

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส  
สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

โดย

นาย รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

และ

น.ส. สันนิภา สุรทัตต์

เดือน กรกฎาคม ปี พ.ศ. 2546

สถาบันวิจัยประชากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ น.สพ. สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ สพ.ญ. นุสรรา พันธุ์ประภา นิสิตปริญญาโท และ  
น.ส.ศศิวิมล ตุ่มมูข นายจักรี รัตนารามิก น.ส.นิดา นพรัตน์ไกรลาส น.ส.พรทิพย์ เลاهشิทธิกุล นายยงยุทธ พงษ์  
ประภาชื่น นายณัฐพล บุญอาภา นายกฤษณ์ก้อง ศรียันต์ น.ส.ชนิดา แย้มกลีบบัว นายเพิ่มศักดิ์ ธนะวัง น.ส.ทัต  
ดาว ไทยวงษ์ นายวิญญู นันทกุล นายชนิศ ลีธีระประเสริฐ นิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 ที่ช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลองและด้านห้องปฏิบัติการ และกองทุนรัชดาภิเษก  
สมโภช สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ปีการเงิน 2545 ครั้งที่ 2 ทางด้านการเงิน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ชื่อโครงการวิจัย** การศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย  
**ชื่อผู้วิจัย** นาย รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และ น.ส. สันนิภา สุรทัตต์  
**เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ** กรกฎาคม 2546

### บทคัดย่อ

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคได้ โดยพบว่า ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ US (01NP1) ก่อโรครุนแรงกว่า ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ EU (02SB3) และยังพบรอยโรครุนแรงในสุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 แต่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าสายพันธุ์อเมริกา ในแทบทุกเนื้อเยื่อที่ได้รับการตรวจ ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ EU อาจแฝงตัวในสุกรได้นานกว่าและอาจมีผลให้เกิดภาวะ persistent infection ทำให้ยากต่อการกำจัดเชื้อออกจากฝูงสุกร นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของสุกรที่ให้เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 5 และ 12 หลังการให้เชื้อ นอกจากนี้ยังตรวจพบการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 และ IFN- $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำล้างปอด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เริ่มจากวันที่ 9 หลังได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไวรัสในการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง cytokines ที่ทดสอบ ( $p > 0.05$ ) จากข้อมูลวิจัยชี้ให้เห็นว่า การเพิ่มการสร้าง IL10 ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส อาจมีผลต่อการตอบสนองของการสร้างภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพ ดังที่พบในกรณีของการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนในท้องที่

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**Research topic:** Pathological study of the selected PRRSV isolates in Thailand

**Researcher:** Roongroje Thanawongnuwech and Sanipa Suradhat

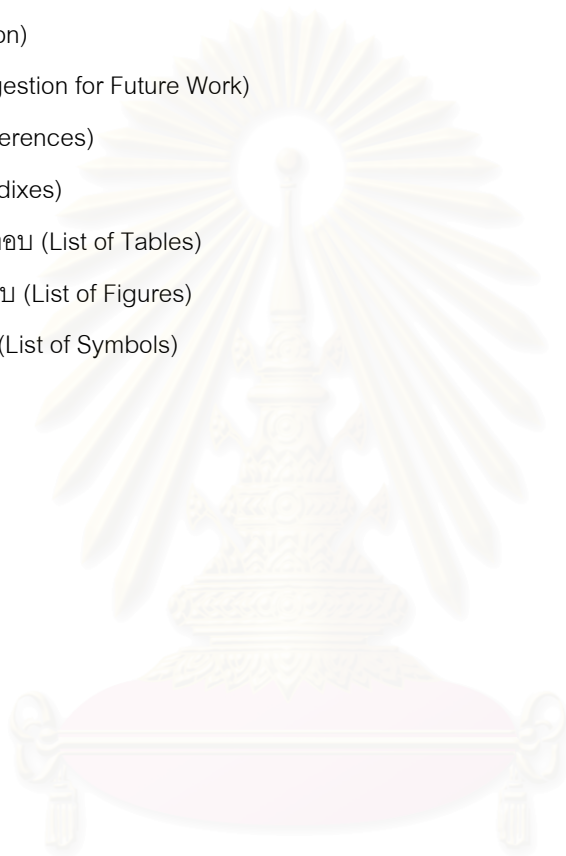
**Finish (Month and year) :** July, 2003

#### **Abstract**

The purpose of this study is to compare the pathogenicity of the selected porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand between the US (01NP1) and EU (02SB3) genotypes. Both genotypes were able to induce clinical signs and lesions until 15 days post infection (DPI). The US genotype appeared to be more virulence. However, PRRSV antigen was detected more in the EU-infected pigs. The results indicated that the EU genotype might persist in pigs longer than the US genotype. We also showed that both EU and US genotypes significantly upregulated IL-10 gene expression in PBMC of infected pigs from 5 DPI. In addition, upregulation of IL-10 and IFN $\gamma$  gene expression was observed in BALC starting from 9 DPI. The upregulation of cytokine gene expression in BALC was observed concurrent with an increased percentage of lymphocytes in the BALC population, suggesting a role for peripheral leukocytes in cytokine production in lungs. Our results demonstrated that PRRSV infection resulted in an upregulation of IL-10 gene expression in vivo and that both EU and US strains induced comparable levels of IL-10 gene expression in the infected pigs, despite differences in the clinical signs. Our data support the notion that induction of IL-10 production may be one of the strategies used by PRRSV to modulate the host's immune responses, and this may contribute to the unique clinical picture observed following PRRSV infection.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ (Introduction)	
วิธีดำเนินการวิจัย (Procedure)	
ผลการวิจัย (Result)	
การอภิปรายผล (Discussion)	
ข้อสรุป (Conclusion)	
ข้อเสนอแนะ (Suggestion for Future Work)	
เอกสารอ้างอิง (References)	
ภาคผนวก (Appendixes)	
รายการตารางประกอบ (List of Tables)	
รายการภาพประกอบ (List of Figures)	
รายการสัญลักษณ์ (List of Symbols)	



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำนำ

โรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือ โรค พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร พบมีการระบาดครั้งแรกในทวีปอเมริกาเหนือ ในปี 2530 และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามมีการแยกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้เป็นครั้งแรกของโลกในปี พ.ศ. 2535 ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) และในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwattanapokin et al., 1996) นอกจากนี้การตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างซีรัมสุกรที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากฟาร์มสุกรในประเทศไทยที่มีประวัติเกี่ยวกับการแท้งและการเกิดมัมมี่ รวมทั้งตัวอย่างซีรัมสุกรนำเข้าจากต่างประเทศที่เก็บจากด่านกักสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 บ่งบอกถึงการแพร่ระบาดของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2534 (Damrongwattanapokin et al., 1996)

การก่อโรคของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ขึ้นกับความรุนแรงของสายพันธุ์ โดยกลุ่มสายพันธุ์ US มักจะก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากกว่ากลุ่มสายพันธุ์ EU และภายในกลุ่มสายพันธุ์ US เอง ความรุนแรงในการก่อโรคนั้นแตกต่างกัน (Halbur et al., 1995) ความรุนแรงในการก่อโรคไม่สามารถชี้ชัดด้วยวิธีใดๆ ในห้องปฏิบัติการ นอกจากการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่ต้องการทราบความรุนแรงในการก่อโรคเข้าไปในสุกรทดลองเท่านั้น นอกจากนี้การกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ หลังได้รับเชื้อ ก็มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัส เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Halbur et al., 1996) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการสร้างต้นแบบการศึกษาการเกิดโรคพี อาร์ อาร์ เอส และโรคแทรกซ้อน เช่นกลุ่มอาการของโรคทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกรในประเทศไทย

