระหว่างปฏิกิริยา MPCR และน่าที่จะมีการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ ในการทดลองต่อมาผู้วิจัยจึงได้เลือกที่จะเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาแล้ว (รายละเอียดอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการ) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เมื่อนำ PBMC ของสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อนมา culture ร่วมกับเชื้ออหิวาต์สุกร (recall antigen) จะมีการสร้าง IFN-γ ขึ้นและสามารถตรวจวัดการสร้างโปรตีนได้โดยเทคนิค ELISPOT (Suradhat et al., 2001) ดังนั้นการใช้เซลล์จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อน จะเป็น positive control ที่ดีสำหรับการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ IFN-γ gene โดยเทคนิค MPCR นอกจากนี้ยังจะได้รับข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวกับอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อแอนติเจนชนิดอื่น ซึ่งอาจสามารถในไปใช้อธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในสภาพการเลี้ยงจริงอีกด้วย

ผลจากการทดลองในช่วงที่ 2 นี้พบว่าสามารถยืนยันผลของ PRRSV ต่อการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ที่ใกล้เคียงกับการทดลองแรก นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้ออหิวาต์สุกร มีการเพิ่มการแสดงออกของ IFN-γ gene อย่างชัดเจนตามที่คาดไว้ ซึ่งเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค MPCR ในการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ cytokine gene นอกจากนี้ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การมีเชื้อ PRRSV ร่วมอยู่ในการ culture ระหว่างเซลล์ primed PBMC กับเชื้ออหิวาต์สุกร จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการแสดงออกของ cytokine gene อย่างชัดเจน กล่าวคือจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ IL-10 transcript และลดลงของปริมาณ IFN-γ transcript อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p<0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์จากสุกรตัวเดียวกันที่ culture กับเชื้ออหิวาต์สุกร เพียงอย่างเดียว จากการศึกษาครั้งนี้พบการ

เปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ IL-2 และ IL-4 gene น้อยมาก ซึ่งคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 (รูปประกอบที่ 3)



รูปประกอบที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ % expression ของ cytokine gene จาก PBMC ที่ culture ร่วมกับเชื้อ PRRSV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1)



รูปประกอบที่ 3 ค่าเฉลี่ย % expression ของ A) IFN-γ และ IL-10 B) IL-2 และ IL-4 gene จาก PBMC ของสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร และนำมา culture ร่วมกับ PRRSV หรือ CSFV หรือ PRRSV ร่วมกับ CSFV (CSFV+) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (การทดลองที่ 2)

วิจารณ์

โดยธรรมชาติแล้ว cytokine เป็นสารที่ไม่มีการสะสมภายในเซลล์ cytokine จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม การสร้าง mRNA ของ cytokine โดยส่วนมากแล้วจะมีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีน อย่างไรก็ดีข้อจำกัดหนึ่งของการศึกษาการ mRNA expression ก็คือ ระดับ mRNA นั้นอาจไม่สามารถบ่งบอกปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นอย่างแท้จริงได้ ซึ่งโดยทางปฏิบัติแล้วควรมีการศึกษาระดับการสร้างของทั้ง mRNA และ protein ควบคู่กันไปเพื่อหาความสัมพันธ์ของ parameter ทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ดีการตรวจวัดการสร้าง cytokine ในสุกรก็ยังมีข้อจำกัดอยู่อย่างมาก โดยเฉพาะในเรื่อง monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ porcine cytokine ที่จำเป็นต่อการตรวจวัดซึ่งยังมีราคาสูงมาก และในบางกรณียังไม่สามารถผลิตได้ นอกจากนี้ cytokine ที่สร้างขึ้นแม้ว่าจะเป็นปริมาณมากอาจถูกจับโดย receptor บนผิวของ target cell อื่นๆ และทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยใช้ protein assay ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้ protein assay คือค่า half-life ของ cytokine แต่ละชนิดนั้นมีค่าไม่เท่ากันและเป็นอุปสรรคสำคัญในการตรวจวัดโดยเฉพาะในการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันที่ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของการสร้าง cytokine หลายชนิดในเวลาเดียวกัน จากเหตุผลข้างต้น รวมถึงการคำนึงในด้านต้นทุนของการตรวจวัดและความเป็นไปได้ของโครงการ ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการใช้ multiplex RT-PCR จะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ และเนื่องจากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยยังไม่มีอุปกรณ์อาทิเช่น light thermocycler หรืองบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจวัดปริมาณของ mRNA ที่แท้จริง การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการเปรียบเทียบในเชิงปริมาณ (semi-quantitative) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ mRNA ที่สร้างจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย PRRSV กับเซลล์ในภาวะปกติ (negative control) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะต้องนำไปประกอบกับข้อมูลในด้านอื่น เช่น clinical sign และ ผลของ PRRSV ที่มีต่อ effector mechanism ชนิดต่างๆของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อทำความเข้าใจระหว่างความสัมพันธ์ระหว่าง PRRSV และสุกรที่ติดเชื้อ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการทำความเข้าใจกับพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

ผลจากการศึกษานี้ผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของ cytokine gene ได้แก่ IFN-γ IL-10 IL-2 และ IL-4 ได้เป็นผลสำเร็จ โดยการออกแบบ primer ใหม่ทั้งหมดเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษานี้ ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเทคนิค MPCR เป็นเทคนิคที่มีความเป็นไปได้และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี densitometric analysis จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษาด้านวิทยาภูมิคุ้มกันในสุกรที่มีประสิทธิภาพสูงและต้นทุนต่ำได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษานี้แม้ว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ConA จะมีการเพิ่มของการแสดงออกของ cytokine gene อย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ดีเป็นที่น่าสังเกตว่า เซลล์ที่ culture ร่วมกับ control medium จะมีการแสดงออกของ gene อยู่ในระดับหนึ่ง ปรากฏการณ์นี้สามารถพบได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเซลล์มาศึกษานอกตัวสัตว์นั้นมีขั้นตอนมากมาย ซึ่งอาจส่งผลการทบต่อภาวะ homeostasis ของเซลล์ ที่มีผลต่อการแสดงออกของ gene ต่างๆ โดยเฉพาะ IL-10 gene การพบการแสดงออกของ IL-10 gene ใน unstimulated cells ก็เป็นข้อมูลที่ถือเป็นเรื่องปกติ และในสุกรเองก็เคยมีการรายงานไว้แล้วโดยคณะผู้วิจัยหลายกลุ่ม (Dozois et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2001) โดยปกติการแสดงออกของ IL-10 gene นั้นสามารถทำได้จากกลไกในเซลล์ที่หลากหลาย (reviewed in (Moore et al., 2001) และอาจเป็นไปได้ว่า IL-10 อาจเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสภาวะสมดุลย์ในการทำงานของเซลล์ การรายงานผลการทดลองในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการตัดผลของ background expression ออกก่อน โดยรายงานค่า % expression level ที่ได้ทำการหักลบค่า background expression ของสุกรแต่ละตัวออกก่อนที่จะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มต่อไป จากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่าเทคนิค MPCR สามารถตรวจเปรียบเทียบการแสดงออกของ cytokine gene ชนิดต่างๆได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-10 และ IFN-γ ในขณะที่การแสดงออกของ housekeeping gene, GAPDH นั้นมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้ GAPDH เป็น reference gene ที่ดีในสุกรได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณการแสดงออกของ IL-4

