



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างสารไซโตคายน์
ในเม็ดเลือดขาวที่แยกจากสุกรที่ได้รับเชื้อ

โดย

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สันนิภา สุรทัตต์

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๔๘

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างสารไซโตคายน์
ในเม็ดเลือดขาวที่แยกจากสุกรที่ได้รับเชื้อ

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สนธิภา สุรทัตต์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	4
ABSTRACT	5
บทคัดย่อ	6
EXECUTIVE SUMMARY	8
บทนำ	12
วัตถุประสงค์	14
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
1) เซลล์เพาะเลี้ยง	15
2) ไวรัส	15
3) สัตว์ทดลองและระเบียบวิธีวิจัย	15
4) การเก็บและแยก PBMC และ <i>in vitro</i> activation	18
5) แอนติบอดีสำหรับ flow cytometry	18
6) Immunofluorescent staining and flow cytometry	18
7) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	20
ผลการวิจัย	
1) การศึกษาการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV โดยจะทำการศึกษาในแง่ dynamic ของการสร้าง ไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ และเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ดังกล่าว	20
1.1 ผลของ PRRSV ต่อการสร้าง IL-10 ของเซลล์ PBMC ที่แยกได้จากสุกร (<i>In vitro</i> effect)	20
1.2 ผลของ CSFV ต่อการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ที่แยกได้จากสุกร	20
1.3 การศึกษา dynamic ของการสร้างไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกา และเซลล์ที่ สร้าง IL-10 ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	24
1.4 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรป	25
1.5 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีน PRRS สายพันธุ์ยุโรป	29
2) การศึกษาผลของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในการ กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร	32
วิจารณ์และข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	51
OUTPUT ที่ได้จากโครงการ	56
ภาคผนวก	53

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.นพ.เกียรติ รัชกรธรรม และคุณสุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง flow cytometer ที่ใช้ในการศึกษา Professor James A. Roth และ Dr. Ratre Platt ผู้ให้ความอนุเคราะห์ custom-conjugated monoclonal antibody ศพ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกสิน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ผู้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านไวรัสอหิวาต์สุกรและวัคซีนอหิวาต์สุกร รศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และเจ้าหน้าที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ PRRSV ที่นำมาใช้ในการศึกษา คณะนิติวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย น.สพ.วีระศักดิ์ สะตะ น.สพ.ระพี ปัญญาทอง อ.น.สพ.สว่าง เกษแดงสกุลภูมิ และนิติทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือเป็นอย่างมาก ในช่วงการศึกษาในสุกรทดลอง ทำยที่สุดนี้ขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันต้นสังกัดที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยมาโดยตลอด

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนหลักจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ทุนพัฒนานักวิจัย) และได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยสมทบจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุนเสริมรากฐานการวิจัย) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนในการไปเสนอผลงานวิจัยในต่างประเทศ ในงานประชุมวิชาการ International Veterinary Immunology Symposium เมือง Quebec city ประเทศแคนาดา เมื่อเดือนกรกฎาคม 2547 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุนประชุมและเสนอผลงานทางวิชาการในระดับนานาชาติ) และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Characterization of *in vivo* cytokine production by the leukocytes from pigs infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), has been recognized worldwide as one of the most economically important swine diseases. The major characteristics of PRRS include reproductive failure of the sows and respiratory disease in pigs of all ages. PRRSV infection generally resulted in delayed and ineffective adaptive immunity against the virus followed by the deterioration of local lung defenses that leads to secondary bacterial infections which are known as the porcine respiratory disease complex. Previous findings from our laboratory indicated that PRRSV infection could result in both systemic and local production of interleukin-10 (IL-10) in infected pigs. The findings lead to a major concern that high IL-10 production during the active stage of PRRSV infection could result in systemic immunosuppression in the infected pigs.

The first objective of the project was to establish various immunofluorescent staining protocols for studying IL-10 and interferon-gamma (IFN- γ) production, the IL-2 receptor-alpha (CD25) surface expression of porcine lymphocytes by flow cytometry. The results indicated that flow cytometric analyses of IFN- γ production could be used to evaluate viral-specific cell-mediated immune responses in pigs. However, IFN- γ production and expression of CD25 were not tightly associated in porcine lymphocytes. Furthermore, the result demonstrated significant increases in IL-10 production by porcine lymphocytes from infected pigs during the early stage of PRRSV infection. The second objective of the project was to evaluate whether the PRRSV infection produced negative impact on the host immune responses. To investigate the effect of PRRSV infection on classical swine fever (CSF) vaccine efficacy, twenty-eight, 17-day-old pigs were divided into 5 groups. The experimental group was infected with a Thai PRRSV (01NP1) a week before CSF vaccination and challenged with the virulent CSF virus (Bangkok 1950) 3 weeks following vaccination. The control groups received no PRRSV infection, no CSF vaccination, no CSF challenge or in combination were included. The results demonstrated that PRRSV infection significantly reduced the CSF vaccine efficacy, with clear evidence of enhanced IL-10 production by the lymphocytes of PRRSV infected pigs at the time of CSF vaccination. These findings implied that active PRRSV infection could induce immunosuppression in infected pigs and might be one of the causes for CSF vaccination failure in the field.

บทคัดย่อ

ผลของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ต่อการสร้างไซโตไคน์ ในเม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับเชื้อ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียเป็นอันดับต้นๆ แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก สาเหตุของโรค PRRS เกิดจากเชื้อไวรัส Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) อาการสำคัญของโรค PRRS ได้แก่ กลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ที่ก่อให้เกิดสภาวะการสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร และโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกกลุ่มอายุ เป็นที่น่าสังเกตว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ PRRSV มักเกิดขึ้นค่อนข้างช้าและไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ปัญหาสำคัญที่ตามมาภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV ได้แก่ การกดภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินหายใจซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจและก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า PRRSV จะทำให้เกิดการเพิ่มการสร้าง อินเตอร์ลิวคิน 10 (IL-10) ในสุกรที่ได้รับเชื้อ และชี้ให้เห็นว่า IL-10 อาจมีบทบาททั้งในแง่การกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักของโครงการในช่วงแรก เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อ PRRSV ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ โดยทำการศึกษารูปแบบของการสร้าง IL-10 ภายหลังจากที่สุกรได้รับเชื้อ และเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ดังกล่าว โดยพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การสร้าง IL-10 จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของสุกร ด้วยวิธี flow cytometry ได้เป็นผลสำเร็จ นอกจากนี้ยังได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์การแสดงออกของ IL-2R-alpha (CD25) บนผิวเซลล์ และการสร้าง อินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (IFN- γ) จนสามารถนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ศึกษารูปแบบและชนิดของเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ของสุกรได้จริง ผลจากการศึกษาพบว่าระดับการสร้าง IFN- γ สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสอดคล้องกับการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสในสุกรมากกว่าการตรวจวัดการแสดงออกของ CD25 นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้ยังสามารถแสดงให้เห็นว่า เชื้อ PRRSV เหนียวนาให้มีการสร้าง IL-10 แบบไม่จำเพาะ จากเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV สูงขึ้น ในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยพบว่าเซลล์ในกลุ่ม $CD4^+CD8^+$ lymphocyte เป็นเซลล์กลุ่มหลักที่สร้าง IL-10 ภายหลังการติดเชื้อในระยะแรกนี้

จากผลงานวิจัยข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อ PRRSV อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรโดยรวม และอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอื่นๆ ที่ให้กับสุกรในระยะเดียวกับที่มีการติดเชื้อ PRRSV ซึ่งนำไปสู่วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยในช่วงปีที่ 2 ของโครงการวิจัยนี้ โดยทำการศึกษาผลการติดเชื้อ PRRSV ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อเมื่อได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร โดยแบ่งสุกรทดลองอายุ 17 วัน เป็น 5 กลุ่ม สุกรกลุ่มทดลองได้รับเชื้อ PRRSV (strain 01NP1) 1 สัปดาห์ ก่อนการให้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร และตามด้วยการให้ฉีดพิษหัดด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (strain Bangkok 1950) 3 สัปดาห์หลังให้วัคซีน สุกรอีก 4 กลุ่ม ประกอบด้วย 1) สุกรที่ได้รับเชื้อ PRRS หรือ 2) ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียวและตามด้วยการฉีดพิษหัด 3) สุกรที่ได้รับการฉีดพิษหัดอย่างเดียว และ 4) สุกรกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาชี้ว่าการได้รับเชื้อ PRRSV ก่อนการให้วัคซีนอหิวาต์สุกร จะรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรและลดความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคของสุกรทดลองเมื่อได้รับเชื้อพิษหัดอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์จากสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV มาก่อนจะมีการสร้าง IL-10 ในปริมาณที่สูงขึ้นในช่วงเวลาที่ได้รับวัคซีน ผลจากการศึกษานี้ชี้ว่า การแพร่กระจายของ

เชื้อ PRRSV อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถรบกวนประสิทธิภาพของวัคซีนหวัดสุกร ซึ่งจะนำไปสู่ความล้มเหลวในการป้องกันโรคหวัดสุกรในฟาร์มสุกรในที่สุด

EXECUTIVE SUMMARY

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคระบาดที่ก่อความสูญเสียเป็นอันดับต้นๆ แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา สาเหตุของ PRRS เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี Arteriviridae (Cavanagh, 1997) อาการสำคัญของโรค PRRS ได้แก่ กลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ที่ก่อให้เกิดสภาวะการสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร และโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกกลุ่มอายุ นอกจากนี้ปัญหาสำคัญที่ตามมาภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV ได้แก่ การกดภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจและก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และ Mycoplasma spp. แทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจของสุกรภายหลังการติดเชื้อ PRRSV (Halbur, 1998)

เนื่องจาก PRRSV เป็นเชื้อที่เพิ่งอุบัติใหม่เมื่อไม่นานมานี้ การศึกษาเกี่ยวกับ PRRSV จึงมักเป็นการศึกษาข้อมูลในด้านระบาดวิทยาและไวรัสวิทยาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและความสัมพันธ์ของเชื้อ PRRSV กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรคของสุกร (viral-host relationship) มีอยู่จำกัดและยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก จากรายงานการศึกษาที่มีอยู่พบว่า PRRSV จะสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์กลุ่ม monocyte และ macrophage (Duan et al., 1997a) เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการติดเชื้อร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อค่อนข้างช้าและไม่มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการตอบสนองในกลุ่ม innate immunity และ cell-mediated immunity (reviewed in Murtaugh et al., 2002) เชื้อ PRRSV สามารถคงอยู่ในตัวสัตว์ได้เป็นระยะเวลานานแม้ว่าสัตว์จะไม่แสดงอาการของโรคแล้ว (persistent infection) ซึ่งบ่งชี้ว่าระบบภูมิคุ้มกันในตัวสุกรไม่สามารถกำจัดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สัตว์ที่ติดเชื้อในระยะนี้ยังสามารถ shed เชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ (Will et al., 1997) และมีการตั้งข้อสังเกตว่า PRRSV อาจมีผลในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยมีอิทธิพลต่อการทำงานของ cytokine network ของสุกร (Lager & Mengeling, 2000)

ในปัจจุบันความเข้าใจด้านวิทยาการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และ cytokine ได้เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับตัวสัตว์ เนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีพื้นฐานมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยการสร้าง protein mediator ที่เรียกโดยรวมว่า cytokine เป็นตัวเชื่อมการสื่อสารระหว่างเซลล์ต่างๆ ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับและลักษณะ (profile) ของการสร้าง cytokine ในกลุ่มนี้เพื่อนำมาใช้ในการอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลายในคนและสัตว์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ cytokine ที่สร้างจาก antigen-specific T-lymphocyte ในสุกรก็เริ่มมีการรายงานบ้างในช่วงที่ผ่านมา (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2003, Suradhat et al., 2001, Zuckermann et al., 1998, Zuckermann et al., 1999) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคที่มีอยู่ในขณะนั้นไม่เอื้อต่อความสามารถในการศึกษาถึงระดับการสร้าง cytokine ได้ที่หลายชนิดพร้อมๆ กัน เนื่องจาก monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ cytokine ของสุกรมีราคาแพงมาก และในบางกรณียังไม่มีการพัฒนาขึ้น นอกจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ในปัจจุบันมีการใช้ความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยการนำเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เข้ามาใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของ cytokine ของ gene ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถศึกษาถึง cytokine profile ที่

สร้างขึ้นได้ (Dozois et al., 1997) ในช่วงปีที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chained reaction (MPCR) เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่สร้าง cytokine ของสุกรได้แก่ interferon-gamma (IFN- γ) interleukin-2 (IL-2), IL-4 และ IL-10 ได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวเป็นผลสำเร็จ และพบว่าเชื้อ PRRSV (field isolate) สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่สร้าง immunomodulatory cytokine ที่สำคัญ ได้แก่ IL-10 เพิ่มขึ้น ใน PBMC ของสุกรที่ culture ร่วมกับ PRRSV ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* effect) ทั้งยังบ่งชี้ว่า PRRSV สามารถรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดอื่น (recall antigen) อย่างมีนัยสำคัญ (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003, Suradhat et al., 2003) เนื่องจากเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า IL-10 เป็น cytokine มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในระดับ antigen presentation และ effector function ต่างๆ (Moore et al., 2001) การค้นพบว่า PRRSV สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene เพิ่มขึ้น จึงถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำมาอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลเบื้องต้นล่าสุดที่ได้จากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย ชี้ให้เห็นว่า PRRSV จะทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในสุกรที่ได้รับเชื้อได้เช่นกัน และชี้ให้เห็นว่า IL-10 อาจมีบทบาททั้งในแง่การกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและลักษณะทางพยาธิสภาพของโรค PRRS ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวและแตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจทั่วไปอีกด้วย (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003) การศึกษาเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ติดเชื้อถือเป็นสิ่งสำคัญที่จะนำไปสู่ความเข้าใจเรื่องพยาธิกำเนิดและความสัมพันธ์ระหว่าง PRRSV กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรให้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น

การค้นพบว่าเชื้อ PRRSV สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ว่า เชื้อ PRRSV อาจมีแนวโน้มในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบในระยะ active stage ของการติดเชื้อ ในปัจจุบันยังมีคำถามและข้ออภิปรายในหมู่นักวิชาการและเกษตรกรในประเทศอยู่มาก ในประเด็นที่ว่า การติดเชื้อ PRRSV ภายในฟาร์มจะทำให้มีภาวะ systemic immunosuppression ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอื่นๆ ที่ให้กับสุกรในระยะเดียวกัน และมีผลต่อระดับภูมิคุ้มโรคต่อเชื้อชนิดอื่นที่มีการระบาดอยู่ในท้องที่ของประเทศไทยได้หรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคอหิวาต์สุกรซึ่งจัดเป็นโรคระบาดร้ายแรง ที่สร้างความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรที่สำคัญเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ จากงานวิจัยในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่า วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่ใช้ในประเทศสามารถให้ความคุ้มโรคแก่สุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพถ้าสุกรได้รับวัคซีนในระยะที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยแวดล้อมอีกหลายอย่างนอกเหนือจากตัววัคซีนเอง อาทิเช่น ระดับของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ อายุของสุกรที่ได้รับวัคซีนครั้งแรก และการติดเชื้อชนิดอื่นแทรกซ้อน ที่มีผลต่อความสามารถในการต้านทานเชื้อพิษในสุกรที่ได้รับวัคซีน (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2002) จากข้อมูลดังกล่าวร่วมกับอุบัติการณ์ของโรค PRRS ที่พบระบาดอยู่ในทุกท้องที่ของประเทศไทย และแนวโน้มในการสร้าง immunomodulatory cytokine ของเชื้อ PRRSV จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการติดเชื้อ PRRSV จะมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษาถึงผลของ PRRSV ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร และเป็นที่น่ามาของข้อเสนอกาววิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยเชื่อว่าผลจากงานวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นต่อการทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของ PRRSV ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร พยาธิกำเนิดของโรค PRRS และนอกจากนี้ยังจะให้ข้อมูลที่สามารถนำไปเผยแพร่ต่อเกษตรกรเพื่อเป็นประโยชน์แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยต่อไปอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV โดยจะทำการศึกษาในแง่ dynamic ของการสร้างไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ และเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ดังกล่าว
- 2) ศึกษาถึงผลของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การศึกษา dynamic ของ cytokine gene expression ภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV และเซลล์ที่สร้าง IL-10 ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

