

ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกรที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์ซีชนิดเพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อ
และสุกรที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์ซีชนิดเพาะเลี้ยงในกระต่าย

Immune response to swine fever virus in tissue cultured C-strain vaccinated pigs
and lapinised C-strain vaccinated pigs

จารุณี สาตรา*

จันทร์ดี ระเบียบเลิศ**

บทคัดย่อ

โรคอหิวาต์สุกร มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus, CSFV) จีนัส *Pestivirus* วงศ์ *Flaviviridae* เป็นโรคติดต่อในสุกรส่งผลกระทบต่อปัญหาเศรษฐกิจทั่วโลก วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษา ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำและระบบภูมิคุ้มกันแบบฟั้งเซลล์ ในสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain หลังฉีดวัคซีน 3 วัน และฉีดเชื้อพิษหัดด้วยเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเขน ผลการทดลองพบว่า สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain มีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นเฉลี่ยระหว่าง $39.40 \pm 0.26^{\circ}\text{C}$ - $39.95 \pm 0.70^{\circ}\text{C}$ ในขณะที่สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain มีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นเฉลี่ยระหว่าง $39.25 \pm 0.34^{\circ}\text{C}$ - $39.58 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$ สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 3 ใน 4 ตัว ไม่มีการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวและการแสดงออกของยีน $\text{TGF-}\beta$ แต่มีการเพิ่มขึ้นของยีน $\text{IFN-}\gamma$ ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด สุกรจำนวน 3 ใน 4 ตัว ในกลุ่มนี้กระตุ้นแอนติบอดีในวันที่ 14 และ 21 และไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงหรือตายหลังฉีดเชื้อพิษหัด อย่างไรก็ตาม สุกรจำนวน 1 ตัว ซึ่งฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain มีจำนวนเม็ดเลือดขาวและยีน $\text{TGF-}\beta$ ลดลง แต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของยีน $\text{IFN-}\gamma$ ตรวจพบแอนติบอดีในวันที่ 14 และตรวจพบแอนติเจนในวันที่ 5, 7 และ 14 หลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยสุกรแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายในวันที่ 18 หลังฉีดเชื้อพิษหัด เช่นเดียวกันกับสุกรในกลุ่มควบคุมบวก สุกรทั้งสี่ตัวในกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain ไม่มีการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวและยีน $\text{TGF-}\beta$ แต่มีการเพิ่มขึ้นของยีน $\text{IFN-}\gamma$ ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด สุกรทั้งสี่ตัวในกลุ่มนี้กระตุ้นแอนติบอดีในวันที่ 14 และ 21 และไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงหรือตายหลังฉีดเชื้อพิษหัด อาการทางคลินิก อุณหภูมิร่างกาย จำนวนเม็ดเลือดขาว การแสดงออกของยีน $\text{IFN-}\gamma$ และ $\text{TGF-}\beta$ รวมทั้งการตรวจพบแอนติเจนและแอนติบอดีในสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 3 ใน 4 ตัว เหมือนกันกับสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain ทั้ง 4 ตัว อย่างไรก็ตาม วัคซีน tissue cultured C-strain ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเขนได้เพียงบางส่วน ในขณะที่วัคซีน lapinised C-strain ให้ความคุ้มโรคได้อย่างสมบูรณ์หลังฉีดวัคซีน 3 วัน

คำสำคัญ: ภูมิคุ้มกัน, ไวรัสอหิวาต์สุกร, วัคซีนสายพันธุ์ซี

* นักศึกษาปริญญาเอกหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต เบอร์โทร 081 879 4724 ; jaruneesatra@gmail.com

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ; jundee04@gmail.com

Abstract

Classical swine fever is caused by classical swine fever virus (CSFV), genus *Pestivirus*, Family Flaviviridae. It is a highly contagious disease of swine that effects to economically worldwide. The aim is to investigate humoral and cell mediated immune responses in tissue cultured C-strain vaccinated pigs and lapinised C-strain vaccinated pigs, 3 days post vaccination, and challenged with a highly virulent CSFV Bangkhen strain. In our results, tissue cultured C-strain vaccinated group had the average rising body temperature $39.40\pm0.26^{\circ}\text{C}$ - $39.95\pm0.70^{\circ}\text{C}$, whereas lapinised C-strain vaccinated group had the average rising body temperature $39.25\pm0.34^{\circ}\text{C}$ - $39.58\pm0.13^{\circ}\text{C}$. Three of four pigs in tissue cultured C-strain vaccinated group did not decrease white blood cells and TGF- β gene expression but increased IFN- γ gene on day 3 post challenge. Three of four pigs in this group induced antibody on day 14 and 21 and did not show severe clinical signs or died post challenge. However, one pig in tissue cultured C-strain vaccinated group decreased white blood cells and TGF- β gene but did not increase IFN- γ gene, the antibody was detected on day 14 and the antigen was detected on day 5, 7 and 14 post challenge. This pig showed severe clinical signs and died on day 18 post challenge, as well as pigs in positive control group. All of four pigs in lapinised C-strain vaccinated group did not decrease white blood cells and TGF- β gene but increased IFN- γ gene on day 3 post-challenge. All of four pigs in this group induced antibody on day 14 and 21 and did not show severe clinical signs or died post challenge. The clinical sign, body temperature, total white blood cells, IFN- γ and TGF- β gene expression, including antibody and antigen detection in three of four tissue cultured C-strain vaccinated pigs were similar to all of four lapinised C-strain vaccinated pigs. However, tissue cultured C-strain vaccine partially protected pigs while lapinised C-strain vaccine completely protected pigs against the highly virulent CSFV Bangkhen strain at 3 days post vaccination.

Key words; immune, swine fever virus, C-strain vaccine

บทนำ

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus, CSFV) ซึ่งเป็นไวรัส RNA ที่มีเปลือกล้อมรอบ จีโนม *Pestivirus* วงศ์ Flaviviridae เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever, CSF) (King *et al.*, 2011) แพร่ระบาดโดยการสัมผัสและส่งผลกระทบต่อปัญหาเศรษฐกิจและสุขอนามัยการปศุสัตว์ทั่วโลก ดังนั้น องค์การระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties, OIE) จึงประกาศให้โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคเฝ้าระวัง (Moennig, *et al.*, 2003) สุกรติดเชื้อมีอาการแบบเฉียบพลัน (acute) แบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) โดยทั่วไปแบบเฉียบพลัน สุกรแสดงอาการป่วยรุนแรง มีไข้สูง

