

# การศึกษาปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 จากเซลล์น้ำล้างปอด ของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

เพิ่มศักดิ์ ชนะวัง<sup>1</sup> ชนิตา แย้มกลีบบัว<sup>1</sup> กฤษณ์ก้อง ศรียันต์<sup>1</sup>  
รุ่งโรจน์ ธานาวงษ์นุเวช<sup>2</sup> สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ<sup>2</sup> สุประดิษฐ์ หวังในธรรม<sup>2</sup> สันนิภา สุรทัตต์<sup>3\*</sup>

## Abstract

Permsak Thanawang<sup>1</sup> Chanida Yamkleebua<sup>1</sup> Kritkong Shiyun<sup>1</sup> Roongroje Thanawongnuwech<sup>2</sup>  
Sawang Kesdangsakonwut<sup>2</sup> Supradit Wangnaitham<sup>2</sup> Sanipa Suradhat<sup>3\*</sup>

## SEMIQUANTITATIVE ANALYSIS OF IL-10 PRODUCTION IN BRONCHO-ALVEOLAR LAVAGE LEUKOCYTES OF PRRSV INFECTED PIGS

Semi-quantitative analysis of the interleukin 10 (IL-10) in bronchoalveolar lavage cells (BALC), from pigs challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), was undertaken in this study. Twenty-one, three weeks old, crossbred pigs from a PRRSV-free commercial farm were separated into three groups, a control, non-infected group (3 pigs/group), and 2 groups (9 pigs/group), the first inoculated with a Thai-isolated European (O2SB3) strain and the second a Thai-isolated, North American (O1NP1) PRRSV strain. BALC were isolated from three infected pigs and one control on days 5, 9 and 15 post infection (DPI). The levels of IL-10 production in BALC were assessed by RT-multiplex PCR and immunofluorescent assay (IFA). In addition, the BALC were stained and subjected to a differential count. Both groups of PRRSV-infected pigs showed significant upregulation of the increase in IL-10 gene expression and IL-10 positive cells in the BALC after 9 DPI. Both PRRSV strains induced comparable levels of IL-10 production in the infected pigs. Furthermore, the enhanced IL-10 production was observed concurrently with an increased lymphocyte population in BALC

**Keywords :** PRRSV, interleukin 10, BALC, pig

<sup>1</sup>6<sup>th</sup> year student, academic year 2003, <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330

\*Corresponding author

<sup>1</sup>นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2545 <sup>2</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา <sup>3</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## บทคัดย่อ

เพิ่มศักดิ์ ธาระวัง<sup>1</sup> ชนิดา แยมกลีบบัว<sup>1</sup> กฤษณ์ก้อง ศรียันต์<sup>1</sup> รุ่งโรจน์ ชนาวงษ์นุเวช<sup>2</sup> สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ<sup>2</sup>  
สุประดิษฐ์ หวังในธรรม<sup>2</sup> สันนิภา สุรทัตต์<sup>3\*</sup>

## การศึกษาปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 จากเซลล์น้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

ศึกษาปริมาณการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 10 (IL-10) จากเซลล์น้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยคัดเลือกสุกรอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 21 ตัว จากฟาร์มที่ปลอดโรค พี อาร์ อาร์ เอส แบ่งสุกรเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อจำนวน 3 ตัว กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) จำนวน 9 ตัว และกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) จำนวน 9 ตัว ให้เชื้อโดยการหยอดจมูกและฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ อย่างละ 1 มล. ( $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> ต่อ มล.) แยกเลี้ยงในห้องป้องกันการติดเชื้อ สุ่มสุกรกลุ่มควบคุม 1 ตัว กลุ่มทดลอง 3 ตัวมาชันสูตรในวันที่ 5 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำล้างปอดนำไปนับแยกชนิดเซลล์ และศึกษาปริมาณการสร้าง IL-10 โดยวิธี RT-multiplex PCR และย้อมด้วยวิธี Immunofluorescence assay (IFA) พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกา มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IL-10 gene expression และเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ IL-10 ในวันที่ 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ อย่างไรก็ตามระดับของการสร้าง IL-10 ระหว่างสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) นอกจากนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของการสร้าง IL-10 สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์ลิมโฟไซตในเซลล์น้ำล้างปอดภายหลังได้รับเชื้อ

คำสำคัญ: เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส อินเตอร์ลิวคิน 10 เซลล์น้ำล้างปอด สุกร

### บทนำ

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร เป็นโรคสำคัญที่ทำให้เกิดความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรทั่วโลก โดยทำให้สุกรที่ป่วยแสดงอาการที่สำคัญ 2 กลุ่มอาการคือ กลุ่มอาการทางระบบสืบพันธุ์และกลุ่มอาการทางระบบหายใจ (White, 1991) นอกจากนี้ โรค พี อาร์ อาร์ เอส ยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิด โรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน (porcine respiratory disease complex; PRDC) หรือ โรค พี อาร์ ดี ซี ซึ่งจะมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนตามมา (reviewed by Goyal, 1993) ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรในประเทศเป็นอย่างมาก