- 1) คัดเลือกเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และทำการเพิ่มจำนวน เพื่อใช้สำหรับการ inoculation
- 2) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 3 สัปดาห์ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) แบ่งสุกรออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนทำการ inoculation
- 3) ทำการให้เชื้อ PRRSV ในขนาด 2 ml (10^5 TCID₅₀/ml) แก่สุกรเข้าทางจมูก จากนั้นทำการจับบันทึกอาการทางคลินิก จนถึงสุดการทดลอง (15 วันหลังให้เชื้อ)
- 4) เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) ในวันที่ 1-5, 10 และ 15 หลังให้เชื้อ จากนั้นนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation พร้อมกับเก็บตัวอย่าง serum เพื่อตรวจแยกเชื้อ PRRSV ในวันดังกล่าว
- 5) แยก PBMC ส่วนหนึ่งมาทำการแยก total RNA แล้วตรวจหา mRNA ของ IL-10 gene โดยเปรียบเทียบกับ housekeeping gene โดยวิธี MPCR ตามวิธีที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003) จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณของ IL-10 mRNA ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยวิธี densitometry¹

¹ เนื่องจากในช่วงการเขียนโครงการเพื่อเสนอขอทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยยังไม่สามารถพัฒนาเทคนิค flow cytometry เพื่อศึกษาการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ที่แยกจากสุกรได้ และไม่แน่ใจว่าจะสามารถพัฒนาได้ทันตามกำหนดหรือไม่ ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานการพัฒนาเทคนิคนี้มาก่อนหน้านี้ในสุกร ผู้วิจัยจึงได้ระบุนิ่วการศึกษาการสร้างไซโตไคน์ โดยใช้วิธี multiplex-PCR ซึ่งได้มีการพัฒนาไว้ก่อนหน้านี้และเชื่อมั่นว่าสามารถทำได้โดยไม่มีปัญหา มาใช้ทำการศึกษาร่วมด้วยในกรณีที่ไม่สามารถพัฒนาเทคนิคทาง flow cytometry ได้ทันตามกำหนดเวลา อย่างไรก็ตามเนื่องจากคณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค flow cytometry ได้เป็นผลสำเร็จ โดยสามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาการสร้างไซโตไคน์ของแต่ละ lymphocyte subpopulation ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ และแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษาเพื่อตอบโจทย์ปัญหางานวิจัยได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นที่ยอมรับในหมู่นักวิจัย ว่าผลที่ได้จากวิธีดังกล่าวสามารถให้ข้อมูลที่บอกถึงระดับการสร้างโปรตีนที่แท้จริง รวมทั้งยังช่วยให้สามารถศึกษาชนิดของเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี multiplex-PCR ผู้วิจัยจึงได้ขอใช้ผลที่ได้จากวิธี flow cytometric analysis มาทดแทนการศึกษาโดยวิธี multiplex-PCR ทั้งหมด และขอตัดการศึกษาส่วน multiplex-PCR ออกจากรายงานการศึกษา (ตามที่ได้เสนอไว้ในรายงานความก้าวหน้าประจำปี ที่ 1)

- 6) ทำการศึกษาลักษณะของ subpopulation ของ PBMC (monocyte, lymphocyte: CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻) พร้อมกับย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 โดยวิธี intracellular cytokine staining โดยทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธี flow cytometry (โดยขออนุเคราะห์ให้ใช้เครื่อง flow cytometer ของ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- 7) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผลการทดลอง

3.2 การศึกษาผลกระทบของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

- 1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุประมาณ 3 สัปดาห์ ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) และมีค่า maternal derived SN titer ต่อ CSFV ที่ต่ำกว่า 32 แบ่งสุกรออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5-7 ตัว นำมาเลี้ยง ปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มสุกร	PRRSV inoculation	CSFV vaccination	CSFV challenge
A	-	-	+
B	-	+	+
C	+	-	+
D	+	+	+
E	-	-	-

- 2) ทำการ inoculate สุกรด้วย PRRSV (day 0) และตามด้วยการให้วัคซีนอหิวาต์สุกร ภายหลังการให้เชื้อ PRRSV เป็นเวลา 7 วัน (day 7) จากนั้น 3 สัปดาห์ (day 28) ทำการฉีดพิษหัดด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร ภายหลังการฉีดพิษหัด ทำการบันทึก clinical sign อัตราการป่วย และตาย ตลอดจนการทดลองจนถึงวันที่ 14 ภายหลังการฉีดพิษหัด ทำการผ่าซากเพื่อศึกษาลักษณะรอยโรคและจุลพยาธิวิทยาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
- 3) การเก็บตัวอย่างในระหว่างการทดลอง โดย
 - เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาเชื้อ PRRSV และ CSFV ระดับ serum neutralizing titer ต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และระดับ antibody titer ต่อเชื้อ PRRSV (IDEXXTM ELISA)
 - เก็บตัวอย่าง whole blood เพื่อนำมาแยก PBMC นำเซลล์ที่ได้มา culture ร่วมกับ CSFV (*in vitro* activation) จากนั้นตรวจวัดระดับ mRNA ของ IL-10 และ IFN- γ และปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells โดยวิธี ELISPOT (Suradhat et al., 2001)
- 4) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผลการทดลอง

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Arterivirus แฟมิลี Arteriviridae (Cavanagh, 1997) อาการสำคัญของโรค PRRS ได้แก่ กลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ที่ก่อให้เกิดสภาวะการสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร และโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกกลุ่มอายุ นอกจากนี้ปัญหาสำคัญที่ตามมาภายหลังจากการติดเชื้อ PRRSV ได้แก่ การกดภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจและก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า porcine respiratory disease complex (PRDC) ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และ Mycoplasma spp. แทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจของสุกรภายหลังการติดเชื้อ PRRSV (Halbur, 1998)

ในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรค PRRS มีอยู่อย่างจำกัดและยังไม่มีที่เข้าใจดีนัก PRRSV ติดเข้าสู่สุกรโดยการหายใจผ่านเข้าทาง nasal epithelial cells และเข้าสู่ tonsilar และ pulmonary macrophage จากนั้นเพิ่มจำนวนใน macrophage และจะกระจายไปทั่วร่างกาย (viremia) ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ทั่วร่างกาย อาทิเช่น pneumonia, myocarditis, encephalitis, vasculitis (Rossow et al., 1995) พยาธิสภาพสำคัญที่เกิดขึ้นอย่างหนึ่งหลังการติดเชื้อ PRRSV คือ พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (generalized lymphadenopathy) โดยจะพบ follicular hypertrophy และ hyperplasia ตั้งแต่วันที่ 10-14 หลังการติดเชื้อ และจะปรากฏอาการอยู่ต่อไปนานหลายสัปดาห์ (reviewed in Lager & Mengeling, 2000) โดยทั่วไปอาการของ PRRS จะเริ่มปรากฏขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และอาการจะค่อย ๆ หายไปภายในเวลา 1 เดือน เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการติดเชื้อร่างกายมีการตอบสนองต่อเชื้อที่ค่อนข้างช้าและไม่มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการตอบสนองในกลุ่ม innate immunity และ cell-mediated immunity (reviewed in Murtaugh et al., 2002) แม้ว่าสัตว์ที่ติดเชื้อ PRRSV จะหายจากอาการป่วยแล้ว และมีการพัฒนาการสร้างแอนติบอดีต่อ PRRSV ตามปกติตั้งแต่ 2 สัปดาห์แรก เชื้อ PRRSV จะยังคงสามารถอยู่ในตัวสัตว์ที่หายป่วยแล้วได้เป็นเวลานานถึง 4 เดือน (persistent infection) โดยที่สัตว์ที่มี persistent infection จะสามารถปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอกและแพร่กระจายไปสู่สัตว์ตัวอื่นได้ในระยะนี้ (Meng, 2000) ซึ่งบ่งชี้ว่าภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นในสัตว์ป่วย ไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพจากการประมวลข้อมูลเบื้องต้นทั้งในแง่กลุ่ม target cell ของ PRRSV ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญใน phagocytic effector mechanism อีกทั้งยังมีความสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ specific immunity ในแง่การเป็น antigen presenting cell พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองที่พบทั่วร่างกาย และความสามารถของเชื้อ PRRSV ที่คงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานาน แม้ว่าสัตว์จะหายจากช่วงที่แสดงอาการแล้ว ทำให้เชื่อได้ว่า PRRSV น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์ (interaction) ใกล้ชิดกับในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับเซลล์ เพื่อประโยชน์ต่อการอยู่รอดของเชื้อในสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นที่ว่าเชื้อ PRRSV อาจจะมีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกร (Lager & Mengeling, 2000)

ในช่วงปีที่ผ่านมาผลงานวิจัยที่ทำในประเทศไทยพบว่าเชื้อ PRRSV (field isolate) สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ immunomodulatory cytokine ที่สำคัญ ได้แก่ IL-10 gene เพิ่มขึ้น ใน PBMC ของสุกรที่ culture ร่วมกับ PRRSV ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* effect) ทั้งยังบ่งชี้ว่า PRRSV สามารถรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มต่อแอนติเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003, Suradhat et al., 2003) โดยทั่วไปแล้วการทำงานที่มีประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน จะเริ่มจากการกระตุ้นให้มีการสร้าง pro-inflammatory

cytokine หลายๆ ชนิดจาก phagocytic cell เพื่อกระตุ้นการทำงานของ innate immunity และ adaptive immunity ในลำดับถัดไป แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการติดเชื้อ PRRSV ในสุกรจะพบว่ามี การสร้าง pro-inflammatory cytokine โดยเฉพาะอย่างยิ่ง TNF- (Van Reeth et al., 1999) และ IFN- (Albina et al., 1998) ในระดับที่ต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะอาการทางคลินิกที่ไม่รุนแรงนัก ร่วมกับภาวะการอักเสบของปอดเกิดขึ้นในระดับต่ำๆ เมื่อเทียบกับอาการที่เกิดจากไวรัสโรคปอดชนิดอื่นๆ (Van Reeth & Nauwynck, 2000) เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า IL-10 สามารถออกฤทธิ์กดการทำงานของ phagocytic cell ในการสร้าง pro-inflammatory cytokine ซึ่งรวมถึง TNF และ IFNs และ cellular function อื่นๆ ในระยะแรกของการได้รับเชื้อ (Moore et al., 2001) นอกจากนี้ IL-10 ยังมีฤทธิ์กดการทำงานของ T-helper lymphocyte ซึ่งจะมีผลในการลดการกระตุ้นตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในระยะต่อมา (Moore et al., 2001) ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อเชื้อ PRRSV จะมีระดับที่ต่ำมากและต้องใช้เวลา นานกว่าที่จะมีการตรวจพบได้ภาย หลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นยังอาจไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอ ที่จะกำจัดเชื้อ PRRSV ออกจากร่างกายของสัตว์ที่ติดเชื้อได้ (Murtaugh et al., 2002) นอกจากนี้ภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนในปอดที่มักจะตามมาภาย หลังการติดเชื้อ PRRSV ยังบ่งชี้ว่าเชื้อ PRRSV มีผลต่อเนื่องในการกดการทำงานของเซลล์ต่างๆ ที่จำเป็นต่อการ กำจัดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การค้นพบว่า PRRSV สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene ใน เม็ดเลือดขาวของสุกรเพิ่มขึ้น ถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนที่จะนำมาใช้ในการอธิบาย พยาธิกำเนิดของโรค PRRS นอกจากนี้ข้อมูลเบื้องต้นล่าสุดที่ได้ยังชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อ PRRSV จะทำให้เกิดการ เพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในสุกรที่ได้รับเชื้อ (*in vivo* effect) ได้เช่นเดียวกัน และชี้ให้เห็นว่า IL-10 อาจมี บทบาทในแง่การกำหนดลักษณะทางพยาธิสภาพของโรค PRRS ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวและแตกต่างจาก การติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจทั่วๆ ไปอีกด้วย โดยผลงานวิจัยล่าสุดจากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยบ่งชี้ว่า เซลล์ที่เดินทางเข้าสู่ปอดภายหลังการติดเชื้อน่าจะมีบทบาทสำคัญในการสร้าง cytokine ในบริเวณปอด ได้แก่ IL-10 และ IFN- γ ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและพยาธิสภาพในปอด และบ่งชี้ว่าเชื้อ PRRSV มีต่อ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบในการติดเชื้อช่วงแรกๆ (systemic effect) (Thanawang et al., 2004) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบว่าการสร้าง IL-10 นั้นเกิดขึ้นตั้งแต่เมื่อไรภายหลังการติดเชื้อ เซลล์ใดเป็นผู้สร้าง cytokine ชนิดนี้ และการกระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene จะมีผลอย่างไรต่อการตอบสนองต่อแอนติเจนอื่นๆ ในตัวสุกร การค้นพบว่า PRRSV กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 gene ถือเป็นข้อมูลที่น่าสนใจ และจำเป็นจะต้องมี การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรค PRRS มากยิ่งขึ้น ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเหล่านี้จะนำไปสู่การศึกษาถึงวิธีการจัดการเพื่อควบคุมป้องกันโรค PRRS อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) เกิดจากเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (classical swine fever virus, CSFV) ซึ่งจัดอยู่ใน genus Pestivirus Family Flaviviridae (Meyers & Thiel, 1996) เป็นโรคระบาดร้ายแรงในสุกร ที่สร้างความเสียหายในเชิงเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยมากเป็นอันดับหนึ่ง ในปัจจุบันโรค อหิวาต์สุกรยังคงเป็นปัญหาและพบการแพร่ระบาดทุกปี โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคที่ติดต่ออย่างรวดเร็วทำให้เกิดโรคได้ ในสุกรทุกกลุ่มอายุ โดยในการเกิดโรคแบบเฉียบพลันสุกรจะแสดงอาการการป่วยและตายที่สูงถึง 100% ในปัจจุบัน แม้ว่าหลายประเทศในยุโรปและทวีปอเมริกาจะสามารถกำจัดโรคได้แล้ว สถานภาพการเลี้ยงในประเทศไทยยังไม่ สามารถทำได้อย่างประเทศอื่น การป้องกันโรคในประเทศไทยสามารถทำได้โดยการให้วัคซีนป้องกันโรคและร่วม กับการจัดการ ประเด็นซึ่งนำมาสู่ความสนใจในเรื่องผลของ PRRSV ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรในโครง

งานวิจัยนี้ เนื่องมาจากข้อมูลจากงานวิจัยในช่วงปี 2543-2545 ซึ่งผู้วิจัยได้รับทุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ให้มีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร และได้รายงานสรุปถึงปัจจัยสำคัญที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรซึ่งมีอยู่หลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาการติดเชื้อที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แทรกซ้อนในระหว่างการเลี้ยง (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2002) และการให้วัคซีนพร้อมกับวัคซีนป้องกันโรค pseudorabies ชนิดเชื้อเป็น ซึ่งมีผลลดการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์โดยตรง (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2003) ปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญต่อความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคอหิวาต์สุกรในสุกรที่ได้รับวัคซีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุกรที่เลี้ยงในเขต endemic area จากรายงานที่ผ่านมา เชื้อ PRRSV สามารถรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณระบบทางเดินหายใจของสุกรที่ติดเชื้อ (Thacker et al., 2000) และทำให้การตอบสนองต่อวัคซีน pseudorabies ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV ล้าช้ากว่าปกติ (De Bruin et al., 2000) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าเชื้อ PRRSV สามารถลดการสร้าง IFN- γ จาก memory cell ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมา culture ร่วมกันกับ CSFV และ PRRSV ในเวลาเดียวกันในห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีผู้รายงานถึงผลของ PRRSV ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร (*in vivo* effect)

วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV โดยจะทำการศึกษาในแง่ dynamic ของการสร้างไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ และเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ดังกล่าว
- 2) ศึกษาถึงผลของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้องค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับผลของ PRRSV ต่อการสร้าง IL-10 ในร่างกายของสุกรที่ติดเชื้อ และเซลล์ที่สร้าง IL-10 เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาทางด้านพยาธิกำเนิดของโรค PRRSV และกลไกที่เกี่ยวข้องกับ immunomodulatory effect ของ PRRSV
- 2) ทราบผลของการติดเชื้อ PRRSV ที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและแก้ไขความล้มเหลวของการทำวัคซีนอหิวาต์สุกรในท้องที่
- 3) manuscript ไม่ต่ำกว่า 2 เรื่อง โดยคาดว่าจะสามารถลงตีพิมพ์ได้ในวารสารวิชาการนานาชาติ ได้แก่ Veterinary Immunology and Immunopathology (impact factor 1.38), Virology (impact factor 3.27) Journal of General Virology (impact factor 3.24) หรือวารสารอื่นที่อยู่ในสาขาที่เกี่ยวข้องกับสัตวแพทย์ และ/หรือวิทยาการภูมิคุ้มโรค ที่มีค่า impact factor ไม่ต่ำกว่า 1.0
- 4) งานวิจัยนี้เป็นโครงการหนึ่งซึ่งจะเป็นพื้นฐานของโครงการวิจัยเพื่อผลิตบัณฑิตในระดับบัณฑิตศึกษา โดยคาดว่าจะมีนิสิตระดับปริญญาโท อย่างน้อย 2 คน ที่เข้าร่วมโครงการนี้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1) เซลล์เพาะเลี้ยง

MARC-145 (African green monkey kidney cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Eileen Thacker, Iowa State University ประเทศอเมริกา และ SK-6 (swine kidney cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Corning Incorporated, USA) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด modified Eagle's medium (MEM) ที่เติม 10% fetal calf serum (GIBCO/BRL, USA) amphotericin B (GIBCO/BRL, USA) 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร penicillin G (GIBCO/BRL, USA) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin (GIBCO/BRL, USA) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (GIBCO/BRL, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂

2) ไวรัส

2.1 ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (PRRSV)

เชื้อ PRRSV กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา strain 01NP1 และ สายพันธุ์ยุโรป strain 02SB3 เป็น PRRSV ที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยในประเทศไทย ที่มีการศึกษาและ characterize ไว้ก่อนแล้ว (Thanawongnuwech et al., 2004) เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ SVI-25 เป็นไวรัสมาตรฐาน กลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (reference strain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก สฟ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโกธิน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

ทำการเพิ่มจำนวน PRRSV โดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 และหาความเข้มข้นของเชื้อด้วยวิธี Indirect Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) ตามวิธีของ Thanawongnuwech และคณะ (Thanawongnuwech et al., 1998)

2.2 ไวรัสอหิวาต์สุกร (CSFV)

เชื้อ CSFV สายพันธุ์ Bangkok 1950 ที่ใช้ในการฉีดพิษหับ (challenge) เป็นเชื้ออหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรง และเชื้อ CSFV สายพันธุ์มาตรฐาน ALD (reference strain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก สฟ.ญ.ดร.สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโกธิน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ CSFV และหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Neutralization Peroxidase-linked Assay (NPLA) โดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 ตามวิธีของ Pinyochon และคณะ (Pinyochon et al., 1999)

3) สัตว์ทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

ก่อนทำการทดลอง experimental protocol ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว (ใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง เลขที่ 01/2546) ทำการเลี้ยงสุกรทดลองในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองติดเชื้อที่มีระบบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การศึกษา dynamic ของการสร้างไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกาและเซลล์ที่สร้าง IL-10 ใน perpheral blood mononuclear cells (PBMC)

3.1.1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 3 สัปดาห์ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) แบ่งสุกรออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2) ในวันที่ 0 (d0) ทำการให้เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ชนิด US genotype (01NP1) ในขนาด 5 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀/ml) แก่สุกรกลุ่มทดลอง เข้าทางจมูกด้านละ 2.5 ml จากนั้นทำการจัดบันทึกอาการทางคลินิก จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (14 วันหลังให้เชื้อ) สุกรกลุ่มควบคุมได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากันในวันเดียวกับที่ทำการให้เชื้อ

3.1.3) เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) ในวันที่ 1-5, 7 และ 10 หลังให้เชื้อ จากนั้นนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation พร้อมกับเก็บตัวอย่าง serum เพื่อตรวจแยกเชื้อ PRRSV ใน d0 d7 และ d14

3.1.4) นำ freshly isolated PBMC มาทำการศึกษาอัตราส่วนของ subpopulation ของ PBMC (lymphocyte: CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻) พร้อมกับย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 โดยวิธี intracellular cytokine staining

3.2 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV

3.2.1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 9 สัปดาห์ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) แบ่งสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2) ในวันที่ 0 (d0) ทำการให้เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ชนิด US (01NP1) และ EU (02SB3) genotype ในขนาด 5 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀/ml) แก่สุกรกลุ่มทดลอง เข้าทางจมูกด้านละ 2.5 ml จากนั้นทำการจัดบันทึกอาการทางคลินิก จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (18 วันหลังให้เชื้อ) สุกรกลุ่มควบคุมได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากันในวันเดียวกับที่ทำการให้เชื้อ

3.2.3) เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) หลังให้เชื้อ นำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation นำ freshly isolated PBMC มาทำการศึกษาอัตราส่วนของ subpopulation ของ PBMC พร้อมกับย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 โดยวิธี intracellular cytokine staining

3.3 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ภายหลังการได้รับวัคซีน PRRS สายพันธุ์ยุโรป

3.3.1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 3 สัปดาห์ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) แบ่งสุกรออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2) ในวันที่ 0 (d0) ทำการให้วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป (Amerivac-PRRSV[®], Laboratorios Hipra, Spain) ขนาด 10^3 TCID₅₀/dose แก่สุกรกลุ่มทดลอง เข้ากล้ามเนื้อตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการจัดบันทึกอาการทางคลินิก จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (10 วันหลังให้วัคซีน) สุกรกลุ่มควบคุมได้รับแต่ diluent ของวัคซีน ในปริมาณที่เท่ากันในวันเดียวกัน

3.3.3) เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) หลังให้เชื้อ นำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation นำ freshly isolated PBMC มาทำการศึกษาอัตราส่วนของ subpopulation ของ PBMC พร้อมกับย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 โดยวิธี intracellular cytokine staining

3.4 การศึกษาผลกระทบของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

3.4.1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 17 วัน จากฟาร์มเอกชนที่ปลอดโรคอหิวาต์สุกร และพี อาร์ อาร์ เอส โดยการตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อทั้งสองชนิดในลูกสุกร โดยจะต้องตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRSV (seronegative) และมีค่า maternal derived SN titer ต่ำ CSFV (ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สุกรที่ได้รับวัคซีนตามโปรแกรมของฟาร์ม) ที่ต่ำกว่า 32 แบ่งสุกรออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5-7 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2) รายละเอียดของการให้เชื้อและวัคซีนของสุกรกลุ่มต่างๆ มีดังนี้

- วันที่ 0 (D0) ทำการ inoculate สุกรกลุ่ม C และ D ด้วยเชื้อ PRRSV ชนิด US genotype สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย (strain 01NP1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml โดยการหยอดจมูก ข้างละ 2.5 ml ส่วนสุกรกลุ่มอื่นๆ (A B และ E) ได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากันหยอดจมูก
- วันที่ 7 (D7) ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized Chinese strain Lot No. 47/46 (กรมปศุสัตว์) ให้แก่สุกรกลุ่ม B และ D โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณ 1 ml ต่อตัว ส่วนสุกรกลุ่มอื่นๆ (A C และ E) ได้รับเฉพาะ diluent ของวัคซีนในปริมาณที่เท่ากัน
- วันที่ 28 (D28) ฉีดพิษหัด (challenge) ให้สุกรกลุ่ม A-D โดยใช้เชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง (strain Bangkok 1950) ขนาด at least 10^5 PLD₅₀/ml (50% pig lethal dose) ต่อตัว โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณ 1 ml
- วันที่ 41 (D41) สิ้นสุดการทดลอง

Group	PRRSV inoculation (D0)	CSFV vaccination (D7)	CSFV challenge (D28)
A	-	-	+
B	-	+	+
C	+	-	+
D	+	+	+
E	-	-	-

3.4.3) รายละเอียดการเก็บข้อมูลตัวอย่างในระหว่างการทดลอง มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- จัดบันทึก clinical sign ของสุกรทุกกลุ่มทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง
- เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาเชื้อ PRRSV เชื้อ CSFV ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41
- เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาระดับ serum neutralizing antibody titer ต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และระดับ antibody titer ต่อเชื้อ PRRSV (IDEXX™ ELISA) ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41
- เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) จากสุกรทดลอง เพื่อการศึกษาทาง hematology และตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ในวันที่ 0, 3, 5, 7 และ 13 ภายหลังการฉีดพิษหัดด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร
- เก็บตัวอย่าง heparinized whole blood เพื่อนำมาแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) นำเซลล์ที่ได้มา culture ร่วมกับ CSFV (*in vitro* stimulation) จากนั้นตรวจวัดปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells โดยวิธี ELISPOT assay (Suradhat et al., 2001) และตรวจหาปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ และ IL-10 producing cells รวมทั้งวิเคราะห์แยก lymphocyte subpopulation ที่สร้าง

cytokine โดยวิธี flow cytometric analysis โดยวิธีของ Suradhat และคณะ (Suradhat et al., 2005) ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41

- ในวันที่สุดท้ายของการทดลอง (D41) หรือในกรณีที่สุกรเสียชีวิตหรือแสดงอาการป่วยหนักมาก (succumb to death) ก่อนสิ้นสุดการทดลอง ทำการ euthanize สุกรทดลอง ด้วยการทำให้สลบโดยให้ pentobarbital sodium (60 mg/ml) ปริมาณ 5-10 ml (to effect) เข้าหลอดเลือดดำ ตามด้วยการ exsanguination จากนั้นทำการผ่าซากเพื่อตรวจหาความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (pathological change) และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุกรทุกตัวเพื่อทำการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และส่งตัวอย่างเพื่อตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย (ในกรณีที่สงสัย)
- เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสุกรทุกตัวเพื่อตรวจหาความเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological change) โดยมุ่งเน้นการเปลี่ยนแปลงที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์สุกรเป็นหลัก

4) การเก็บและแยก PBMC และ *in vitro* activation

4.1) เก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากการทดลองข้างต้น โดยเจาะเลือดสุกรด้วยเข็มเบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว จากเส้นเลือด jugular vein ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อครั้ง เก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวที่มี heparin sodium (Vacutte[®], Greiner Bio-one, Austria)

4.2) นำเลือดมาปั่นแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ด้วยวิธี density gradient centrifugation (Suradhat et al., 2001) และหาปริมาณ และความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี trypan blue exclusion test

4.3) ในการทดลองที่ 3.2 ซึ่งจะต้องทำการ *in vitro* stimulation ด้วยเชื้อ CSFV จะเลี้ยงเซลล์ PBMC ที่ได้ในเพลทพลาสติกชนิด 24 หลุม โดยใช้เซลล์ปริมาณ 6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม และทำการกระตุ้นด้วยไวรัสอหิวาต์สุกร (ALD strain) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ CSFV ที่ 1 multiplicity of infection (m.o.i.) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (สำหรับเทคนิค ELISPOT) และ 40 ชั่วโมงสำหรับเทคนิค intracellular immunofluorescent staining assay ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂

5) แอนติบอดีสำหรับ flow cytometry

anti-swine CD8-PE-Cy5 conjugated mAb (76-2-11, IgG2a) และ anti-swine CD25-PE conjugated mAb (PGBL25A, IgG1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. J. A. Roth จาก Iowa States University, Ames, Iowa, USA

anti-swine CD4-FITC conjugated mAb (74-12-4, IgG2b) anti-swine CD4-PE conjugated mAb (74-12-4, IgG2b) และ Biotinylated anti-swine IFN- γ mAb (P2C11, IgG2a) จากบริษัท BD Biosciences (USA) streptavidin conjugated-FITC จากบริษัท Serotec (UK) anti-swine IL-10 mAb (954A4C437B1) จากบริษัท Biosource (USA) และ goat anti-mouse IgG1 FITC conjugate จากบริษัท Serotec (UK)

6) Immunofluorescent staining and flow cytometry

6.1 การย้อมผิวเซลล์ (surface staining)

นำ freshly isolated PBMC หรือเซลล์ที่ได้จากการ *in vitro* activation ที่ทำการเก็บและล้างด้วย PBS 1 ครั้ง มาปั่นล้างด้วย PBS ที่มี sodium azide 0.1% และ 5% bovine serum albumin (FACS buffer) นับและปรับ

ความเข้มข้นของเซลล์ ให้มีปริมาณประมาณ 2×10^6 เซลล์ ต่อ 1 staining reaction นำเซลล์ที่ได้ใส่ใน 96-well tissue cultured plate นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที สะบักส่วน supernatant ทิ้งไป จากนั้น resuspend cell pellet ด้วยการเติม mAb ที่เจือจางในปริมาณที่เหมาะสม (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE-Cy-5 และ anti-CD25-PE หรือ anti-CD8-PE-Cy-5 และ anti-CD25-PE) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ในที่มืด นำไปปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย FACS buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วย 2% formaldehyde ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนทำการวิเคราะห์ผลด้วย Facscan cytometer (BD Biosciences, USA)

6.2 การย้อมภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining)

ประยุกต์จากวิธีการตรวจของ Pala และคณะ (Pala et al., 2000) โดยมีขั้นตอนเพื่อตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ โดยในการทดลองที่ 3.1 ทำการเพาะเซลล์ที่เก็บจากสุกรทดลอง (freshly isolate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ ร่วมกับ monensin (GolgiStop™; BD Biosciences, USA) เพื่อยับยั้งขบวนการการหลั่งสารออกนอกเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนการย้อมเซลล์ สำหรับในการทดลองที่ 3.2 ภายหลังทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยเชื้อหิวาต์สุกร เป็นเวลา 28 ชั่วโมง จะทำการเติม monensin (GolgiStop™, BD Biosciences, USA) และ incubate ต่อไปอีก 12 ชั่วโมง จนครบ 40 ชั่วโมง จึงทำการเก็บและย้อมเซลล์

ทำการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวและทำการย้อมผิวเซลล์ (CD4 และ CD8) ตามขั้นตอนย้อมผิวเซลล์ข้างต้น หลังจากนั้นทำการ fix และ permeabilize เซลล์ด้วย Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences, USA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลอด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมภายในเซลล์ด้วย biotinylated anti-swine IFN- γ mAb หรือ anti-swine IL-10 mAb ที่เจือจางใน perm/wash solution (BD Biosciences) ในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลอด และตามด้วย streptavidin-FITC conjugate สำหรับ IFN- γ หรือ goat anti-mouse IgG1-FITC Conjugated mAb สำหรับ IL-10 ที่เจือจางใน Perm/wash (BD Biosciences, USA) ในขั้นสุดท้าย fix เซลล์ด้วย 2% formaldehyde ก่อนทำการวิเคราะห์ผลด้วย Facscan cytometer (BD Biosciences, USA)

6.3 วิธีการเลือกศึกษาประชากรเซลล์

การศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์และประชากรย่อยที่สร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์ ทำการวิเคราะห์จากเซลล์จำนวน 10,000 และ 100,000 เซลล์ ตามลำดับ โดยการเลือกศึกษาประชากรเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์ (R1) จะพิจารณาจากขนาดเซลล์ (FSC) และความหนาแน่นภายในเซลล์ (SSC) โดยพบว่าในกลุ่มประชากรที่เลือกมาศึกษานั้นประกอบด้วยเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์เป็นส่วนใหญ่ และมีประชากรเซลล์ชนิดโมโนไซต์ (SWC3⁺) ปนอยู่ประมาณร้อยละ 3 ของประชากรทั้งหมด (data not shown)