เลือดออก (hemorrhage) เม็ดเลือดขาวลดลง (leucopenia) แท้งลูก (abortion) และอัตราตายสูง (Durand *et al.*, 2009) แบบกึ่งเฉียบพลันสุกรแสดงอาการป่วยเพียงเล็กน้อย และแบบเรื้อรังสุกรจะไม่แสดงอาการหรือมีอาการป่วยเรื้อรังและอาจหายป่วยได้ โดยอาการของโรคคหิวหวัดสุกรจะรุนแรงหรือไม่ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของสัตว์รวมทั้งความรุนแรงของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ (Flogal-Niesmann *et al.*, 2003) สุกรที่ติดเชื้อสายพันธุ์รุนแรงมากจะตายทุกตัว ในขณะที่สุกรที่ติดเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลางหรือรุนแรงน้อยจะมีอาการป่วยเรื้อรัง (Gladue *et al.*, 2010) การให้วัคซีนแบบฉุกเฉิน (emergency vaccination) มีความสำคัญในการลดการแพร่ระบาดของโรค วัคซีนชนิดเชื้อเป็น (modified live vaccine, MLV) ราคาไม่แพงและสามารถกระตุ้นความคุ้มโรคอย่างสมบูรณ์ (complete protection) ต่อเชื้อ CSFV ที่รุนแรง (virulent CSFV) ดังนั้นจึงยังคงมีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอย่างกว้างขวางในท้องที่ที่มีการระบาดของโรค (endemic areas) รวมทั้งทวีปเอเชีย ส่วนกลางและใต้ของทวีปอเมริกา (Blome *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2005; Paton *et al.*, 2000; Suradhat *et al.*, 2007) ได้มีการพัฒนาวัคซีนชนิดเชื้อเป็นหลายชนิดโดยการผ่านเชื้อ CSFV ในกระต่าย เช่น สายพันธุ์ซี (Chinese or C-strain) หรือผ่านในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (tissue cultured) เช่น สายพันธุ์ Thiverval (Blome *et al.*, 2006; van Oirschot, 2003) การทดสอบความคุ้มโรคตามมาตรฐาน OIE กำหนดให้ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อจำนวน 2 กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มแรกฉีดวัคซีนในขนาด 1/80 โด๊ส และกลุ่มที่สองฉีดวัคซีนในขนาด 1/160 โด๊ส โดยมีกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีนจำนวน 2 ตัว และฉีดพิษหัดเข้ากล้ามเนื้อด้วยเชื้อ CSFV ในปริมาณ 10^5 PID₅₀/ml หลังฉีดวัคซีน 14 วัน (OIE, 2008) ในขณะที่มาตรฐานอาเซียนกำหนดให้ฉีดวัคซีนในขนาด 1/100 โด๊ส เข้ากล้ามเนื้อจำนวนไม่น้อยกว่า 4 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน จำนวน 2 ตัว และฉีดพิษหัดเข้ากล้ามเนื้อด้วยเชื้อ CSFV ในปริมาณไม่ต่ำกว่า 10^4 LD₅₀/ml (50% lethal dose) หลังฉีดวัคซีนไม่น้อยกว่า 14 วัน (ASEAN, 1998) ในประเทศไทยเกิดอุบัติการณ์โรคคหิวหวัดสุกรครั้งแรกที่อำเภอบางเขน (ปัจจุบันอยู่ในเขตจตุจักร) กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2493 (ค.ศ. 1950) และเกิดการระบาดไปทั่วประเทศ ส่งผลทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในฟาร์มสุกร และเป็นปีแรกที่กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนเชื้อตายชนิด crystal violet (Kongsmak., 1980) ที่ให้ภูมิคุ้มกันช้าและหมดเร็ว จึงได้ปรับปรุงเป็นผลิตวัคซีนเชื้อเป็นสเตอร์น SFA แต่สุกรมีปฏิกิริยาหลังฉีดและต้องฉีด hyperimmune serum ควบคู่ไปด้วย ต่อมาในปี พ.ศ. 2518 (ค.ศ. 1975) ได้รับเชื้อไวรัสคหิวหวัดสุกรชนิดผ่านกระต่ายสายพันธุ์ไชน่า (lapinised swine fever virus, China strain) จากประเทศอังกฤษ และได้ทดลองใช้ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อเป็น พบว่าเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัยสูง ไม่มีปฏิกิริยาภายหลังฉีด ไวรัสไม่แพร่กระจายไปยังตัวอื่น ให้ความคุ้มโรคได้เร็วเพียง 5 วัน หลังฉีดวัคซีน [ฉาย จอมเกาะ, 2529 (1986)] และ 7 วัน หลังฉีดวัคซีน [จารุณี สาตรา และ สุณีจิต คงทน, 2535 (1995)] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ซี (C-strain) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในกระต่ายเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ suspension ของม้ามและต่อมน้ำเหลือง และซีรัม มาผลิตวัคซีนในรูปดูดแห้ง (lyophilized form) เรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า lapinised C-strain [กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530 (1987)] เนื่องจากการใช้กระต่ายจำนวนมากในการผลิตวัคซีนขัดต่อหลักจรรยาบรรณสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จึงได้ร่วมมือกับสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ทำการวิจัยและพัฒนาวัคซีน C-strain โดยเพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อ เรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า tissue cultured C-strain ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ เพื่อประกอบการตัดสินใจในการนำวัคซีนที่พัฒนาได้ใหม่ไปใช้ในการควบคุมโรคคหิวหวัดสุกรในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำและระบบภูมิคุ้มกันแบบฟั้งเซลล์ในสุกร กลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain หลังฉีดวัคซีน 3 วัน และฉีดเชื้อพิษหัดด้วยเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน (Bangkhen strain) โดยดูอาการทางคลินิก (clinical signs) วัดอุณหภูมิร่างกาย (rectal body temperature) ตรวจวัดจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้ง white blood cells และ lymphocytes ตรวจหาแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) ในซีรัม และตรวจวัดการแสดงออกของยีน interferon-gamma (IFN- γ) และ transforming growth factor-beta (TGF- β) ในสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain หลังฉีดเชื้อพิษหัดด้วยเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน

วิธีการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการตรวจและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของกรมปศุสัตว์ ใบอนุมัติเลขที่ ID#001/2553 ในวันที่ 21 กรกฎาคม 2553

1. สัตว์ทดลอง

สุกรลูกผสมสามสายพันธุ์ ลาร์จไวท์ (Large White) แลนด์เรซ (Landrace) และดูโรคเจอร์ซี (Durox Jersey) อายุ 11 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กิโลกรัม คละเพศ จำนวน 12 ตัว ได้รับจากฟาร์มสุกรของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์นครราชสีมา กรมปศุสัตว์ และนำมาแยกเลี้ยงในอาคารสัตว์ทดลองของกลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา ทำการติดเบอร์หูสุกรและเจาะเลือดเพื่อนำไปตรวจหาแอนติเจนของ CSFV และแอนติบอดีต่อ CSFV สุ่มคัดเลือกสุกรที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีแอนติเจนของ CSFV และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV มาใช้ในการทดลอง โดยใช้จำนวนสัตว์ทดลองขั้นต่ำตามมาตรฐานอาเซียนกำหนด (ASEAN, 1998) และสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ [สภาวิจัยแห่งชาติ 2554 (2011)] โดยแบ่งสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มควบคุมลบ (negative control group) จำนวน 2 ตัว (N1 และ F8) (2) กลุ่มควบคุมบวก (positive control group) จำนวน 2 ตัว (D6 และ D0) (3) กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ซีชนิดเพาะเลี้ยงในกระต่าย (lapinised C-strain vaccinated group) จำนวน 4 ตัว (N2, N4, N7 และ V2) และ (4) กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ซีชนิดเพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อ (tissue cultured C-strain vaccinated group) จำนวน 4 ตัว (N5, N6, V1 และ V0) โดยแยกเลี้ยงสุกรแต่ละกลุ่มในห้องที่สะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งคัดหลั่งและสิ่งขับถ่าย

2. เชื้อไวรัสและวัคซีน

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์บางเขน (CSFV, Bangkhen strain) ซึ่งแยกได้จากสุกรที่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์สุกรในห้องที่อำเภอบางเขน (ปัจจุบันอยู่ในเขตจตุจักร) กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2493 (ค.ศ. 1950) (Kongsmak, 1980) เตรียมเชื้อพิษหัดโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน ในสุกรที่มีความไวต่อเชื้อ เก็บเลือดขณะที่สุกรมีอุณหภูมิร่างกายสูงกว่า 40°C. และแสดงอาการป่วย แบ่งใส่หลอดทดลองๆ ละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C. ตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสในสต็อกไวรัสชุดที่ 1/54 โดยการไตเตรทในสุกรที่มีความไวต่อเชื้อ พบมีปริมาณเชื้อไวรัส เท่ากับ 1×10^6 PID₅₀/ml (50% pig infectivity dose) วัคซีน lapinised C-strain ชุดที่ 1/54 หมดอายุ 26 มกราคม 2556 และวัคซีน tissue cultured C-strain ชุดที่ 1/55 หมดอายุ 3 เมษายน 2556 ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ประเทศไทย วัคซีนทั้ง 2 ชุด มีปริมาณไวรัส 100 PD₅₀ (50%

protective dose) โดยการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรที่มีความไวต่อเชื้อและฉีดเชื้อพิษหับหลังฉีดวัคซีน 14 วัน ทั้งเชื้อไวรัสและวัคซีนได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา

3. การทดสอบวัคซีนและการฉีดเชื้อไวรัส

สุกรถูกนำมาเลี้ยงไว้ในอาคารสัตว์ทดลอง เพื่อตรวจสอบอาการทางคลินิก และวัดอุณหภูมิร่างกายด้วยปรอทวัดไขทางช่องทวาร (rectal body temperature) วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 7 วัน ก่อนทำการทดลอง สุกรได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular inoculation) ตัวละ 1 ml สุกรกลุ่มควบคุมลบ (N1 และ F8) ฉีดสาร 0.85% Normal saline (NS) และฉีดซ้ำหลังฉีดครั้งแรก 3 วัน สุกรกลุ่มควบคุมบวก (D6 และ D0) ฉีดสาร NS, หลังฉีดสาร NS 3 วัน ฉีดเชื้อ CSFV ปริมาณความรุนแรง 10^5 PID₅₀/ml สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain (N2, N4, N7 และ V2) และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain (N5, N6, V1 และ V0) หลังฉีดวัคซีน 3 วัน ฉีดเชื้อพิษหับเข้ากล้ามเนื้อสุกรด้วยเชื้อ CSFV ปริมาณ 10^5 PID₅₀/ml ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน OIE และ ASEAN (OIE, 2008) (ASEAN, 1998) สังเกตอาการและวัดอุณหภูมิร่างกายวันละ 2 ครั้ง และบันทึกผล เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน หลังฉีดเชื้อ โดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (anterior vena cava) โดย aseptically technique ปริมาตรครั้งละ 20 ml แบ่งใส่หลอด clot blood หลอดละ 5 ml เพื่อแยกเก็บซีรัม (serum) แบ่งใส่หลอด EDTA หลอดละ 5 ml เพื่อส่งไปตรวจวัดค่าเลือด ณ ห้องปฏิบัติการของเอกชน และแบ่งใส่หลอด EDTA หลอดละ 10 ml เพื่อนำไปแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood cell, PBMC)