Interleukin 10 เป็น cytokine ที่สำคัญในการยับยั้งการสร้าง proinflammatory cytokines หลายชนิด รวมทั้งยับยั้งหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages ไวรัสหลายชนิดกระตุ้นการสร้าง Interleukin 10 เพื่อประโยชน์ในการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น Human respiratory syncytial virus (HRSV) จะกระตุ้นการสร้าง Interleukin 10 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages (Panuska et al., 1995) ซึ่งทำให้ไวรัส เฮช อาร์ เอส (HRSV) สามารถคงอยู่ในร่างกายของผู้ติดเชื้อได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การทดลองให้เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส กับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages ในห้องปฏิบัติการ พบการเพิ่มขึ้นของ Interleukin 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Thanawongnuwech et al., 2001) จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ถึงการสร้าง Interleukin 10 จาก PBMC ในกระแสเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ที่แยกได้จากต่อมน้ำเหลืองซัฟปอด และจากเซลล์ที่ได้จากน้ำล้างปอด ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงขบวนการก่อโรคของไวรัสชนิดนี้

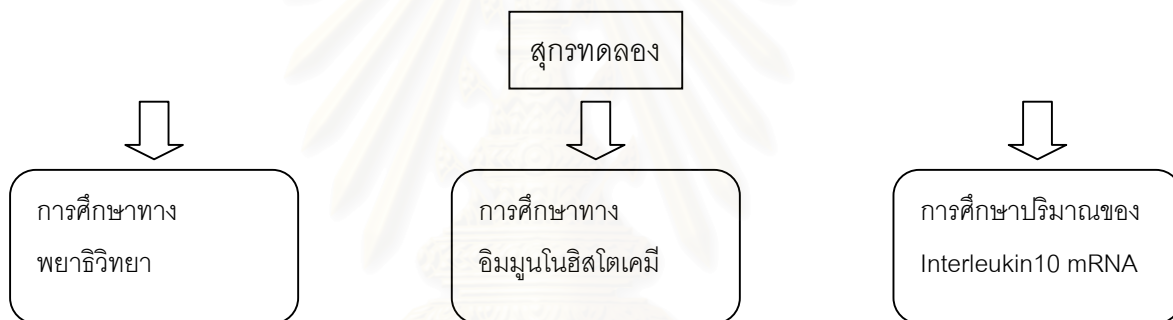
คณะผู้วิจัยต้องการทราบพยาธิกำเนิดของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยเพื่อสร้างต้นแบบของการติดเชื้อในสุกรทดลองเพื่อการศึกษา และวิจัยต่อไปเกี่ยวกับโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร (Porcine respiratory disease complex ; PRDC) หรือโรค พี อาร์ ดี ซี ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อร่วมของจุลินทรีย์หลายชนิดในระบบทางเดินหายใจสุกร โดยมีไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นเชื้อปฐมภูมิ

คณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์ 3 ข้อ คือ

- 1.) ศึกษาลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งกลุ่มสายพันธุ์ US (01NP1) และ กลุ่มสายพันธุ์ EU (02SB3)
- 2.) ศึกษาการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี
- 3.) พัฒนารูปแบบการตรวจหาปริมาณของ mRNA ของ Interleukin 10 (IL 10) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวในกระแสเลือด (Peripheral blood mononuclear cells or PBMC) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากน้ำล้างปอด ( bronchoalveolar lavage lymphocytes ) ของสุกรที่ได้รับไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี multiplex PCR ( MPCR) เทียบกับ housekeeping gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)

### วิธีดำเนินการวิจัย

ภาพที่ 1 แสดงแผนภูมิวิธีการดำเนินงานวิจัย



ตารางที่ 1: แสดงแผนการใช้สุกรทดลอง

สุกรทดลอง	กลุ่มควบคุม (Media)	กลุ่ม US (01NP1)	กลุ่ม EU (02SB3)
จำนวนสุกรเริ่มต้น (ตัว)	3	8	9
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 5 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	3	3
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 9 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	3	3
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	3	3

แผนภูมิวิธีการดำเนินการวิจัยแสดงไว้ในภาพที่ 1 และตารางที่ 1 จากการทดลองในสุกรทดลอง จำนวน 21 ตัวแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ US (01NP1) และกลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ EU (02SB3)

## แผนการศึกษา

เริ่มเลี้ยงสุกรทดลอง วันที่ 7 ตุลาคม 2545 และสิ้นสุดการเลี้ยงวันที่ 31 ตุลาคม 2545

### 1) ศึกษาลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยทั้ง กลุ่มสายพันธุ์ US และกลุ่มสายพันธุ์ EU

1.1 นำสุกรหย่านมอายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว ที่ปลอดจาก ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลองดังตารางที่ 1 ฉีดยาปฏิชีวนะ 3 วันแรกของการปรับสภาพ ก่อนทำการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในขนาด 2 มิลลิตรต่อตัว ( $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> ต่อ มิลลิตร) แก่สุกรตามกลุ่มทดลองโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และทางจมูกละ 1 มิลลิตร และเจาะเลือดเก็บซีรัม เพื่อส่งตรวจหาระดับแอนติบอดี ต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โรคคหิวต้อสุกร และโรคพิษสุนัขบ้าเทียม และแยกเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 0 5 9 และ 15 หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

1.2 จัดบันทึกอาการทางคลินิก และวัดอุณหภูมิทุกวัน โดยกำหนดให้สุกรที่มีอุณหภูมิร่างกายมากกว่า 40 องศาเซลเซียสถือว่ามิใช่

1.3 สุ่มชันสูตรสุกร ณ วันที่ 5 9 และ 15 ดังตารางที่ 1 หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส บันทึกโรคทางพยาธิวิทยา และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ US และกลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ EU กับกลุ่มควบคุม

### 2) ศึกษาการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

2.1 นำชิ้นเนื้อเยื่อสุกรทดลองที่ได้ทำการชันสูตร ณ วันที่ 5 9 และ 15 หลังการฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่ฝังในบล็อควาร่าฟีนมาย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ

2.2 ประเมินการกระจายของแอนติเจน ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น สมอง ทอนซิล ปอด หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้เล็กส่วนปลาย และต่อมน้ำเหลืองข้อขั้วปอด เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ US และกลุ่มได้รับเชื้อสายพันธุ์ EU

การแบ่งระดับของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยใช้เกณฑ์ของ Halbur และคณะ (1996) โดยแบ่งเป็น

ระดับ 0 = ไม่พบเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส

ระดับ 1 = มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์

ระดับ 2 = มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 11-30 เซลล์

ระดับ 3 = มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 31-100 เซลล์

ระดับ 4 = มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกตั้งแต่ 100 เซลล์

3) การวัดระดับของ Interleukin-10 (IL-10) gene expression ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวในกระแสเลือด (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์จากน้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage lymphocytes) ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (MPCR)



3.1 เก็บตัวอย่างเลือด และ เซลล์จาก bronchoalveolar lavage fluid จากสุกรทดลอง เพื่อปั่นแยก PBMC และ Bronchoalveolar lymphocytes (BAL) ตามลำดับ โดยวิธี gradient centrifugation โดยใช้ separating media ที่ density 1.077

3.2 ตัวอย่างสุกรที่ใช้ ได้แก่ prechallenge sample 3 ตัวอย่าง (เฉพาะ PBMC) และจะเก็บตัวอย่างจากสุกร ตามการทดลองข้างต้น ในวันที่ 5 9 และ 15 หลังให้เชื้อ (days post infection, dpi) ดังนี้

