

การกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

พรทิพย์ เล่าหิทธิกุล¹ ณัฐพล บุญอาภา¹ ยงยุทธ พงษ์ประภาชื่น¹
สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ² สุประดิษฐ์ หวังในธรรม² รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช^{2*}

Abstract

Porntip Laohasittikul¹ Nuttapon Boonarpa¹ Yongyut Pongprapachuen¹ Sawang Kesdangsakonwut²
Supradit Wangnaitham² Roongroje Thanawongnuwech^{2*}

ANTIGEN DISTRIBUTION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN THAI CROSSBRED PIGS USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Twenty, 3-week-old, crossbred pigs from a herd free from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) were inoculated intranasally and intramuscularly (1 ml each $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml) with Thai PRRSV isolates of the US genotype (01NP1) (n=9) or the EU genotype (02SB3) (n=8). Three pigs were used as negative controls. Three infected and one control group pig were euthanatized 5, 9 or 15 days postinoculation (DPI) to detect and to compare the location and the amount of PRRSV-antigen present. Immunohistochemical evaluation of formalin-fixed tissues revealed PRRSV-antigen in the pulmonary macrophages of the lungs (6/9, 8/8 and 0/3 of the 01NP1-infected, 02SB3-infected and control pigs, respectively). Macrophages staining for PRRSV-antigen in the spleen were seen in 1/9, 4/8 and 0/3 of the 01NP1-infected, 02SB3-infected and control groups. Other tissues and cells in which PRRSV-antigen was detected included follicular macrophages in the lymph nodes, macrophages in the liver, Peyer's patches, kidney, tonsil, turbinate bones, and heart. No PRRSV-antigen was detected in the brain of any PRRSV-inoculated pigs. Significantly, more PRRSV-antigen was detected in the spleen ($p<0.05$) of the 02SB3-infected pigs than in the spleen of 01NP1-infected pigs. The results suggested that PRRSV-antigen of the EU genotype was seen in a greater proportion of tissues despite showing less clinical signs. It could be that the EU genotype is well adapted to the pigs and may persist in the pigs for a longer period of time.

Keywords : antigen, immunohistochemistry, pig, PRRSV

¹Sixth year students, Academic year 2003, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

²Veterinary Pathology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand.

*Corresponding author

¹นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2546 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

พรทิพย์ เลาสลิตกุล¹ ณัฐพล บุญอาภา¹ ยงยุทธ พงษ์ประภาชน์¹ สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ² สุประดิษฐ์ หวังในธรรม²
รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช^{2*}

การกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

คัดเลือกสุกรหย่านม 3 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว จากฝูงที่ปลอดจากไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบ่งเป็น กลุ่มควบคุม จำนวน 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย สายพันธุ์อเมริกา (OINP1) จำนวน 9 ตัว หรือสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) จำนวน 8 ตัว โดยการหยอดจมูก และฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อย่างละ 1 มล. ($10^{2.5}$ TCID₅₀ ต่อ มล.) เพื่อตรวจหาและเปรียบเทียบตำแหน่งและปริมาณของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยสุ่มสุกรเพื่อทำการชันสูตรในวันที่ 5, 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ โดยมีจำนวนสุกรกลุ่มควบคุม 1 ตัว และสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส กลุ่มละ 3 ตัว จากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบสุกรที่มีแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในมาโครฟาจของปอด จำนวน 6/9 8/8 และ 0/3 ตัว ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา สายพันธุ์ยุโรปและกลุ่มควบคุม ตามลำดับ และพบสุกรที่มีแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในมาโครฟาจของม้าม จำนวน 1/9, 4/8 และ 0/3 ตัว ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา สายพันธุ์ยุโรป และกลุ่มควบคุมตามลำดับ อีกทั้งสามารถพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อและเซลล์อื่นๆ รวมทั้งมาโครฟาจของต่อมน้ำเหลือง ตับ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย ไต ทอนซิล กระดูกทอรัสเบินต์ และหัวใจ แต่ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสมองของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในม้ามของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการศึกษาี้แสดงว่า ไวรัสสายพันธุ์ยุโรปไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากเท่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกา แต่กลับพบการกระจายของไวรัสไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ มากกว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกา อาจเนื่องจากการปรับตัวให้เข้ากับสุกรได้ดีกว่าและซ่อนตัวอยู่ในสุกรได้นานกว่า