โรค พี อาร์ อาร์ เอส ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2535 ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Wensvoort et al., 1991) และปี พ.ศ. 2539 พบครั้งแรกในประเทศไทย (Damrongwatanapokin

et al., 1996) เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (PRRSV) เป็น RNA virus จัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus ในไฟลัม Arteriviridae (De Vries et al., 1997) โดยแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์หลักๆ คือกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (EU) นอกจากนี้ยังสามารถพบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ในแต่ละกลุ่มของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา โดยสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ตามความรุนแรงของโรค (Nelson et al., 1993) เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา จะมีความรุนแรงและก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากกว่ากลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (Halbur et al., 1995) นอกจากนี้ภายในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันเองความรุนแรงในการก่อโรคนั้นแตกต่างกันอีกด้วย ในประเทศไทยพบว่าการติดเชื้อของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ จากวิธีจำแนกลักษณะของเชื้อตามความแตกต่างของผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส nested multiplex PCR (Thanawongnuwech et al., 2002)

เซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมาโครฟาจ โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจที่ปอด (Thanawongnuwech et al., 1997) โดยเมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการหยอดจมูก ไวรัสจะผ่านเข้าไปใน nasal epithelium, tonsil macrophage และ pulmonary macrophages หลังจากนั้นจะเกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสโลหิต ภายใน 12 ชม. หลังจากรับเชื้อ (Rossow et al., 1996) โดยสามารถพบเชื้อไวรัสได้จากปอด ต่อมน้ำเหลืองม้าม และต่อมทอนซิล ในวันที่ 7 หลังจากรับเชื้อไวรัส และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสปริมาณมากในต่อมน้ำเหลืองม้าม และทอนซิล ในวันที่ 28 หลังจากรับเชื้อ การติดเชื้อไวรัสทำให้เกิด interstitial pneumonia, myocarditis, encephalitis, vasculitis และ lymphadenitis ตามมา (Rossow et al., 1994) ปัญหาการติดเชื้อแทรกซ้อนของระบบทางเดินหายใจในสุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง โดยพบว่าการทำหน้าที่ของเซลล์มาโครฟาจในปอดถูกรบกวนจากการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งทำให้ความสามารถในการเก็บกินและทำลายจุลชีพน้อยลง (Thanawongnuwech et al., 1997, Thanawongnuwech et al., 1998) นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มาโครฟาจ (Thanawongnuwech et al., 2000) เป็นผลทำให้สุกรที่ติดเชื้อเกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย

โรค พี อาร์ อาร์ เอส เป็นโรคที่ถูกค้นพบในช่วงระยะเวลาไม่นานมานี้ ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส มักมุ่งเน้นการศึกษาในแง่ไวรัสวิทยา ระบาดวิทยา และการศึกษาทางชีววิทยา อย่างไรก็ตามมีข้อมูลงานวิจัยหลายชิ้นที่บ่งชี้ว่าเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส อาจมีความสามารถในการควบคุมหรือเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เป็นประโยชน์ต่อความอยู่รอดของเชื้อในตัวสุกรที่ได้รับเชื้อ เชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส สามารถคงอยู่ในร่างกายสุกรที่ติดเชื้อมากกว่า 12 สัปดาห์ แม้ว่าสัตว์จะไม่แสดงอาการป่วยแล้ว (Will et al., 1997) ภายหลังจากติดเชื้อมีการกระตุ้นการสร้าง non-neutralizing antibody อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการนำเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้การพัฒนาภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะทั้งชนิดเซลล์ และ neutralizing antibody ยังเป็นไปอย่างล่าช้ามาก (Meier et al., 2003) อีกทั้งยังมีการรายงานว่าภายในปอดของสุกรที่ติดเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส จะมีการสร้าง pro-inflammatory cytokine (IL-1, IFN- $\alpha$ , TNF) ที่จำเป็นต่อการต่อต้านการติดเชื้อในปอด และการ

พัฒนาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในระยะต่อมา ในปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ในระบบทางเดินหายใจ (Van Reeth and Nauwynck, 2000) จากรายงานเหล่านี้บ่งชี้ว่าเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส น่าจะมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในระดับอวัยวะที่มีการติดเชื้อ (local) และทั่วร่างกาย (systemic)