และ IL-2 gene นั้นไม่มีเปลี่ยนแปลงมากนักในระบบการศึกษานี้ ซึ่งอาจแตกต่างจากผลการศึกษาที่ได้จากสัตว์ต่าง species แต่อย่างไรก็ตามก็เคยมีการตั้งข้อสังเกตจากคณะผู้วิจัยอื่นที่ศึกษาการสร้าง mRNA ของ gene ดังกล่าวในสุกร โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR และไม่สามารถตรวจพบการสร้าง IL-2 และ IL4 mRNA ได้จากเซลล์ที่ทำการกระตุ้นด้วย mitogen หลายชนิดได้เช่นกัน ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ว่าสุกรอาจมีวิธีการใช้ cytokine ทั้ง 2 ชนิด ที่แตกต่างจากที่มีรายงานในมนุษย์และหนูทดลอง (Reddy et al., 2000)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่า PRRSV มีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene อย่างชัดเจนในทั้ง 2 การทดลอง ผลการศึกษานี้ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน แม้ว่าผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาในระยะต้นและไม่ได้มีการตรวจวัดระดับของ IL-10 ที่สร้างขึ้นจริง แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าการสร้าง IL-10 ในตัวสัตว์ที่ติดเชื้อค่อนข้างจะสอดคล้องกับปรากฏการณ์หลายๆ อย่างที่เกิดขึ้นในระหว่างการติดเชื้อ PRRSV ดังจะอภิปรายต่อไป นอกจากนี้ยังเคยมีการรายงานมาก่อนว่าในลูกสุกรที่เกิดจากแม่ที่เคยได้รับเชื้อ PRRSV มาก่อนจะสามารถตรวจพบการสร้าง IL-10 จาก PBMC ได้ในปริมาณสูงได้เช่นกัน (Feng et al., 2000)

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า IL-10 เป็น cytokine ที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การใช้ IL-10 เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการเพิ่มความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ใน host ถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีการนำมาใช้อยู่บ่อยครั้งโดยเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ในกลุ่ม monocyte/macrphage เชื้อโรคบางชนิดกระตุ้นให้ host สร้าง IL-10 ในขณะที่เชื้อโรคอีกหลายชนิดได้พัฒนาความสามารถในการสร้าง IL-10 ด้วยตัวเอง (Redpath et al., 2001; Fickenscher et al., 2002) IL-10 มีฤทธิ์กดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดตั้งแต่ monocyte macrophage dendritic cell NK-cell รวมไปถึง T cell โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Th1 cell (Moore et al., 2001) IL-10 มีฤทธิ์กดการสร้าง proinflammatory cytokine หลายชนิด จากเซลล์กลุ่ม monocyte/macrophage รวมทั้ง tumor necrosis factor- alpha (TNF-α) ซึ่งจัดเป็น cytokine ที่สำคัญที่สุดตัวหนึ่งในการเริ่มต้น cytokine cascade ของขบวนการอักเสบ (Abbas et al., 2000) เป็นที่น่าสังเกตว่าหลังการติดเชื้อ PRRSV จะแทบไม่สามารถตรวจวัดการสร้าง TNF-α ได้เลยจากเซลล์ที่แยกได้จากปอด (Van Reeth et al., 1999) ทั้งยังพบการกดการสร้าง IFN-α อย่างชัดเจนโดยไม่ได้มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Albina et al., 1998) และนอกจากนี้ยังเคยมีการรายงานไว้แล้วว่า PRRSV สามารถกดการทำงานของเซลล์ในกลุ่ม monocyte/macrophage ทั้งในด้าน phagocytic และ bacteriocidal activity (Thanawongnuwech et al., 1998) ซึ่งจะมีผลลดความสามารถของเซลล์เหล่านี้ในการกำจัดเชื้อออกจาก host อีกด้วย ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการกดการทำงานของเซลล์ในกลุ่ม monocyte และ macrophage โดยเชื้อ PRRSV อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางพยาธิสภาพที่พบในปอดของสัตว์ที่ติดเชื้อ PRRSV ที่มักจะไม่พบการอักเสบของเนื้อเยื่อมากนักเมื่อเทียบกับไวรัสชนิดอื่น แต่ในขณะเดียวกันก็มีการเรียก target cell เหล่านี้เข้ามาในบริเวณเพิ่มมากขึ้น (Van Reeth and Nauwynck, 2000) การกดการทำงานของเซลล์เหล่านี้ยังอาจสามารถนำไปใช้อธิบายการติดเชื้อแทรกซ้อนที่ปอดภายหลังการติดเชื้อ PRRSV ที่มักพบได้อยู่เสมอในสภาพการเลี้ยงจริง นอกจากนี้การกดการทำหน้าที่ของเซลล์เหล่านี้ในแง่ของการเป็น antigen-presenting cell จะส่งผลให้มีความล่าช้าของการกระตุ้นการทำงานของ specific immunity และเปิดโอกาสให้เชื้อ PRRSV จึงมีโอกาสเพิ่มจำนวนในร่างกายอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งตรงกับลักษณะของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ PRRSV ที่มักจะช้ากว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากความจำเพาะของเซลล์ที่ PRRSV สามารถเจริญอยู่ได้ และลักษณะของพยาธิสภาพ และการตอบสนองทางภูมิคุ้ม จึงเป็นไปได้ว่า PRRSV จะพัฒนาความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 ภายใน host เพื่อประโยชน์ของตัวไวรัสเอง

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการมีการติดเชื้อ PRRSV ร่วมด้วยอาจส่งผลรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อ antigen ชนิดอื่นอีกด้วย (การศึกษาที่ 2) แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่ได้ลงลึกไปถึงกลไกของการรบกวน แต่ก็อาจใช้อธิบายถึงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในสภาวะการเลี้ยงจริง ซึ่งมักพบว่าการติดเชื้อ PRRSV มักจะก่อให้

เกิดการรบกวนประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดอื่นที่ใช้กลไกของเซลล์ในการกำจัดเชื้อพิษ (De Bruin et al., 2000; Thacker et al., 2000)

แม้ว่าการศึกษานี้ได้ดำเนินมาสู่ระยะสุดท้ายของโครงการ ผลที่ได้รับจากงานวิจัยทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคสำหรับการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์โดยการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ cytokine gene ชนิดต่างๆ และชี้ให้เห็นอิทธิพลของเชื้อ PRRSV ต่อการแสดงออกของ cytokine gene ซึ่งถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาอย่างจริงจังมาก่อน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเชื่อว่าผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นจุดเริ่มของการศึกษาในแนวลึกอีกมากมาย เพื่อเพิ่มความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรค PRRS ให้ดีขึ้น และจะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะใช้ในการวางแนวทางในการจัดการและป้องกันการเกิดโรคในสุกรที่มีประสิทธิภาพและเป็นผลประโยชน์โดยตรงแก่เกษตรกรในประเทศต่อไป นอกจากนี้ผู้วิจัยเชื่อมั่นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ในในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรได้ในอีกหลายๆ ทาง

Output ที่ได้จากโครงการ

1. **Poster presentation**

   Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA) advanced course and conference; "Molecular mechanisms of infection and immunity" 21-25 October 2002, Ayutthaya Thailand.

   Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine cytokine gene expression

   Suradhat, S, Thanawongnuwech, R., and Poovorawan, Y.

2. **Manuscript** (คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ใน Journal of General Virology หรือ Viral Immunology)

   Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

   Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., and Poovorawan, Y.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

References

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S., 2000. Cytokines. In: Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders company, Philadelphia, pp. 235-269.

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

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

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, J., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and 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.

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

Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J.-P., Fairbrother, J. M. and Oswald, I. P., 1997. A reverse-transcription-polymerase chain reaction method to analyse porcine cytokine gene expression. Vet. Immunol. Immunopathol. 58, 287-300.

Duan, X., Nauwynck, H. J. and Pensaert, M. B., 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time interval after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Microbiol. 56, 9-19.

Feng, W. H., Tompkins, M., Xu, J., Brown, T., Laster, S. and McCaw, M. B., 2000. Cytokine production by pigs infected *in-utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia, pp. 657.

Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S. and Sticht, H., 2002. The interleukin-10 family of cytokines. Trends in Immunol. 23, 89-96.

Halbur, P. G., 1998. Porcine viral respiratory diseases. Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, UK, pp. 1-10.

Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M. and Capra, J. D., 1999. Host defense against infection. In: Immunobiology: The immune system in health and disease. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, London, pp. 363-415.

Lager, K. M. and Mengeling, W. L., 2000. PRRS: nature of the RNA virus and how it causes disease (A keynote paper). Proceedings of the 16th congress of the International Pig Veterinary Society. Melbourne, Australia, pp. 538-543.

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

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

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

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

Reddy, N. R. J., Borgs, P. and Wilkie, B. N., 2000. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. Vet. Immuno. Immunopathol. 74, 31-46.

Redpath, S., Ghazal, P. and Gascoigne, N. R., 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. Trends in Microbiol. 9, 86-92.

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

Suradhat, S. and Damrongwatanapokin, S., 2000. Establishment of an ELISPOT assay for detection of classical swine fever virus specific interferon-gamma secreting cells from porcine peripheral blood mononuclear cells. Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. Melbourne, Australia, pp. 619.

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

Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F. and Halbur, P. G., 2000. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine 18, 1244-1252.

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

Thanawongnuwech, R., 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. Immuno. Immunopathol. 79, 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 viral infections: correlation with pathology. Res. in 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.

Wardley, R. C., Martin, S. and Saif, L. J., 1996. Pathogenesis of viral infections. In: Tumbleson, M. E. and Schook, L. B. (Eds), Advances in swine in biomedical research, Vol. 2. Plenum press, New York, pp. 409-422.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., Laak, E. T., Bloemraad, F., Kluyver, E. D., Kragten, C., Buiten, L. V., Besten, A. D., Wagenaar, F., Broekhuijsen, A., Moonen, P., Zestra, T., Boer, E. D., Tibben, H., Jong, M., Veld, P. V. T., G., G., Gennep, J. V., Voets, M., Verheijden, J. and Braamskamp, J.,

1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quar. 13, 121-130.

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

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

Zuckermann, F. A., Martin, S., Husmann, R. J. and Brandt, J., 1999. Use of interleukin-12 to enhance the cellular immune response of swine to an activated herpesvirus vaccine. Adv. Vet. Med. 41, 447-461.

ภาคผนวก

1. Poster presentation ส่งเข้าร่วมในงานประชุม Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA) advanced course and conference; "Molecular mechanisms of infection and immunity" 21-25 October 2002, Ayutthaya, Thailand.

EFFECT OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ON THE PORCINE CYTOKINE GENE EXPRESSION

Sanipa Suradhat[1], Roongroje Thanawongnuwech[1], and Yong Poovorawan[2]

[1] The Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[2] The Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

To study the role of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on porcine cytokine production, we established the multiplex PCR assay, which allowed semi-quantitative analysis of porcine cytokine, IFN-γ, IL-2, IL-4, and IL-10 gene expression simultaneously from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In the presence of PRRSV, the IL-10 gene expression in porcine PBMC, isolated from naïve pigs, was prominently upregulated. In another separate experiment, in which PBMC from pigs, previously primed with a classical swine fever virus (CSFV) vaccine, were used for *in vitro* stimulation, the PBMC cultured in the presence of the recall antigen, CSFV, exhibited an enhanced IFN-γ gene expression. However, a significant reduction of IFN-γ and upregulation of IL-10 gene expression were observed in the PBMC cultured in the presence of CSFV and PRRSV. This finding indicated that the presence of PRRSV enhanced the IL-10 gene expression in porcine PBMC, and could significantly interfere with the recall antigen response. In both experiments, the changes in IL-2 and IL-4 gene expression were minimal. Our results implied that enhanced IL-10 production might be one of the strategies used by PRRSV to regulate the host immune system.

2. Manuscript (submitted to The Journal of General Virology)

Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

Sanipa Suradhat[1], Roongroje Thanawongnuwech[1], and Yong Poovorawan[2]

[1] The Faculty of Veterinary Science, [2] The Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Running title: PRRSV upregulated IL-10 gene expression

Total number of words in the main text:	3,645
Total number of words in the summary:	146
Number of tables:	1
Number of figures:	3

Author of Correspondence:

Sanipa Suradhat, DVM, Ph.D.
Department of Veterinary Microbiology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Henri-Dunant Rd., Pathumwan
Bangkok 10330, THAILAND
Phone: (662) 218-9583
Fax: (662) 251-1656
e-mail: Sanipa.S@chula.ac.th

Summary

Several lines of evidence suggest that Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) may have immunomodulatory effects on the host immune system. To study the role of PRRSV on porcine cytokine production, we established the multiplex PCR that allowed a semi-quantitative analysis of IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expression from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Our results showed that PRRSV predominantly upregulated the IL-10 gene expression in porcine PBMC. When PBMC isolated from pigs, previously primed with a classical swine fever virus (CSFV) vaccine, were cultured with CSFV and PRRSV, significant upregulation of IL-10 gene expression and reduction of IFN-γ gene expression were observed, indicating that the presence of PRRSV had influence on the recall antigen response. Our results implied that the enhanced IL-10 production might be one of the strategies used by PRRSV to modulate the host immune system.