เนื่องจากในสุกรจะพบ double positive cell (CD4⁺CD8⁺) ได้ในกระแสเลือดซึ่งได้เคยถูก characterize เป็นกลุ่ม memory helper T cell (Saalmuller et al., 2002, Zuckermann, 1999) ดังนั้นการศึกษาชนิดประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์ (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ และ CD4⁺CD8⁺) ที่สร้างไซโตไคน์ หรือ CD25 จึงจำเป็นต้องใช้ระบบการย้อมแบบ 3-color staining โดยพิจารณาจากร้อยละของประชากรเซลล์ชนิด CD4⁺ และ/หรือ CD8⁺ จาก R1 สำหรับการศึกษาแอนติเจนสี่ที่สาม (tripled positive cell) จะเลือกศึกษาจากประชากรเซลล์จากความหนาแน่นภายในเซลล์และ CD8⁺ (R2) หรือ CD4⁺ (R3) โดยพิจารณาประชากรเซลล์ที่แสดง CD4⁺ หรือ CD8⁺ และสี่ที่สาม คือ CD25 หรือไซโตไคน์ (IFN- γ หรือ IL-10) เนื่องจากประชากรเซลล์ชนิด CD8⁺ ของสุกรมี 2

ชนิด คือ $CD8^{low}$ และ $CD8^{hi}$ (Zuckermann, 1999) ดังนั้นการศึกษาประชากรเซลล์ที่แสดง $CD4^{+}CD8^{+}CD25^{+}$ หรือ $CD4^{+}CD8^{+}cytokine^{+}$ จึงเลือกพิจารณาจาก R3 เป็นหลัก การแสดงผลในการศึกษานี้ คัดจากปริมาณเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก $\pm$ SEM จากสุกรในแต่ละกลุ่ม

7) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลตลอดการศึกษาโดยใช้โปรแกรมสถิติ GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) โดยใช้ *t*-test, Fisher's exact test หรือ ANOVA และตามด้วย Tukey's multiple comparison เมื่อมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มการศึกษาย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ 1: การศึกษาการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV ในแง่ dynamic ของการสร้าง ไซโตไคน์ภายหลังการได้รับเชื้อ และเซลล์ที่สร้าง cytokine ดังกล่าว

1.1 ผลของ PRRSV ต่อการสร้าง IL-10 ของเซลล์ PBMC ที่แยกได้จากสุกร (*In vitro* effect)

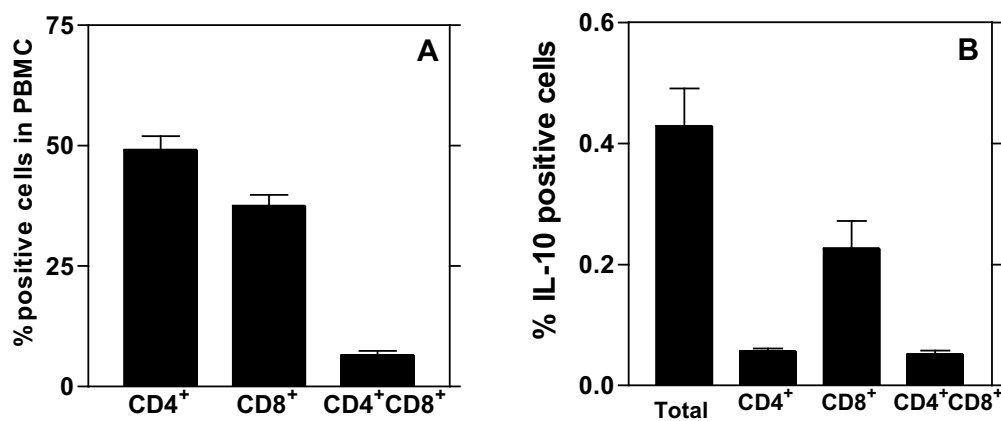
ในช่วง preliminary experiment นี้ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรอายุระหว่าง 7-11 สัปดาห์ จาก commercial farm แห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยก PBMC จากนั้นนำมา culture ร่วมกับ PRRSV เพื่อทำการพัฒนาเทคนิค ICS โดยทั้งนี้มีข้อมูลเบื้องต้นในงานวิจัยก่อนหน้านี้ มาแล้วว่า PRRSV สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ใน PBMC ของสุกร เมื่อทำการ culture เชื้อร่วมกับ PBMC เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการ (Suradhat et al., 2003) ดังนั้นจึงนำ culture system นี้มาใช้ในการพัฒนาเทคนิค ICS ในเบื้องต้นได้ ภายหลังจากที่ได้ทำการปรับ (optimize) ช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการ pulse เซลล์ด้วย monensin (GolgiStop™) และ permeabilize เซลล์ PBMC เป็นผลสำเร็จ จึงสามารถแสดงการสร้าง IL-10 ในเซลล์ PBMC ที่ทำการ culture ร่วมกับ PRRSV เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เห็นได้ นอกจากนี้ผลจาก preliminary experiment ยังชี้ให้เห็นว่า เซลล์กลุ่ม $CD4^{+}CD8^{+}$ T cells เป็นเซลล์กลุ่มหลักที่สร้าง IL-10 ใน culture system นี้ (ภาพประกอบที่ 1.1)

1.2 ผลของ CSFV ต่อการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC ที่แยกได้จากสุกร

ในการศึกษานี้ นอกจากการศึกษาผลของ PRRSV ต่อการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ PBMC แล้ว ผู้วิจัยยังได้พัฒนาเทคนิคการตรวจหา intracellular cytokine production ที่จำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกรไปพร้อมๆ กัน โดยจะนำเซลล์ PBMC ไปกระตุ้นด้วย CSFV ที่ความเข้มข้น 1 m.o.i. โดยดัดแปลงจากตามวิธีที่เคยใช้สำหรับการตรวจหา CSFV-specific IFN- γ secreting cells ที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว (Suradhat et al., 2001) ก่อนวิเคราะห์หาเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์โดย flow cytometry

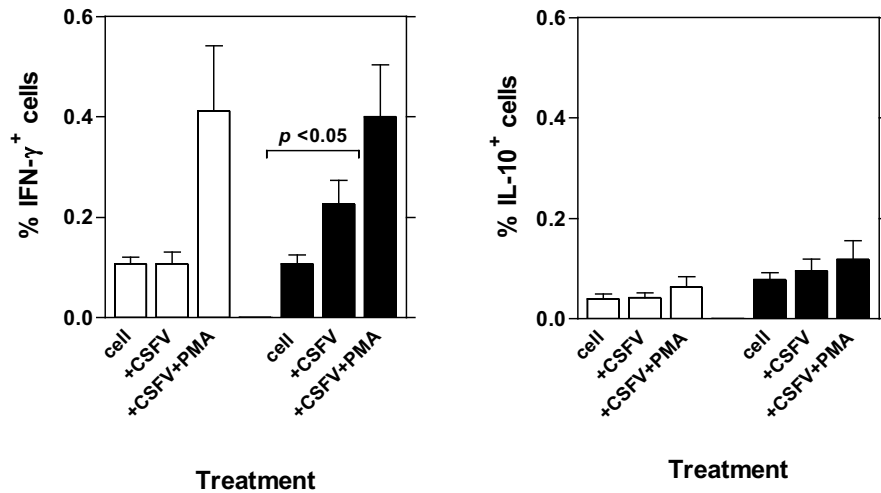
ในช่วง preliminary experiment ทำการเก็บตัวอย่าง PBMC จาก สุกรจากฟาร์มสุกรทดลอง ศูนย์ฝึกคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม แห่งหนึ่ง ตั้งแต่อายุ 3-13 สัปดาห์ เพื่อศึกษารูปแบบการแสดง CD25 และการสร้างไซโตไคน์ เมื่อสุกรได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรตามโปรแกรมปกติในฟาร์มเมื่ออายุ 5

และ 7 สัปดาห์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิค flow cytometry ที่พัฒนาขึ้น มาใช้แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในสุกรที่เคยได้รับวัคซีนได้ โดยพบว่าเซลล์ PBMC ของสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อนจะมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN- γ เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในห้องปฏิบัติการ (ภาพประกอบที่ 1.2) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการสร้าง IFN- γ สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสอดคล้องกับการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสในสุกรได้ดีกว่าการตรวจวัดการแสดงออกของ CD25 (ภาพประกอบที่ 1.3) โดยผลการศึกษาได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว รายละเอียดสามารถดูได้จาก reprint ในภาคผนวก (Suradhat et al., 2005)



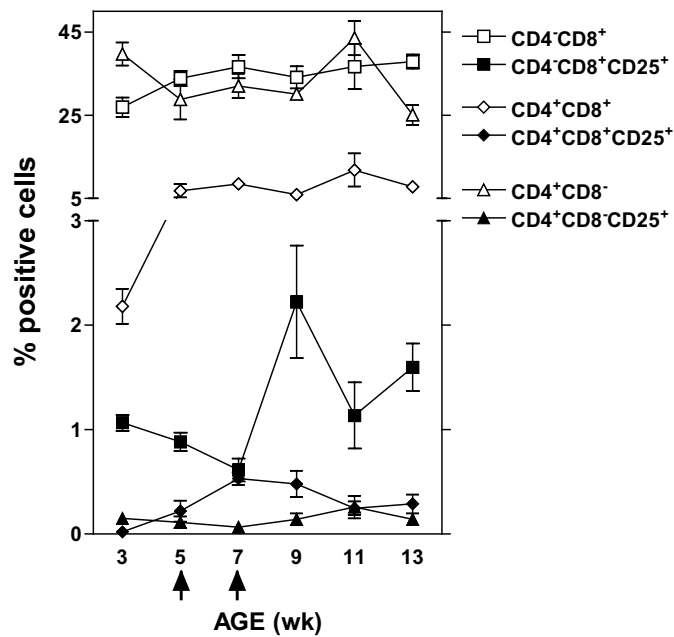
ภาพประกอบที่ 1.1 ผลของ PRRSV ต่อการสร้าง IL-10 ของเซลล์ PBMC (*In vitro* effect)

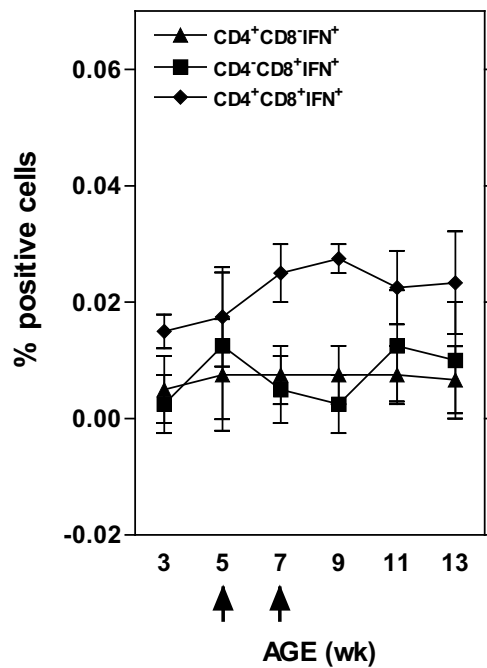
A) ปริมาณเฉลี่ยร้อยละของ lymphocyte subpopulation และ B) ปริมาณเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-10 จากเซลล์ PBMC ของสุกร (จำนวน 8 ตัว) ที่นำมา culture ร่วมกับเชื้อ PRRSV (SVI strain) ปริมาณ 1 m.o.i. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 1.2 ผลของ CSFV ต่อการสร้างไซโตไคน์ ของเซลล์ PBMC (*In vitro* effect)

(A) ปริมาณเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN- γ และ (B) IL-10 ของ PBMC จากของสุกรที่ไม่เคย (สีขาว) หรือสุกรที่เคยได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรมาก่อน (สีดำ) กลุ่มทดลองประกอบด้วย เซลล์ PBMC (cell) หรือ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นในห้องปฏิบัติการด้วย CSFV เป็นเวลา 40 ชั่วโมง (+CSFV) หรือ PBMC ที่ได้กระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin (+CSFV+PMA) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Suradhat et al., 2005)





ภาพประกอบที่ 1.3 รูปแบบการแสดง CD25 บนผิวเซลล์ และการสร้าง IFN- γ ของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CSFV

(A) ปริมาณเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่แสดง CD25 บนผิวเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IFN- γ (B) ใน PBMC ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรเมื่ออายุ 5 และ 7 สัปดาห์ (ลูกศร) เซลล์ PBMC ได้รับการกระตุ้นในห้องปฏิบัติการด้วย CSFV (1 m.o.i.) เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์ผล (Suradhat et al., 2005)

1.3 การศึกษา dynamic ของการสร้างไซโตคายน์ภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกา และ เซลล์ที่สร้าง IL-10 ใน perpheral blood mononuclear cells (PBMC)

ระเบียบวิธีวิจัย

1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 3 สัปดาห์ที่ปลอดจากเชื้อ PRRSV (seronegative) แบ่งสุกรออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) ในวันที่ 0 (d0) ทำการให้เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ชนิด US genotype (01NP1) ในขนาด 5 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀/ml) แก่สุกรกลุ่มทดลอง เข้าทางจมูกด้านละ 2.5 ml จากนั้นทำการจดบันทึกอาการทางคลินิก จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (14 วันหลังให้เชื้อ) สุกรกลุ่มควบคุมได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากันในวันเดียวกันกับการให้เชื้อ

3) เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) ในวันที่ 1-5, 7 และ 10 หลังให้เชื้อ จากนั้นนำมาปั่นแยก PBMC ด้วยวิธี density gradient centrifugation พร้อมกับเก็บตัวอย่าง serum เพื่อตรวจแยกเชื้อ PRRSV ใน d0 d7 และ d14

4) นำ freshly isolated PBMC มาทำการศึกษาอัตราส่วนของ subpopulation ของ PBMC (lymphocyte: CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻) พร้อมกับย้อมตรวจหาเซลล์ที่สร้าง IL-10 และ IFN- γ โดยวิธี intracellular cytokine staining โดยทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธี flow cytometry

ผลการทดลองและวิจารณ์

ภายหลังการให้เชื้อสุกรกลุ่มทดลองเริ่มแสดงอาการของโรค PRRS ได้แก่ อาการอ่อนเพลีย leukopenia และจะเริ่มสังเกตอาการทางระบบทางเดินหายใจ ตั้งแต่วันที่ 2 หลังให้เชื้อจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยจะพบอาการมากที่สุดในวันที่ 4-5 หลังการให้เชื้อ นอกจากนี้ยังพบอาการเยื่อตาขาวอักเสบ และตาบวมในกลุ่มทดลองได้ตั้งแต่วันที่ 4-6 หลังการให้เชื้อ อาการป่วยของสุกรจะหายไปเองหลังจากให้เชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ และไม่พบอาการผิดปกติใดๆ ในสุกรกลุ่มควบคุม ผลการตรวจวัดปริมาณของเชื้อไวรัส และระดับแอนติบอดีไคเตอร์ในสุกรทดลอง แสดงไว้ในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ระดับแอนติบอดีและไวรัสไคเตอร์จากซีรัมของสุกรทดลองภายหลังจากการให้เชื้อ PRRSV

	Viral titer (TCID ₅₀ /ml)			Mean S/P ratio ^a (% pig positive) ^b		
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0	Day 7	Day 14
Infected	Neg.	10 ^{3.5}	<10 ²	0.00	0.157 (0)	1.095 (80)
Control	Neg.	Neg.	Neg.	0.023	0.016 (0)	0.032 (0)

^a ELISA test for determining anti-PRRSV antibody titers was performed using IDEXX[®] ELISA test kit.

SP ratio = OD (sample)/OD (positive sample provided in the kit)

^b Cut-off value for seropositive was when the SP ratio > 0.4.