ในช่วงปีที่ผ่านมา มีรายงานว่า เชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่แยกได้จากเลือด (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) ในห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2003) โดยการศึกษานี้ได้ทำการศึกษากการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 และ IL-10 ในเวลาเดียวกัน และพบว่าเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส (virulent strain) ทั้งชนิดเชื้อเป็น และเชื้อตาย สามารถกระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 อย่างมีนัยสำคัญ ภายใน 24 ชม. หลังการ expose ต่อเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่สร้าง IL-2 และ IL-4 ซึ่งในระยะต่อมาได้มียืนยันผลของไวรัสต่อการสร้าง IL-10 ของ PBMC ในที่ติดเชื้อตัวสุกร (in vivo, systemic effect) ไว้แล้วอีกด้วย (Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) อีกทั้งยังเคยมีรายงานว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 เพิ่มขึ้น ในเซลล์มาโครฟาจอย่างมีนัยสำคัญ (Thanawongnuwech et al., 2001) การค้นพบเหล่านี้บ่งชี้ว่า เชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส อาจใช้การสร้าง IL-10 เป็นกลไกในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้เนื่องจาก IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่สร้างได้จากเซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมาโครฟาจและลิมโฟไซต์ มีหน้าที่กดการสร้าง proinflammatory cytokine ซึ่งมีผลในการลดการอักเสบและกดการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมาโครฟาจและลิมโฟไซต์ ในปัจจุบันพบว่า IL-10 เป็นไซโตไคน์สำคัญที่มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบ และยังพบว่าเชื้อโรคหลายชนิดสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในร่างกายสัตว์ที่ติดเชื้อ รวมทั้งอาจพัฒนาขึ้นที่สร้าง IL-10 ด้วยตัวเองอีกด้วย (reviewed by Moore et al., 2001) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษา ผลของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตไคน์ในบริเวณอวัยวะเป้าหมาย โดยศึกษาการสร้าง IL-10 จากเซลล์ของน้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส โดยการ

ตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง IL-10 ด้วยวิธี reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction (RT-PCR) และจำนวนเซลล์ที่สร้าง IL-10 ด้วยวิธี immunofluorescent assay (IFA)

## วัสดุและวิธีการ

### สัตว์ทดลอง

นำลูกสุกรหย่านมอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 21 ตัว ที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อ ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (PRRS-seronegative) จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการเกิดโรค พี อาร์ อาร์ เอส (clinical sign) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปี ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) จำนวน 9 ตัว และกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) จำนวน 9 ตัว โดยที่สุกรในทุกกลุ่มได้รับการฉีดยาปฏิชีวนะ 2 วันแรกของการปรับสภาพก่อนการทดลอง จากนั้นทำการให้เชื้อแก่สุกรกลุ่มทดลองโดยการหยอดจมูกร่วมกับการฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ อย่างละ 1 มล. ( $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> ต่อมล.) ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากับสุกรกลุ่มทดลอง เลี้ยงสุกรทั้ง 3 กลุ่ม ไว้ในห้องที่ป้องกันการติดเชื้อ ภายในตึกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแยกเลี้ยงห้องละ 1 กลุ่ม และทำการสุ่มสุกรเพื่อชันสูตรในวันที่ 5, 9 และ 15 หลังได้รับเชื้อ (days post infection; DPI) ในแต่ละครั้งที่ทำการสุ่มชันสูตรจะมีสุกรในกลุ่มควบคุม 1 ตัว กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกากลุ่มละ 3 ตัว ทำการเก็บตัวอย่าง BALC เพื่อนำไปศึกษาโดยการนำไปนับแยกเซลล์และย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ นำตัวอย่างที่เหลือไปปั่นเซลล์ที่ 4,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 26°C นาน 2 นาที แล้วเท supernatant ด้านบนทิ้ง แล้วเติม RNA later® (Ambion®, USA) 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำการสกัดแยก RNA และ RT-multiplex PCR ต่อไป

### การนับแยกเซลล์

นำตัวอย่าง BALC ที่ผ่านการปั่นล้างที่ 3,000 รอบ/นาที 10 นาที 2 ครั้ง มา smear บนแผ่นสไลด์กระจกที่สะอาดและทำการย้อมด้วยสี Giemsa stain จำนวน 3 แผ่น

ต่อตัวอย่างแล้วทำการนับแยกชนิดของเซลล์โดยอาศัยลักษณะกายภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง หาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แต่ละชนิดที่พบในสุกรแต่ละตัว

### การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)

นำตัวอย่าง BALC ที่ผ่านการปั่นล้างแล้วมา smear บนแผ่นสไลด์กระจกที่สะอาดจำนวน 5 แผ่นต่อตัวอย่าง แล้วทำการ fix ด้วยสารละลาย methanol : acetone (1:4) นาน 5 นาที นำสไลด์แช่ในสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) นาน 5 นาที หยด monoclonal antibody (Mab) anti-swine IL-10 (Biosource, USA) ขนาดความเข้มข้น 1 : 200 ประมาณ 150 ไมโครลิตร ให้ท่วมในบริเวณวงกลมหลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ใส่ไว้ใน moisture chamber แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. ล้างสารละลาย PBS นาน 5 นาที หยด goat anti-mouse IgG FITC conjugate (SIGMA, USA) ขนาดความเข้มข้น 1 : 200 ประมาณ 150 ไมโครลิตร ใน moisture chamber แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. นำสไลด์แช่สารละลาย PBS ใน chamber ที่ห่อด้วย aluminum foil นาน 5 นาที ในแต่ละครั้งจะทำการย้อมแผ่นควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) 2 แผ่นที่ทำการย้อมเหมือนวิธีข้างต้น โดยแผ่นแรกไม่หยด Mab anti-swine IL-10 และแผ่นที่สองไม่หยด goat anti-mouse IgG FITC conjugate (SIGMA, USA) หลังจากนั้นหยด 50% glycerine บนสไลด์แล้วปิดด้วย cover glass slide นำไปดูภายใต้กล้อง fluorescent microscope และทำการนับแยกเซลล์ที่ให้ผลบวกและลบต่อการย้อมทั้งหมดประมาณ 50 เซลล์ และสังเกตลักษณะ morphology ของเซลล์ที่ให้ผลบวก ทำการบันทึกภาพตัวอย่างเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อม