คำสำคัญ : แอนติเจน อิมมูโนฮิสโตเคมี สุกร ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

บทนำ

โรค พี อาร์ อาร์ เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก เนื่องจากทำให้เกิดความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์ในพ่อและแม่สุกรพันธุ์ และปัญหาในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะในสุกรและหากมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนอาจพัฒนาเป็นโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อน (โรค พี อาร์ ดี ซี; porcine respiratory disease complex; PRDC) ทำให้อัตราการตายของสุกรสูงขึ้น (รุ่งโรจน์, 2001)

ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยวมีเปลือกหุ้ม ในแฟมิลี Arteriviridae กลุ่ม Arterivirus (Rossow, 1998) สามารถแบ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์หลักๆ ได้

2 กลุ่ม ตามความแตกต่างทางพันธุกรรม (genotype) คือกลุ่มสายพันธุ์ประเทศสหรัฐอเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ประเทศยุโรป (EU) เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายทางเยื่อเมือกจากการหายใจ หรือการผสมพันธุ์ จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในมาโครฟาจและโมโนไซต์บริเวณนั้นๆ ต่อมาจะมีการแพร่กระจายไปยังมาโครฟาจและโมโนไซต์ ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะที่ปอด (Thanawongnuwech et al., 2000) เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่างชนิดสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคต่างกัน นอกจากปอดแล้ว แอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ยังมีรายงานการพบได้ในมาโครฟาจในอวัยวะอื่นๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ทอนซิล ม้าม หัวใจ ตับ ไต สมอง ต่อมไทมัส ต่อมหมวกไต กระดูก turbinates และ Peyer's patches (Halbur et al., 1995^a; 1996^a; Thanawongnuwech et al., 1997)

รวมทั้งอาจพบได้ใน dendritic cells ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissues) (Halbur et al., 1996^a; Rossow et al., 1996)

ประเทศไทยได้มีการรายงานของการพบแอนติบอดีต่อโรค พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และสามารถแยกพิสูจน์ เชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (Damrong-watanapokin et al., 1996^{a,b}) จากการศึกษาของ Thanawongnuwech และคณะ (2002) พบว่าในประเทศไทยมีการระบาดของ ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วย วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry staining) โดยสามารถระบุตำแหน่งของ immune complex แสดงแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Halbur et al., 1995^a) ในเนื้อเยื่อสุกรที่ติดเชื้อของทั้ง 2 สายพันธุ์ที่พบภายในประเทศ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส และโรคแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุม ป้องกัน รวมถึงการวินิจฉัยโรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกสุกรหย่านมอายุ 3 สัปดาห์จากฝูงสุกรที่ปลอดจากโรค พี อาร์ อาร์ เอส (แอนติบอดี seronegative ต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โรคพิษสุนัขบ้าเทียม และโรคอหิวาต์สุกร) จำนวน 20 ตัว ทำการแบ่งแบบสุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ) จำนวน 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) จำนวน 9 ตัว กลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) จำนวน 8 ตัว ลูกสุกรทุกตัวจะได้รับการฉีด Ceftiofur hydrochloride (Excenel®, Pharmacia, USA) ในขนาด 1.5 มก./กก. 2 วันแรกของการปรับสภาพก่อนทำการให้เชื้อ จากนั้นจะทำการให้เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แก่สุกรกลุ่มทดลอง โดยการหยอดจมูก และฉีดเข้ากล้ามเนื้ออย่างละ 1 มล. ($10^{2.5}$ TCID₅₀ ต่อมล.) และสุ่มสุกรเพื่อทำการชันสูตรในวันที่ 5, 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ โดยแต่ละวันที่ทำการชันสูตร มีจำนวนสุกรกลุ่มควบคุม 1 ตัว กลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป และกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาอย่างละ 3 ตัว เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปอด ตับ ลำไส้เล็ก ส่วนปลาย ไต ต่อมน้ำเหลืองข้างปอด ม้าม ทอนซิล กระดูก turbinates หัวใจ และสมอง ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน

เพื่อศึกษาการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา กลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปกับกลุ่มควบคุม