ผลการศึกษารูปแบบของการสร้าง IL-10 แสดงไว้ในภาพประกอบที่ 1.4 โดยพบว่าสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 ในระดับใกล้เคียงกันในวันที่เริ่มให้เชื้อ เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับการสร้าง IL-10 มีปริมาณค่อนข้างสูงในสุกรทั้ง 2 กลุ่ม ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องจากภาวะความเครียดจากการแยกจากแม่สุกรและการขนส่ง เนื่องจากเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าตามปกติสุกรมักมีการสร้าง endogenous IL-10 อยู่ในระดับหนึ่ง และระดับ IL-10 จะสูงขึ้นในขณะที่มีการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ อย่างไรก็ตามภายหลังจากได้รับ mock infected cell lysate สุกรกลุ่มควบคุมแสดงระดับการสร้าง IL-10 ที่ลดลงต่ำกว่าจนใกล้ระดับ baseline ภายหลังจากการ treatment และต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อในช่วงระหว่าง d1-d4 ส่วนในกลุ่มทดลองแม้ว่าระดับ IL-10 จะลดต่ำลงภายหลัง d0 อย่างไรก็ตามสุกรกลุ่มนี้ยังคงมีปริมาณของเซลล์ที่สร้าง IL-10 สูงกว่าสุกรกลุ่มควบคุมในช่วง 4 วันหลังได้รับเชื้อ ($p < 0.05$, student *t*-test) (ภาพประกอบที่ 1.4A) โดยพบว่าเซลล์กลุ่ม double-positive cells ($CD4^+CD8^+$) เป็นเซลล์กลุ่มหลักที่สร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV (ภาพประกอบที่ 1.4B) เป็นที่น่าสังเกตว่าจะพบความแตกต่างของการสร้าง IL-10 ระหว่างกลุ่มการทดลองได้เฉพาะในช่วงแรกของการติดเชื้อ โดยสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณการสร้าง IL-10 ในระดับที่ใกล้เคียงกันหลังจากวันที่ 5 เป็นต้นไป และเนื่องจากสุกรไม่เคยได้รับเชื้อ PRRSV ก่อนการทดลอง ดังนั้นจึงเชื่อว่าไวรัสสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 ได้จากเซลล์กลุ่มดังกล่าวแบบไม่จำเพาะ ส่วนการศึกษาการสร้าง IFN- γ พบว่าสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีรูปแบบของการสร้าง IFN- γ ที่ใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง โดยจะพบการสร้าง IFN- γ สูงขึ้นในช่วงระหว่าง d2-d4 ซึ่งน่าจะเกิดจาก early non-specific response จากการได้รับ PRRSV หรือ mock-infected lysate (ภาพประกอบที่ 1.4C)

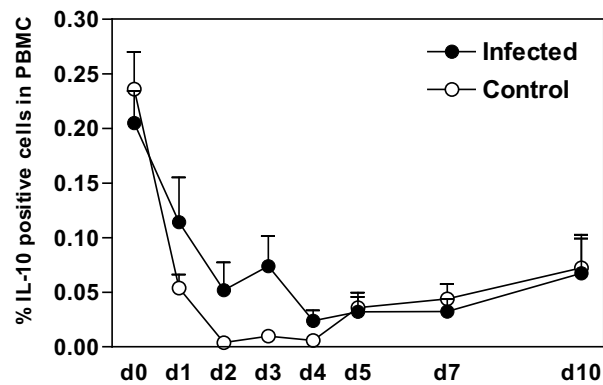
นอกจากการตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ ในการทดลองนี้ยังได้ศึกษาการสร้าง IL-2R (CD25) ซึ่งเป็น activation marker ชนิดหนึ่งของเซลล์ในกลุ่ม lymphocyte โดยแสดงไว้ตามภาพประกอบที่ 1.5 โดยพบว่าภายหลังจากการ treatment สุกรทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณเซลล์ที่แสดง CD25 บนผิวเซลล์มากขึ้น โดยเป็นที่น่าสนใจว่าสุกรกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเพียง mock infected lysate กลับมี activated cell ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ PRRSV อย่างมีนัยสำคัญในช่วงวันที่ 2-3 หลังการให้เชื้อ ($p < 0.05$, student *t*-test) (ภาพประกอบที่ 1.5A) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาถึงชนิดของเซลล์ที่สร้าง CD25 กลับพบว่าเซลล์กลุ่มหลักที่เป็นแสดง CD25 บนผิวเซลล์ เป็นเซลล์ในกลุ่ม $CD4^+CD8^-$ population (ภาพประกอบที่ 1.5A, B) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายังมีเซลล์ลิมโฟไซต์ population อื่นที่ไม่ได้ทำการศึกษาในการศึกษานี้ (เช่น NK cells, B cells, $\gamma\delta$ T cells เป็นต้น) ที่ได้รับการกระตุ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกๆของการ treatment และน่าจะสอดคล้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด early non-specific response อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับ PRRSV จะทำให้การตอบสนองดังกล่าวนั้นต่ำกว่าสุกรกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าช่วงเวลาของการตอบสนองทางเซลล์ที่ต่ำลงในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสนั้น มีความใกล้เคียงกับระยะเวลาที่มีการสร้าง IL-10 ในสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ซึ่งบ่งชี้ว่าการสร้าง IL-10 ในระบบในช่วงระยะเวลาดังกล่าว น่าจะมีผลในการทำงานของ systemic cellular activation อีกด้วย

1.4 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรป

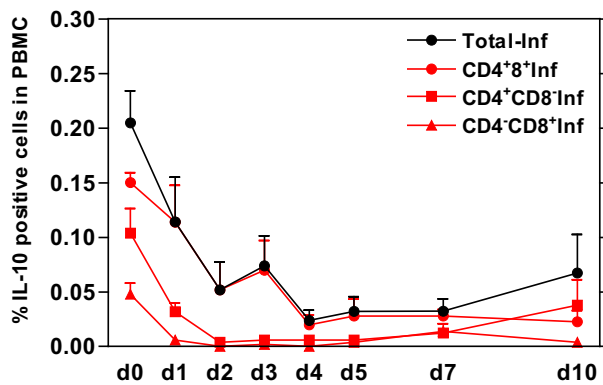
จากผลการวิจัยข้างต้น ชี้ให้เห็นว่า PRRSV สายพันธุ์อเมริกา (strain 01NP1) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง systemic IL10 ในสุกรที่ติดเชื้อในช่วงระหว่างสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามเชื้อ PRRSV ได้ถูกจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มสายพันธุ์ใหญ่ ได้แก่สายพันธุ์อเมริกา (US) และสายพันธุ์ยุโรป (EU) ซึ่งในปัจจุบัน สามารถพบ

การระบาดของไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ในประเทศไทย โดยพบการระบาดของเชื้อสายพันธุ์ยุโรปในอัตราส่วนที่สูงกว่าสายพันธุ์อเมริกา (Thanawongnuwech et al., 2004)

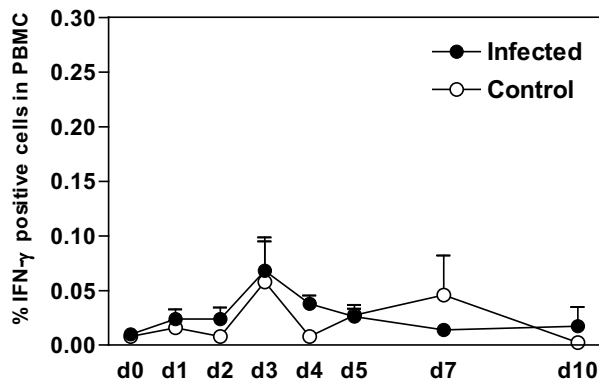
A



B



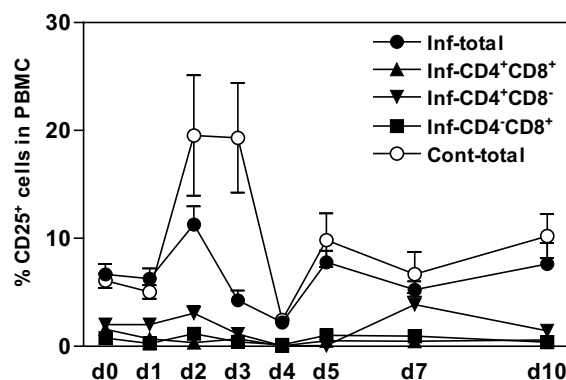
C



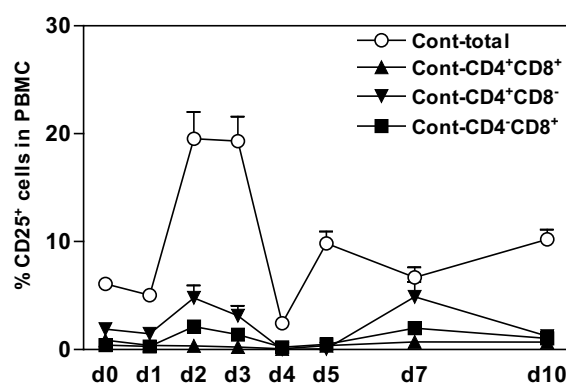
ภาพประกอบที่ 1.4 ปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 (A), ชนิดของเซลล์ที่สร้าง IL-10 (B) และ ปริมาณเซลล์ที่สร้าง IFN- γ (C) จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรทดลอง

สุกรกลุ่มทดลอง (Infected) รับเชื้อ PRRSV (01NP1) ในวันที่ d0 สุกรกลุ่มควบคุม (Control) ได้รับ mock infected cell lysate ในวันเดียวกัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0-5, 7 และ 10 หลังให้เชื้อ และตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์โดยวิธี intracellular cytokine staining และ flow cytometric analysis โดยศึกษาจากเซลล์ที่ gate อยู่ในกลุ่ม ลิมโฟไซต์

A



B



ภาพประกอบที่ 1.5 ปริมาณและ subset ของเซลล์ที่แสดง CD25 (IL-2R) จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรทดลองกลุ่มทดลอง (A) และกลุ่มควบคุม (B)

สุกรกลุ่มทดลอง (Inf) รับเชื้อ PRRSV (01NP1) ในวันที่ d0 สุกรกลุ่มควบคุม (Cont) ได้รับ mock infected cell lysate ในวันเดียวกัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0-5, 7 และ 10 หลังให้เชื้อ และตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ gate จากกลุ่มลิมโฟไซต์ และแสดง CD25 บนผิวเซลล์ ด้วยวิธี surface staining และ flow cytometric analysis

ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิจัยมีความสมบูรณ์ และสามารถตอบปัญหาของประเทศได้มากขึ้น คณะผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มเติม โดยการให้เชื้อ PRRSV ชนิดสายพันธุ์ยุโรปที่แยกได้ในประเทศไทย (strain 02SB3) ปริมาณ 5 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀/ml) แก่สุกรทดลองอายุ 9 สัปดาห์ (5 ต่อกลุ่ม) และและศึกษาการสร้างไซโตไคน์ใน PBMC ของสุกรทดลอง (รายละเอียดระเบียบวิธีวิจัยอยู่ในส่วนอุปกรณ์และวิธีทดลอง ข้อ 3.2)

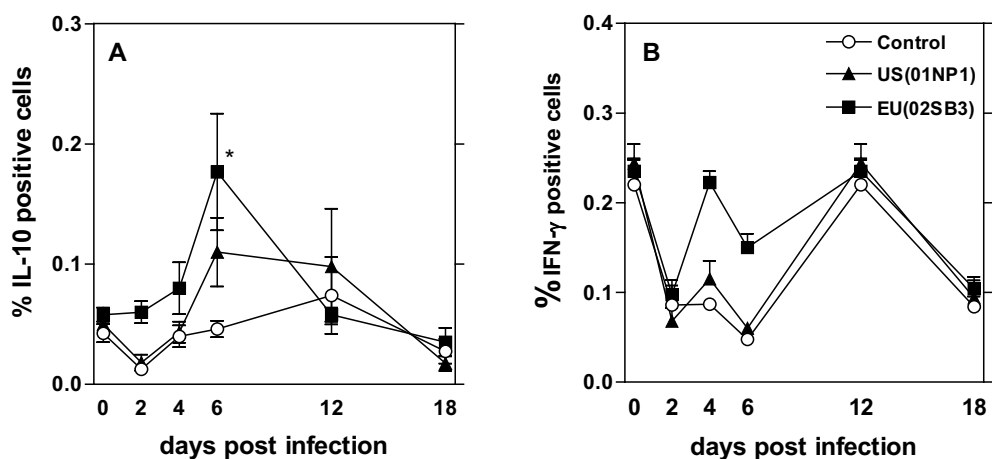
ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรปสามารถกระตุ้นการสร้าง systemic IL-10 เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, ANOVA ตามด้วย Tukey's multiple comparison test) ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อได้เช่นเดียว (ภาพประกอบที่ 1.6A) โดยพบว่าเซลล์ในกลุ่ม CD4⁺CD8⁺ มีบทบาทหลักในการสร้าง IL-10 (data not shown) ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการทดลองข้างต้น และเป็นที่น่าสนใจว่าในการทดลองนี้ ในช่วงวันที่ 4-6 หลังการให้เชื้อจะสามารถตรวจพบการสร้าง IFN- γ ได้เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ EU (ภาพประกอบที่ 1.6B) โดยทั่วไปแล้ว PRRSV สายพันธุ์ยุโรปมักก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่เบากว่าสายพันธุ์อเมริกา ผลการตรวจพบการสร้าง IFN- γ ในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อ อาจสามารถช่วยอธิบายถึงปรากฏการณ์ดังกล่าวได้บางส่วน ทั้งนี้เนื่องจากเคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ว่า IFN- γ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PRRSV ได้ (Bautista & Molitor, 1997) โดยผลการตรวจวัดปริมาณไวรัสในกระแสเลือดจากการทดลองนี้ ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ยุโรปจะมีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสุกรต่ำกว่ากลุ่มสายพันธุ์ US อีกด้วย (ภาพประกอบที่ 1.7)

1.5 การศึกษา dynamic ของการสร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับวัคซีน PRRS สายพันธุ์ยุโรป

เนื่องจากปัจจุบัน มีการอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรปในประเทศไทย แม้ว่าจะยังไม่มีรายงานถึงประสิทธิผลของวัคซีนดังกล่าวในการป้องกันโรค PRRS ที่ระบาดในประเทศไทย อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานก่อนหน้านี้ ในต่างประเทศว่าวัคซีน PRRS มักกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ช้าและไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับวัคซีนเชื้อเป็นชนิดอื่นๆ (Meier et al., 2003) ซึ่งทำให้น่าสงสัยว่าวัคซีนเชื้อเป็นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง systemic IL-10 ได้ในระยะแรกของการให้วัคซีนได้เช่นกัน โดยก่อนหน้านี้ได้เคยมีรายงานว่าวัคซีน PRRS สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 gene ในห้องปฏิบัติการมาแล้ว (Suradhat & Thanawongnuwech, 2004)

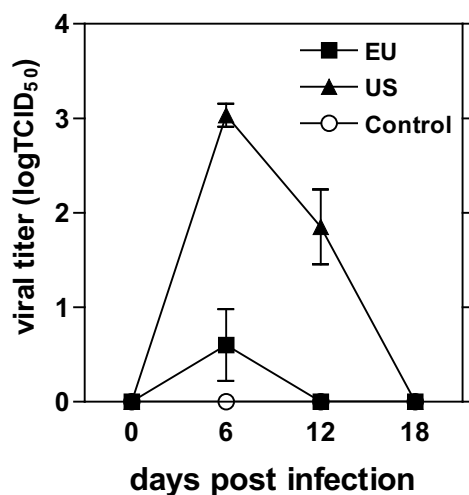
เพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าว ในการทดลองต่อมา ผู้วิจัยจึงทำการให้วัคซีน PRRS เชื้อเป็นชนิดสายพันธุ์ยุโรป (Amervac-PRRSV[®], Laboratorios Hipra) แก่สุกรทดลอง อายุ 3 สัปดาห์ (รายละเอียดระเบียบวิธีวิจัยอยู่ในส่วนอุปกรณ์และวิธีทดลอง ข้อ 3.3) และติดตามการสร้าง IL-10 ของ PBMC จากสุกรดังกล่าว ผลจากการศึกษาพบว่า การให้วัคซีนดังกล่าว สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-10 โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, student *t*-test) ได้เช่นกับ virulent PRRSV strain (ภาพประกอบที่ 1.8)

โดยสรุปจากผลการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมด ในช่วงวัตถุประสงค์ที่ 1 ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อ PRRSV ทั้ง 2 สายพันธุ์ รวมทั้งวัคซีนเชื้อเป็นที่นำมาใช้ในการศึกษา สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง systemic IL-10 แบบไม่จำเพาะขึ้นในสุกรที่ติดเชื้อหรือได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญในระยะสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ และมีหลักฐานที่บ่งชี้ว่าการสร้าง IL-10 ในระบบในช่วงระยะเวลาดังกล่าว น่าจะมีผลในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในระยะดังกล่าวอีกด้วย