### การสกัดแยก RNA และการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี RT-PCR

นำตัวอย่าง BALC ที่เก็บไว้ใน RNA later® ประมาณ  $2 \times 10^6$  เซลล์ มาสกัดแยก RNA โดยใช้ NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยที่ DNA ที่ปนเปื้อนจะถูกกำจัดออกโดยการใส่ DNase I จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปเข้าสู่กระบวนการ RT-MPCR ต่อไป การเพิ่มจำนวน cDNA ของยีนที่ต้องการศึกษาประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ reverse transcription (RT)

และ multiplex-PCR โดยใช้ protocol เดียวกันที่ได้เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Suradhat and Thanawongnuwech, 2003)

**การวิเคราะห์หาปริมาณ PCR product**

นำ agarose gel ที่ได้มาตรวจหา PCR product ภายใต UV illuminator และ ทำการบันทึกภาพโดย “Photo-print” photodocumentation system (Vilber Loumat, France) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR จากค่าความหนาของแถบ PCR product บน agarose gel โดยใช้ Scion Image software (Scion corporation) โดยระดับการแสดงผลออกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR จะถูกปรับให้มีค่าฐานเท่ากัน (normalize) กับ housekeeping gene (GAPDH) ค่าที่ได้จะคิดเป็นร้อยละของการแสดงผลออกของไซโตคาไนน์ คือ house-keeping gene

**การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS Version 6.12 เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มของระดับการแสดงผลออกของ IL-10 gene ผลการนับแยกเซลล์ โดยใช้ Tukey's Student Range (HSD) Test และผลการทำอิมมูโนโนไซโตเคมีทำการวิเคราะห์โดยใช้ Chi-Square ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$

**ผลการทดลอง**

ภายหลังจากให้เชื้อพบว่าสุกรกลุ่มที่ให้เชื้อแสดงอาการของโรค พี อาร์ อาร์ เอส โดยสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อ US strain มีอาการทางคลินิก และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่รุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อ EU strain โดยสามารถแยกเชื้อได้จากสุกรที่ให้เชื้อทุกตัว และทำการยืนยัน genotype ของเชื้อว่าตรงกับเชื้อที่ได้รับ และยืนยันว่าไม่เกิด cross contamination ของเชื้อทั้ง 2 genotype ขึ้นในระหว่างการทดลอง ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมไม่พบอาการ และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาใดๆ

ผลการนับแยกเซลล์ BALC (differential count) หลังจากได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์ยุโรป และอเมริกา ในวันที่ 5 หลังได้รับเชื้อพบว่าประชากรเม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่เป็นมาโครฟาจ แต่ในวันที่ 9 และ 15 หลังได้รับเชื้อ พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของประชากรลิมโฟไซต์เป็น

จำนวนมาก และมีการเปลี่ยนแปลงของประชากรนิวโทรฟิลเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 1A, 1B) ส่วนการนับแยกเซลล์ในสุกรกลุ่มควบคุม ในวันที่ 5 9 และ 15 หลังได้รับเชื่อนั้นพบว่าอยู่ในระดับคงที่ไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงโดยประชากรเม็ดเลือดขาวเรียงจากมากไปหาน้อยได้แก่ มาโครฟาจ ลิมโฟไซต์และนิวโทรฟิล ตามลำดับ (รูปที่ 1C)

ผลการศึกษาการแสดงผลออกของ IL-10 gene ในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี RT-multiplex PCR พบว่าในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์ยุโรป และ อเมริกา มีการแสดงผลออกของ IL-10 gene ในระดับที่สูงขึ้น ภายหลังจากได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และระดับการแสดงผลออกของ IL-10 gene ในสุกรที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันตลอด 3 ระยะเวลาที่ได้ทำการตรวจวัดและไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ส่วนสุกรในกลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงผลออกของ IL-10 gene ค่อนข้างน้อยและอยู่ในระดับต่ำตลอดการทดลอง (รูปที่ 2)