4. การตรวจวัดจำนวนเม็ดเลือดขาว

ตัวอย่างเลือดที่แบ่งใส่หลอด EDTA หลอดละ 5 ml/ตัวอย่าง ถูกส่งไปตรวจวัดค่าเลือด ณ ห้องปฏิบัติการของเอกชน (Patching Central Lab) อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ค่าเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer) แล้วนำค่าเลือด white blood cells (WBC) และ lymphocytes มาวิเคราะห์

5. การแยกซีรัมและเซลล์ PBMC

สำหรับการแยกซีรัม: ปั่นตกซีรัมจากเลือดในหลอด clot blood ด้วยความเร็ว 800g นาน 20 นาที แล้วแยกแบ่งใส่หลอดหรือไวแอล เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -70°C . สำหรับใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของ CSFV และแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ด้วยวิธี ELISA

สำหรับการแยกเซลล์ PBMC: เจือจางเลือดในหลอด EDTA ด้วยสารละลาย 0.1 mM Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แบบ 2 เท่า ปั่นตกแยกเก็บเซลล์ PBMC ด้วยน้ำยา Lymphoprep (ความหนาแน่น 1.077 ± 0.001 g/ml, Robbins Scientific Corporation, Synnyvale, CA, USA) สัดส่วน 1:1 ด้วยความเร็ว 400 g นาน 30 นาที ปั่นล้างเซลล์ PBMC ด้วยสารละลาย PBS ด้วยความเร็ว 400g นาน 5 นาที เป็นเวลา 2 ครั้ง สุ่มนับจำนวนเซลล์ด้วยการใช้สี Trypan-blue (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) แบ่งและเก็บส่วนเซลล์ PBMC ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อนำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ (cytokine gene expression) ได้แก่ interferon gamma (IFN- γ) และ Transforming growth factor-beta (TGF- β) ด้วยวิธี Quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

6. การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ CSFV ในซีรัมด้วยวิธี ELISA

ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ CSFV จากซีรัมสุกรทุกกลุ่ม หลังการฉีดเชื้อพิษทัพบเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ด้วยชุดตรวจสอบ HerdChek* CSFV Ag ELISA kit (IDEXX laboratories, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader (Science Tech) ที่ค่า A_{450} nm แบบ 2 ซ้ำคำนวณปริมาณแอนติเจนตามสูตร ดังนี้

$$\text{Test samples} = \text{Sample } A_{450} - \text{NCA}_{450}$$

แปลผล; ค่า OD < 0.300 ให้ผลเป็นลบ ค่า OD $\geq$ 0.300 ให้ผลเป็นบวก

ซึ่งเป็นค่า cut off สำหรับการตัดสินใจสุกรติดเชื้อ CSFV เพื่อประโยชน์ในการคัดสุกรออกจากฝูง

หมายเหตุ Test samples = ปริมาณแอนติเจน (OD_{450}) ของตัวอย่างที่ทดสอบ

Sample A_{450} = ค่าเฉลี่ยของ OD ของตัวอย่างที่ตรวจวัดที่ 450 นาโนมิเตอร์

NCA_{450} = ค่าเฉลี่ยของ OD ของตัวอย่างลบที่ตรวจวัดที่ 450 นาโนมิเตอร์

7. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ในซีรัมด้วยวิธี ELISA

ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV จากซีรัมสุกรทุกกลุ่มหลังการทดสอบเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ด้วยชุดตรวจสอบ HerdChek* CSFV Ab ELISA kit (IDEXX laboratories) ตามคำแนะนำของบริษัท อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader (Science Tech.) ที่ค่า A_{450} nm แบบ 2 ซ้ำ แปลผลการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Test samples} = \frac{(\text{NCA}_{450} - \text{Sample } A_{450}) \times 100}{\text{NCA}_{450}}$$

แปลผล; ค่า OD $\leq$ 30% ให้ผลเป็นลบ ค่า OD $\geq$ 40% ให้ผลเป็นบวก

ซึ่งเป็นค่า cut off สำหรับการตัดสินใจสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนติดเชื้อ CSFV เพื่อประโยชน์ในการคัดสุกร

ออกจากฝูง ค่า OD > 30% แต่ <40% ตัดสินว่าเป็น suspected case ต้องทำการตรวจซ้ำหรือ

ยืนยันด้วยการตรวจโดยวิธีอื่น

8. การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ (Cytokine gene expression) ด้วยวิธี Quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

สกัด RNA จากเซลล์ PBMC ของสุกรแต่ละกลุ่มด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป RNeasy Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต สังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดน้ำยา Reverse Transcription Kit (TaqMan[®] microRNA Reverse transcription kits, Valencia, CA, USA) และ random hexamer primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) เจือจาง cDNA 10 เท่า ต่อมาใช้ cDNA ปริมาตร 1 μ l เติมลงใน PCR tube strips แล้วเติม iQ SYBR Green supermix ที่บรรจุ gene specific primers [Applied Biosystems (Roche, Basel, Switzerland)] IFN- γ ; 5'-CGATCCTAAAGGACTA TTTTAATGCAA-3'(F); 5'-TTTTGTCACTCTCCTCTTTCCAAT-3'(R) และ TGF- β ; 5'-CCTGCAA GACCATCGACATG-3'(F); 5'-GCCGAAGCTTGGACAGAATC-3'(R) แล้วนำเข้าเครื่อง real-time thermal cycler แต่ละรอบปฏิกิริยา (Cycling conditions) ประกอบด้วย activation of Polymerase ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 40 รอบ denature ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 15 วินาที annealing และ extension ที่

60 °ซ.เป็นเวลา 1 นาที่ อ่านผลการเพิ่มปริมาณ (amplification) ของยีนไซโตไคน์ จาก melting curve analysis ที่แสดง แปรผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนไซโตไคน์เป็นค่าเท่า (fold-changes) ก่อนและหลังการฉีดเชื้อพิษหัดเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

ผลการวิจัย

1. อาการของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง

สุกรกลุ่มควบคุมลบ (N1 และ F8) มีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยเท่ากับ $38.55 \pm 0.21^{\circ}\text{ซ}$. ก่อนฉีดสารละลาย 0.85 % Normal saline (NS) โดยอุณหภูมิร่างกายไม่มีการเปลี่ยนแปลงและสุกรไม่แสดงอาการป่วย หลังได้รับสาร NS ตลอดการทดลอง สุกรกลุ่มควบคุมบวก (D6 และ D0) ก่อนฉีดเชื้อมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยเท่ากับ $38.5 \pm 0.00^{\circ}\text{ซ}$. สุกรเริ่มแสดงอาการป่วยและมีไข้สูง ($39.6 \pm 0.00^{\circ}\text{ซ}$.) ตั้งแต่วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน และมีไข้สูงต่อเนื่องโดยมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยระหว่าง $39.4 \pm 0.14^{\circ}\text{ซ}$. - $40.25 \pm 0.78^{\circ}\text{ซ}$. ตั้งแต่วันที่ 2-12 สำหรับสุกร D6 ซึ่งตายในวันที่ 13 และตั้งแต่วันที่ 2-17 สำหรับสุกร D0 ซึ่งตายในวันที่ 18 หลังฉีดเชื้อโดยมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 8 หลังฉีดเชื้อ สุกรในกลุ่มควบคุมบวกทั้งสองตัว แสดงอาการป่วยรุนแรง ตั้งแต่วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ ได้แก่ อาการไอ ซึม เบื่ออาหาร ตาอักเสบร่วมกับมีขี้ตา ท้องผูกตามด้วยอาการท้องเสีย เดินเซื่องซึม สั่น ชัก มีเลือดออกเป็นรอยคล้ำบริเวณหลังใบหูและลำตัว สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain (N2, N4, N7 และ V2) มีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยเท่ากับ $38.53 \pm 0.10^{\circ}\text{ซ}$. หลังฉีดวัคซีน 3 วัน และมีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 3-14 หลังฉีดเชื้อพิษหัด เฉลี่ยระหว่าง $39.25 \pm 0.35^{\circ}\text{ซ}$. - $39.58 \pm 0.13^{\circ}\text{ซ}$. สุกรมีอุณหภูมิร่างกายลดลงเฉลี่ยเท่ากับ $38.5 \pm 0.12^{\circ}\text{ซ}$. ในวันที่ 21 หลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยสุกรทั้งสี่ตัวไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงและรอดชีวิตหลังได้รับเชื้อพิษหัด สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain (N5, N6, V1 และ V0) มีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยเท่ากับ $38.55 \pm 0.10^{\circ}\text{ซ}$. หลังฉีดวัคซีน 3 วัน สุกรมีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2-18 หลังฉีดเชื้อพิษหัด เฉลี่ยระหว่าง $39.10 \pm 0.29^{\circ}\text{ซ}$. - $39.98 \pm 0.77^{\circ}\text{ซ}$. (รูปภาพ 1ก) สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงและรอดชีวิตมีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2-18 หลังฉีดเชื้อพิษหัด เฉลี่ยระหว่าง $39.10 \pm 0.36^{\circ}\text{ซ}$. - $39.6 \pm 0.2^{\circ}\text{ซ}$. สุกรมีอุณหภูมิร่างกายลดลงเฉลี่ยเท่ากับ $38.67 \pm 0.38^{\circ}\text{ซ}$. ในวันที่ 21 หลังฉีดเชื้อพิษหัด ในขณะที่สุกรอีกหนึ่งตัว (V0) มีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2-14 หลังฉีดเชื้อพิษหัด ระหว่าง 39.10°ซ . - 41.10°ซ . สุกรมีอุณหภูมิร่างกายลดลงเท่ากับ 38.2°ซ . ในวันที่ 17 โดยสุกรแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายในวันที่ 18 หลังฉีดเชื้อพิษหัด

2. จำนวนเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell Count)

ผลการตรวจค่าเลือดพบว่าสุกรกลุ่มควบคุมลบ มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell, WBC) เฉลี่ยเท่ากับ $22.55 \pm 3.18 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ ก่อนฉีดสาร NS โดยจำนวน WBC ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หลังได้รับสาร NS ตลอดการทดลอง สุกรกลุ่มควบคุมบวก มีจำนวน WBC เฉลี่ยเท่ากับ $23.10 \pm 6.08 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ ก่อนฉีดเชื้อ โดยสุกร D6 มีจำนวน WBC ลดลงต่ำสุดเท่ากับ $9.1 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน และสุกร D0 มีจำนวน WBC ลดลงต่ำสุดเท่ากับ $9.4 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อ สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain มีจำนวน WBC เฉลี่ยเท่ากับ $22.58 \pm 2.90 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน และจำนวน WBC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ย

ระหว่าง $16.98 \pm 2.53 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ – $19.78 \pm 4.29 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ สุกกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain มีจำนวน WBC เฉลี่ยเท่ากับ $24.48 \pm 2.0 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน จำนวน WBC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $14.30 \pm 3.80 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ – $24.35 \pm 2.21 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ (รูปภาพ 1ข) โดยสุกร 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิตหลังได้รับเชื้อพิษหัด มีจำนวน WBC เฉลี่ยเท่ากับ $24.90 \pm 2.21 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน จำนวน WBC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $15.80 \pm 2.86 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ – $23.40 \pm 1.37 \times 10^3 \text{ cells/mm}^3$ ในทางตรงกันข้ามสุกรอีกหนึ่งตัว (V0) ที่เสียชีวิต มีจำนวน WBC ลดลงต่ำสุดเท่ากับ $9.8 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ในวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อพิษหัด

3. จำนวนเม็ดเลือดขาว (% Lymphocyte)

ผลการตรวจค่าเลือด พบว่าสุกรกลุ่มควบคุมมีจำนวนเม็ดเลือดขาว (lymphocytes) เฉลี่ยเท่ากับ $63 \pm 1.41\%$ ก่อนฉีดสาร NS โดยจำนวน lymphocytes ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับสาร NS ตลอดการทดลอง สุกกรกลุ่มควบคุมมีจำนวน lymphocytes เฉลี่ยเท่ากับ $68 \pm 2.83\%$ ก่อนฉีดเชื้อ โดยสุกร D6 มีจำนวน lymphocytes ลดลงต่ำสุดเท่ากับ 10% ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน และสุกร D0 มีจำนวน lymphocytes ลดลงต่ำสุดเท่ากับ 28% ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อ สุกกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain มีจำนวน lymphocytes เฉลี่ยเท่ากับ $61 \pm 4\%$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน และจำนวน lymphocytes ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $33 \pm 32.03\%$ – $57.5 \pm 3.5\%$ สุกกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain มีจำนวน lymphocytes เฉลี่ยเท่ากับ $60 \pm 2.45\%$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน จำนวน lymphocytes ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $53.25 \pm 7.14\%$ – $65.67 \pm 4.93\%$ (รูปภาพ 1ค) สุกร 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิต มีจำนวน lymphocytes เฉลี่ยเท่ากับ $61 \pm 1.73\%$ หลังฉีดวัคซีน 3 วัน จำนวน lymphocytes ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $53.33 \pm 8.74\%$ – $65.67 \pm 4.93\%$ ในทางตรงกันข้ามสุกรอีกหนึ่งตัว (V0) ที่เสียชีวิต มีจำนวน lymphocytes ลดลงต่ำสุดเท่ากับ 27% ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อพิษหัด

4. การตรวจหาแอนติเจนของ CSFV ในซีรัมสุกร

สุกรกลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบแอนติเจนของ CSFV ในซีรัม ทั้งก่อนฉีดสาร NS (ค่า OD เฉลี่ย = 0.0000 ± 0.0000) และหลังฉีดสาร NS โดยมีค่า OD เฉลี่ยสูงสุด = 0.0020 ± 0.0048 (< 0.300) ตลอดการทดลอง สุกกรกลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมก่อนฉีดเชื้อ CSFV (ค่า OD เฉลี่ย = 0.0000 ± 0.0000) แต่ตรวจพบแอนติเจนในซีรัมของสุกร D6 โดยมีค่า OD สูงสุดเท่ากับ 2.6520 (≥ 0.300) ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน และตรวจพบแอนติเจนในซีรัมของสุกร D0 โดยมีค่า OD สูงสุดเท่ากับ 2.1030 ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อ สุกกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain ตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมหลังฉีดวัคซีน 3 วัน (ค่า OD เฉลี่ย = 0.0080 ± 0.0068) และตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมหลังฉีดเชื้อพิษหัด (ค่า OD เฉลี่ยสูงสุด = 0.0120 ± 0.0106) สุกกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain ตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมหลังฉีดวัคซีน 3 วัน (ค่า OD เฉลี่ย = 0.0264 ± 0.0395) โดยสุกร 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิตหลังได้รับเชื้อพิษหัด ตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมหลังฉีดเชื้อพิษหัด (ค่า OD เฉลี่ยสูงสุด = 0.0365 ± 0.0437)

ในทางตรงกันข้ามสุกรอีกหนึ่งตัว (V0) ที่เสียชีวิตตรวจพบแอนติเจนหลังฉีดเชื้อพิษหัดโดยมีค่า OD เท่ากับ 2.6100, 2.7100 และ 2.7800 ในวันที่ 5, 7 และ 14 หลังฉีดเชื้อพิษหัดตามลำดับ

5. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ในซีรัมสุกร

สุกรกลุ่มควบคุมลบตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัม ทั้งก่อนฉีดสาร NS (ค่า OD เฉลี่ย = $10.60 \pm 2.12\%$) และหลังฉีดสาร NS โดยมีค่า OD เฉลี่ยสูงสุด = $15.05 \pm 6.07\%$ ($\leq 30\%$) ตลอดการทดลอง สุกรกลุ่มควบคุมบวกตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัมก่อนฉีดเชื้อ CSFV (ค่า OD เฉลี่ย = $12.18 \pm 0.91\%$) และตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัมของสุกร D6 ซึ่งมีค่า OD สูงสุด = 16.08% ($\leq 30\%$) ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเชน แต่ตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมของสุกร D0 ในระดับที่ต่ำ โดยมีค่า OD = 49.64% ($\geq 40\%$) ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อ สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain ตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัม หลังฉีดวัคซีน 3 วัน (ค่า OD เฉลี่ย = $18.62 \pm 1.17\%$) แต่ตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมโดยมีค่า OD เฉลี่ยเท่ากับ $55.24 \pm 10.08\%$ และ $74.67 \pm 7.19\%$ ในวันที่ 14 และ 21 หลังฉีดเชื้อพิษหัดตามลำดับ สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C strain ตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัม หลังฉีดวัคซีน 3 วัน (ค่า OD เฉลี่ย = $21.01 \pm 1.28\%$) โดยสุกรจำนวน 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิตหลังได้รับเชื้อพิษหัด ตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมโดยมีค่า OD เฉลี่ยเท่ากับ $58.95 \pm 11.70\%$ และ $83.97 \pm 5.78\%$ ในวันที่ 14 และ 21 หลังฉีดเชื้อพิษหัดตามลำดับ ในขณะที่สุกรอีกหนึ่งตัว (V0) ที่เสียชีวิต ตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหลังฉีดพิษหัดในระดับที่ต่ำ โดยมีค่า OD เท่ากับ 49.83% ($\geq 40\%$) ในวันที่ 14 หลังฉีดพิษหัด

6. การตรวจวัดการแสดงออกของยีน IFN- γ และ TGF- β

การแสดงออกของยีน IFN- γ จากเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมลบไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดสาร NS โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าเท่า (fold-change) เฉลี่ยเท่ากับ 0.99 ± 0.0738 และ 0.95 ± 0.0040 ในวันที่ 1 และ 3 หลังฉีดสาร NS ตามลำดับ และการแสดงออกของยีน IFN- γ จากสุกรกลุ่มควบคุมบวกไม่เพิ่มขึ้นหลังการฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเชน โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 1.21 ± 0.1042 และ 1.65 ± 0.2412 ในวันที่ 1 และ 3 หลังการฉีดเชื้อ ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของยีน IFN- γ จากสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain เพิ่มขึ้นหลังฉีดเชื้อพิษหัด CSFV สายพันธุ์บางเชน โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 2.56 ± 0.2910 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด ในทำนองเดียวกัน การแสดงออกของยีน IFN- γ จากสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain เพิ่มขึ้นหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 1.93 ± 0.0743 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด (รูปภาพ 2 ก) โดยสุกร 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิตหลังได้รับเชื้อพิษหัด มีการแสดงออกของยีน IFN- γ เพิ่มขึ้นหลังฉีดเชื้อพิษหัด โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 2.16 ± 0.1224 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด ในทางตรงกันข้าม สุกรอีกหนึ่งตัว (V0) ที่เสียชีวิต การแสดงออกของยีน IFN- γ ไม่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า fold-change เท่ากับ 1.07 และ 1.18 ในวันที่ 1 และ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหัด

การแสดงออกของยีน TGF- β จากเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมลบไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังฉีดสาร NS โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าเท่า (fold-change) เฉลี่ยเท่ากับ 1.05 ± 0.0131 และ 1.09 ± 0.0117 ในวันที่ 1 และ 3 หลังฉีดสาร NS ตามลำดับ ในขณะที่การแสดงออกของยีน TGF- β จากสุกรกลุ่มควบคุมบวก

ลดลงหลังการฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 3.06 ± 1.9711 และ 2.90 ± 0.7547 ในวันที่ 1 และ 3 หลังฉีดเชื้อ ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของยีน TGF- β จากสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน lapinised C-strain ไม่ลดลงหลังฉีดเชื้อพิษหับ โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 1.05 ± 0.0408 และ 1.03 ± 0.0407 ในวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ ในทำนองเดียวกันการแสดงออกของยีน TGF- β จากสุกรกลุ่มฉีด tissue cultured C-strain ไม่ลดลงหลังฉีดเชื้อพิษหับ CSFV โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 1.04 ± 0.0695 และ 1.36 ± 0.6584 ในวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ (รูปภาพ 2ข) โดยสุกร 3 ใน 4 ตัว (N5, N6 และ V1) ที่ไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิต การแสดงออกของยีน TGF- β ไม่ลดลงหลังฉีดเชื้อพิษหับ โดยมีค่า fold-change เฉลี่ยเท่ากับ 1.07 ± 0.0361 – 1.03 ± 0.0208 ในวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ ในทางตรงกันข้าม สุกรอีกหนึ่งตัว (V0) มีการแสดงออกของยีน TGF- β ลดลง โดยมีค่า fold-change เท่ากับ 2.35 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ

วิจารณ์

รายงานนี้เป็นรายงานแรกระบุว่า วัคซีนเชื้อเป็น (modified live vaccine) สายพันธุ์ซินนิดีเฉพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อ (tissue cultures C-strain) ให้ความคุ้มครองต่อไวรัสโรคหัดสุกรชนิดรุนแรงสายพันธุ์บางเขน (highly virulent classical swine fever virus, CSFV, Bangkhen strain) ได้บางส่วน (partial protection) ในขณะที่วัคซีนสายพันธุ์ซินนิดีเฉพาะเลี้ยงในกระต่ายให้ความคุ้มครองได้สมบูรณ์ (complete protection) หลังให้วัคซีน 3 วัน ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในสุกรสามสายพันธุ์ ลาร์จไวท์ (Large White) แลนด์เรซ (Landrace) และดัวร์คเจอร์ซี่ (Durox Jerzy) อายุ 11 สัปดาห์

ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน เป็นสาเหตุทำให้สุกรกลุ่มควบคุมบวกซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนทั้งสองตัวมีไข้สูงต่อเนื่อง (39.8 – 40.8 °ซ.) ตั้งแต่วันที่ 2–12 และ 2–14 หลังได้รับเชื้อ โดยสุกรแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายในวันที่ 13 และ 18 ตามลำดับ สุกรแสดงอาการเด่นชัดของโรคหัดสุกรชนิดเฉียบพลัน (typical characteristic of acute CSF) ได้แก่ การมีไข้สูงต่อเนื่อง ร่วมกับอาการ จาม ชีมี เบื่ออาหาร ตาอักเสบและมีไข้ดำเป็นหนอง ท้องผูกตามด้วยอาการท้องเสีย เดินเซื่องซึม สั่น ชัก และมีรอยจ้ำตามตามแผ่นหลังและด้านหลังใบหู และตาย อาการทางคลินิกของสุกรที่ได้รับเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน สอดคล้องกับอาการทางคลินิกของสุกรที่ได้รับเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Brescia ที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์รุนแรงมากและเป็นสาเหตุทำให้สุกรเริ่มแสดงอาการป่วยและมีไข้สูง (40.5 °ซ.) ตั้งแต่วันที่ 2 และมีไข้สูงต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยสุกรมีอาการซึม เบื่ออาหาร เดินเซื่องซึม และมีรอยจ้ำบนผิวหนัง (skin hyperemia) ถ่ายเป็นเลือด และมีไข้ดำเป็นหนอง (Donahue *et al.*, 2012) และสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า โรคหัดสุกรชนิดเฉียบพลัน (acute forms) ร่วมกับไวรัสโรคหัดสุกรสายพันธุ์รุนแรงมาก (highly virulent CSFV strains) ทำให้เกิดอาการมีไข้สูง ชีมี มีเลือดออก (hyperemia) ตาอักเสบและมีไข้ดำเป็นหนอง มีอาการทางประสาทรุนแรง และอัตราการตายถึง 100% ในสุกรอายุน้อย (Moenig *et al.*, 2003) จากการประเมินตามหลัก clinical scoring system (Mittelholzer *et al.*, 2000) แสดงว่าเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขนเป็นเชื้อก่อโรคหัดสุกรสายพันธุ์รุนแรงมาก (highly virulent CSFV strain) นอกจากนี้ผลการผ่าซากพบว่า มีการอักเสบของต่อมทอนซิล จุดเนื้อตายที่ม้าม เลือดออกเป็นจุดที่ไต และต่อมน้ำเหลืองแดงอักเสบ ซึ่งเป็นอาการเด่นชัดของโรคหัดสุกร

(typical pathological lesions of CSFV) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าผลการผ่าซากสุกรที่ติดเชื้อรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงมากสายพันธุ์ CSFV-Romania และ CSFV-Israel ก็พบว่า มีเลือดออก (hemorrhages) ที่ขอบของม้าม มีจุดเลือดออกที่ไต ร่วมกับการบวมและจุดเลือดออกที่ต่อมน้ำเหลือง (Lohse *et al.*, 2012)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่า สุกรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนทั้งสองตัวและสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 1 ใน 4 ตัว ซึ่งแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อไวรัส CSFV สายพันธุ์บางเขน มีจำนวน WBC ($9,100-9,800 \text{ cells/mm}^3$) และจำนวน lymphocytes (10-28%) ซึ่งลดต่ำสุดในวันที่ 7 และ 14 หลังได้รับเชื้อไวรัส แสดงว่าเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขนมีความรุนแรงมากทำให้มีการทำลาย WBC และ lymphocytes ในสุกรที่ติดเชื้อ มีผลทำให้สุกรมีอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า การลดลงของจำนวน lymphocytes ในสุกรติดเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Magarita strain เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Renson *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010) และได้มีการทดลองหาสาเหตุที่การติดเชื้อ CSFV ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวในสุกรลดลงอย่างรวดเร็วและพบว่า สาเหตุสำคัญคือกระบวนการทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ทั้ง T-lymphocyte และ B-lymphocyte โดยจำนวนของ WBC ต่ำสุด ในวันที่ 7 หลังติดเชื้อไวรัส (Summerfield *et al.*, 2001) การลดลงของจำนวน lymphocytes อย่างรวดเร็วเป็นสาเหตุทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบปรับตัว (adaptive immunity) ทำงานบกพร่องส่งผลทำให้สุกรแสดงอาการของโรคคหิวต้งสุกรรุนแรงมากขึ้น (Renson *et al.*, 2010; Summerfield *et al.*, 2006; Ganges *et al.*, 2005) และสุกรที่ติดเชื้อชนิดรุนแรงและแสดงอาการป่วยจะมีสภาวะ leucopenia คือมีจำนวน WBC ลดลงอย่างรวดเร็ว คงเหลือ $\leq 9,000 \text{ cells/mm}^3$ (van Oirschot, 2003) ในทางตรงกันข้ามสุกรที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain ทั้ง 4 ตัว และสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain 3 ใน 4 ตัว เป็นเวลา 3 วัน ก่อนฉีดเชื้อพิษทัณฑ์ด้วยเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเขน ไม่มีการลดลงของจำนวน WBC และ lymphocytes และสุกรไม่แสดงอาการป่วยหรือตายหลังได้รับเชื้อ แสดงว่าวัคซีน C-strain สามารถป้องกันการเกิด leucopenia และอาการป่วยในสุกรที่ได้รับเชื้อพิษทัณฑ์ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเขน สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า การฉีดวัคซีนเชื้อเป็น (Riemsers® C-strain CSFV vaccine) ให้สุกร 5 วัน ก่อนการให้เชื้อพิษทัณฑ์ทั้ง genotype 2.1 (UK2000/7.1) และ genotype 3 (CBR/93) สามารถป้องกันอาการป่วย และสุกรยังคงมีจำนวนเม็ดเลือดขาวและ platelet ในระดับปกติ การให้เชื้อพิษทัณฑ์ genotype 3 (CBR/93) แก่สุกรหลังได้รับวัคซีน 3 วัน ก็พบว่า สุกรทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยหรือมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง (Graham *et al.*, 2012a) อย่างไรก็ตามวัคซีน lapinised C-strain สามารถป้องกันได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection) โดยสามารถป้องกันสุกรทั้ง 4 ตัว จากอาการป่วยและการลดลงของเม็ดเลือดขาว ในขณะที่วัคซีน tissue cultured C-strain สามารถป้องกันได้เพียงบางส่วน (partial protection) โดยสามารถป้องกันสุกรเพียง 3 ใน 4 ตัว จากอาการป่วยและการลดจำนวนของเม็ดเลือดขาว ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า วัคซีน C-strain สามารถกระตุ้น complete protection ต่อเชื้อ CSFV genogroups ภายใน 1 สัปดาห์ หลังได้รับวัคซีน (Suradhat *et al.*, 2007; van Oirschot, 2003) แต่การทดลองครั้งนี้เป็นการให้เชื้อพิษทัณฑ์หลังให้วัคซีนแก่สุกร 3 วัน เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันโรคที่เร็ว (rapid protection) ซึ่งสุกรบางตัวอาจมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่ทันก่อนได้รับเชื้อพิษทัณฑ์