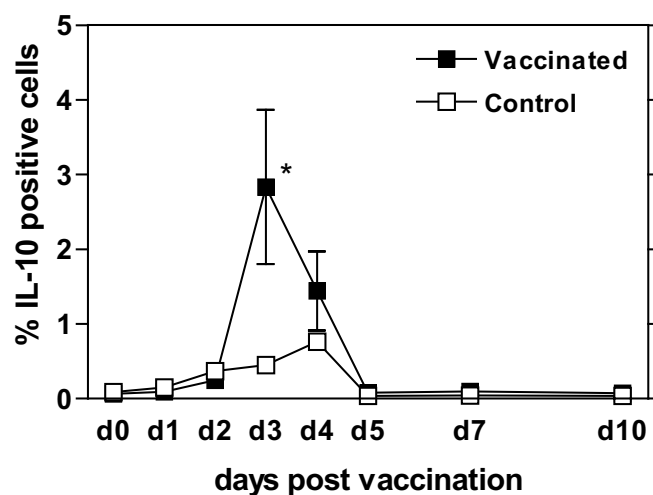
ภาพประกอบที่ 1.6 ปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรทดลอง

สุกรทดลองกลุ่ม US ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) กลุ่ม EU ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ที่แยกได้ในประเทศไทย ในวันที่ 0 สุกรกลุ่มควบคุม (Control) ได้รับ mock infected cell lysate ในวันเดียวกัน ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์โดยวิธี intracellular cytokine staining และ flow cytometric analysis โดยศึกษาจากเซลล์ที่ gate อยู่ในกลุ่มลิมโฟไซต์ * แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพประกอบที่ 1.7 ปริมาณไวรัส PRRSV ที่แยกได้จากซีรัมของสุกรทดลอง

สุกรทดลองกลุ่ม US ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์อเมริกา (01NP1) กลุ่ม EU ได้รับเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ยุโรป (02SB3) ที่แยกได้ในประเทศไทย ในวันที่ 0 สุกรกลุ่มควบคุม (Control) ได้รับ mock infected cell lysate ในวันเดียวกัน



ภาพประกอบที่ 1.8 ปริมาณเซลล์ที่สร้าง IL-10 จาก PBMC ที่แยกได้จากสุกรทดลองที่ได้รับวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น

สุกรกลุ่มทดลองได้รับวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป สุกรกลุ่มควบคุม (Control) ได้รับ vaccine diluent ในวันเดียวกัน ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์โดยวิธี intracellular cytokine staining และ flow cytometric analysis โดยศึกษาจากเซลล์ที่ gate อยู่ในกลุ่มลิมโฟไซต์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (see text)

วัตถุประสงค์ที่ 2 การศึกษาผลของการได้รับเชื้อ PRRSV ที่มีต่อประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร

ระเบียบวิธีวิจัย

1) คัดเลือกสุกรหย่านม อายุ 17 วัน จากฟาร์มเอกชนที่ปลอดโรคอหิวาต์สุกร และ พี อาร์ อาร์ เอส โดยการตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อทั้งสองชนิดในลูกสุกร โดยจะต้องตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRSV (seronegative) และมีค่า maternal derived SN titer ต่อ CSFV (ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สุกรที่ได้รับวัคซีนตามโปรแกรมของฟาร์ม) ที่ต่ำกว่า 32 แบ่งสุกรออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5-7 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) รายละเอียดของการให้เชื้อและวัคซีนของสุกรกลุ่มต่างๆ มีดังนี้

- วันที่ 0 (D0) ทำการ inoculate สุกรกลุ่ม C และ D ด้วยเชื้อ PRRSV ชนิด US genotype สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย (strain 01NP1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml โดยการหยอดจมูก ข้างละ 2.5 ml ส่วนสุกรกลุ่มอื่นๆ (A B และ E) ได้รับ mock infected MARC-145 cell lysate ในปริมาณที่เท่ากันหยอดจมูก
- วันที่ 7 (D7) ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรชนิด lapinized Chinese strain Lot No. 47/46 (กรมปศุสัตว์) ให้แก่สุกรกลุ่ม B และ D โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณ 1 ml ต่อตัว ส่วนสุกรกลุ่มอื่นๆ (A C และ E) ได้รับเฉพาะ diluent ของวัคซีนในปริมาณที่เท่ากัน
- วันที่ 28 (D28) ฉีดพิชัท (challenge) ให้สุกรกลุ่ม A-D โดยใช้เชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง (strain Bangkok 1950) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ขนาด at least 10^5 PLD₅₀/ml ต่อตัว โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณ 1 ml
- วันที่ 41 (D41) สิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 2.1 รายละเอียดการทดลองในสุกรแต่ละกลุ่ม

Group	PRRSV inoculation (D0)	CSFV vaccination (D7)	CSFV challenge (D28)
A	-	-	+
B	-	+	+
C	+	-	+
D	+	+	+
E	-	-	-

3) รายละเอียดการเก็บข้อมูลตัวอย่างในระหว่างการทดลอง มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- จัดบันทึก clinical sign ของสุกรทุกกลุ่มทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง
- เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาเชื้อ PRRSV เชื้อ CSFV ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41
- เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหาระดับ serum neutralizing antibody titer ต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และระดับ antibody titer ต่อเชื้อ PRRSV (IDEXX™ ELISA) ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41

- เก็บตัวอย่างเลือด (heparinized whole blood) จากสุกรทดลอง เพื่อทำการศึกษาทาง hematology และตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ในวันที่ 0, 3, 5, 7 และ 13 ภายหลังการฉีดพิษด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร
- เก็บตัวอย่าง heparinized whole blood เพื่อนำมาแยก PBMC นำเซลล์ที่ได้มา culture ร่วมกับ CSFV (*in vitro* activation) จากนั้นตรวจวัดปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ secreting cells โดยวิธี ELISPOT assay (Suradhat & Damrongwatanapokin, 2002) และตรวจหาปริมาณของ CSFV-specific IFN- γ และ IL-10 producing cells รวมทั้งวิเคราะห์แยก lymphocyte subpopulation ที่สร้าง cytokine โดยวิธี flow cytometric analysis โดยวิธีของ Suradhat และคณะ (Suradhat et al., 2005) ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 41
- ในวันสุดท้ายของการทดลอง (D41) หรือในกรณีที่มีสุกรเสียชีวิตหรือแสดงอาการป่วยหนักมาก (succumb to death) ก่อนสิ้นสุดการทดลอง ทำการ euthanize สุกรทดลอง จากนั้นทำการผ่าซากเพื่อตรวจหาความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (pathological change) และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุกรทุกตัวเพื่อทำการแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และส่งตัวอย่างเพื่อตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย (ในกรณีที่สงสัย)
- เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสุกรทุกตัวเพื่อตรวจหาความเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological change) โดยมุ่งเน้นการเปลี่ยนแปลงที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์สุกรเป็นหลัก

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) จำนวนสุกรและอาการทางคลินิก

ตารางที่ 2.2 แสดงจำนวนของสุกรทดลองในแต่ละกลุ่มตลอดการทดลอง และอัตราการรอดตายของสุกรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ภายหลังจากการให้เชื้อ PRRSV (D0) สุกรกลุ่ม C และ D เริ่มแสดงอาการของโรคพี อาร์ อาร์ เอส โดยจะพบอาการซึม เบื่ออาหาร นอนสุมกัน และหายใจหอบ ในช่วงวันที่ 2-16 ของการทดลอง (D2-16) นอกจากนี้ยังพบอาการตาบวมและเยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) ร่วมด้วย สุกรแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจมากที่สุดในช่วงวันที่ 4-5 ของการทดลอง และ recover จากโรคในวันที่ 16 ของการทดลอง นอกจากนี้พบว่า สุกร 3 ตัว ในกลุ่ม C ตายจากการติดเชื้อ *Haemophilus spp.*² (Glasser's disease) ในวันที่ 10 11 และ 18 และมีสุกรจากกลุ่ม D ตายจากภาวะติดเชื้อ *Haemophilus spp.* 1 ตัว ในวันที่ 12 ส่วนสุกรที่อยู่ในกลุ่มอื่นไม่แสดงอาการทางคลินิกที่ผิดปกติใดๆ ภายหลังจากการให้ mock infected MARC-145 lysate

สุกรกลุ่ม B ไม่แสดงอาการผิดปกติทางคลินิกใดๆ ภายหลังจากให้วัคซีน และการฉีดพิษทับ นอกจากนี้ยังไม่พบอาการ leukopenia ในสุกรกลุ่มนี้ภายหลังจากการให้เชื้ออหิวาต์สุกร (ภาพประกอบที่ 2.1) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า วัคซีนสามารถกระตุ้นต้านทานโรคได้อย่างสมบูรณ์

ภายหลังจากฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง (D28) พบว่าสุกรกลุ่ม A เริ่มแสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกรอย่างชัดเจนและอย่างรุนแรง เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ของการให้เชื้อ โดยมีอาการซึม เบื่ออาหาร ขนหอยง มีไข้ (rectal temperature > 40°C) leukopenia (WBC < 9,000 cells/mm³) หายใจหอบ นอนสุมรวมกัน สิ้น อูจจะระร่วง พบจุดเลือดออกที่บริเวณผิวหนัง ในระยะหลังสุกรจะนอนในลักษณะ lateral recumbency และแสดงอาการชัก

² เชื้อ *Haemophilus spp.* เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสซึ่งพบได้ในสุกร โดยมักก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ (Glasser's disease) เมื่อสุกรอยู่ในภาวะที่มีการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunocompromised)

โดยเริ่มตายตั้งแต่วันที่ 9 หลังการให้เชื้อ (D37) และเสียชีวิต ทั้งหมดภายใน 11 วันหลังการให้เชื้อ (D39) ส่วนสุกรกลุ่ม C พบอาการของโรคอหิวาต์สุกรที่รุนแรงใกล้เคียงกับกลุ่ม A โดยเริ่มตายในวันที่ 33-37 ของการทดลอง สุกรกลุ่ม D ซึ่งได้เชื้อ PRRSV มาก่อนการทำการวัคซีนอหิวาต์สุกร แสดงอาการของโรคเช่นกัน แต่ไม่รุนแรงเท่ากลุ่ม A และ C อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าสุกรในกลุ่มนี้ตายลงภายหลังการได้รับเชื้อ ในเวลาที่รวดเร็วกว่ากลุ่มควบคุม (A) โดยเริ่มมีสุกรตายตั้งแต่วันที่ 33-36 ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกับกลุ่ม C ในวันสุดท้ายของการทดลองมีสุกร 1 ตัวที่มีชีวิตรอดจากการฉีดพิษหับ โดยสุกรมีปริมาณเม็ดเลือดขาวกลับเข้าสู่ระดับเดียวกับกลุ่ม B และ E (ภาพประกอบที่ 2.1) ข้อสังเกตดังกล่าวได้เคยมีการรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ว่าการได้รับเชื้อ PRRSV จะเร่งให้มีการดำเนินไปของโรคอหิวาต์สุกรที่เร็วขึ้น (Depner et al., 1999) อย่างไรก็ตาม สาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติม

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการรอดของสุกรในกลุ่ม D ต่ำกว่าสุกรในกลุ่ม B อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Fisher's exact test) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่ม A และ C) ส่วนในสุกรกลุ่ม E (naïve) ไม่ได้แสดงอาการผิดปกติทางคลินิกใดๆ ตลอดช่วงเวลาของการศึกษา

2) ผลการตรวจทางไวรัสวิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยาจากตัวอย่างซีรัมและอวัยวะภายในของสุกร แสดงให้เห็นว่าวัคซีนอหิวาต์สุกรสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโรคได้อย่างสมบูรณ์ในสุกรกลุ่ม B โดยในการศึกษานี้ไม่สามารถแยกเชื้อได้จากทั้งซีรัม (ตารางที่ 2.3) และอวัยวะภายใน (ตารางที่ 2.4) ภายหลังจากการฉีดพิษหับ ในขณะที่สามารถแยกเชื้ออหิวาต์สุกรได้จากทั้งซีรัมและอวัยวะภายในของสุกรกลุ่ม D ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (กลุ่ม A และ C)

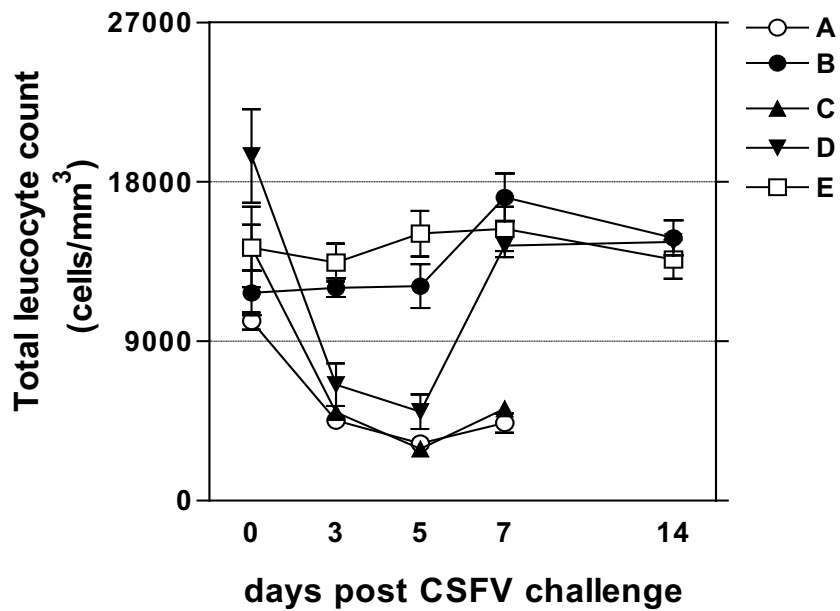
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (ตารางที่ 2.5) และจุลพยาธิวิทยา (ตารางที่ 2.6) ที่ได้จากการศึกษานี้ ต่างก็สอดคล้องกับผลการศึกษาทางคลินิกและไวรัสวิทยา กล่าวคือพบพยาธิสภาพและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่จำเพาะกับโรคอหิวาต์สุกรอย่างเด่นชัด ในสุกรกลุ่ม A C และ D ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิในอวัยวะภายในของสุกรในกลุ่ม B และ E แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในกลุ่ม D มีแนวโน้มที่ต่ำกว่ากลุ่ม A (ตารางที่ 2.6) ส่วนผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียแสดงไว้ใน ตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.2 กลุ่มสุกรทดลองและจำนวนสุกรทดลองมีชีวิตในระหว่างการทดลอง

Gr.	Treatments			(PRRSV)	(Vaccine)	(CSFV)	Survival		
	PRRSV	Vaccine	CSFV	D0	D7	D28	D35	D41	rate (%)
A	-	-	+	5	5	5	5	0	0
B	-	+	+	5	5	5	5	5	100
C	+	-	+	7	7	4 ^a	1	0	0
D	+	+	+	6	6	5 ^b	2	1	20
E	-	-	-	5	5	5	5	5	100

^a สุกร 3 ตัวตายจากการติดเชื้อ *Haemophilus spp.* (Glasser's disease) ในวันที่ 10 11 และ 18

^b สุกร 1 ตัวตายจากภาวะติดเชื้อ *Haemophilus spp.* ในวันที่ 12



ภาพประกอบที่ 2.1 ปริมาณเม็ดเลือดขาวในสุกรทดลองภายหลังจากการฉีดพิษด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร
 สุกรทดลอง กลุ่ม C (▲) และ D (▼) ได้รับเชื้อ PRRSV ในวันที่ 0 สุกรกลุ่ม B (●) และ D (▼) ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 7 สุกรทุกกลุ่ม (A-D) ได้รับการฉีดพิษด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง ยกเว้นกลุ่ม E (□)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณเชื้อไวรัสจากตัวอย่างซีรัมสุกรในระยะเวลาต่างๆ ของการทดลอง

	D0 (P)	D7 (V)	D14	D28 (C)	D31	D33	D35	D38	D41
PRRSV titer^a									
A (- / - /C)	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	na ^c
B (- / V /C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (P/ - /C)	-	3.5	<2	-	-	-	-	na	na
D (P/ V /C)	-	3.25	3	2.5	2.5	2.25	2.5	-	-
E (- / - / -)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSFV titer									
A (- / - /C)	-	-	-	-	3.68	6.97	7.97	-	na
B (- / V /C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (P/ - /C)	-	-	-	-	4.80	6.30	7.8	na	na
D (P/ V /C)	-	-	-	-	4.63	6.97	6.97	2.97	-
E (- / - / -)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a viral titers from pooled serum sample (logTCID₅₀/ml)

^b Negative

^c Not applicable due to animal death

Treatments (P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine, -; no treatment)