การศึกษาปริมาณของเซลล์จากน้ำล้างปอดสุกรที่ให้ผลบวกต่อ swine IL-10 โดยวิธี IFA พบว่าในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก (IL-10 producing cells) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันที่ 9 และ 15 หลังได้รับเชื้อ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของจำนวน IL-10 producing cells ในน้ำล้างปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนในสุกรกลุ่มควบคุมพบจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงน้อยทั้งที่ 9 และ 15 วัน หลังได้รับเชื้อ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่าลักษณะ morphology ของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ IL-10 โดยวิธี IFA คาดว่าน่าจะเป็นเซลล์ในกลุ่มลิมโฟไซต์ (รูปที่ 3)

**วิจารณ์**

หลังจากที่เคยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีผลเพิ่มการแสดงผลออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง IL-10 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม PBMC ที่แยกได้จากสุกรในห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงผลของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ใน BALC ที่ได้จากสุกรที่ติดเชื้อ โดยพบว่ามีเพิ่มขึ้นของการแสดงผลออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง IL-10 ในเซลล์จากน้ำล้างปอด ของสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์ยุโรป และอเมริกา ตั้งแต่วันที่ 9 หลังได้รับเชื้อ

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนนี้ที่พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ IL-10 gene ใน BALC ในลูกสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ผ่านทางรก (Johnsen et al., 2002) และการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene ใน BALC จากสุกรในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่วันที่ 10 หลังได้รับเชื้อ (Thanawongnuwech et al., 2003) อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ติดเชื้อกลับพบมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IL-10 gene ตั้งแต่วันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ (Suradhat and Thanawongnuwech, 2003) ซึ่งการที่พบการสร้าง IL-10 ใน PBMC ก่อนอาจเป็นผลเนื่องมาจากการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อในระยะทั่วร่างกาย (systemic infection) โดยมีรายงานว่าภายหลังจากที่ได้รับเชื้อแล้วจะเกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสโลหิตภายใน 12 ชั่วโมง (Rossow et al., 1996) หลังจากนั้นจึงตรวจพบการเพิ่มขึ้นของยีนที่ควบคุมการสร้าง IL-10 ใน BALC ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อของร่างกายในแบบเฉพาะที่ (localized infection) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวใน BALC ยังได้ยืนยันแนวคิดดังกล่าวอีกด้วย

การศึกษาจำนวนประชากรของ BALC โดยการนับแยกเซลล์สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้เป็นอย่างดี (Narita et al., 1993) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีแนวโน้มของจำนวนประชากรเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้น ในขณะที่จำนวนมาโครฟาจมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 9 และ 15 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งผลการนับแยกเซลล์ดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยมีรายงานพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรเม็ดเลือดขาวประเภทลิมโฟไซต์ และการลดลงของมาโครฟาจใน BALC ที่ได้จากสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Shibata et al., 1997) ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่ได้ทำการนับแยกเซลล์จาก BALC ทั้งหมดทุกเซลล์ (total count) อย่างไรก็ตามได้เคยมีการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่า BALC มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วง วันที่ 10-21 หลังได้รับเชื้อ โดยเกิดจากการเคลื่อนที่ของเซลล์ในกลุ่มลิมโฟไซต์เข้าสู่บริเวณปอด โดยที่ในช่วงเวลาดังกล่าวจำนวนประชากรของมาโครฟาจจะยังไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ (Samsom et al., 2000) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบประชากรมาโครฟาจมีแนวโน้มลดลงซึ่งอาจเนื่องมาจากในช่วงเวลาดังกล่าวมีประชากรลิมโฟไซต์เข้ามาเพิ่มใน BALC จำนวนมากทำให้ในการนับแยกเซลล์พบ