	PBMC			BAL		
	Cont	US	EU	Cont.	US	EU
- Prechallenge	3	8	9	-	-	-
- 5 dpi	3	8	9	1	3	3
- 9 dpi	2	6	6	1	3	3
- 15 dpi	1	3	3	1	3	3
<b>total</b>	<b>9</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>9</b>

3.3 นำ PBMC และ BAL มาตรวจหา cytokine gene expression โดยวิธี multiplex-PCR โดยสามารถแยกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

- RNA extraction: นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดแยก total RNA
- cDNA synthesis: นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ random hexamer primer
- PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวนของ cytokine gene จาก cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น โดยวิธี multiplex PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ cytokine gene ได้แก่ IL-10 ควบคู่ไปกับ housekeeping gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) ที่ได้มีการพัฒนาเทคนิคไว้ก่อนแล้ว (สันนิษา สุรทัตต์, ข้อมูลส่วนตัว)
- ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis
- เปรียบเทียบปริมาณของ IL-10 ในสุกรแต่ละตัว โดยคำนวณเป็นร้อยละของ housekeeping gene จากตัวอย่างเดียวกัน โดยวิธี densitometry เพื่อเปรียบเทียบผลของ PRRSV infection ต่อ IL-10 gene expression ในสุกรแต่ละกลุ่ม เนื่องจาก primer ที่ใช้ทั้ง 2 ชุด (IL-10 และ GAPDH) ได้ถูกออกแบบเพื่อให้มี amplification efficiency ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นความเข้มของ band ของแต่ละ amplicon จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA ในตัวอย่าง และสามารถนำมาใช้ประเมินความแตกต่างของระดับการสร้าง mRNA ได้โดย normalize กับ ปริมาณของ housekeeping gene ในแต่ละตัวอย่าง

#### ผลของการวิจัย

1) ศึกษาลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยาของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยทั้ง กลุ่มสายพันธุ์ US และกลุ่มสายพันธุ์ EU

พบว่าสุกรมีภาวะมีไข้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของสุกรทดลองในแต่ละ โดยกลุ่ม 01NP1 พบในวันที่ 1 และ 4 ถึง 11 และกลุ่ม 02SB3 อยู่ระหว่างวันที่ 6 ถึง 8 และ 10 หลังการให้เชื้อ

สุกรปลอดจากโรคพี อาร์ อาร์ เอส โรคคหิววาท์สุกร และโรคพิษสุนัขบ้าเทียม เมื่อเจาะเลือดตรวจวันที่ 8 ตุลาคม 2545 สามารถแยกไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากซีรัมได้ตั้งแต่วันที่ 5 หลังให้เชื้อ จนตลอดการทดลอง และมีปริมาณไวรัสในกลุ่ม 01NP1 ระหว่าง  $10^{1.50}$  ถึง  $10^{3.50}$  TCID<sub>50</sub>/ml ส่วนกลุ่ม 02SB3 ระหว่าง  $10^{2.00}$  ถึง  $10^{3.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml (ตารางที่2) เมื่อทำการตรวจด้วยวิธี Nested multiplex RT-PCR พบว่าเป็น ไวรัสชนิดเดียวกับที่ให้ในแต่ละกลุ่ม ไม่พบการปนเปื้อนระหว่างกลุ่ม

คะแนนรอยโรคปอดจาก PRRSV-induced pneumonia (รูปที่ 2.1) มีการตรวจพบตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงสิ้นสุดการทดลองทั้งสองกลุ่มและมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามวันที่ทำการทดลอง (ตารางที่2)

ผลการชันสูตรสุกรที่ให้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบ petichial hemorrhage ที่ไต (รูปที่ 2.2) และ marked lymphadenopathy (รูปที่ 2.3) โดยพบในสุกรที่ชันสูตรตั้งแต่วันที่ 5 หลังให้เชื้อ และพบมากใน 01NP1 ซึ่งรอยโรค petichial hemorrhage ที่ไต มีความคล้ายคลึงกับรอยโรคของโรคคหิววาท์สุกรเป็นอย่างมาก และไม่เคยมีรายงานถึงรอยโรคนี้นในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อน

ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาของกลุ่ม 01NP1 ให้ผลบวก 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 9 และ 15 หลังการให้เชื้อ กลุ่ม 02SB3 ให้ผลบวก 83.33 และ 66.66 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 9 และ 15 หลังการให้เชื้อ และสุกรกลุ่มควบคุม ให้ผลการตรวจเป็นลบตลอดการทดลอง เช่นเดียวกับสุกรกลุ่มทดลองทั้งสองในวันที่ 5 หลังการให้เชื้อ

ตารางที่ 2 ผลคะแนนรอยโรคปอด ผลทางซีรัมวิทยา และปริมาณของไวรัสที่แยกได้

ผลการทดลอง	กลุ่มควบคุม (Media)	กลุ่ม US (01NP1)	กลุ่ม EU (02SB3)
	คะแนนรอยโรคปอด ( mean $\pm$ SD )		
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 5 หลังให้เชื้อ	0	7.67 $\pm$ 6.66	1.50 $\pm$ 0.00
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 9 หลังให้เชื้อ	0	54.00 $\pm$ 19.00	27.67 $\pm$ 23.75
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 หลังให้เชื้อ	0	60.67 $\pm$ 8.62	33.00 $\pm$ 11.00
	PRRSV Seroconversion ( IDEXX ELISA; %)		
สุกรก่อนทำการให้เชื้อ	0 (0/3)	0 (0/9)	0 (0/9)
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 5 หลังให้เชื้อ	0 (0/3)	0 (0/9)	0 (0/9)
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 9 หลังให้เชื้อ	0 (0/2)	100 (6/6)	83.33 (5/6)
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 หลังให้เชื้อ	0 (0/1)	100 (2/2)	66.66 (2/3)
	PRRSV Isolation from serum (TCID <sub>50</sub> /ml)		
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 5 หลังให้เชื้อ	-	Upto $10^{2.66}$	Upto $10^{3.25}$
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 9 หลังให้เชื้อ	-	Upto $10^{3.50}$	Upto $10^{2.75}$
สุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 หลังให้เชื้อ	-	Upto $10^{1.50}$	Upto $10^{2.00}$

2) ศึกษาการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

จำนวนสุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) และกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) ดังแสดงในตารางที่ 3 การทดลองครั้งนี้มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 82% ซึ่งคำนวณจาก จำนวนปอดของสุกรที่ให้ผลบวก (พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส) ต่อจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (14/17) ส่วนความจำเพาะ (specificity) ของการทดลองมีค่าเท่ากับ 100% คำนวณจาก จำนวนสุกรกลุ่มควบคุมที่ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อจำนวนสุกรกลุ่มควบคุม ปริมาณแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส และระดับของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป แสดงดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนตารางที่ 4 แสดงระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยแยกตามจำนวนวันที่ทำการชันสูตร และสายพันธุ์ของไวรัสที่สุกรได้รับ การทดลองครั้งนี้ ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรกลุ่มควบคุม

พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ใน cytoplasm ของ macrophages และ cytoplasm ของ mononuclear cells ภายใน alveolar septum แต่ไม่พบในเยื่อของ bronchi และ bronchiole ของปอดสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป (รูปที่ 2.4) จากตารางที่ 1 สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 6 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 9 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 1 ตัว ในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว และวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 2 ตัว ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 8 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 2 ตัว ในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว และวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว ระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส แสดงดังตารางที่ 4

พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตับ (รูปที่ 2.6) ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป จากตารางที่ 1 สุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 1 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 9 ตัว ซึ่งพบเฉพาะสุกรที่ชันสูตรเมื่อวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 6 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 1 ตัว ในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว และวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 2 ตัว แอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบใน kupffer cells ของตับ ระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตับของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส แสดงดังตารางที่ 4