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยตรวจพบแอนติเจนของ CSFV โดยใช้ชุดตรวจ CSFV Ag ELISA ในซีรัมของสุกรกลุ่มควบคุมทั้งสองตัว และในซีรัมของสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 1 ใน 4 ตัว ซึ่งแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเขน โดยตรวจพบแอนติเจนในซีรัมในวันที่ 5, 7 และ/หรือ 14 หลังฉีดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า สามารถตรวจพบ viral RNA ในซีรัมสุกรและ nasal swabs ในสุกรที่ติดเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Cat01 และสายพันธุ์ Margarita ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดเชื้อ (Tarradas *et al.*, 2014) ในทางตรงกันข้ามสุกรที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain ทั้ง 4 ตัว และสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain 3 ใน 4 ตัว เป็นเวลา 3 วัน แล้วฉีดเชื้อพิษทับด้วยเชื้อ CSFV ที่รุนแรงสายพันธุ์บางเขน ตรวจไม่พบแอนติเจนในซีรัมหลังได้รับเชื้อพิษทับและไม่แสดงอาการป่วยหรือตาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า ตรวจไม่พบ viral RNA ในเลือดของสุกรที่ฉีดวัคซีน C-strain 5 วัน แล้วให้เชื้อพิษทับด้วยไวรัส genotype 2.1 (UK2000/7.1) และสุกรไม่แสดงอาการป่วย ตรงกันข้ามสุกรกลุ่มควบคุมบวซึ่งแสดงอาการป่วยรุนแรงและมี viraemia ในระดับสูงหลังได้รับเชื้อ CSFV (Graham *et al.*, 2010) ซึ่งต่อมามีรายงานที่ระบุว่าตรวจพบ CSFV RNA ในเลือดสุกรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้วัคซีน ทั้งในกลุ่มที่ให้เชื้อ genotype 2.1 (UK2000/7.1) และกลุ่มที่ให้เชื้อ genotype 3.3 (CBR/93) ในทางตรงกันข้าม สุกรที่ได้รับวัคซีน C-strain 5 วัน แล้วให้เชื้อพิษทับ ซึ่งไม่แสดงอาการป่วย ตรวจไม่พบ viral RNA ทั้งในเลือดและสิ่งคัดหลั่งทางจมูก (nasal secretion) อย่างไรก็ตามมีการตรวจพบ CSFV RNA ในระดับที่ต่ำทั้งในเลือดและ nasal swabs ในสุกรที่ได้รับวัคซีน C-strain 3 วัน แล้วให้เชื้อ genotype 2.1 (UK2000/7.1) ในขณะที่กลุ่มที่ให้เชื้อ genotype 3.3 (CBR/93) ตรวจไม่พบ viral RNA ใน nasal swabs ของสุกรทุกตัว แต่ตรวจพบ viral RNA ในเลือดของสุกร 1 ตัว (Graham *et al.*, 2012a)

ในการศึกษาครั้งนี้ จากการตรวจแอนติบอดีต่อ CSFV โดยใช้ชุดตรวจ CSFV Ab ELISA พบว่าภายใน 1 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อ CSFV ไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ CSFV ในสุกรกลุ่มควบคุมบวและสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue culture C-strain จำนวน 1 ตัว ที่แสดงอาการป่วย แต่เริ่มตรวจพบในวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ CSFV ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า ตรวจไม่พบทั้ง E2-specific antibodies โดยวิธี ELISA และ neutralizing antibodies โดยวิธี neutralization peroxidase-linked assay (NPLA) ในสุกรก่อนวันที่ 13 หลังฉีดเชื้อไวรัส CSFV สายพันธุ์ Cat01 แต่สามารถตรวจพบ E2-specific antibodies ในสุกรที่ติดเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Cat01 ทุกตัว ตั้งแต่วันที่ 13-17 หลังฉีดเชื้อ อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบ E2-specific antibodies ในสุกรที่ตายหรือถูกฆ่าให้ตายอย่างสงบประมาณวันที่ 13 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Margarita โดยในวันที่ตายก็ตรวจไม่พบแอนติบอดี ในขณะที่เดียวกันตรวจพบ neutralizing antibodies ในสุกร 2 ตัว ในวันที่ 13 และในสุกรทุกตัว ในวันที่ 17 หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Cat01 (Tarradas *et al.*, 2014) ผู้วิจัยยังพบว่า สุกรที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain ทั้ง 4 ตัว และสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain 3 ใน 4 ตัว ตรวจพบแอนติบอดีในวันที่ 14 และ 21 วัน หลังฉีดเชื้อพิษทับ CSFV สายพันธุ์บางเขน โดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิต แสดงว่าสุกรที่ได้รับวัคซีน C-strain มาก่อน 3 วัน แล้วให้เชื้อพิษทับ CSFV ที่รุนแรงมากสายพันธุ์บางเขน สามารถกระตุ้นแอนติบอดีในระดับที่สูงพอที่จะป้องกันไม่ให้สุกรแสดงอาการป่วยหรือตายหลังได้รับเชื้อพิษทับ และผลการผ่าซากก็ตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ อย่างไรก็ตาม มีสุกรจำนวน 1 ตัว ที่ฉีดวัคซีน tissue cultured C-strain สามารถกระตุ้นแอนติบอดีในระดับที่ต่ำ (OD = 49.83%)

แสดงอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อพิษหับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า สุกรที่ได้รับ DNA วัคซีน นาน 45 วัน แล้วฉีดเชื้อพิษหับด้วยเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Margarita ในปริมาณ 10^5 TCID₅₀ เริ่มตรวจพบ E2 specific neutralizing antibodies ในวันที่ 7 และสูงสุดในวันที่ 17 หลังฉีดเชื้อพิษหับ โดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยและผลการผ่าซากตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (pathological change) ใดๆก็ตาม สุกรจำนวน 1 ตัว ซึ่งมีไข้ขึ้นๆ ลงๆ มี neutralizing antibodies ในระดับที่ต่ำ โดยมีระดับแอนติบอดีสูงสุดเท่ากับ 1:80 ในวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อพิษหับ (Tarradas *et al.*, 2010) มีรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า neutralizing antibodies ชัดขวางการแพร่กระจาย (dissemination) และการขับออก (shedding) ของเชื้อพิษหับ (Blome *et al.*, 2014)