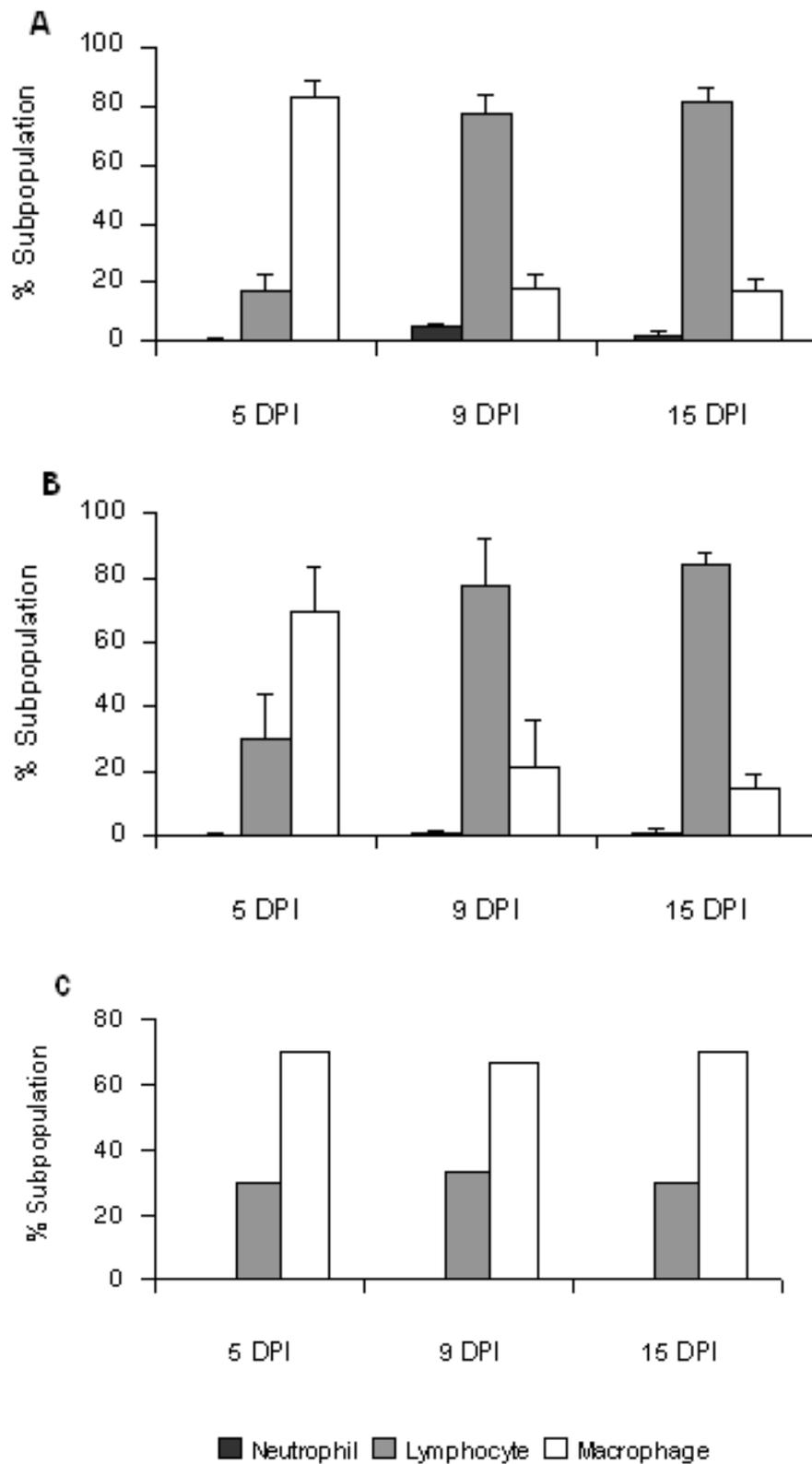
สัดส่วนประชากรมาโครฟาจลดลง (relatively decreased) ข้อมูลจากรายงานที่ผ่านมาซึ่งศึกษา phenotype ของเซลล์ที่เข้ามาใน BALC ภายหลังการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบว่าเซลล์ที่เข้ามาภายหลังการติดเชื้อ มักเป็นเซลล์ในกลุ่ม natural killer cells (NK cells) และ cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Samsom et al., 2000) ซึ่งอาจอธิบายได้จากกลไกการป้องกันการติดเชื้อโดยเมื่อร่างกายสุกรติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส NK cells และ CTL จะเข้ามายังบริเวณติดเชื้อมากขึ้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดขบวนการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ

การศึกษานี้ยังพบว่า IL-10 producing cells ใน BALC ของสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มากกว่าสุกรกลุ่มควบคุมทั้งในวันที่ 9 และ 15 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นการยืนยันการสร้าง IL-10 ในระดับโปรตีน ซึ่งเป็นการยืนยันผลจากการตรวจในระดับยีน (mRNA) ในช่วงเวลาเดียวกันอีกด้วย ประเด็นที่น่าสนใจจากการศึกษานี้คือผลการนับเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ IFA พบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เข้ามาใน BALC ไม่ได้ให้ผลบวกทุกเซลล์ และควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปว่า lymphocyte subpopulation ใดเป็นผู้สร้าง IL-10 ภายใน BALC จากรายงานที่ผ่านมา แม้ว่า เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป และ อเมริกา จะมีความแตกต่างกันในลักษณะของ antigen, genotype และความรุนแรงของโรค (Meng, 2000) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับการสร้าง IL-10 จาก BALC ระหว่างเชื้อไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งบ่งชี้ว่าความสามารถในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ถูกรักษา (conserve) ไว้ในระหว่างการวิวัฒนาการของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์