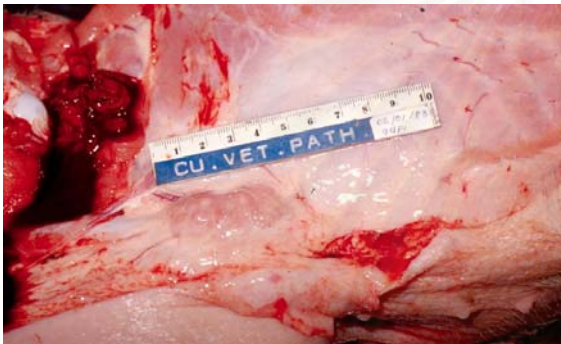
ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในลำไส้เล็กส่วนปลาย และไตของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวกในลำไส้เล็กส่วนปลาย จำนวน 2 ตัว (รูปที่ 2.7) จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัว และในไต (รูปที่ 2.5) พบสุกรที่ให้ผลบวก 1 ตัวจากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัวตามลำดับ ซึ่งพบเฉพาะสุกรชันสูตรในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ (ตารางที่ 1) โดยพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเซลล์ macrophages บริเวณ peyer's patch ของลำไส้เล็กส่วนปลาย และใน macrophages ของไต ระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในลำไส้ส่วนปลายและไตของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส แสดงดังตารางที่ 4



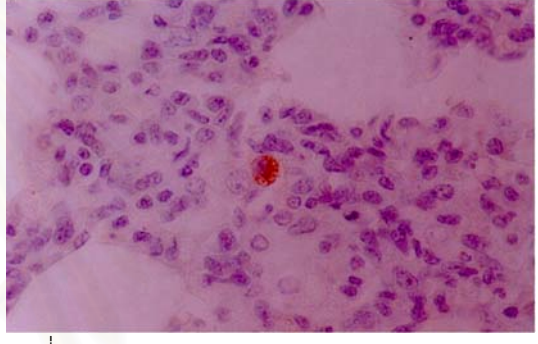
รูปที่ 2.1



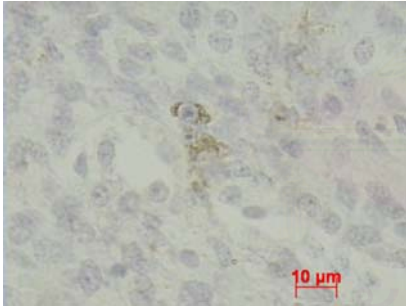
รูปที่ 2.2



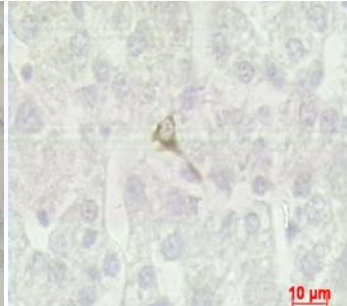
รูปที่ 2.3



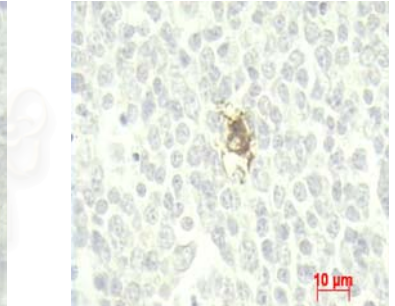
รูปที่ 2.4



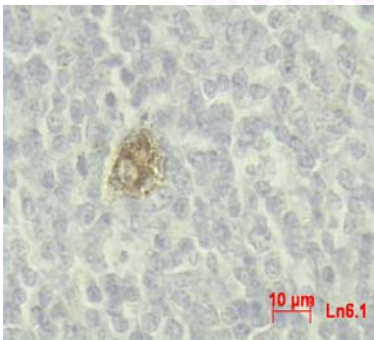
รูปที่ 2.5



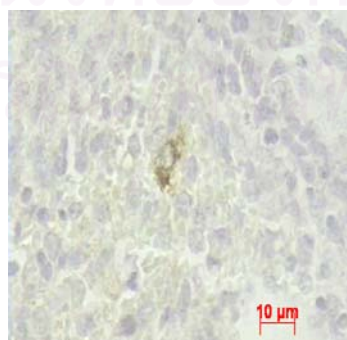
รูปที่ 2.6



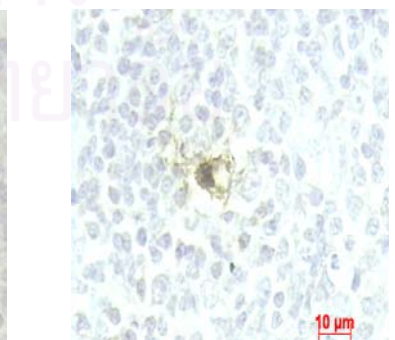
รูปที่ 2.7



รูปที่ 2.8



รูปที่ 2.9



รูปที่ 2.10

## รูปที่ 2

- 2.1 รอยโรคปอดสุกรทางมหภาค (Gross findings) ที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 01NP1 ชั้นสูตรวันที่ 9 พบ Diffuse pneumonia
- 2.2 รอยโรคที่ไตสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 01NP1 ชั้นสูตรวันที่ 5 พบจุดเลือดออกเล็กๆ (petechial hemorrhage)
- 2.3 รอยโรคที่ต่อมน้ำเหลืองข้างขาหนีบสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 02SB3 ชั้นสูตรวันที่ 5 พบการขยายตัวของต่อมน้ำเหลือง (Lymphadenopathy)
- 2.4 รอยโรคปอดสุกรทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology) ที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 01NP1 ชั้นสูตรวันที่ 5 พบ multifocal to diffuse interstitial pneumonia เซลล์น้ำตาคือเซลล์ที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของ mononuclear cell ในปอด
- 2.5 เซลล์ mononuclear cell ในไตที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม
- 2.6 เซลล์ Kupffer cell ในตับที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม
- 2.7 เซลล์ mononuclear cell ในลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) ที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม
- 2.8 เซลล์ mononuclear cell ในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอด (Lymph node) ที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม
- 2.9 เซลล์ mononuclear cell ในม้ามที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม
- 2.10 เซลล์ mononuclear cell ในต่อมทอลซิลที่ย้อมติดแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึม

พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอด (รูปที่ 2.8) ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป จากตารางที่ 1 สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 2 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 9 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 1 ตัว และในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 ตัว ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 3 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 1 ตัว และในวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 2 ตัว แอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มักพบในเซลล์ macrophages ที่มีนิวเคลียส และ cytoplasm ขนาดใหญ่ ระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส แสดงดังตารางที่ 4

แอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบใน cytoplasm ของ macrophages บริเวณ white pulp ของม้ามสุกร ทั้งกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป (รูปที่ 2.9) ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 1 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 9 ตัว ซึ่งพบเฉพาะสุกรที่ชั้นสูตรเมื่อวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 4 ตัว จากจำนวนสุกรที่ได้รับเชื้อ 8 ตัว ซึ่งสามารถพบได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อไปแล้ว 5 วัน จำนวน 1 ตัว และในวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว (ตารางที่ 1) ระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในม้ามของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์สุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรที่ได้รับเชื้อกลุ่ม US และกลุ่ม EU