Introduction

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is caused by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), an enveloped positive-stranded RNA virus that belongs to the family *Arteriviridae* (Snijder & Meulenberg, 1998). PRRSV has been recognized as one of the major etiological agents of Porcine Respiratory disease Complex (PRDC) which causes a serious health problem in pig industry worldwide (Halbur, 1998). Although the mechanism(s) by which PRRSV undertakes to invade the host immune system is unclear, several lines of evidence imply that PRRSV may negatively modulate the host immune system.

PRRSV are phenotypically highly variable, and generally cause a persistent infection with a wide range of secondary infection (Wardley *et al.*, 1996). Following initial infection, PRRSV persists in infected pigs up to 12 weeks and the infected pigs can shed infectious virus (Will *et al.*, 1997). Although PRRSV is highly contagious, the virus replication appears to be limited mainly within the phagocytic cell populations including macrophages and monocytes. This population was known to be the major effector cells of the lungs. Interestingly, in most cases, there is a lack of correlation between the amount of viral antigen and the degree of pathological lesions. These findings imply a possibility of immune mediated pathogenesis rather than the direct effect from viral infection (reviewed in Lager & Mengeling, 2000). In addition, several proinflammatory cytokines were undetectable or minimally increased following the exposure to PRRSV, as compared to other respiratory viruses (Van Reeth & Nauwynck, 2000).

The immune responses to PRRSV have been studied extensively, and viral-specific cellular responses in pigs have been demonstrated, including lymphocyte proliferation, delayed type hypersensitivity response, cytotoxic activity, and cytokine production. However, there seemed to be a delay in the responses upon PRRSV infection, as compared to other viral infections. Cellular response to PRRSV is not usually detected until 4 weeks following PRRSV infection (Bautista & Molitor, 1997; Lopez Fuertes *et al.*, 1999), whereas the cellular immune response to other virus, for example classical swine fever virus (CSFV), can be detected within a week following viral infection (Suradhat *et al.*, 2001). In addition, although PRRSV induces a strong antibody response within the first week post infection, neutralizing antibodies are only detected at 4 weeks post-infection, long after the virus is cleared from the blood circulation (Yoon *et al.*, 1995). Thus, there appears to be a delay in induction of both arms of immune responses in PRRSV infected pigs.

Cytokines play crucial role in induction and regulation of immune responses. However, studies of the role of cytokine in immune regulation in pigs have been limited due to the lack of porcine cytokine-specific immunological and biological assays. Recently, knowledge on the role of cytokines for immunopathology and host-pathogen interactions has been increased rapidly (Wood & Seow, 1996). A reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been shown to be a sensitive and effective method for measuring cytokine mRNA expression in porcine samples (Dozois *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2000; Thanawongnuwech *et al.*, 2001). The relative levels of cytokine expression can be semi-quantitatively analyzed by normalizing the target mRNA with the reference (i.e. housekeeping gene) transcripts. Multiplex polymerase chain reaction (MPCR) is a variant of PCR in which two or more amplicons can be amplified in the same reaction, therefore is a rapid and reliable way to study the level of cytokine gene expression. In this study, we established the MPCR assay for the study of porcine cytokine gene expression, in particular interferon-γ (IFN-γ), interleukin-10 (IL-10), IL-2 and IL-4, and used the established assay to study an *in vitro* effect of PRRSV on cytokine gene expressions in porcine PBMC.

Methods

Viruses. A wild-type US strain of PRRSV (SVI-275) and the CSFV, ALD strain, were kindly provided by Dr. S. Damrongwatanapokin at The National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand. The stock of PRRSV was prepared in MARC-145 cells and viral titers were determined as previously described (Thanawongnuwech *et al.*, 1998). The CSFV was propagated in a swine kidney cell line, SK-6 cells, and virus titers were determined as previously described (Suradhat *et al.*, 2001). The stock viruses were kept at –80 °C until needed.

Animals and immunization protocol. In the first experiment, blood samples were collected from three, five-week-old, non-vaccinated, crossbred pigs from a PRRSV-free commercial farm. In the second experiment, blood samples were collected from four crossbred pigs, obtained from the Faculty of Veterinary Science Research Farm, which had no serological evidence of exposure to PRRSV. Pigs were immunized with the lapinized Chinese-strain of CSF vaccine twice at 5 and 7 weeks of age, according to the routine vaccination program in the farm. Blood samples were collected when the pigs were approximately 16 weeks old.

Isolation and *in vitro* stimulation of porcine PBMC. Porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 10 ml of the heparinized blood samples using Isoprep® separation medium (Robbins Scientific Cooperation, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's protocol. The purified PBMC were resuspended in RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Rockville, MD) supplemented with 10% calf serum (Starrate, Australia), 2mM L-glutamine (GIBCO/BRL), 100 µM non-essential amino-acid (GIBCO/BRL), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO/BRL), 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 100 unit/ml of penicillin G, 100 µg/ml of streptomycin and 0.25 µg/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution; GIBCO/BRL). PBMCs, at a concentration of $6x10^6$ cells/ml/well of the 24-well plate, were cultured in the presence of antigen in a 5% CO_2, 37 °C incubator for 24-48 h as indicated in the text. The concentration of Concanavalin A (ConA, Sigma) used for *in vitro* culture was 10 µg/ml. The CSFV and PRRSV concentrations used for *in vitro* co-stimulation were 1 multiplicity of infection (m.o.i.), and 0.01 m.o.i., respectively. Following *in vitro* stimulation, cells were harvested and washed once with phosphate-buffered saline. Cell pellets were kept at –20 °C in the presence of RNAlater™ (Ambion, Austin, TX) until needed.

RNA extraction and reverse transcription. RNA was extracted from approximately $2x10^6$ cells using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Easton, PA), according to the manufacturer's instruction. Contaminating DNA was removed by DNase I treatment provided in the kit. At the final step, total RNA was eluted in 60 µl RNase-free water. Ten microliters of the total RNA from each sample was reverse-transcribed using Omniscript RT kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a total volume of 20 µl reaction, according to the manufacturer's protocol, in the presence of 0.5 µg of random hexamers (Promega, Madison, WI) and 40 U of ribonuclease inhibitor (RNaseOUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA). The RT reaction was carried at 37 °C for 60 min followed by the heat inactivation at 93 °C for 5 min and a rapid cooling on ice.

Multiplex PCR. All of the primers were designed specifically for MPCR to possess the same melting temperature (Tm) of 60 °C, based on the nearest neighbor analysis, in order to minimize the differences in amplification efficiency among the primers during MPCR. Sequences of the primer, the reference sequences, and expected sizes of the PCR products were given in Table 1. MPCR was performed in a total volume of 50 µl reaction containing 2 µl of the cDNA template, 10 µl of the primer mix (1 µl of each primer; see below), 10 mM dNTPs (Bio Basic Inc., Ontario, Canada), 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (HotStarTaq DNA polymerase, Qiagen), 1.5X concentration of the PCR buffer provided with the enzyme. The amounts of each primer used in MPCR were empirically optimized according to the intensity of the band. The final concentration of the primers for GAPDH was 0.05 µM, 0.2 µM for IL-10, and 0.6 µM for IFN-γ, IL-2 and IL-4 primers.