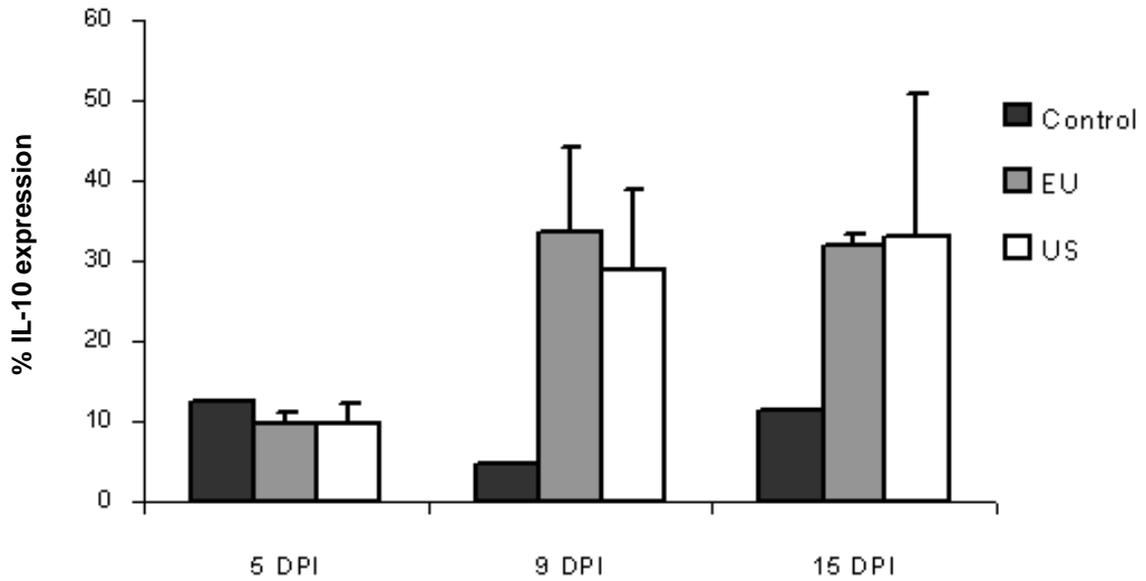
โดยสรุปจากการศึกษานี้พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จะพบการเพิ่มขึ้นของการสร้าง IL-10 ทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน ซึ่งเป็นการศึกษายืนยันการศึกษาดังกล่าวในทางห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2003) ในสัตว์ทดลอง (*in vitro* effect) ผลการศึกษานี้นี้อาจใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายเรื่องผลของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อภาวะการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกร และเป็นข้อมูลในการหาวิธีการที่จะควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

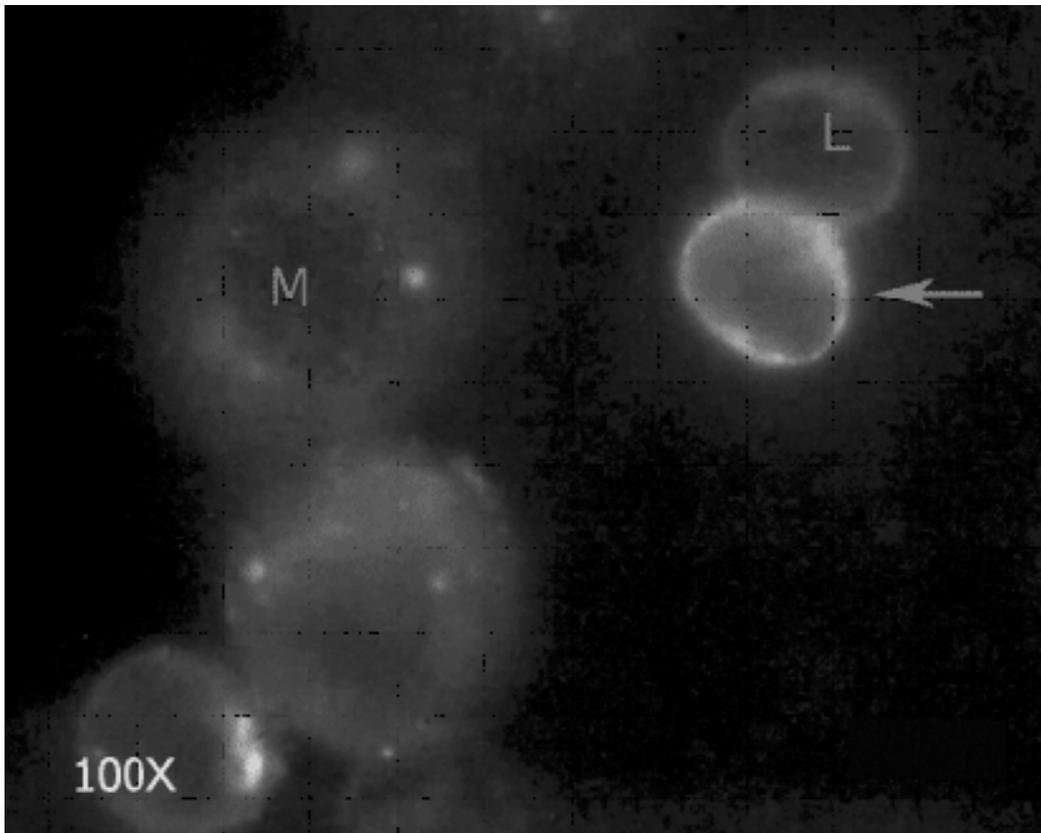
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ปี 2545-2546 และโครงการเสริมทักษะการวิจัย ปีการศึกษา 2546 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์