	เปอร์เซ็นต์สุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส			
	5 DPI	9 DPI	15 DPI	Total
<b>กลุ่ม US (01NP1)</b>				
ปอด	33.33 (1/3)	100 (3/3)	66.66 (2/3)	66.66 (6/9)
ตับ	0 (0/3)	33.33 (1/3)	0 (0/3)	11.11 (1/9)
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/9)
ไต	0 (0/3)	0 (0/3)	ND	0 (0/6)
ต่อมน้ำเหลืองข้างปอด	33.33 (1/3)	33.33 (1/3)	0 (0/3)	22.22 (2/9)
ม้าม	33.33 (1/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	11.11 (1/9)
ทอนซิล	66.66 (2/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	22.22 (2/9)
กระดูก turbinates	33.33 (1/3)	66.66 (2/3)	33.33 (1/3)	44.44 (4/9)
หัวใจ	0 (0/3)	66.66 (2/3)	66.66 (2/3)	44.44 (4/9)
สมอง	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/9)
<b>กลุ่ม EU (02SB3)</b>				
ปอด	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (8/8)
ตับ	50 (1/2)	100 (3/3)	66.66 (2/3)	75 (6/8)
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	100 (2/2)	0 (0/3)	0 (0/3)	25 (2/8)
ไต	50 (1/2)	0 (0/3)	0 (0/3)	12.5 (1/8)
ต่อมน้ำเหลืองข้างปอด	50 (1/2)	0 (0/3)	66.66 (2/3)	37.5 (3/8)
ม้าม	50 (1/2)	0 (0/3)	100 (3/3)	50 (4/8)
ทอนซิล	50 (1/2)	0 (0/3)	66.66 (2/3)	37.5 (3/8)
กระดูก turbinates	50 (1/2)	33.33 (1/3)	33.33 (1/3)	37.5 (3/8)
หัวใจ	0 (0/2)	33.33 (1/3)	0 (0/3)	12.5 (1/8)
สมอง	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/8)

DPI = วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation)

ND = no data

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์US และEU

DPI	ID	Strain	ปอด	ตับ	ลำไส้เล็กส่วนปลาย	ไต	ต่อมน้ำเหลืองชั้นปอด	ม้าม	ทอนซิล	กระดูก turbinatae	หัวใจ	สมอง
5	1	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	US	33	0	0	0	3	1	1	0	0	0
	3	US	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	4	US	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	EU	23	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	6	EU	11	5	5	6	7	2	9	2	0	0
9	7	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	US	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0
	9	US	5	0	0	0	0	0	0	14	0	0
	10	US	5	0	0	0	2	0	0	13	1	0
	11	EU	23	2	0	0	0	0	0	3	0	0
	12	EU	8	41	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	EU	9	3	0	0	0	0	0	0	1	0
15	14	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	US	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	US	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	17	US	17	0	0	ND	0	0	0	20	6	0
	18	EU	4	7	0	0	19	1	10	5	0	0
	19	EU	3	2	0	0	10	3	9	0	0	0
	20	EU	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0

DPI = วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation)

ND = no data

**ตารางที่ 5** แสดงช่วงคะแนน (Halbur และคณะ 1996) ของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์ US และสายพันธุ์ EU

DPI	ID	Strain	ปอด	ตับ	ลำไส้เล็กส่วนปลาย	ไต	ต่อมน้ำเหลืองข้อปอด	ม้าม	ทอนซิล	กระดูก turbinate	หัวใจ	สมอง
5	1	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	US	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	3	US	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	4	US	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	EU	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	6	EU	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	7	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	US	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	9	US	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	10	US	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0
	11	EU	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	12	EU	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	EU	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
15	14	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	US	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	US	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	17	US	2	0	0	ND	0	0	0	2	1	0
	18	EU	1	1	0	0	2	1	1	1	0	0
	19	EU	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	20	EU	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

DPI = วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation)

ND = no data



**ตารางที่ 6** แสดงระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยแยกตามวันที่ทำการชันสูตร และสายพันธุ์ของไวรัสที่สุกรได้รับ

เนื้อเยื่อ	สายพันธุ์อเมริกา (01NP1)			สายพันธุ์ยุโรป (02SB3)		
	5 DPI	9 DPI	15 DPI	5 DPI <sup>2</sup>	9 DPI	15 DPI
ปอด	1 ± 1.73 <sup>1</sup>	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 0	1.33 ± 0.58	1 ± 0
ตับ	0	0.33 ± 0.58	0	0.5 ± 0.71	1.66 ± 1.15	0.67 ± 0.58
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	0	0	0	1 ± 0	0	0
ไต	0	0	0	0.5 ± 0.71	0	0
ต่อมน้ำเหลืองซี่ปอด	0.33 ± 0.58	0.33 ± 0.58	0	0.5 ± 0.71	0	1 ± 1
ม้าม	0.33 ± 0.58	0	0	0.5 ± 0.71	0	1 ± 0
ทอนซิล	0.67 ± 0.58	0	0	0.5 ± 0.71	0	0.67 ± 0.58
กระดูก turbinatae	0.33 ± 0.58	1.33 ± 1.15	0.67 ± 1.15	0.5 ± 0.71	0.33 ± 0.58	0.33 ± 0.58
หัวใจ	0	0.67 ± 0.58	0.67 ± 0.58	0	0.33 ± 0.58	0
สมอง	0	0	0	0	0	0

DPI = วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation)

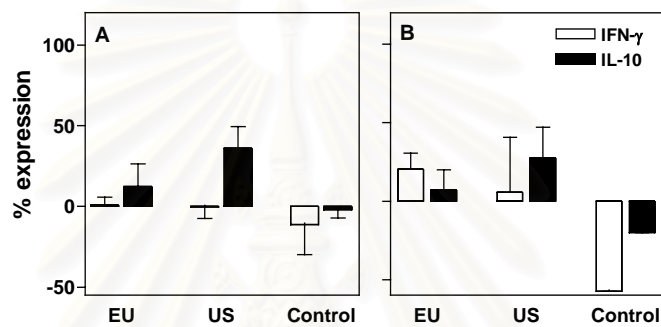
<sup>1</sup> Mean ± SD, n=3

<sup>2</sup> เฉพาะในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ ทำการชันสูตรสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป เพียง 2 ตัว, Mean ± SD, n=2

ND = no data

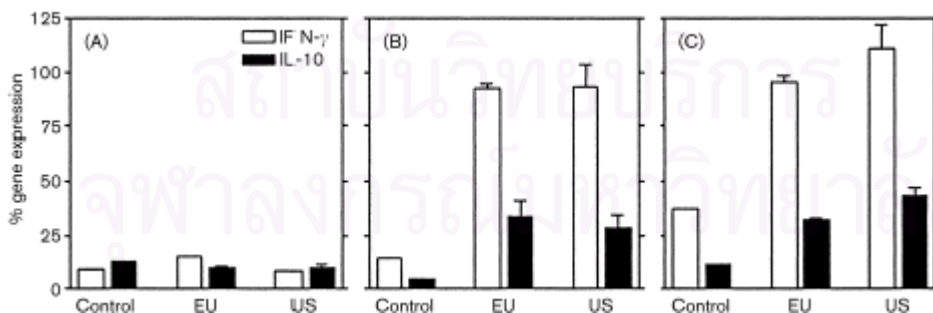
3) การวัดระดับของ Interleukin-10 (IL-10) gene expression ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) และเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage cells) ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV โดยวิธี multiplex polymerase chain reaction (MPCR)

พบการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของสุกรที่ให้เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 5 และ 12 หลังการให้เชื้อ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไวรัสในการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 ( $p > 0.05$ ) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ควบคุม การสร้าง cytokines ทั้งสองชนิดที่ทดสอบ ในสุกรกลุ่มควบคุม วันที่ 5 และ 12 หลังการให้เชื้อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนที่สร้าง porcine IFN- $\gamma$  (กราฟสีขาว) และ IL-10 (กราฟสีดำ) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด ณ วันที่ 5 (กราฟ A) และ 12 (กราฟ B) หลังการให้เชื้อ