The cycling parameters were consisted of 1) "hot start" at 95 °C for 15 min; 2) denaturing at 94 °C for 30 sec; 3) annealing at 55 °C for 45 sec; 4) extension at 72 °C for 45 sec; and 5) final extension at 72 °C for 5 min. The number of PCR cycle was optimized to assure that none of the products reached a plateau phase during the PCR amplification (data not shown). In this experiment, PCR amplification at 33 cycles was applied for further densitometric analysis. Following the MPCR, ten microliters of the PCR reaction was subjected to agarose gel electrophoresis using 2.5 % agarose (Sigma) in 1x TBE buffer (GIBCO/BRL)

in the presence of 0.5 μg/ml ethidium bromide (Research Organics, Cleveland, OH). A 100 bp DNA ladder molecular weight marker (GIBCO/BRL) was run in every gel as molecular weight standards.

Densitometric quantification of PCR product. Images of the MPCR products resolved in ethidium bromide-stained agarose gels were visualized under UV illuminator and digitally saved by the "Photo-print" photodocumentation system (Vilber Lourmat, France). The images were further processed for quantification of the band by densitometry using the Scion Image software (Scion corporation, USA). The expression level of each product was determined by normalizing its expression against the housekeeping gene, i.e. GAPDH, expression. The results were expressed as the percentage of the cytokine area/GAPDH area of the same sample and referred as % expression. When the PBMC populations were considered as a group, the values were averaged and the standard error of means (SEM) were calculated and expressed as Mean % expression ± SEM.

Verification of the PCR product by sequence analysis. Each cytokine and GAPDH PCR product was verified by sequencing. DNA fragments were cut from agarose gels and purified with Nucleospin® Extract kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. The purified DNA was used as a template for the cycle sequencing reaction (DNA sequencing kit, Big Dye Terminator Cycle Sequencing, ABI PRISM PE Applied Biosystems, USA) and subsequently analyzed on an ABI prism 310 Genetic Analyser. The sequence identity was analyzed by using NCBI Blast software.

Results

Primer specificity and MPCR of cytokine mRNA transcripts

In the preliminary experiment, PBMC from naïve pig were cultured in the presence of 10 μg/ml ConA for 24 h and used as a positive sample for the establishment of MPCR. The ability of ConA to induce cytokine expression in pig had been already shown by the other group (Dozois *et al.*, 1997). The newly designed primer sets were able to amplified a single band of the expected size of porcine GAPDH, IFN-γ, IL-10, IL-2 and IL-4 from the positive sample (Fig. 1a). The specificity of the primer sets was confirmed by sequence analysis of each product (data not shown). Furthermore, the feasibility of MPCR was demonstrated when combining all the primer sets in a single-tube reaction (Fig 1b). Increased levels of cytokine gene expression were observed in ConA stimulated PBMC, whereas the level of GAPDH mRNA expression remained comparable in both unstimulated and ConA stimulated populations. It should be noted that in our system, unstimulated cells also produced considerable amount of cytokine transcripts after the culturing period, as shown in Fig. 1. In addition, these levels of background cytokine expression were somewhat varied among the pigs. Therefore, in order to eliminate this individual variability, the % expression of each cytokine from the unstimulated sample (i.e. background cytokine gene expression from the same animal) was subtracted from the % expression of the respective cytokine from the stimulated sample, prior to the calculation of the mean values. Therefore, the positive value represented an increase in % of the cytokine gene expression compared to the unstimulated sample from the same animal. The negative value indicated that the % expression was less than the % expression of the respective cytokine gene obtained from the unstimulated sample of the same animal.

An *in vitro* effect of PRRSV on porcine mRNA expression

Following the 24-hour- *in vitro* cultivation with PRRSV, an increase in IL-10 gene expression was the most apparent as compared to other cytokine genes. The IL-10 expression was significantly increased over the time of viral exposure (paired t-test, $p<0.05$). In this system, PRRSV seemed to have a minimal effect on IL-2 and IL-4 gene expressions in porcine PBMC and the effect of PRRSV on IL-10 and IFN-γ gene expressions appeared to be in a dose-dependent manner (Fig. 2).

The finding that PRRSV could enhanced the level of IL-10 expression in porcine PBMC raised a concern whether this observation was truly the effect of PRRSV or our newly established system was biased toward the detection of IL-10 gene. We, therefore, collected blood samples from pigs that were already primed with a classical swine fever vaccine (see methods). The isolated PBMC from each pig were further stimulated with the recall antigen, CSFV, in the presence or absence of PRRSV. In our previous work, the strong CSFV-specific IFN-γ production was detected from the PBMC of primed animals following the *in vitro* stimulation with CSFV using an ELISPOT assay (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2000; Suradhat *et al.*, 2001). In addition, this experiment would allow us to explore if the presence of PRRSV had any effect on the recall antigen response.

Following the incubation period, the presence of PRRSV considerably upregulated the IL-10 gene expression (Fig. 3). This finding indicated that the effect of PRRSV on IL-10 gene expression was

reproducible even in pigs of different age and immune status. In fact, IL-10 gene seemed to be the most prominently expressed cytokine gene in the system. However, in the presence of recall antigen, CSFV, IFN-γ gene expression was predominantly enhanced, suggesting that the recall antigen response to CSFV was a Th1-like response and that our assay was not biased towards only the detection of IL-10 gene expression. Furthermore, when PBMC from primed animals were cultured in the presence of both PRRSV and CSFV, a significant decrease of IFN-γ gene expression (paired t-test, $p<0.05$) and a significant increase of IL-10 gene expression (paired t-test, $p<0.05$) were observed (Fig. 3a). These findings indicated that the presence of PRRSV in the culture significantly suppressed the recall response to CSFV. Similarly to the previous experiment, minimal effects of both viruses were observed on the levels of IL-2 and IL-4 gene expression (Fig. 3b).