IFN- γ เป็นตัวชี้วัดที่ดีของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ โดยมีระดับแอนติบอดีส่งเสริมประสิทธิภาพของ IFN- γ (Crawley *et al.*, 2003) วัคซีน CSFV สายพันธุ์ C-strain ป้องกันโรคหิวาต์สุกรในสุกรโดยการสร้าง IFN- γ จากเซลล์ PBMC เพื่อต้านเชื้อ CSFV ก่อนระดับ neutralizing antibody เกิดขึ้น แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคหิวาต์สุกร (Suradhat *et al.*, 2001) มีรายงานระบุว่า เซลล์ CD4+ lymphocytes สร้าง IFN- γ ต้านเชื้อ CSFV ในสุกร (Tarradas *et al.*, 2010) การเพิ่มขึ้นของ IFN- γ อย่างรวดเร็วทำให้ป้องกันโรคหิวาต์สุกรเร็วขึ้น (Graham *et al.*, 2012a) การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า IFN- γ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ CSFV (Graham *et al.*, 2012b) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่าสุกรกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีนทั้งสองตัว และสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 1 ใน 4 ตัว ซึ่งแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อไวรัส CSFV ไม่มีการเพิ่มขึ้นของยีน IFN- γ ในทางตรงกันข้ามสุกรที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain 3 วัน แล้วให้เชื้อพิษหับ CSFV ที่รุนแรงมากสายพันธุ์บางเซน พบว่าสุกรทั้ง 4 ตัว มีการเพิ่มขึ้นของยีน IFN- γ โดยมีค่าเฉลี่ย fold change เท่ากับ 2.56 ± 0.2910 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ ในทำนองเดียวกันสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 3 ใน 4 ตัว ก็มีการเพิ่มขึ้นของยีน IFN- γ โดยมีค่าเฉลี่ย fold change เท่ากับ 2.16 ± 0.1224 ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อพิษหับ โดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยหรือตายหลังฉีดเชื้อพิษหับ แสดงว่าเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่รอดชีวิตสร้าง IFN- γ ต้านเชื้อไวรัสในระยะแรกหลังได้รับวัคซีนซึ่งระดับแอนติบอดีในกระแสเลือดยังต่ำอยู่ และ IFN- γ ช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในระดับสูงขึ้นเพื่อต้านเชื้อไวรัส ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tarradas และคณะ (2014) ระบุว่า IFN- γ และระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อ CSFV

TGF- β ควบคุมการอักเสบและภูมิคุ้มกันตัวเองซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของ CD4+CD25+ regulatory T cell (Wahl *et al.*, 2004) การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่าสุกรกลุ่มควบคุมทั้งสองตัวที่ไม่ได้รับวัคซีนและสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain จำนวน 1 ใน 4 ตัว ซึ่งแสดงอาการป่วยรุนแรงและตายหลังได้รับเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์บางเซน มีการแสดงออกของยีน TGF- β ลดลง ในทางตรงกันข้ามสุกรที่ได้รับวัคซีน lapinised C-strain ทั้ง 4 ตัว และสุกรที่ได้รับวัคซีน tissue cultured C-strain 3 ใน 4 ตัว เป็นเวลา 3 วัน แล้วให้เชื้อพิษหับ CSFV ที่รุนแรงมากสายพันธุ์บางเซน พบว่าสุกรไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TGF- β โดยสุกรไม่แสดงอาการป่วยและรอดชีวิตหลังฉีดเชื้อพิษหับ แสดงให้เห็นว่าการลดลงของยีน TGF- β มีผลต่อการแสดงอาการป่วย การอักเสบของอวัยวะต่างๆ และการตายของสุกรหลังฉีดเชื้อพิษหับและมีผลต่อการ

เพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในซีรัมสุกร ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า ยีน TGF- β จากเซลล์ PBMC ของสุกรลดลงในวันที่ 1 หลังการติดเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงมาก (Li *et al.*, 2010) และมีการลดลงของ TGF- β expression ระดับปานกลาง ในวันที่ 1 และ 2 หลังได้รับเชื้อ CSFV สายพันธุ์ Brescia โดยการลดลงของ TGF- β กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อ CSFV (Borca *et al.*, 2008) TGF- β ลดลงในสุกรที่ติดเชื้อ CSFV ชนิดรุนแรงปานกลางสายพันธุ์ Bas-Rhin (genotype 2.3) และสามารถป้องกันได้โดยการให้วัคซีน (Renon *et al.*, 2013) และสอดคล้องกับรายงานของ Renon *et al.* (2014) ที่ระบุว่า ระดับของ TGF- β 1 ในสุกรกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับวัคซีน CP7_E2alf หลังได้รับเชื้อพิษหัด CSFV ชนิดรุนแรงมากสายพันธุ์ Koslov ลดลงในวันที่ 7 และ 10 ในทางตรงกันข้ามสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีน CP7_E2alf หลังได้รับเชื้อพิษหัดสามารถป้องกันการลดลงของ TGF- β 1

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณรายจ่ายประจำปี 2553-2554 ในการจัดซื้อวัสดุเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ ภก. ผศ. ดร. สรวง รุ่งประกายพรรณ และ ดร. วิทวัช วิริยะรัตน์ ที่ช่วยแนะนำการวิจัย ขอขอบคุณ รศ. ดร. เรณู เวชชรัตน์วิมล และ รศ. ดร. สุพล เลื่องยศลือชากุล ที่ได้แนะนำการเขียนผลงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานกลุ่มตรวจสอบ ชีววัตถุสำหรับสัตว์ กรมปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่และนักศึกษาภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือการดำเนินการวิจัยทั้งด้านเทคนิคและสิ่งอำนวยความสะดวก

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กองผลิตชีวภัณฑ์ (2530) มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของไวรัสวัคซีน เอกสารทางวิชาการ พิมพ์โดยศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์, 5-30.

จารุณี สาตรา และ สุนิจิต คงทน (2538) ความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดต่างๆ สัตวแพทย์สาร ปีที่ 46 เล่มที่ 4 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, 23-29.

ฉาย จอมเกาะ (2529) วัคซีนอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร รายงานทางวิชาการ 2526-2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์. เล่มที่ 2, 384-390.

สภาวิจัยแห่งชาติ (2554) จรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ภาษาต่างประเทศ

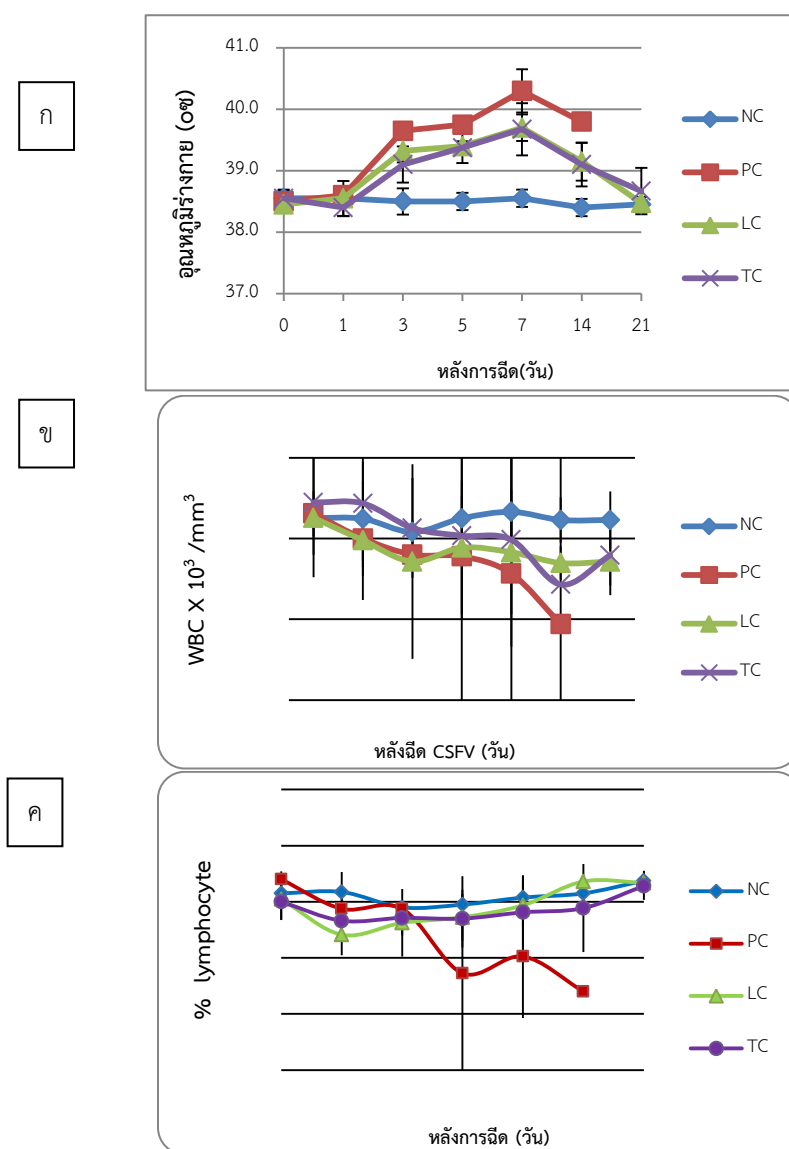
ASEAN (1998) Manual of ASEAN standards for Animal Vaccines. Livestock Publication Series No. 2A, 26-27.

Blome, S., Meindl-Böhmer, A., Loeffen, W., Thuer, B. and Moennig, V. (2006) Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. *Rev Sci Tech*, 25, 1025-1038.