นอกจากนี้ยังตรวจพบการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 และ IFN- $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำล้างปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เริ่มจากวันที่ 9 หลังได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไวรัส (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนที่สร้าง porcine IFN- $\gamma$  (กราฟสีขาว) และ IL-10 (กราฟสีดำ) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในน้ำล้างปอด ณ วันที่ 5 (กราฟ A) 9 (กราฟ B) และ 15 (กราฟ C) หลังการให้เชื้อ

## การอภิปรายผลและข้อสรุป (Discussion and conclusion)

จากผลการวิจัยเบื้องต้นพบว่าไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคได้ โดยพบว่า ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ US (01NP1) ก่อโรครุนแรงกว่า ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ EU (02SB3) และยังพบรอยโรครุนแรงในสุกรที่ชันสูตรวันที่ 15 หลังให้เชื้อ ซึ่งต่างจากการทดลองของนักวิจัยต่างประเทศ ที่พบไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มักก่อโรครุนแรงที่สุดในวันที่ 10 หลังให้เชื้อ ความแตกต่างของสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในประเทศไทยอาจเอื้ออำนวยให้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย มีความรุนแรงและ ก่อโรคได้นานมากกว่า 15 วัน ดังนั้นเพื่อความสมบูรณ์ของการศึกษาพยากรณ์โรคไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย ควรทำการเลี้ยงสุกรไม่น้อยกว่า 30 วัน ก่อนทำการชันสูตร

รอยโรคที่น่าสนใจจากการชันสูตร คือ petichial hemorrhage ที่ไต มีความคล้ายคลึงกับรอยโรคของ Classical swine fever เป็นอย่างมาก และไม่เคยมีรายงานถึงรอยโรคนี้ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มาก่อน สุกรทดลองทุกตัวได้ทำการตรวจซีรัมโดยวิธี Neutralization peroxidase-linked assay (NPLA) พบไตเตอร์ต่ำกว่า 1:16 นอกจากนี้ ทำการตรวจเนื้อเยื่อเพื่อหา CSF antigen และแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร จาก ต่อมทอลซิล ต่อมน้ำเหลือง ม้าม ไต และ ลำไส้เล็กส่วน Ileum ไม่พบ หา CSF antigen และไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้ ดังนั้นการพบ petichial hemorrhage ที่ไตในงานชันสูตรซาก ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร อาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ก็ได้ สัตวแพทย์ควรทำการพิสูจน์ เพิ่มเติม

พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อปอดมากที่สุดในวันที่ 9 ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ในขณะที่สายพันธุ์ยุโรป (02SB3) สามารถพบได้ทุกวันที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ยังพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) มากกว่าสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) ในแทบทุกเนื้อเยื่อที่ได้รับการตรวจ ยกเว้นในกระดูก turbinates และในหัวใจที่มีแนวโน้มของการพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกามากกว่าสายพันธุ์ยุโรป ในทางตรงกันข้ามสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) มีความรุนแรงของรอยโรคมากกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ปริมาณ แอนติเจนที่พบไม่สอดคล้องกับรอยโรคที่พบ จากผลการวิจัยอาจสรุปได้ว่าไวรัส พี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ยุโรปสามารถปรับตัวเข้ากับสุกรได้ดีกว่าสายพันธุ์อเมริกา โดยไม่เหนี่ยวนำให้เกิดอาการทาง clinic มากเท่าสายพันธุ์อเมริกา แต่อาจแฝงตัวในสุกรได้นานกว่าและอาจมีผลให้เกิดภาวะ persistent infection ทำให้ยากต่อการกำจัดเชื้อออกจากฝูงสุกร การพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อตับและไตแสดงให้เห็นว่า ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถขับออกทางน้ำดี หรือทางอุจจาระ และทางปัสสาวะได้ เช่นเดียวกับการติดต่อทาง oronasal route ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่อมทอลซิล และกระดูก turbinates

นอกจากนี้ มีการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวในกระแสเลือดของสุกรที่ให้เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ณ วันที่ 5 และ 12 หลังการให้เชื้อ รวมทั้งยังตรวจพบการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 และ IFN- $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำล้างปอด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เริ่มจากวันที่ 9 จนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง คือวันที่ 15 หลังได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไวรัสในการเพิ่มขึ้นของยีนที่สร้าง IL-10 หรือ IFN- $\gamma$  ( $p > 0.05$ ) พยากรณ์โรคของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส อาจมีความแตกต่างกันทางพยาธิวิทยา แต่ในแง่การเหนี่ยวนำการสร้าง IL10 แล้วไม่แตกต่าง

กัน ซึ่งอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในแง่ของการติดเชื้อแทรกซ้อนจาก  
แบคทีเรีย

### เอกสารอ้างอิง

1. Carmen, S. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in ontario-1978-1982. *Can. Vet. J.* 36:76-777,
2. Damrongwattanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, J., Parchariyanon, S., Pinyochon, W., and Tantaswasdi, U. 1996a. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. *Thai Vet. Med. Assoc.* 47(2):19-30.
3. De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., et al. 1997. The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Sem Virol* 8:33-47.
4. Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X-J., Lum, M.A., Andrews, J.J., and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32:648-660.
5. Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X-J., Andrews, J.J., Lum, M.A., and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 33:159-170.
6. Katz, J.B., Shafer, A.L., Eernisse, K.A., Landgraf, J.G., and Nelson, E.A. 1995. *Vet. Microbiol.* 44:65-76.
7. Keffaber, K.K., Stevenson, G.W., Van Alstine, W.G., et al. 1992. SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am Assoc Swine Pract Newsletter* 4:38-40.
8. Nelson, E.A., Christopher-Jennings, J., Drew, T., et al. 1993. Differentiation of United States and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Micro.* 31:3184-3189.
9. Oraveerakul, K., Punarriwatana, D., Luengyosluechakul, S., Tuntasuparak, and Kunavongkrit, A. 1995. The seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and north-eastern part of Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 25(3):233-240.

10. Panuska, J.R., Merolla, R., Rebert, N.A., Hoffmann, S.P., Tsvitse, P., Cirino, N.M., Silverman, R.H., and Rankin, J.A. 1995. Respiratory syncytial virus induces Interleukin 10 by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 96:2445-2453.
11. Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A., and Damrongwatanapokin, S. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. *IPVS (Accepted)*
12. Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L., and Halbur, P.G. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): *In vitro* comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet. Immuno. Immunopathol.* 59:323-335.
13. Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Ackermann, M.R., Thacker, E.L., and Royer, R.L. 1998. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet. Path.* 35:398-406.
14. 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.
15. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., et al., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q:*13:121-130.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก

### ผลงานวิจัย

- R. Thanawongnuwech, S. Kesdaengsakolwut, A. Tatsanakit, and N. Panprapa 2003. Pathological study of the selected PRRSV isolates in Thailand. The 4<sup>th</sup> International Symposium on emerging and re-emerging pig diseases. Rome Palazzo Dei Congressi, Rome, Italy June 29-July 2, 2003, P. 69.
- S. Suradhat and R. Thanawongnuwech. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV). The 4<sup>th</sup> International Symposium on emerging and re-emerging pig diseases. Rome Palazzo Dei Congressi, Rome, Italy June 29-July 2, 2003, p. 83.
- S. Suradhat and R. Thanawongnuwech. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J. Gen. Virol. 84: (In Press)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## PATHOLOGICAL STUDY OF THE SELECTED PRRSV ISOLATES IN THAILAND

R. Thanawongnuwech<sup>1</sup>, S. Kesdaengsakolwut<sup>1</sup>, A. Tatsanakit<sup>1</sup>, N. Panprapa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

**Keywords:** PRRS, pathogenesis, genotype, Thailand

### Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the Arterivirus, first observed in the United States (US) in 1987 and in Europe (EU) in 1990 (2). The earliest detection of PRRSV seropositive pigs in Thailand was in 1989 when a serological survey of swine sera was conducted during 1988-1999. However, PRRSV was first isolated in Thailand from suckling and nursery pigs with severe chronic respiratory distress and the virus was identified as the US genotype (1). Since Thailand has continuously imported swine breeders from both European and North American countries for genetic improvement of breeding stocks, both EU and US genotypes are present in the swine population in Thailand (6). Differences in pathogenicity of PRRSV have been demonstrated (3). The purpose of this study was to compare the pathogenicity of the selected PRRSV isolates in Thailand between the EU and US genotypes.