Discussion

In this study we established the MPCR assay for detection of porcine cytokine gene expression. The RT-MPCR appeared to be a rapid and powerful tool to explore the dynamics of different cytokine productions from porcine samples. Furthermore, the use of densitometric analysis allowed an affordable semi-quantitative analysis of the level of mRNA transcripts, when target RNA levels were normalized with the reference level of the housekeeping gene. Previously, cyclophilin, β-actin or β_2-microglobulin genes have been used as references (Dozois *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2000; Thanawongnuwech *et al.*, 2001). In the present report, we demonstrated that the GAPDH gene could be also used as a reference gene for study of cytokine gene expression in swine. Although increased cytokine gene expressions were observed in a ConA stimulated PBMC (Fig 1), it should be noted that the unstimulated cells also produced a considerable amount of the cytokine transcripts, in particular IL-10. This finding was not unusual, considering that several factors, both intrinsic and extrinsic, might influence the cytokine production in the culture system. The presence of IL-10 transcripts in unstimulated cells had also been previously observed (Dozois *et al.*, 1997; Thanawongnuwech *et al.*, 2001). In some cases, the level of IL-10 mRNA expression, analyzed by RT-PCR, was almost at the same level as with the ConA stimulated cells at all tested time points (Dozois *et al.*, 1997). Therefore, in our study, the "absolute increase" of the gene expression was determined by subtracting the background expression level of the cell control from the treatment expression level prior to analysis of the data. The increase in IL-10 gene expression was evident in PRRSV infected population, whereas IFN-γ gene expression were increased in the presence of a recall antigen, CSFV. In our study, the changes in IL-2 and IL-4 gene expression were minimal. An increase in IL-2 and IL-4 gene expression following ConA stimulation of porcine PBMC was previously reported using RT-PCR technique (Dozois *et al.*, 1997). The reason for this difference is not clear, however, the differences in the primer sensitivity and housekeeping gene used in the assay are likely to be the cause. Interestingly, our results was in the same line with the previous reported, in which a quantitative RT-PCR technique was used for studying of porcine cytokine gene expressions (Reddy *et al.*, 2000). In this study, several mitogens, including lipopolysaccharide, phytohaemagglutinin, hen egg white lysozyme and purified protein derivative of tuberculin, did not induce any detectable level of IL-2 and IL-4 gene expressions in porcine efferent lymph leukocytes. These results imply that pigs may not utilize the two cytokine as do humans and mice (Reddy *et al.*, 2000). Interestingly, in their experiment, the IL-10 gene expression was increased following 24 h of mitogen exposure and declined by 48 h, whereas in our study, the IL-10 expression continued to increase over the time in the presence of PRRSV (Fig. 2).

The observation that PRRSV upregulated the IL-10 expression *in vitro* is intriguing. There is at least one report, describing an increase in IL-10 mRNA expression from PBMC of piglets born from infected sow (Féng *et al.*, 2000). Although the RT-MPCR provides a rapid and convenient way of studying the cytokine gene expression, the relative amount of mRNA determined by RT-PCR does not necessarily reflect the relative amounts of the functional cytokine produced. Nevertheless, there are several *in vivo* findings suggesting that an increased IL-10 production *in vivo* may occur and contribute to the pathological outcome of PRRSV in infected animals.

IL-10 has been known to be the potent negative immunomodulator. The exploitation of IL-10 appears to be the common mechanism of immunosuppression by several intracellular pathogens specifically targeting macrophages for infection. Certain viruses induce IL-10 production, whereas others encode their own IL-10 to inhibit the host immune response and to hamper the viral clearance process (reviewed in Fickenscher *et al.*, 2002; Redpath *et al.*, 2001). Considering the restricted tissue tropism of PRRSV, it is possible that PRRSV also uses IL-10 for suppressing the host immune response. Induction of IL-10 production in an early stage of infection may enhance the viral survival within the host and delays the induction of protective immunity, which seems to be the case of PRRSV infection. IL-10 is known to

inhibit productions of proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor-α (TNF-α), the major mediator of acute inflammatory response, and IL-12 from macrophages. The latter cytokine is known to play a key role in the development of cell-mediated immune responses (Abbas *et al*., 2000). The inhibitory effects of IL-10 on monocytes, macrophages, and dendritic cells have been extensively reviewed (Moore *et al*., 2001). A series of reports on kinetics of proinflammatory cytokine responses following PRRSV infection seem to support our view. Following PRRSV infection, production of TNF-α was almost undetectable (Van Reeth *et al*., 1999). Furthermore, the production of IFN-α was significantly suppressed in both PBMC and alveolar macrophages, and this inhibitory effect was not due to the cell death (Albina *et al*., 1998). The poor cytokine response agrees with the overall mild clinical course and minimal gross lung pathology (Van Reeth *et al*., 1999; Van Reeth & Nauwynck, 2000). Regardless of the virulence of infecting PRRSV, the effect of PRRSV on porcine macrophage bacteriocidal functions was previously demonstrated (Thanawongnuwech *et al*., 1998). Together, these findings support the notion that PRRSV may interfere with the overall function of the macrophage-like cells through the induction of immunosuppressive factor, such as IL-10, which may result in an alteration of a cascade of proinflammatory cytokine production. The inhibitory effect of IL-10 on the functions of antigen presenting cells (APC) may be one of the mechanisms for the delayed induction of both arms of protective immune responses to PRRSV, which is tended to develop long after the active phase of viral replication and viremia.

Our finding that PRRSV can also affect the cytokine production in the recall antigen response supports the immunosuppressive role of PRRSV. It is well established that IL-10 strongly inhibits the cytokine production and proliferation of $CD4^+$ cells, particularly the Th1 population via its downregulatory effect on APC function, resulting in inhibition of cell-mediated immune responses (Moore *et al*., 2001). The observed changes in IFN-γ and IL-10 gene expression may represent the direct effect of IL-10 on APC and T cell functions. Our finding has provided the evidence that the presence of PRRSV can significantly interfere with the production of IFN-γ in the recall response to CSFV (Fig. 3). Alteration of the magnitude and delayed T cell responses to pseudorabies virus vaccine in PRRSV-infected pigs has previously been observed (De Bruin *et al*., 2000). These findings support the role of PRRSV in interference of cell-mediated immune response in the host. Interestingly, infection or vaccination with PRRSV appear to decrease the efficacy of *M. hyopneumoniae* bacterin in *M. hyopneumoniae* challenged pigs (Thacker *et al*., 2000). Inhibition of the memory Th cell and/or effector cell functions by the viral-induced IL-10 may be one of the explanations for this decrease, since cell-mediated immunity is believed to play a significant role in respiratory defense against bacterial infections (Dunkley *et al*., 1995). The increase in IL-10 production may also explain an increased incidence of secondary infection in the lung following an episode of PRRSV infection apart from the direct effect of PRRSV on monocytes/macrophages.

In summary, our results imply that the enhanced IL-10 production may be one of the strategies used by PRRSV to regulate the host immune system. It would be interesting to explore if this phenomenon occurs *in vivo* following PRRSV infection and what is the mechanism of viral-induced IL-10 production. Knowledge in regard to the effect of PRRSV on the host immune system would be crucial for the development of the practical control strategy and in designing a safe and effective PRRS vaccine in the future.

Acknowledgements

The authors thank Drs. R. Brownlie, R. Tantilertcharoen, W. Sada and Ms. A. Thasanakij and A. Theamboonlers for their technical assistance. This work is supported by the Thailand Research Fund (TRF) post-doctoral fellowship (#PDF/97/2544) and the TRF Senior Research Scholar programs.

References

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S. (2000). Cytokines. In *Cellular and molecular immunology*, 4rd edn, pp. 235-269. Philadelphia: W. B. Saunders company.

Albina, E., Carrat, C. & Charley, B. (1998). Interferon-α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18, 485-490.

Bautista, E. M. & Molitor, T. W. (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome in swine. *Viral Immunology* 10, 83-94.

De Bruin, M. G. M., Samson, J. N., Voermans, J. J. M., van Rooij, E. M. A., De Visser, Y. E. & Bianchi, A. T. J. (2000). Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the

development of the immune response against pseudorabies virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76, 125-135.

Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J.-P., Fairbrother, J. M. & Oswald, I. P. (1997). A reverse-transcription-polymerase chain reaction method to analyse porcine cytokine gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58, 287-300.

Dunkley, M., Pabst, R. & Cripps, A. (1995). An important role for intestinally derived T cells in respiratory defence. *Immunology Today* 16, 231-236.

Feng, W. H., Tompkins, M., Xu, J., Brown, T., Laster, S. & McCaw, M. B. (2000). Cytokine production by pigs infected *in-utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In *The International Pig Veterinary Society Congress*, pp. 657. Melbourne, Australia.

Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S. & Sticht, H. (2002). The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology* 23, 89-96.

Halbur, P. G. (1998). Porcine viral respiratory diseases. In *15th congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 1-10. Birmingham, UK.

Lager, K. M. & Mengeling, W. L. (2000). PRRS: nature of the RNA virus and how it causes disease (A keynote paper). In *16th congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 538-543. Melbourne, Australia.

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

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Reviews in Immunology* 19, 683-765.

Reddy, N. R. J., Borgs, P. & Wilkie, B. N. (2000). Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 74, 31-46.

Redpath, S., Ghazal, P. & Gascoigne, N. R. (2001). Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in Microbiology* 9, 86-92.

Snijder, E. J. & Meulenberg, J. M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology* 79, 961-979.

Suradhat, S. & Damrongwatanapokin, S. (2000). Establishment of an ELISPOT assay for detection of classical swine fever virus specific interferon-gamma secreting cells from porcine peripheral blood mononuclear cells. In *16th Congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 619. Melbourne, Australia.

Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. & Damrongwatanapokin, S. (2001). The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83, 177-189.

Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F. & Halbur, P. G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18, 1244-1252.

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

Thanawongnuwech, R., Young, T. F., Thacker, B. J. & Thacker, E. L. (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 115-127.

Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory viral infections: correlations with pathology. *Research in Veterinary Science* 67, 47-52.

Van Reeth, K. & Nauwynck, H. (2000). Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Veterinary Research* 31, 187-213.

Wardley, R. C., Martin, S. & Saif, L. J. (1996). Pathogenesis of viral infections. In *Advances in swine in biomedical research*, pp. 409-422. Edited by M. E. Tumbleson & L. B. Schook. New York: Plenum press.

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

Wood, P. R. & Seow, H.-F. (1996). T cell cytokines and disease prevention. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 33-34.

Yoon, S. L., Zimmerman, J. J., Swenson, M. J., McGinley, M. J., Eernisse, K. A., Brevik, A., Rhinehart, L. L., Frey, M. L., Hill, H. T. & Platt, K. B. (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* 7, 305-312.

Legends

Figure 1 RT-PCR cytokine products from cultured PBMC. **Panel A** depicted the single PCR product of 1) GAPDH, 2) IFN-γ, 3) IL-10, 4) IL-2, 5) IL-4 from porcine PBMC cultured in the presence of ConA. **Panel B** depicted the PCR products from porcine PBMC cultured in the absence (-) or presence (+) of ConA for 24 h. A 100 bp DNA ladder molecular weight marker was included in the gel (M). The image shown is the representative image from 3 animals.

Figure 2 The means % expression of porcine cytokines in the presence of PRRSV. Porcine PBMC were cultured in the presence of 0.01 m.o.i. (white) or 0.001 m.o.i. (black) of PRRSV for 24 or 48 h prior to total RNA isolation and RT-MPCR.

Figure 3 The means % expression of (A) IFN-γ and IL-10 and (B) IL-4 and IL-2. Porcine PBMC were cultured with PRRSV, CSFV, or CSFV in the presence of PRRSV (CSFV+) for 24 hr prior to total RNA isolation and RT-MPCR.

Table 1. Oligonucleotide sequences designed for MPCR in this study

Gene specificity	Oligonucleotide sequences (5'-3')	GenBank Acc. No.	Product (bp)
GAPDH	F-TTCCACGGCACAGTCAA R-GCAGGTCAGGTCCACAA	AF017079	576
IFN-γ	F-CTCTCCGAAACAATGAGTTATACAA R-GCTCTCTGGCCTTGGAA	X53085	503
IL-10	F- AGCCAGCATTAAGTCTGAGAA R-CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA	L20001	394
IL-2	F-TCTTGTGTTGCATTGCACTAA R-TCAGAGTTTTTGCTTTGACCTAA	X56750	280
IL-4	F- GGACACAAGTGCGACATCA R- GCACGTGTGGTGTCTGTA	X68330	186