- Blome, S., Gabriel, C., Schmeiser, S. and Meyer, D. (2014) Efficacy of marker vaccine candidate CP7_E2alf against challenge with classical swine fever virus isolates of different genotypes. *Vet Microbiol*, 169, 8-17.
- Borca, M.V., Gudmundsdottir, I., Fernandez-Sainz, I.J., Holinka, L.G. and Risatti, G.R. (2008) Patterns of cellular gene expression in swine macrophages infected with highly virulent classical swine fever virus strain Brescia. *Virus Res*, 138, 89-96.
- Crawley, A., Raymond, C. and Willkie, B.N. (2003) Control of immunological isotype production by porcine B-cell cultured with cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 141-154.
- Deng, M.C., Huang, C.C., Huang, T.S., Chang, C.Y., Lin, Y.J., Chien, M.S. and Jong, M.H. (2005) Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan. *Vet Microbiol*, 106, 187-193.
- Donahue, B.C., Petrowski, H.M., Melkonian, K., Ward, G.B., Mayr, G.A. and Metwally, S. (2012) Analysis of clinical samples for early detection of classical swine fever during infection with low, moderate, and highly virulent strains in relation to the onset of clinical signs. *J Virol Methods*, 179, 108-115.
- Durand, S.V., Hulst, M.M., de Wit, A.A., Mastebroek, L. and Loeffen, W.L. (2009) Activation and modulation of antiviral and apoptotic genes in pigs infected with classical swine fever viruses of high, moderate or low virulence. *Arch Virol*, 154, 1417-1431.
- Gladue, D.P., Zhu, J., Holinka, L.G., Fernandez-Sainz, I., Carrillo, C., Prarat, M.V., O'Donnell, V. and Borca, M.V. (2010) Patterns of gene expression in swine macrophages infected with classical swine fever virus detected by microarray. *Virus Res*, 151, 10-18.
- Graham S.P., Everett, H.E., Johns, H.L., Haines, F.J., La Rocca, S.A. and Khatri, M. (2010) Characterisation of virus-specific peripheral blood cell cytokine responses following vaccination or infection with classical swine fever viruses. *Vet Microbiol*, 142, 34-40.
- Graham, S.P., Everett, H.E., Haines, F.J., Johns, H.L., Sosan, O.A., Salguero, F.J., Clifford, D.J., Steinbach, F., Drew, T.W. and Crooke, H.R. (2012a) Challenge of pigs with classical swine fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity. *PLoS One*, 7, e29310.
- Graham, S.P., Haines, F.J., Johns, H.L., Sosan, O., La Rocca, S.A., Lamp, B., Rümenapf, T., Everett, H.E. and Crooke, H.R. (2012b) Characterization of vaccine-induced, broadly cross-reactive IFN- γ secreting T cell responses that correlate with rapid protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 30, 2742-2748.

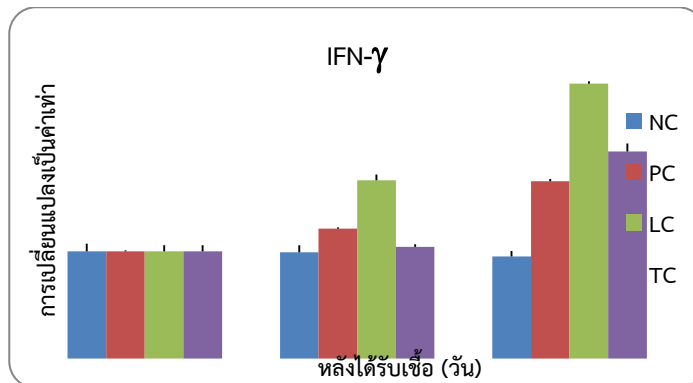
- Floegel-Niesmann, G., Bunzenthall, C., Fischer, S. and Moennig, V. (2003) Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50, 214-220.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (2011) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Kongsmak, S. (1980) Swine fever in Thailand. Proceedings of Symposium on Tropical Agriculture Research, 3-7 November 1979. Tsukuba, Japan, 163-166.
- Li, J., Yu, Y.J., Feng, L., Cai, X.B., Tang, H.B., Sun, S.K., Zhang, H.Y., Liang, J.J. and Luo, T.R. (2010) Global transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cell during classical swine fever virus infection. *Virus Res* 148, 60-70.
- Lohse, L., Nielsen, J. and Uttenthal, A. (2012) Early pathogenesis of classical swine fever virus (CSFV) strains in Danish pigs. *Vet Microbiol*, 159, 327-336.
- Mittelholzer, C., Moser, C., Tratschin, J. and Hofmann, M.A. (2000) Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet Microbiol*, 74 (4), 293-308.
- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G. and Greiser-Wilke, I. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever; a review of new knowledge. *Vet J*, 165, 11-20.
- OIE (2008) Classical Swine Fever (hog cholera). OIE Terrestrial Manual, Paris, France, Chapter 2.8.3, 1092-1106.
- Paton, D.J., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J.Y., Liou, P.P., Stadejek, T., Lowings, J.P., Björklund, H. and Belák, S., 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 73, 137-157.
- Renson, P., Blanchard, Y., Le Dimna, M., Felix, H., Cariolet, R., Jestin, A. and Le Potier, M.F. (2010) Acute induction of cell death-related IFN stimulated genes (ISG) differentiates highly from moderately virulent CSFV strains. *Vet Res*, 41, 7.
- Renson, P., Dimna, M.L., Karanflech, A., Cariolet, R. and Koenen, F. (2013) CP7_E2alf oral vaccination confers partial protection against early classical swine fever virus challenge and interferes with pathogeny-related cytokine responses. *Vet Res*, 44, 9
- Renson, P., Dimna, M.L., Gabriel, C., Levai, R., Blome, S., Kulcsar, G., Koenen, F. and Le Potier, M.F. (2014) Cytokine and immunoglobulin isotype profiles during CP7_E2alf vaccination against a challenge with the highly virulent Koslov strain of classical swine fever virus. *Res Vet Sci*, 96, 389-395.

- Summerfield, A., Alves, M., Ruggli, N., de Bruin, MG. and McCullough, K.C. (2006) High IFN- α responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26, 248-255.
- Summerfield, A., McNeilly, F., Walker, I., Allan, G., Knoetig, S.M. and McCullough, K.C. (2001a) Depletion of CD4+ and CD8 high+ T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. *Vet Immunol Immunopathol*, 78, 3-19.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. and Damrongwatanapokin, S. (2001) The correlation of virus-specific interferon- γ production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Microbiol*, 83, 177-189.
- Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S. and Thanawongnuwech, R. (2007) Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol*, 119, 1-9.
- Tarradas, J., Argilaguet, J.M., Rosell, R., Nofrarias, M., Crisci, E., Córdoba, L., Pérez-Martín, E., Díaz, I., Rodríguez, F., Domingo, M., Montoya, M. and Ganges, L. (2010) Interferon- γ induction correlates with protection by DNA vaccine expressing E2 glycoprotein against classical swine fever virus infection in domestic pigs. *Vet Microbiol*, 142, 51-58.
- Tarradas, J., de la Torre, M.E., Rosell, R., Perez, L.J., Pujols, J., Muñoz, M., Muñoz, I., Muñoz, S., Abad, X., Domingo, M., Fraile, L. and Ganges, L. (2014) The impact of CSFV on the immune response to control infection. *Virus Res*, 185, 82-91.
- van Oirschot, J.T. (2003) Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*, 96, 367-384.
- Wahl, S.M., Swisher J., McCartney-Francis N. and Chen W. (2004) TGF- β : the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol* 76, 15-24.

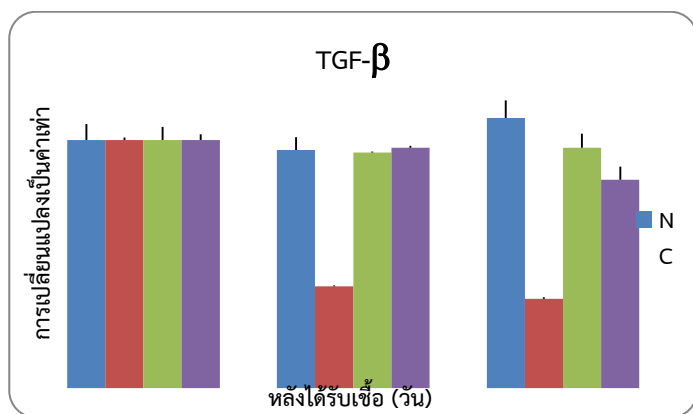


รูปภาพที่ 1 อาการทางคลินิก (ก) อุณหภูมิร่างกาย (ข) จำนวน WBC (ค) จำนวน lymphocytes ของสุกรกลุ่มควบคุมหลังฉีดสาร 0.85 % normal saline (NC), สุกรกลุ่มควบคุมบวก (PC) สุกรกลุ่มฉีดวัคซีน Lapinised C-strain (LC) และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน Tissue Cultured C-strain (TC) หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของสุกรแต่ละกลุ่ม $\pm$ SD

ก



ข



รูปภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน (ก) IFN- γ และ (ข) TGF- β จากเซลล์ PBMC ของสุกรกลุ่มควบคุมลบ หลังฉีดสาร 0.85 % normal saline (NC) สุกรกลุ่มควบคุมบวก (PC) สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนLapinized C-strain (LC) และสุกรกลุ่มฉีดวัคซีน Tissue Cultured C-strain (TC) หลังฉีดเชื้อ CSFV สายพันธุ์บางเขน เป็นเวลา 0, 1 และ 3 วัน ตรวจด้วยวิธี qRT-PCR กราฟแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของสุกรแต่ละกลุ่ม $\pm$ SD