### Materials and Methods

**Animals:** Twenty-one PRRSV-free pigs were obtained at 3-wk-old of age and divided into 3 groups (Table 1). Pigs were inoculated with either genotype (01NP1, US genotype and 02SB3, EU genotype) of PRRSV at  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, one ml intranasally and one ml intramuscularly. Pigs were examined daily after inoculation.

**Pathology:** Pigs were necrosied at 5, 9 and 15 days post inoculation (DPI; Table 1). Gross and microscopic findings were recorded as well as lung score.

**Virology and serology:** Virus isolation (VI) was performed from pooled sera and titrated as TCID<sub>50</sub>/ml on Marc-145 (5). IDEXX ELISA (IDEXX Laboratories Inc., U.S.A.) was used to detect PRRSV antibodies in sera.

### Results and Discussion

Respiratory disease characterized by transient dyspnea and tachypnea after handling or being stress was minimal to moderate in both PRRSV-infected groups. However, after 5 DPI in the 01NP1-infected pigs, moderate lethargy and anorexia with rough hair coat and huddling behavior was obviously seen until 15 DPI. More fever days (50% of pigs with the rectal temperature over than 40C) were also observed in the US group (9 days) compared with the EU group (4 days). Similar to the previous reports (3), we demonstrated the severe clinical signs induced by the US genotype of the Thai isolate.

In addition, necropsy revealed more extensive diffuse pneumonia with the higher lung score in the US-infected pigs at all necropsied dates (Table 2, Fig.1). Interestingly, the severity of the pneumonia was still observed at 15 DPI, whereas Halbur et al. (1995) demonstrated the peak of the lung lesion at 10 DPI.

Microscopically, the lung lesions were characterized by septal thickening by hyperplasia and hypertrophy of pneumocyte type II with infiltration of lymphocytes (Fig. 3) and cellular debris in the alveolar spaces were also observed as previously described (4). Microscopic lesions were still observed at 15 DPI. Both of our isolates induced longer clinical signs and lung lesions, especially in the US genotype. This particular Thai isolate (01NP1) is obviously more virulent than the EU isolate (02SB3).

Other remarkable lesions were lymphadenopathy and diffuse petechial hemorrhage of the kidney. Enlargement of lymph nodes was seen in all PRRSV-infected pigs. Again, in the 01NP1-infected pigs, the lymph nodes were much bigger (2-3 times) than the 02SB3-infected pigs. Petechial hemorrhage of the kidney was the most remarkable in the US-infected pigs, particularly at 5 DPI (Fig. 2), but less in severity in the EU-infected pigs. The hemorrhage was still observed at the kidney of both PRRSV-infected groups, but milder (pin-point hemorrhage) at 9 and 15 DPI. No evidence of classical swine fever virus nor Aujeszky's disease virus was detected in the sera or tissues of all pigs.

PRRSV was isolated from serum of all PRRSV-infected pigs and was confirmed by the nested multiplex RT-PCR. The viruses were the same viruses used for inoculation in each group. No cross contamination between groups was found. Viremia was seen as early as 5 DPI through 15 DPI. All PRRSV-infected pigs had antibodies measured by ELISA as early as 9 DPI.

In this study, we demonstrated the high virulence US genotype isolated in Thailand. Phylogenetic analysis and in vivo cytokine response of those isolates are under investigation in our lab.

### Acknowledgements

This study was funded by the Rachadapiseksompoch Endowment Fund, 2002-2003.

## References

1. Damrongwatanapokin et al., 1996. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47: 23-34.
2. Gilbert et al., 1997. J Clin Microbiol 35:264-267.
3. Halbur et al., 1995. Vet. Pathol. 32:648-660.
4. Rossow, 1998. Vet. Pathol. 35:1-20.
5. Thanawonguwech et al., 2000. Vet. Pathol. 35:398-406.
6. Thanawonguwech et al., 2002. The 17<sup>th</sup> IPVS p. 410.

**Table 1:** Experimental design

Necropsied Date	Control (Media)	US (01NP1)	EU (02SB3)
5 DPI	1	3	3
9 DPI	1	3	3
15 DPI	1	3	3

**Table 2:** Results after PRRSV inoculation

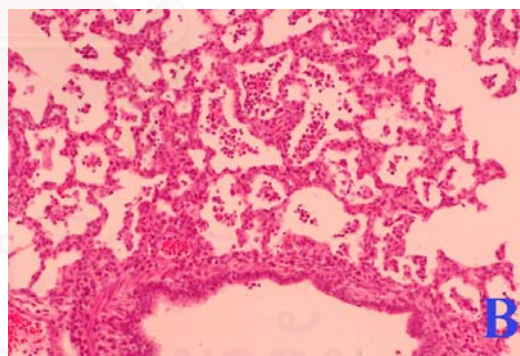
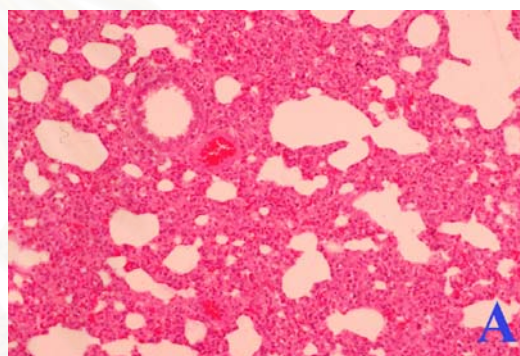
Lung Score (%)	Control	US (01NP1)	EU (02SB3)
5 DPI	0	7.67 ± 6.66	1.5 ± 0.0
9 DPI	0	54.00 ± 19.00	27.67 ± 23.75
15 DPI	0	60.67 ± 8.62	33.00 ± 11.00
PRRSV ELISA			
0 DPI	0/3	0/9	0/9
5 DPI	0/3	0/9	0/9
9 DPI	0/2	6/6	5/6
15 DPI	0/1	2/2	2/3
VI-Serum (TCID <sub>50</sub> /ml)			
5 DPI	0	Upto 10 <sup>2.66</sup>	Upto 10 <sup>3.25</sup>
9 DPI	0	Upto 10 <sup>3.50</sup>	Upto 10 <sup>2.75</sup>
15 DPI	0	Upto 10 <sup>1.50</sup>	Upto 10 <sup>2.00</sup>



**Fig. 1** Lung, PRRSV (01NP1)-infected pig (No.28), diffuse pneumonia at 9 DPI.



**Fig. 2** Kidney, PRRSV (01NP1)-infected pig (No.25), diffuse petechial hemorrhage at 5 DPI



**Fig. 3** A) Lung, PRRSV (01NP1)-infected pig (No.26) revealed diffuse lymphohistiocytic interstitial pneumonia at 9 DPI. (HE, X 660)  
B) cellular debris in the alveolar space of PRRSV (01NP1)-infected pig (No.28) at 9 DPI. (HE, X 660)



# UPREGULATION OF IL-10 GENE EXPRESSION IN THE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC) OF PIGS INFECTED WITH PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV)

Sanipa Suradhat<sup>1</sup> and Roongroje Thanawongnuwech<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Microbiology; <sup>2</sup> Department of Veterinary Pathology, The Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand

**Keywords:** PRRS, immunology, IL-10

## Introduction

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) has been recognized, worldwide, as one of the economically important pathogens of swine, since its emergence in the late 1980's. Several studies suggest that PRRSV may negatively modulate the host immune system. There appeared to be a weak innate immune response at the time of PRRSV infection, as compared to other respiratory pathogens. Proinflammatory cytokines were mostly undetectable or minimally increased following the exposure to PRRSV (1, 2). The poor innate immune response is consistent with induction of delayed and inefficient adaptive immunity against the virus (2). Following the infection, PRRSV persists in the infected pigs up to 12 weeks and the infectious virus can be shed during this stage (3), suggesting that the immune system could not completely eliminate the virus from infected host.