F = forward. R=reverse

Figure 1

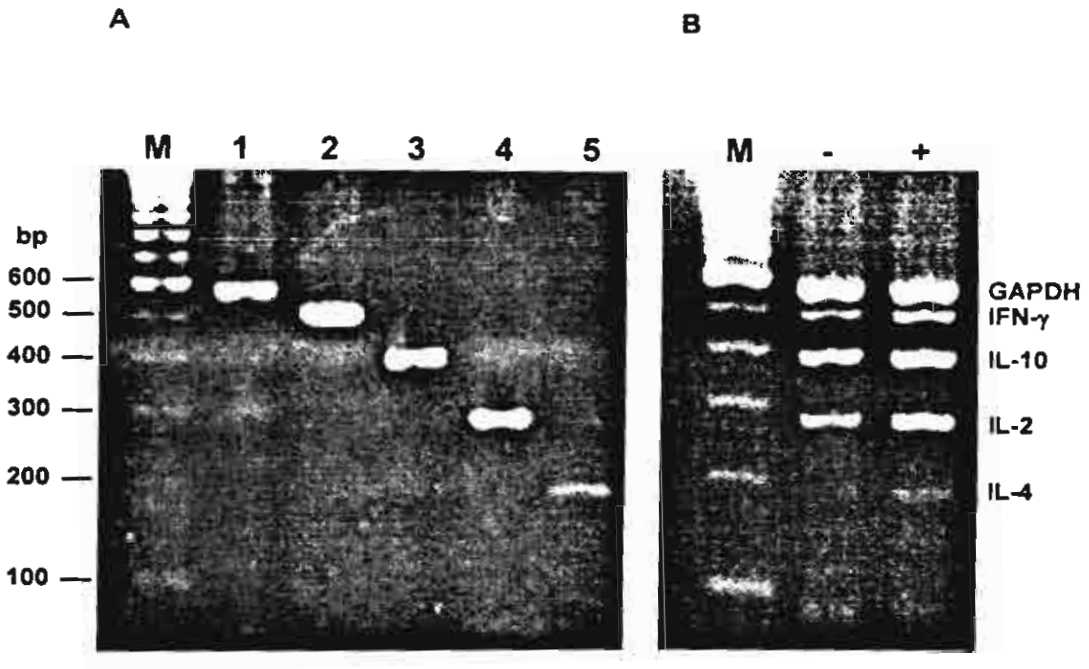


Figure 2

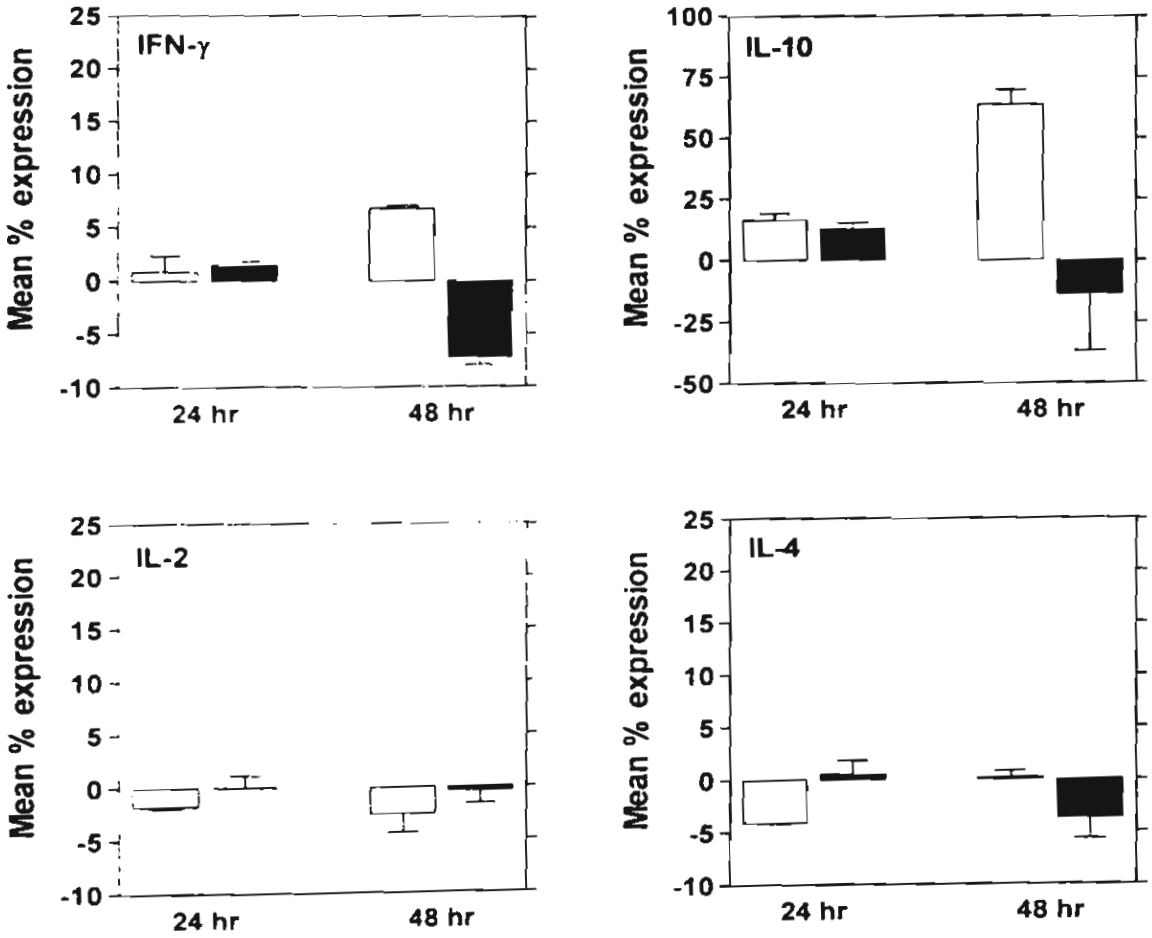
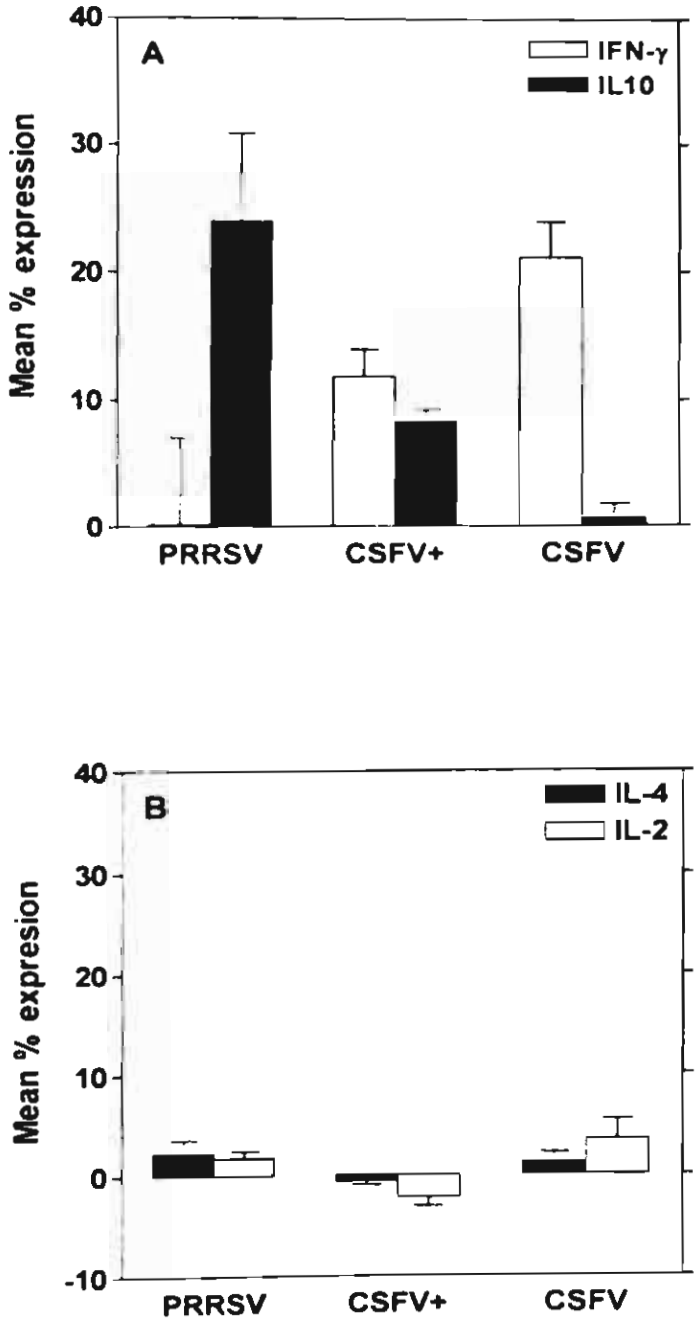

IFN-γ
Mean % expression
25
20
15
10
5
0
-5
-10
24 hr
48 hr
IL-10
Mean % expression
100
75
50
25
0
-25
-50
24 hr
48 hr
IL-2
Mean % expression
25
20
15
10
5
0
-5
-10
24 hr
48 hr
IL-4
Mean % expression
25
20
15
10
5
0
-5
-10
24 hr
48 hr

Figure 3


A
IFN-γ
IL10
Mean % expression
40
30
20
10
0
PRRSV
CSFV+
CSFV
B
IL-4
IL-2
Mean % expresion
40
30
20
10
0
-10
PRRSV
CSFV+
CSFV