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

ใช้อิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธี peroxidase-anti-peroxidase (PAP) โดยจัดพาราฟินและเอาเนื้อออกจากเนื้อเยื่อ แล้วจึงทำการเปิดเผยแอนติเจน (antigen retrieval treatment) ด้วย 0.1% trypsin ที่ 37°C. 20 นาที แล้วล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการหยุดผลของปฏิกิริยาจาก non-specific endogenous peroxidase binding ด้วย 3% H₂O₂ ใน absolute methanol ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ระวังผลของปฏิกิริยาจาก การติดสีที่ไม่จำเพาะอื่นๆ โดยการใช้ 10% bovine serum albumin (BSA) บ่มที่ 37°C. นาน 60 นาที ทำปฏิกิริยาต่อกับ monoclonal antibody (SDOW 17; ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University, Ames, Iowa, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 1:1000 ที่ 4°C นาน 12-14 ชม. แล้วหยดสารละลาย PAP (MAX-PO, Nichirei, Japan) 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที ทำให้เกิดสีโดยจุ่มใน 0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, Sigma, USA) ล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับ ด้วยสี Meyer's hematoxylin นาน 35 วินาที ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสงสว่าง โดยนับที่กำลังขยาย 40x (HPF) ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกทั้งหมดในแต่ละชิ้นเนื้อ ซึ่งหมายถึง เซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (PRRSV-positive cells) การทดลองนี้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุกรกลุ่มควบคุมเป็นตัวควบคุมลบ ส่วนตัวควบคุมบวกใช้เนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองจากสุกรทดลองที่ทำการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในการทดลองครั้งก่อน (Thanawongnuwech et al., 1998)

การแบ่งระดับของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยใช้เกณฑ์ของ Halbur et al. (1996^a) โดยแบ่งเป็นระดับ 0-4 โดยเริ่มจากระดับ 0 คือ ไม่พบเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัส ระดับ 1 คือ มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 1-10 เซลล์ ระดับ 2 คือ มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 11-30 เซลล์ ระดับ 3 คือ มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก 31-100 เซลล์และระดับ 4 คือ มีจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกตั้งแต่ 100 เซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ระดับที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ nonparametric โดยใช้ Kruskal-Wallis test และ Willcoxon 2-sample test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มและวันที่ภายหลังได้รับเชื้อที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ผลการทดลอง

จำนวนสุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) และกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) แสดงดังในตารางที่ 1 การทดลองครั้งนี้มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 60, 100 และ 83 ตามลำดับ ในวันที่ 5, 9 และ 15 ของการชันสูตรตามลำดับ และความจำเพาะ (specificity) ของการทดลองมีค่าเท่ากับร้อยละ 100 การทดลองครั้งนี้ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรกลุ่มควบคุม

พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจภายในปอด แต่ไม่พบในเซลล์เยื่อของหลอดลมและหลอดลมฝอยของปอดสุกรทั้ง 2 กลุ่ม (ภาพที่ 1) สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 6 ตัว โดยพบในวันที่ 5, 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1, 3 และ 2 ตัวตามลำดับ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 8 ตัว ซึ่งพบได้ทุกวันที่ทำการศึกษา

ในตับของสุกรที่ได้รับเชื้อ พบแอนติเจนของไวรัส พีอาร์ อาร์ เอส ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมของ Kupffer cells โดยในสุกรที่ได้เชื้อสายพันธุ์ยุโรปจะพบการกระจายตัวของแอนติเจนมากกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา มีสุกรที่ให้ผลบวก 1 ตัว ในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 6 ตัว โดยพบในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 ตัว วันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว และวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 2 ตัว

บริเวณ Peyer's patches ของลำไส้เล็กส่วนปลายและบริเวณ medulla ของไตสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจ ในสุกรที่ได้รับเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ยุโรป โดยพบสุกรที่ให้ผลบวกในลำไส้เล็กส่วนปลายและไตจำนวน 2 และ 1 ตัวตามลำดับ ในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ

ในต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา พบสุกรที่ให้ผลบวก 2 ตัว ในวันที่ 5 และ 9 ภาย

หลังได้รับเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 3 ตัว ซึ่งพบในวันที่ 5 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 และ 2 ตัวตามลำดับ โดยแอนติเจนของไวรัสในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจเช่นเดียวกับอวัยวะอื่น

นอกจากนี้ในสุกรทั้ง 2 กลุ่มนั้นยังพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจ บริเวณ white pulp ของม้าม โดยสามารถพบในสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 4 ตัว ในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 ตัว และวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 3 ตัว ในขณะที่สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาพบสุกรที่ให้ผลบวกเพียง 1 ตัว ในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ

พบการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจ บริเวณรอบๆ ฟอลลิเคิลของทอนซิลสุกรทั้งสองกลุ่ม โดยสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา ให้ผลบวก 2 ตัวโดยพบได้ในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวก 3 ตัว โดยพบในวันที่ 5 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

ในสุกรทั้งสองกลุ่มที่ได้รับเชื้อให้ผลบวกทุกวันที่ทำการชันสูตร โดยพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจบริเวณชั้น submucosa ของกระดูก turbinates โดยพบจำนวนสุกรที่ให้ผลบวกจำนวน 1, 2 และ 1 ตัวในวันที่ 5, 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อตามลำดับ ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรที่ให้ผลบวกวันละ 1 ตัว

การพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในหัวใจนั้น สามารถพบได้ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจที่แทรกระหว่างกล้ามเนื้อหัวใจ โดยพบสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาให้ผลบวกทั้งสิ้น 4 ตัว ซึ่งพบในวันที่ 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ วันละ 2 ตัวตามลำดับ ส่วนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบสุกรเพียง 1 ตัวที่ให้ผลบวก ซึ่งพบในวันที่ 9 ภายหลังได้รับเชื้อ

จากการทดลองครั้งนี้ ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสมองของสุกรทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 1) แต่พบลักษณะ non-suppurative encephalitis ในสุกรที่ได้เชื้อสายพันธุ์อเมริกา

จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการกระจายตัวของแอนติเจนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในปอดสุกรทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้งสอง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (01NP1) และสายพันธุ์ยุโรป (02SB3) และร้อยละการให้ผลบวกต่อ การตรวจหาแอนติเจน

เนื้อเยื่อ	จำนวนสุกรที่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส / จำนวนสุกรที่ชันสูตรในแต่ละวัน									
	5 DPI		9 DPI		15 DPI		ทั้งหมด		ร้อยละ	
	US	EU	US	EU	US	EU	US	EU	US	EU
ปอด	1/3	2/2	3/3	3/3	2/3	3/3	6/9	8/8	66.66	100
ตับ	0/3	1/2	1/3	3/3	0/3	2/3	1/9	6/8	11.11	75
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	0/3	2/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/9	2/8	0	25
ไต	0/3	1/2	0/3	0/3	ND	0/3	ND	1/8	ND	12.5
ต่อมน้ำเหลืองข้างปอด	1/3	1/2	1/3	0/3	0/3	2/3	2/9	3/8	22.22	37.5
ม้าม	1/3	1/2	0/3	0/3	0/3	3/3	1/9	4/8	11.11	50
ทอนซิล	2/3	1/2	0/3	0/3	0/3	2/3	2/9	3/8	22.22	37.5
กระดูก turbinates	1/3	1/2	2/3	1/3	1/3	1/3	4/9	3/8	44.44	37.5
หัวใจ	0/3	0/2	2/3	1/3	2/3	0/3	4/9	1/8	44.44	12.5
สมอง	0/3	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/9	0/8	0	0

ND: no data, DPI: วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation),

US: สายพันธุ์อเมริกา (01NP1), EU: สายพันธุ์ยุโรป (02SB3)

ตารางที่ 2 แสดงระดับเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่พบแอนติเจน ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยแยกตามวันที่ทำการชันสูตร และสายพันธุ์ของไวรัสที่สุกรได้รับ