Cytokines play a crucial role in an induction and modulation of immunological process. We recently reported that PRRSV could significantly upregulate the IL-10 gene expression in the PBMC cultured, *in vitro* (4). We postulated that an induction of IL-10 might be one of the strategies used by PRRSV to tamper the host immune responses. The inhibitory effect of IL-10 on macrophage and T lymphocyte functions during the early stage of PRRSV infection may interfere with an induction of effective anti-PRRSV immunity. In this study, we further examined an *in vivo* effect of PRRSV on levels of cytokine gene expression in the PBMC of infected pigs. In addition, both European and US strains of PRRSV were compared for their effects on the cytokine gene expressions.

## Materials and methods

### Animals and experiment protocol:

Twenty-one, 3 weeks old, PRRSV-free pigs were obtained from a commercial farm. Pigs were inoculated with 2 ml (one ml intranasally and one ml intramuscularly) of either the US (01NP1) or European (02SB3) strain of the Thai PRRSV at the dose of at  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, (9 pigs/group). Three pigs were used as a negative control group. Pigs were examined daily after inoculation until 15 dpi. Gross and microscopic findings as well as lung scores were recorded.

**Viruses and Cells:** Thai PRRSV isolates used for experimental infection were cloned and previously characterized as the US genotype (01NP1) and the European genotype (02SB3) (R. Thanawongnuwech, unpublished data).

Heparinized blood samples were collected on the challenge day (day 0), 5 and 12 days post infection (dpi) and porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation technique. The freshly isolated PBMC were counted, and approximately  $3 \times 10^6$  of PBMC were resuspended in 200  $\mu$ l of RNA Later (Ambion, Texas). Cells were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until needed.

**RNA extraction and RT-MPCR:** Total RNA from each sample was extracted and subjected to reverse-transcription. The multiplex PCR that simultaneously amplified GAPDH, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-4 gene products was performed using protocol described previously (4). Following the MPCR, the amplified product was subjected to agarose gel electrophoresis and quantification of the PCR products by densitometry using the Scion Image software (Scion Corporation, USA). The expression level of the cytokine was determined by normalizing its expression against the GAPDH, expression. The results were expressed as the percentage

of the cytokine expression /GAPDH expression, and referred as % expression.

It should be noted that levels of background cytokine gene expression in the PBMC were varied among the pigs. In addition, unstimulated cells also had some background level of the cytokine gene expression. Thus, in order to minimize the variability, the background of % gene expression in PBMC of each pig on day 0 was subtracted from the % expression of the PBMC measured during the experiment.

### Results

Following PRRSV inoculation, all infected pigs showed clinical signs of PRRSV. As expected, the US strain induced more severe clinical signs and pathological changes than the European strain (data not shown).

PRRSV infection resulted in a significant upregulation of the IL-10 gene expression ( $p < 0.05$ ), in the PBMC of infected pigs at 5 and 12 dpi. The level of IL-10 expression induced by European and US strains were indifferent ( $p > 0.05$ ) on both tested time points. The control (uninfected) pigs did not show any increase in cytokine gene expression. (Figure 1). In this experiment, minimal changes in IL-2 and IL-4 gene expression levels were observed (data not shown).

### Discussion

Previously, we reported the *in vitro* effect of PRRSV on the IL-10 gene expression (4). In this study, we showed that PRRSV infection also resulted in upregulation of IL-10 gene expression in the porcine PBMC *in vivo*, similar to the previous experiment demonstrating the upregulation of IL-10 gene expression in the alveolar macrophages of the PRRSV-infected pigs (R. Thanawongnuwech, personal observation). Interleukin-10 has been known as a potent immunosuppressive cytokine. The biological effects of IL-10 include downregulation of macrophage, antigen presenting cell and T-lymphocyte functions (5). The exploitation of IL-10 appears to be the common mechanism of immunosuppression by several intracellular pathogens that specifically targeting macrophages for infection (6, 7). 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. There is at least one report, describing an increase in IL-10 mRNA expression from PBMC of piglets born from infected sow (8). In addition, PBMC from piglets infected *in utero* with PRRSV contained less IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  producing cells, suggesting the immunomodulatory effect of PRRSV, possibly through the systemic overproduction of IL-10 (9).

It is well documented that European and US strains of PRRSV are antigenically and genotypically heterologous and are differ in their virulence (10). The differences in clinical signs and pathological changes of the 2 strains were also observed in this experiment. However, no significant difference, in the levels of IL-10 expression, between both groups was observed at both tested time points. This finding suggests that the ability of inducing IL-10 expression may be conserved among the strains of PRRSV and may explain why both PRRSV genotypes appear to share similarity in disease outcome, regarding to their immunomodulatory properties observed in the field.

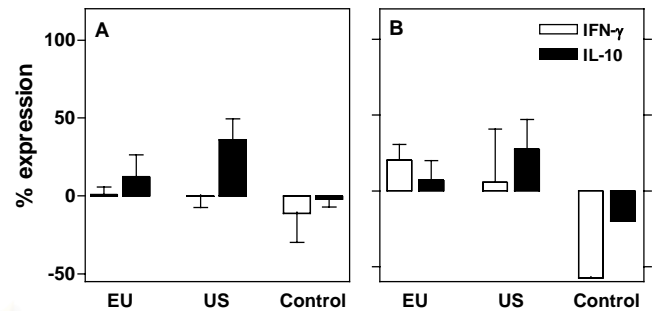
### Acknowledgements

This study was supported by the Rachadapiseksompoch Endowment Fund, 2002-2003. The authors are grateful to Drs. S. Kesdaengsakolwut, N. Panprapa, and Ms A. Tatsanakit for their technical assistance.

### References

1. Van Reeth, K., and H. Nauwynck. 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31:187-213.
2. Murtaugh, M. P., Z. Xiao, and F. A. Zuckermann. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15:533-547.
3. Will, R. W., J. J. Zimmerman, S. L. Yoon, M. J. Swenson, M. J. McGinley, H. T. Hill, K. B. Platt, J. Christopher-Hennings, and E. A. Nelson. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55:231-240.

4. Suradhat, S., R. Thanawongnuwech, and Y. Poovorawan. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84:453-459.
5. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 19:683-765.
6. Fickenscher, H., S. Hor, H. Kupers, A. Knappe, S. Wittmann, and H. Sticht. 2002. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunol.* 23:89-96.
7. Redpath, S., P. Ghazal, and N. R. Gascoigne. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in Microbiol.* 9:86-92.
8. Feng, W. H., M. Tompkins, J. Xu, T. Brown, S. Laster, and M. B. McCaw. 2000. Cytokine production by pigs infected in-utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia, p. 657.
9. Aasted, B., P. Bach, J. Nielsen, and P. Lind. 2002. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9:1229-1234.
10. Meng, X. J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficiency and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74:309-329.



**Figure 1** Mean percent expression of porcine IFN- $\gamma$  gene (white) and IL-10 gene (black) in the PBMCs of pigs infected with European (EU) or US strain (US) PRRSV on **A)** 5 dpi and **B)** 12 dpi.