**รูปที่ 1** ปริมาณเฉลี่ยของ leukocyte subpopulation (mean  $\pm$  SD) ที่แยกได้จาก BALC ของสุกรที่ A) ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรป (EU) B) ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกา (US) C) ไม่ได้รับเชื้อในวันที่ 5 9 และ 15 หลังการได้รับเชื้อ (DPI)



**รูปที่ 2** ระดับเฉลี่ยของ % expression (mean  $\pm$  SD) ของการแสดงออกของ IL-10 gene จากเซลล์น้ำเลี้ยงปอดสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อและกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 3** เซลล์น้ำเลี้ยงปอด (BALC) จากสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV ย้อมด้วยวิธี Immunofluorescent assay (IFA) เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ anti-swine IL-10 มีลักษณะคล้ายลิมโฟไซต์ (ลูกศรชี้) เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ให้ผลลบ (L) และเซลล์มาโครฟาจ (M)

ตารางที่ 1 ปริมาณเฉลี่ย (mean ± SD) ของ IL-10 producing cells จากเซลล์น้ำเลี้ยงปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อและกลุ่มควบคุม

DPI	Group (Number of pig)	% IFA positive cells
5	ND*	ND*
9	Control (1)	18 <sup>a</sup>
	EU (3)	46.67±2.31 <sup>b</sup>
	US (3)	48.00±7.21 <sup>b</sup>
15	Control (1)	14 <sup>a</sup>
	EU (3)	54±0 <sup>b</sup>
	US (3)	49.33±2.31 <sup>b</sup>

\*ND = Not determined

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.น.สพ.ดร.เผด็จ  
 ธรรมรักษ์ ผู้ให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลทางด้าน  
 สถิติ น.สพ.รชฎ ดันติเลิศเจริญ สพ.ญ.นุสรรา พันธุ์ประภา  
 เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและหน่วยชันสูตรโรคสัตว์  
 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความ  
 ช่วยเหลือด้านเทคนิคปฏิบัติการ

**เอกสารอ้างอิง**

Benfield, D.A., Collin, J.E., Dee, S.A., Halbur, P.G., Joo, H.S., Larger, K.M., Mengeling, W.L., Murtaugh, M.P., Rossow, K.D., Stevenson, G.W. and Zimmerman, J.J. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In Disease of Swine. 8<sup>th</sup> ed. B.E. Straw, S.D. Allavie, W.L. Mengeling and D.J. Tayler (eds.) Ames, Iowa University Press. 201-232.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, J., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47: 19-30.

De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C. and Rottier, P.J.M. 1997. The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. Sem. Virol. 8: 33-47.

Done, S.H. and Paton, D.J. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. Vet. Rec. 136: 32-35.

Goyal, S.M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. J. Vet. Diag. Invest. 5: 656-664.

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.

Johnsen, C.K., Botner, A., Kamstrup, S., Lind, P. and Nielsen, J. 2002. Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells experimentally infected *in utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: association of sustained expression of INF-γ and IL-10 after viral clearance. Viral Immunol. 15: 549-556.

Lager, K.M. and Mengeling, W.L. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome: update and overview of the reproductive disease. Am. Assoc. Sw. Pract. 555-558.

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

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

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

- Narita, M., Kawashima, K., Matsuura, S., Uchimura, A. and Miura, Y. 1993. Pneumonia in pig inoculated with pseudorabies virus by means of a bronchoscope. *J. Comp. Pathol.* 109: 335-344.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E. and Benfield, D.A. 1993. Differentiation of United State and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3184-3189.
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A. and Collin, J.E. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10 - week- old pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 6: 3-12.
- Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher ñ Hennings, J. and Collin, J.E. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33: 551-556.
- Sansom, J.N., De Bruin, M.G.M., Voermans, J.J.M., Meulenberge, J.M., Pol, J.M.A. and Bianchi, A.T.J. 2000. Change of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pig infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cells. *J. Gen. Virol.* 81: 497-505.
- Shibata, I., Mori, M., Uruno, K., Samegai, Y. and Okada, M. 1997. In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophage and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 539-543.
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84: 453-459.
- Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2003. Upregulation of interleukin -10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84: 2755-2760.
- 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. Immunol. Immunopathol.* 59: 323-335.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1998. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). *Vet. Microbiol.* 63:177-187.
- Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G. and Thacker, E.L. 2000. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Anim. Health Res. Rev.* 1: 95-102.
- Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J. and Thacker, E.L. 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 115-127.
- Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A. and Damrongwatanapokin, S. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. In Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA. 410.
- Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J., Halbur, P.G. and Thacker, E.L. 2003. Interleukin (IL) -10, IL-12 and Interferon-Gamma (INF) level in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol.* 16: 355-365.
- Van Reeth, K. and Nauwynck, H. 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31: 187-213.
- Wensvoort, G., Terpstra, C. and Pol, J.M.A. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the Isolation of Lelystad virus. *Vet. Quar.* 13: 121-130.
- White, M. 1991. Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* 128: 574.
- Will, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, S. L., Swenson, M. J., McGinley, M. J., Hill, H. T., Platt, K. B., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E. A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55: 231-240.