ตารางที่ 2. 4 ปริมาณเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้จากอวัยวะภายในของสุกรทดลองภายหลังการฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Gr. (treatment)	Viral titers (log TCID ₅₀ /gram)				
	A (-/-/C)	B (-/V/C)	C (P-/C)	D (P/V/C)	E (-/V/-)
Brain	4.13 ± 0.60 ^a	0 ^b	4.80 ± 0.71 ^a	2.80 ± 0.17 ^c	0 ^b
Tonsil	4.08 ± 0.19 ^{a,b}	0 ^c	4.55 ± 1.77 ^a	3.25 ± 0.58 ^b	0 ^c
Lung	4.32 ± 0.62 ^a	0 ^b	3.72 ± 1.47 ^{a,c}	2.66 ± 1.05 ^c	0 ^b
Spleen	3.84 ± 0.63 ^a	0 ^b	4.11 ± 2.26 ^a	4.06 ± 1.06 ^a	0 ^b
Kidney	3.81 ± 0.83 ^a	0 ^b	5.14 ± 0.23 ^c	3.45 ± 0.89 ^a	0 ^b
Lymph nodes	3.89 ± 0.63 ^a	0 ^b	5.22 ± 0.83 ^c	3.36 ± 0.42 ^a	0 ^b

* Data represents mean ± SD virus titers (log TCID₅₀/gr)

^{a-c} indicates statistical differences among the experimental groups (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$)

Treatments: P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine

ตารางที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (macroscopic lesion) ที่พบในอวัยวะภายในของสุกรทดลอง

	Experimental group (treatments)				
	A (-/-/C) ^a	B (-/V/C)	C (P/-/C)	D (P/V/C)	E (-/-/-)
Pneumonia	100 ^b	0	100	100	0
Lymphadenopathy					
- inguinal Ln.	75	0	75	75	0
- tracheobroncheal Ln.	75	0	100	75	0
- mandibular Ln.	100	0	100	100	0
- mesenteric Ln.	40	0	40	40	0
Thymic atrophy	100	0	100	100	0
Haemorrhage					
- skin	60	0	40	20	0
- lymph node	60	0	40	40	0
- kidney	60	0	20	60	0
- tonsil	0	0	0	20	0
- gastric mucosa	0	0	20	0	0
Splenic infarction	0	0	20	75	0
Brain congestion	100	0	100	100	0
Gastric infarction	20	0	20	0	0
Fibrinous pleuritis	0	0	20	0	0
Fibrinous peritonitis	0	0	20	0	0

^a Treatments (P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine, -; no treatment)

^b Percentage of animal with CSF lesion in the group

ตารางที่ 2.6 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ที่พบในอวัยวะต่างๆ ของสุกทดลอง

	Experimental group (treatments)				
	A (-/C) ^a	B (-V/C)	C (P-/C)	D (P/V/C)	E (-/-/-)
Brain					
non-suppurative meningoencephalitis	1.6 ^b	0	1.6	1	0
Thymus					
lymphoid depletion	1.5	0	1.5	0.8	0
Tonsil					
lymphoid depletion	1.4	0	1.2	0.8	0
Lymph node (lymphoid depletion)					
tracheobroncheal Ln.	1.2	0	1	0.8	0
mesenteric Ln	1.4	0.2	1	1	0
inguinal Ln.	1.4	0.2	1	1	0
Spleen					
lymphoid depletion	1.4	0	1.2	1	0
Ileum					
lymphoid depletion	0.75	0	0.67	0.6	0
Lung					
Lymphohistiocytic interstitial pneumonia					
Peribronchiolar & perivascular lymphoid	0	2	1.4	2.2	0
hyperplasia	1	2	1	2	0
Kidney					
Hemorrhage	1.3	0	1.7	0.2	0

^a Treatments (P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine, -; no treatment)

^b mean histopathological score of the group (ranged from nil; 0, mild; 1, moderate; 2, severe; 3)

ตารางที่ 2.7 ผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากสุกรทดลองหลังการฉีดพิษหัดด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร

Group (Treatments)*	Isolated bacteria
A (-/-/C)	<i>Streptococcus spp.</i> (α -hemolysis)
	<i>Streptococcus spp.</i> (non-hemolysis)
	<i>Hemophilus spp.</i>
	<i>E. coli</i>
B (-/N/C)	-
C (P/-/C)	<i>Streptococcus spp.</i> (α -hemolysis)
	<i>Streptococcus spp.</i> (non-hemolysis)
	<i>Hemophilus spp.</i>
	<i>E. coli</i>
D (P/V/C)	<i>Salmonella spp.</i> (Gr. B)
	<i>Streptococcus spp.</i> (α -hemolysis)
	<i>Hemophilus spp.</i>
E (-/-/-)	<i>E. coli</i>
	-

* Treatments (P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine, -; no treatment)

ผลการตรวจวัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรทดลอง

ผลการตรวจทางซีรั่มวิทยา

ผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRSV ของสุกรทดลอง พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อ PRRSV ส่วนใหญ่เริ่มมี seroconversion ต่อเชื้อ PRRSV ในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังการได้รับเชื้อ (ตารางที่ 2.8) นอกจากนี้ไม่พบ seroconversion ในสุกรกลุ่มอื่นๆ ตลอดการทดลอง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าไม่มีการ cross contamination ของเชื้อ PRRSV ในระหว่างกลุ่มสุกรทดลอง

ในวันที่ 7 ของการทดลองสุกรทุกกลุ่มมีระดับ maternal derived antibody เฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$, ANOVA) และต่ำกว่า 32 ซึ่งเป็นระดับที่มีการศึกษายืนยันไว้แล้วว่าจะไม่แสดงผลรบกวนต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร (Suvintrakorn et al., 1993) ภายหลังการให้วัคซีนอหิวาต์สุกร สุกรในกลุ่ม B มีระดับ serum neutralizing (SN) titer เพิ่มขึ้นซึ่งแสดงถึงการตอบสนองต่อการให้วัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, paired t -test) และแสดงให้เห็นถึง anamnestic response เมื่อได้รับเชื้อพิษ โดยมีระดับ anti-CSFV SN titer สูงขึ้นโดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (D41) สุกรกลุ่มนี้มีค่าเฉลี่ย SN titer ที่สูงกว่าวันที่ 7 ของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$, ANOVA ตามด้วย Tukey's multiple comparison test) ในขณะที่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับ SN titer ในกลุ่ม D ภายหลังการให้วัคซีน หรือในสุกรที่รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพประกอบที่ 2.2)

ผลการตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ในสุกรทดลอง

การศึกษาการสร้าง CSFV-specific interferon-gamma (IFN- γ) โดยวิธี flow cytometry ไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ antigen-specific IFN- γ producing cells ใน PBMC ของสุกรภายหลังการให้วัคซีน อย่างไรก็ตาม ภายหลังการฉีดพิษพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ IFN- γ^+ cells ใน PBMC ของสุกรกลุ่ม B ($p < 0.05$, paired t -test) ภายหลังการฉีดพิษ จากนั้นปริมาณของ IFN- γ^+ cells จะลดลงสู่ภาวะปกติ ซึ่งบ่งชี้ถึง anamnestic response และเมื่อพิจารณาพร้อมกับความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคโดยสมบูรณ์ดังแสดงไว้ข้างต้น แสดงให้เห็นว่ามีการ primed ของระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถให้ complete protection ได้ (ภาพประกอบที่ 2.3A) เป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่มสุกรทดลองซึ่งได้รับเชื้อ PRRSV มาก่อน ไม่ว่าจะได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรมาก่อนหรือไม่ก็ตาม จะมีปริมาณของ IFN- γ^+ cells ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มอื่นๆ ในสุกรกลุ่ม D ซึ่งมีสุกรเพียง 1 ตัวที่รอดชีวิต โดยที่สุกรนั้นมีระดับ IFN- γ^+ cells ที่ลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพประกอบที่ 2.3A) จากการศึกษาที่ผ่านมา การเพิ่มสูงขึ้นของ IFN- γ^+ cells เป็นปริมาณมากๆ มักบ่งชี้ถึงภาวะของ overwhelmed infection ในสุกรทดลอง (Suradhat et al., 2001) ซึ่งมักพบในระยะท้ายของการติดเชื้อซึ่งมักจะมีภาวะ bacterial septicemia จากการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ร่วมด้วย (ตารางที่ 2.7) จากการศึกษากลุ่มประชากร lymphocyte ที่สร้าง IFN- γ พบว่าเซลล์กลุ่ม CD8 $^+$ เป็นเซลล์กลุ่มหลักที่สร้าง IFN- γ ในสุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนภายหลังการฉีดพิษ ในขณะที่ยุทธศาสตร์ประชากรของสุกรกลุ่มควบคุมจะมีการสร้าง IFN- γ เพิ่มขึ้นภายหลังการฉีดพิษ (ภาพประกอบที่ 2.4)

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ จะพบความไม่สอดคล้องของผลการตรวจวัดหา IFN- γ secreting cells ระหว่างวิธี flow cytometry และโดยวิธี ELISPOT อยู่บ้าง โดยพบว่ากลุ่มสุกรที่ได้รับ PRRSV มาก่อนจะมีปริมาณของ IFN- γ ที่สูงมากก่อนการฉีดพิษ ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมาจากสาเหตุของการมี bacterial complication ที่สูงขึ้นในกระแสดเลือด ซึ่งเมื่อนำเซลล์มาทำการกระตุ้นในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* activation) ก่อนการตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ จะพบ non-specific activation ของเซลล์ lymphocyte เพิ่มขึ้นใน culture system เพิ่มมากขึ้น อีกทั้ง

เทคนิค ELISPOT ไม่สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตออกจากเซลล์ที่ตายลงระหว่างการ culture ได้ ดังนั้นจึงอาจสามารถตรวจพบการสร้าง IFN- γ แบบ non-specific activation ได้มากกว่าการใช้ flow cytometric analysis (ภาพประกอบที่ 2.5)

เป็นที่น่าสังเกตว่าสุกรทดลองกลุ่มที่เคยได้รับเชื้อ PRRSV จะมีปริมาณของ IL-10⁺ cells ใน PBMC เพิ่มขึ้น เมื่อนำมากระตุ้นในห้องปฏิบัติการด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรโดยเฉพาะในช่วง 2-3 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ จากนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งภายหลังการฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกร (ภาพประกอบที่ 2.3B) ในกรณีนี้การสร้าง IL-10 ที่ตรวจพบก่อนการฉีดพิษทับ ไม่น่าจะจำเพาะต่อเชื้ออหิวาต์สุกร ทั้งนี้เนื่องจากสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนแต่ได้รับเชื้อ PRRSV ก็มีการสร้าง IL-10 ในลักษณะเดียวกัน ก่อนหน้านั้นเคยมีรายงานว่า การเติมเชื้อ PRRSV ลงใน culture system สามารถเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 จาก CSFV-primed PBMC ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Suradhat et al., 2003) การกระตุ้นการสร้าง IL-10 ที่พบในกรณีนี้อาจเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของเซลล์ที่ติดเชื้อ PRRSV เข้ามาในระบบ culture system นอกจากนี้ภายหลังการฉีดพิษทับจะพบว่าการสร้าง IL-10 จะเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม D โดยพบว่าเซลล์กลุ่ม CD8⁺ เป็นเซลล์กลุ่มหลักที่สร้าง IL-10 ในสุกรภายหลังการได้รับเชื้ออหิวาต์สุกร (ภาพประกอบที่ 2.4)

สรุป

โดยสรุปจากการทดลองนี้ พบว่าเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ 01NP1 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร (กลุ่ม C และ D) ได้ตามที่คาดไว้ เชื้ออหิวาต์สุกร (Bangkok 1950) ที่นำมาใช้ฉีดพิษทับในการศึกษานี้มีความรุนแรงที่จะก่อให้เกิดโรคอหิวาต์สุกรได้ และทำให้สุกรทดลองที่ได้รับเชื้อมีแสดงอาการป่วยที่รุนแรงและมีอัตราการตายที่สูงถึง 100% (กลุ่ม A และ C) ส่วนวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ใช้ในการศึกษา มีประสิทธิภาพดี และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สามารถต้านทานการเกิดโรคจากการได้รับเชื้อพิษได้อย่างสมบูรณ์ (กลุ่ม B) อย่างไรก็ตามการได้รับเชื้อ PRRSV แก่สุกรทดลองในช่วง 7 วันก่อนให้วัคซีนอหิวาต์สุกร (กลุ่ม D) มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการให้วัคซีนในช่วงเวลาดังกล่าว ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในสุกรทดลองได้ (กลุ่ม D) โดยสุกรทดลองแสดงอาการป่วยและมีการแพร่กระจายของเชื้ออหิวาต์สุกรที่ไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (กลุ่ม A และ C) ผลการตรวจวัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรทดลอง แสดงให้เห็นว่าการได้รับเชื้อ PRRSV มาก่อนการให้วัคซีน จะมีผลต่อรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรทั้งชนิดเซลล์และแอนติบอดี นอกจากนี้ยังตรวจพบการเพิ่มสูงขึ้นของเซลล์ที่สร้าง IL-10 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSV เมื่อนำมากระตุ้นในห้องปฏิบัติการ ในช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกันกับที่สุกรได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกร ผลจากการศึกษานี้ชี้ว่าการมี IL-10 เพิ่มขึ้นในระบบภายหลังจากสุกรได้รับเชื้อ PRRSV น่าจะมีผลในเชิงลบต่อความสามารถของสุกรในการตอบสนองต่อการทำวัคซีน และมีผลต่อความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคภายหลังการฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในที่สุด

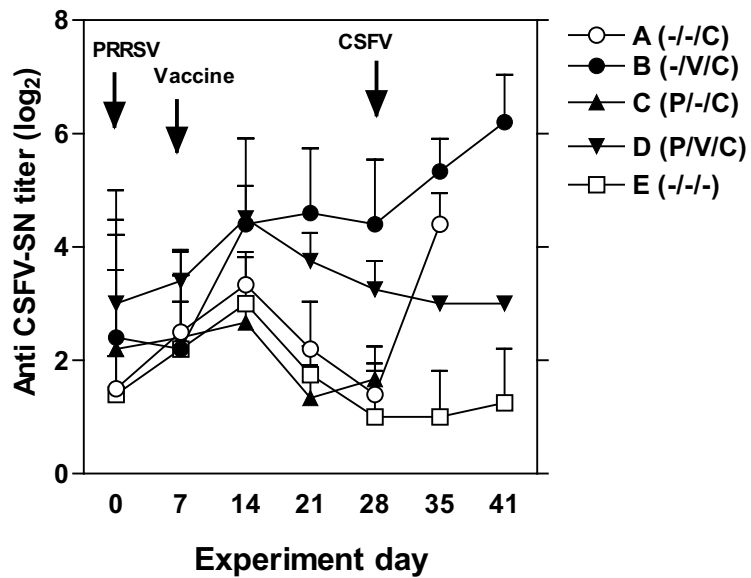
ตารางที่ 2.8 ระดับแอนติบอดีไคเตอร์ต่อเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส ของสุกรในระยะเวลาต่างๆ ของการทดลอง

GROUPS (Treatment)	Mean S/P ratio ^a (% pig positive)						
	D0 (P)	D7 (Vac)	D14	D21	D28 (C)	D35	D38
A (- / - /C)	0	0.02	0.016	0.01	0.018	0.017	0.05
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	0	0.035	0.012	0.092	0.011	0.041	0.009
B (- / V/C)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
C (P/ - /C)	0.003	0.157	1.095	1.838	1.44	1.306	na ^b
	(0)	(0)	(80)	(100)	(66.67)	(66.67)	
D (P/ V /C)	0.002	0.273	0.959	1.016	0.745	1.061	2.379
E (- / - / -)	(0)	(16.67)	(60)	(60)	(75)	(100)	(100)
	0.05	0.016	0.032	0.108	0.01	0.009	0.008
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

^a Cut-off value for PRRSV-seropositive when S/P ratio $\geq$ 0.4 (IDEXX[®] ELISA test kit)