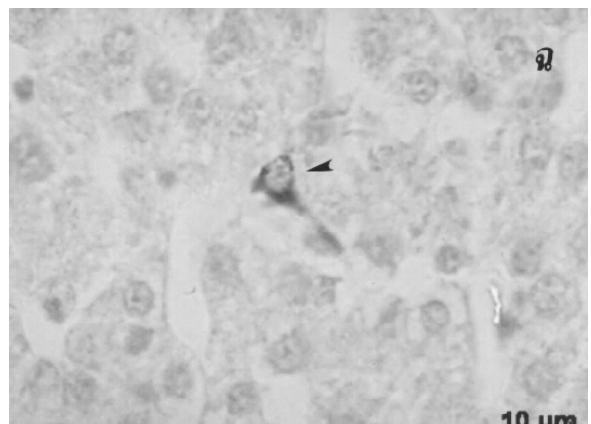
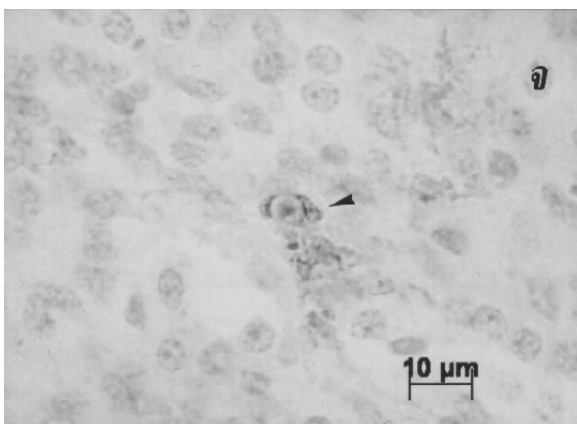
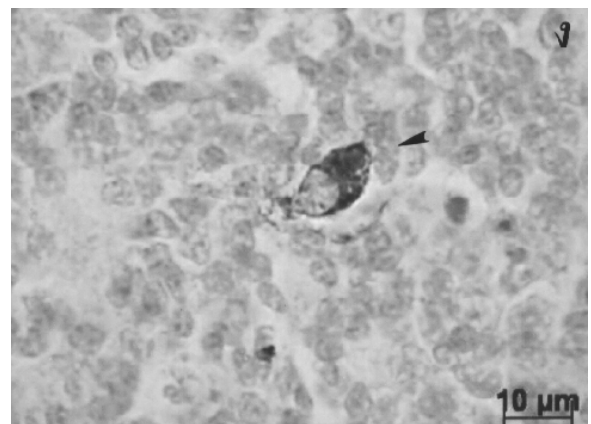
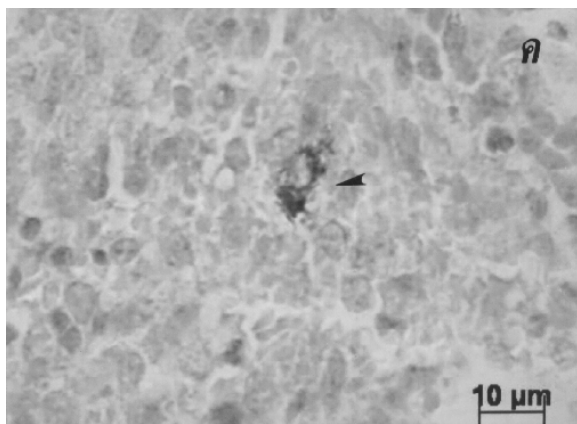
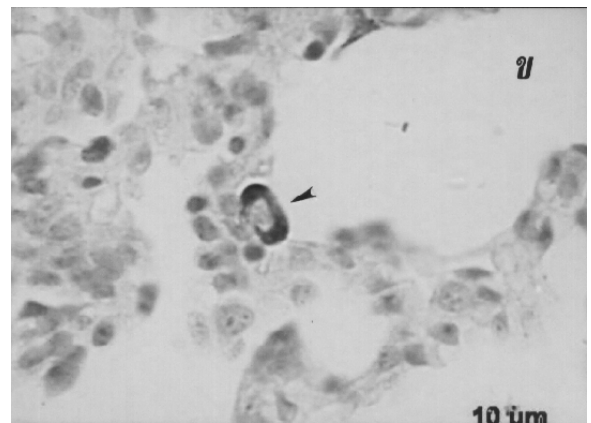
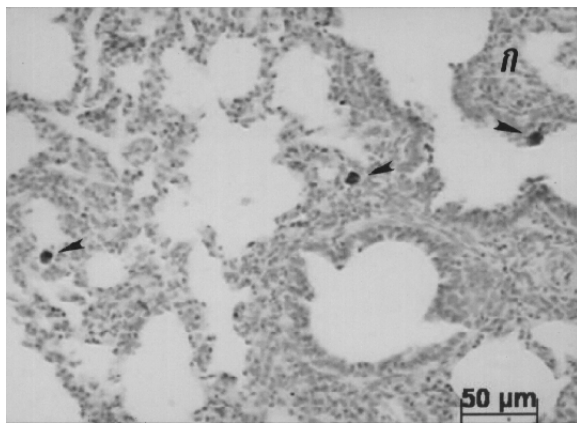
เนื้อเยื่อ	สายพันธุ์อเมริกา (01NP1)			สายพันธุ์ยุโรป (02SB3)		
	5 DPI	9 DPI	15 DPI	5 DPI*	9 DPI	15 DPI
ปอด	1±1.73**	1±0	1±1	2±0	1.33±0.58	1±0
ตับ	0	0.33±0.58	0	0.5±0.71	1.66±1.15	0.67±0.58
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	0	0	0	1±0	0	0
ไต	0	0	0	0.5±0.71	0	0
ต่อมน้ำเหลืองข้างปอด	0.33±0.58	0.33±0.58	0	0.5±0.71	0	1±1
ม้าม	0.33±0.58	0	0 ^a	0.5±0.71	0	1±0 ^b
ทอนซิล	0.67±0.58	0	0	0.5±0.71	0	0.67±0.58
กระดูก turbinates	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

*เฉพาะในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ ทำการชันสูตร สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป เพียง 2 ตัว, mean±SD, n=2,

**Mean±SD, n=3

DPI: วันภายหลังได้รับเชื้อ (days postinoculation)

^{a,b} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มในวันเดียวกัน



ภาพที่ 1 แสดงแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่พบในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจ (ลูกศรชี้) ของสุกรในอวัยวะต่างๆ 5 วันภายหลังได้รับเชื้อ โดยใช้วิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี (SDOW-17 ต่อ nucleocapsid protein ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส) แล้วย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin

- ก) ปอด สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา
- ข) ปอด สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป
- ค) ม้าม สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป
- ง) ต่อมมน้ำเหลืองข้างปอด สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป
- จ) ไต สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป
- ฉ) ตับ สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป

สายพันธุ์ แต่มีแนวโน้มว่าในปอดสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปมีปริมาณ การกระจายตัวของแอนติเจนไปยังอวัยวะต่างๆ มากกว่าสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา นอกจากนี้พบ ปริมาณการกระจายตัวของ แอนติเจนในปอดสุกรทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป มากที่สุดในวันที่ 5, 9 และ 15 ภายหลังได้รับเชื้อตามลำดับ

ในวันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อเริ่มตรวจพบการกระจาย ตัวของแอนติเจนในกลุ่มของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่ทำการเก็บ ตัวอย่าง ได้แก่ ทอนซิล ต่อมมน้ำเหลืองขั้วปอดและม้ามของสุกร ที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมีปริมาณการกระจาย ตัวของแอนติเจนที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ในสุกรที่ได้รับ เชื้อสายพันธุ์ยุโรป สามารถตรวจพบแอนติเจนในกลุ่มของ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่ทำการเก็บตัวอย่างอีกครั้งในวันที่ 15 ภาย ใจเชื้อ โดยในม้ามของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรปมีปริมาณ แอนติเจนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อ เทียบกับสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา

วิจารณ์

การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ซึ่งอยู่ภายในมาโครฟาจและ mononuclear cells ในเนื้อเยื่อต่างๆ (Halbur et al., 1994; 1995^a, 1996^a; Rossow et al., 1996; Cooper et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 1997) ซึ่งวิธีนี้จะเหมาะกับชิ้นเนื้อที่ทำการเก็บรักษา ในฟอร์มาลิน แต่ทั้งนี้ ควรทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วยวิธี virus isolation หรือ PCR (Benfield et al., 1999) ร่วมด้วย ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าความจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสสูง (ร้อยละ 100) และมีความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 40-90 ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น วันที่ทำการชันสูตรปริมาณ ของ แอนติเจน ชนิดของตัวอย่างชิ้นเนื้อ ตำแหน่งของชิ้นเนื้อ ซึ่งนำมาเป็นตัวแทนในการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส จำนวนหน้าตัดของชิ้นเนื้อ และขั้นตอนในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ ซึ่งล้วนส่งผลต่อค่าความไวของการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ทั้งสิ้น นอกจากนี้ระยะเวลาในการเก็บรักษาชิ้นเนื้อใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน หากนานเกิน 2 วัน การตรวจพบแอนติเจน ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมีอาจลดลง (Van Alstine et al., 2002) อีก ทั้งวิธี antigen retrieval ที่ใช้ในการศึกษาอาจส่งผลต่อการพบ แอนติเจนของเชื้อ ดังรายงานของ Kanai et al., 1998 กล่าวว่า การ pretreatment ด้วยเตาอบไมโครเวฟ หรือ trypsin เป็นวิธี

ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบแอนติเจน ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของมาโครฟาจ ในปอด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่งผลให้เกิด การเสื่อมหรือ apoptosis ของ มาโครฟาจในปอด และเซลล์จะ หลั่งเอนไซม์และไซโตไคน์ มากกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของ ปอดตามมา (Halbur et al., 1996^a) เชื้อไวรัสจะเหนี่ยวนำ ให้ เกิดความเสียหายต่อผนังถุงลมปอด พบ moderate multifocal interstitial pneumonia และมี mononuclear cellsแทรกเข้ามาที่ ผนังของถุงลม (Halbur et al., 1995^a)

เมื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับ พบการสะสมของ mononuclear cells บริเวณ portal triad และตรวจพบแอนติเจน ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของ Kupffer cells ของตับซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองดังกล่าว (Halbur et al., 1996^a; Cheon and Chae, 2000) จากการศึกษาครั้งนี้พบ แอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตับตั้งแต่วันที่ 5 ภายหลังได้รับเชื้อ ในสุกรที่ได้รับเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ยุโรป

การพบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ใน มาโครฟาจ บริเวณ medulla ของไตร่วมกับการอักเสบของ หลอดเลือด (vasculitis) สอดคล้องกับรายงาน (Halbur et al., 1996^a; Cooper et al., 1997) เนื่องจากการตอบสนองต่อ แอนติเจนของไวรัส (Rossow et al., 1995) ทำให้สามารถนำ น้ำปัสสาวะมาใช้ในการทำ virus isolation เพื่อวินิจฉัยโรค ได้เช่นกัน (Rossow et al., 1994; Wills et al., 1997)

ในการศึกษาครั้งนี้พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในม้าม บริเวณ white pulp ซึ่งเป็นบริเวณที่พบพยาธิสภาพ เมื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณการกระจายตัวของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในม้ามของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป มากกว่าสุกรที่ได้ รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจบ่งถึง ระยะเวลาของการเกิด viremia ในสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ ยุโรป (O2SB3) อาจนานกว่า

จากการศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถพบแอนติเจนของไวรัส ได้ในหัวใจ กระดูก turbinates ทอนซิล ต่อมมน้ำเหลืองขั้วปอด และในลำไส้เล็กส่วนปลายซึ่งพบในมาโครฟาจ และ dendritic cells ใน Peyer's patches และ domes ของลำไส้ บ่งชี้ถึงการ ขับออกของไวรัสทางอุจจาระ (Halbur et al., 1996^a) โดยเฉพาะ ในสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) ที่ทำการศึกษานี้

แต่การทดลองครั้งนี้ไม่พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสมองของสุกรทั้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์

อเมริกา และสายพันธุ์ยุโรป พบเพียงรอยโรค non-suppurative encephalitis ในสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) เท่านั้น แต่จากการศึกษาของ Thanawongnuwech และคณะ (1997) พบแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในไซโตพลาสซึมของ microglia-like cells และ mononuclear cells ภายในผนังหลอดเลือดแดงของสมองสุกร ทำให้เกิดการอักเสบของสมอง (encephalitis) ร่วมกับ necrotizing vasculitis ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของอาการทางประสาท ในลูกสุกร (Halbur et al., 1995^a; 1996^a; Rossow et al., 1995; 1996)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้กล่าวได้ว่า ไม่มีความแตกต่างในการกระจายตัวของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในอวัยวะต่างๆ ทั้งในสายพันธุ์อเมริกาและสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทย ยกเว้นม้ามของสุกร ในวันที่ 15 ภายหลังได้รับเชื้อ ซึ่งสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป พบปริมาณแอนติเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา อาจเป็นไปได้ว่าการเกิดภาวะ viremia ของสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (O2SB3) ที่พบในประเทศไทย ยาวนานกว่าสุกรที่ได้รับเชื้ออเมริกา (O1NP1) แม้ว่าจะมีอาการทางคลินิกน้อยกว่าก็ตาม ซึ่งแตกต่างจากรายงานในอดีต ที่กล่าวว่า สุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาจะมีความรุนแรงของรอยโรคและปริมาณแอนติเจน ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (Halbur et al., 1995^{a,b}; 1996^a; Thanawongnuwech et al., 1998 ; 2003) ความแตกต่างดังกล่าวนี้ อาจเกิดเนื่องจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกามีความแตกต่างทางพันธุกรรม และแอนติเจนโดยแยกเป็นกลุ่มย่อยๆ ตามความรุนแรงของโรค (Halbur et al., 1996^b; Haynes et al., 1997) ดังนั้นเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกาที่แยกได้ในประเทศไทย (O1NP1) อาจเป็นเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำกว่าสเตรนที่พบในอดีต แต่ยังคงมีความรุนแรงทางคลินิกมากกว่าสายพันธุ์ยุโรปที่ใช้ทดสอบ ทำให้การกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไม่มีความแตกต่างกับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทย (O2SB3) แนวโน้มของการพบการกระจายของแอนติเจนของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสายพันธุ์ยุโรปในอวัยวะต่างๆ อาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการซ่อนตัว (persist) ของไวรัสสายพันธุ์นี้ และการปรับตัวในสุกร ทำให้ไม่พบอาการทางคลินิกที่รุนแรง เหมือนสุกรที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์อเมริกา ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรเพิ่มจำนวนสุกรทดลอง เพิ่มจำนวนครั้งที่ทำการชันสูตร และเพิ่มระยะเวลาของการทดลอง อีกทั้งอาจทำการย้อม อิมมูโนฮิส

โตเคมีร่วมกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีอื่นๆ เพื่อความกระจ่างชัดของการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการการเรียนการสอน เพื่อเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 และกองทุนวิจัย รัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเงินทุนวิจัย บริษัท ทำจากเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด ที่เอื้อเพื่อสุกรทดลองและอาหารสุกร ผศ.น.สพ.ดร.เผด็จ ธรรมรักษ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาลและวิทยาการสืบพันธุ์ สำหรับงานด้านสถิติ สพ.ญ.นุสรา พันธุ์ประภา นิสิตปริญญาโทภาควิชาพยาธิวิทยา ที่ช่วยเหลือในการศึกษาก่อนหน้านี้ รวมทั้งคณาจารย์และบุคลากรหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์เนช. 2001(2544). บทบาทของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนระบบทางเดินหายใจของสุกร เวชสารสัตวแพทย์. 31(2) 13-20.
- Benfield, D.A., Collins, J.E., Dee, S.A., Halbur, P.G., Joo, H.S., Lager, 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: Diseases of swine. 8th ed. B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling and D.J. Taylor (eds.) Iowa State University Press. 201-232.
- Cheon, D.S. and Chae, C. 2000. Comparison of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from naturally aborted fetuses and stillborn piglets. J. Vet. Diagn. Invest. 12(6): 582-587.
- Cooper, V.L., Hesse, R.A. and Doster, A.R. 1997. Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. J. Vet. Diagn. Invest. 9(2): 198-201.

- Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996^a. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 47(2): 19-31.
- Damrongwatanapokin, S., Patchimasiri, T., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996^b. Experimental inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus (local strain) in weaning pigs. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 47(3-4): 23-34.
- Halbur, P.G., Miller, L.D., Paul, P.S., Meng, X.J., Huffman, E.L. and Andrews, J.J. 1995^a. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32(2): 200-204.
- 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^b. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32(6): 648-660.
- 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. 1996^a. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 33(2):159-170.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1996^b. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8 (1): 11-20.
- Haynes, J.S., Halbur, P.G., Sirinarumitr, T., Paul, P.S., Meng, X.J. and Huffman, E.L. 1997. Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Vet. Pathol.* 34(1): 39-43.
- Kanai, K., Nunoya, T., Shibuya, K. and Tajima, M. 1998. Variations in effectiveness of antigen retrieval pretreatments for diagnostic immunohistochemistry. *Res. Vet. Sci.* 64(1): 57-61.
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A. and Collins, J.E. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6(1): 3-12.
- Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Benfield, D.A. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32(4): 361-373.
- Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Collins, J.E. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33(5): 551-556.
- Rossow, K.D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35(1): 1-20.
- Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G. and Andrews, J.J. 1997. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(3): 334-337.
- 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. Pathol.* 35(5): 398-406.

- 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(2): 95-102.
- Thanawongnuwech, R., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S. and Thacker, E.L. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. *Proceedings of the 17th IPVS*: 410.
- Thanawongnuwech, R., Rungsipipat, A., Disatian, S., Saiyasombat, R., Napakanaporn, S. and Halbur, P.R. 2003. Immunohistochemical staining of IFN γ positive cells in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected lungs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91(1): 73-77.
- Van Alstine, W.G., Popielarczyk, M. and Albregts, S.R. 2002. Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(6): 504-507.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57(1): 69-81.