^b not applicable due to animal death

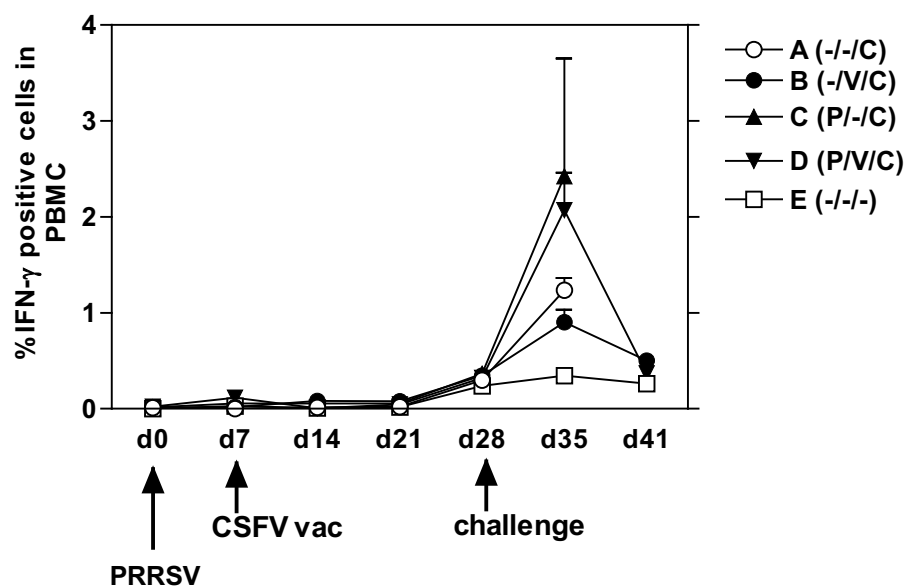
Treatments (P; PRRSV, C; CSFV challenge, Vac; CSFV Vaccine, -; no treatment)



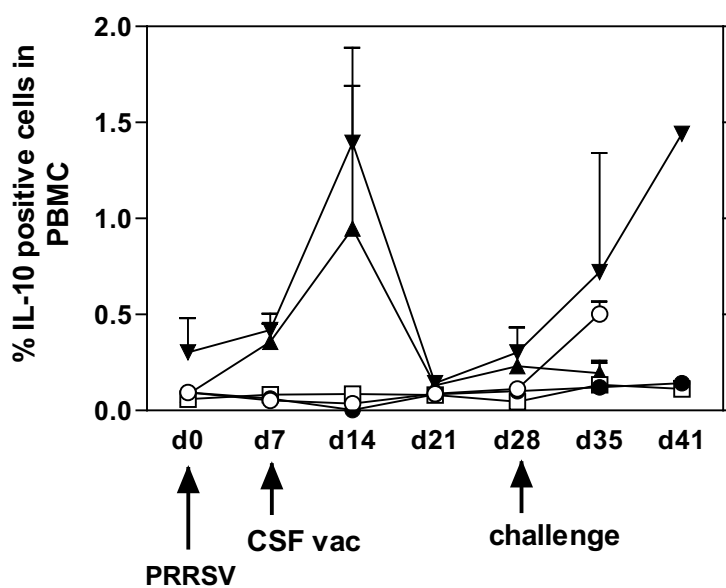
ภาพประกอบที่ 2.2 ระดับค่าเฉลี่ยของ neutralizing antibody titer ($\pm$ SD) ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรจากสุกรทดลอง

สุกรทดลอง กลุ่ม C (▲) และ D (▼) ได้รับเชื้อ PRRSV ในวันที่ 0 สุกรกลุ่ม B (●) และ D (▼) ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 7 สุกรทุกกลุ่ม (A-D) ได้รับการฉีดพิษตับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง ยกเว้นกลุ่ม E (□)

A

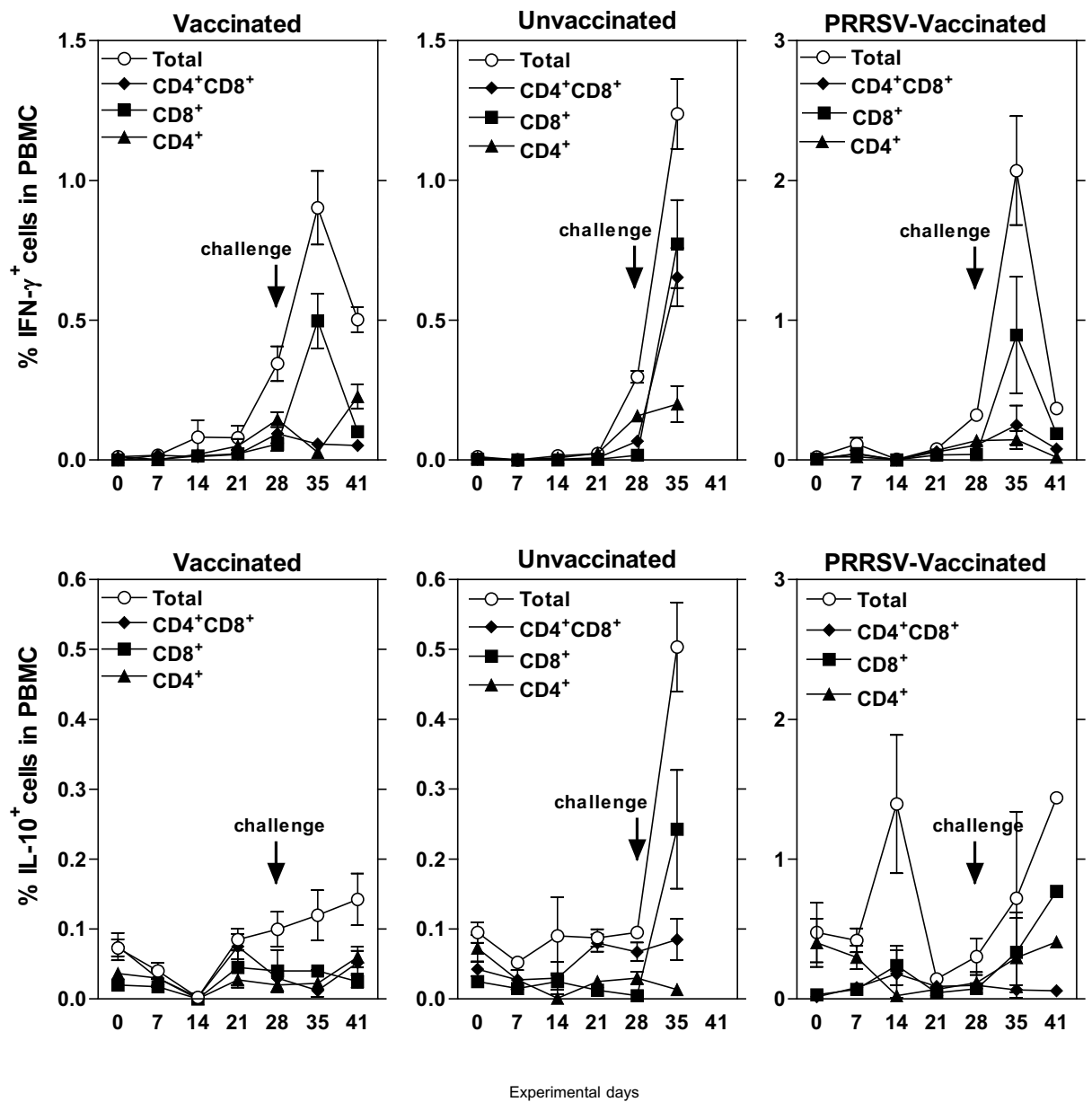


B



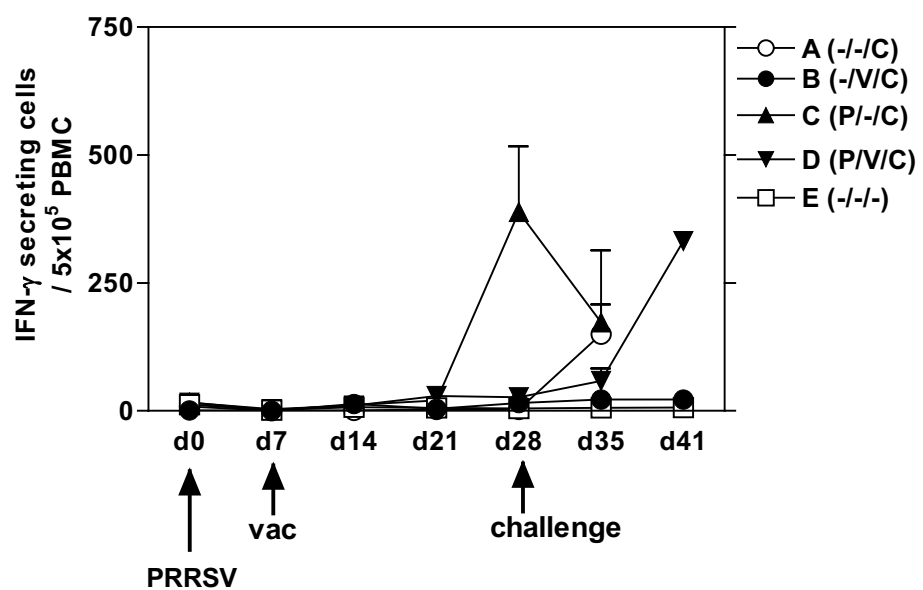
ภาพประกอบที่ 2.3 ปริมาณของ cytokine producing cells ที่ตรวจวัดโดยวิธี flow cytometry

สุกรทดลอง กลุ่ม C (▲) และ D (▼) ได้รับเชื้อ PRRSV ในวันที่ 0 สุกรกลุ่ม B (●) และ D (▼) ได้รับวัคซีนป้องกันโรคคอหิวด์สุกรในวันที่ 7 สุกรทุกกลุ่ม (A-D) ได้รับการฉีดพิษตับด้วยเชื้อคอหิวด์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง ยกเว้นกลุ่ม E (□)



ภาพประกอบที่ 2.4 ชนิดของเซลล์ลิมโฟไซต์จาก PBMC ที่สร้างไซโตไคน์ของสุกรทดลอง

สุกรทดลอง (panel ขวา) ได้รับเชื้อ PRRSV ในวันที่ 0 และได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 7 (panel ขวา, ซ้าย) สุกรทุกกลุ่มได้รับการฉีดพิษหัดด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง



ภาพประกอบที่ 2.5 ปริมาณของ IFN- γ secreting cells จาก PBMC ของสุกรทดลอง ที่ตรวจวัดโดยวิธี ELISPOT

สุกรทดลอง กลุ่ม C (▲) และ D (▼) ได้รับเชื้อ PRRSV ในวันที่ 0 สุกรกลุ่ม B (●) และ D (▼) ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในวันที่ 7 สุกรทุกกลุ่ม (A-D) ได้รับการฉีดพิษตับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรในวันที่ 28 ของการทดลอง ยกเว้นกลุ่ม E (□)

วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

โดยทั่วไปการติดเชื้อ PRRSV มักจะไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ innate immunity ได้ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับ respiratory pathogen ชนิดอื่น (Van Reeth et al., 1999) การพัฒนาการทำงานของ specific immunity ก็มักจะใช้เวลานานและไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร รวมทั้งการติดเชื้อ PRRSV มักนำไปสู่การลดการทำงานของกลไกป้องกันการติดเชื้อภายในปอด (Meier et al., 2003) นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่าเชื้อ PRRSV มักมีผลกดการทำงานของ T cell ของสัตว์ที่ติดเชื้ออีกด้วย (Aasted et al., 2002, Xiao et al., 2004) จากหลักฐานเหล่านี้ทำให้มีการตั้งสมมติฐานว่า เชื้อ PRRSV น่าจะมีความสามารถในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยผ่านกลไกบางอย่าง อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลกระทบของการติดเชื้อ PRRSV ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกร มักจะให้ผลที่ขัดแย้งกันจนหาข้อสรุปไม่ได้ (Murtaugh et al., 2002) สาเหตุของความขัดแย้งดังกล่าวน่าจะประกอบจากหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะของการติดเชื้อ PRRSV ที่นำมาทำการศึกษา immunocompetency ของสุกรทดลอง และ interaction ระหว่างเชื้อ PRRSV กับวัคซีนหรือเชื้อชนิดอื่นที่นำมาใช้ศึกษาด้วย เป็นต้น

พยาธิกำเนิดของโรค PRRS สามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วงใหญ่ๆ (Beyer et al., 2000) ได้แก่ ช่วง early acute phase ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลา 2 สัปดาห์แรกภายหลังได้รับเชื้อ โดยจะพบ viremia อย่างรวดเร็ว ภายหลังการติดเชื้อ PRRSV โดยจะสามารถพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ตั้งแต่วันแรกของการติดเชื้อ (Duan et al., 1997b, Halbur et al., 1996) จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะน้ำเหลืองทั่วร่างกาย ตามมาด้วยระยะ delayed acute phase ในช่วง 2-3 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ ซึ่งจะพบเชื้อได้ที่บริเวณปอดเป็นหลัก จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ persistent phase ซึ่งอาจมีระยะเวลายาวนานหลายเดือน เชื้อจะหลบอยู่ตามเนื้อเยื่อของร่างกายโดยที่สัตว์อาจไม่แสดงอาการป่วยแต่อย่างไร ในระยะ early acute phase เชื้อ PRRSV จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายในเซลล์หลายชนิดรวมถึง monocyte/macrophage และ dendritic cell ภายในอวัยวะน้ำเหลืองทั่วร่างกาย (Beyer et al., 2000, Xiao et al., 2004) เซลล์เหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าการติดเชื้อ PRRSV โดยเฉพาะในช่วง early acute phase จะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบในระยะดังกล่าว เท่าที่ผ่านมามีรายงานว่า การติดเชื้อ PRRSV จะมีผลรบกวนประสิทธิภาพของวัคซีนหลายชนิด (De Bruin et al., 2000, Thacker et al., 2000) รวมทั้งเคยมีรายงานว่า การได้รับเชื้อ PRRSV จะทำให้สุกรมีการสร้างแอนติบอดีภายหลังได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในระดับที่ต่ำลง (Li & Yang, 2003) ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ได้ยืนยันอย่างชัดเจนว่า การได้รับเชื้อ PRRSV ก่อนได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างภูมิคุ้มโรคต่อภายหลังได้รับวัคซีนและไปสู่ความล้มเหลวในการต่อต้านการเกิดโรคอหิวาต์สุกรในที่สุด

แม้ว่าเชื้อ PRRSV จะแพร่เข้าสู่อวัยวะน้ำเหลืองทั่วร่างกายอย่างรวดเร็วในระยะ early acute phase แต่อย่างไรก็ตามเท่าที่ผ่านมา ไม่พบว่ามีรายงานว่า การติดเชื้อจะทำให้มีการทำลายเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงระยะเวลาดังกล่าว โดยภายหลังการติดเชื้อ PRRSV ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ macrophage หรือ T lymphocyte subpopulation กลุ่มที่สำคัญทั้งภายในกระแสเลือดอวัยวะน้ำเหลือง หรือปอด (Samsom et al., 2000, Xiao et al., 2004) ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า น่าจะมีกลไกอื่นที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการได้รับเชื้อ PRRSV ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาเริ่มมีรายงานว่า เชื้อ PRRSV สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง IL-10 โดยเฉพาะในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อ (Chung & Chae, 2003, Royae et al., 2004, Suradhat & Thanawongnuwech, 2003, Van Gucht et al., 2004) จากผลการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่าเชื้อ PRRSV ทั้งชนิดที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต (heat-inactivated PRRSV) สามารถเหนี่ยวนำให้มี

การแสดงออกของยีนที่สร้าง IL-10 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Suradhat & Thanawongnuwech, 2003) นอกจากนี้แม้แต่วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น ก็สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ได้รับวัคซีนได้เช่นกัน (Suradhat & Thanawongnuwech, 2004 และ ภาพประกอบที่ 1.8) ผลการวิจัยในช่วงแรกของโครงการนี้ได้ยืนยัน *in vivo effect* ของ PRRSV ที่มีผลการกระตุ้นการสร้าง systemic IL-10 ในช่วงระยะสัปดาห์แรกของการติดเชื้ออย่างเด่นชัด ข้อมูลดังกล่าวควรที่จะต้องมีการเผยแพร่แก่สัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มและเกษตรกรที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้ตระหนักถึงอิทธิพลของ PRRSV ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรโดยรวม รวมถึงข้อควรระวังเบื้องต้นในการใช้วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า IL-10 เป็นไซโตไคน์สำคัญที่มีฤทธิ์กดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด รวมถึง antigen presenting cell และ effector cell อื่นๆ (Moore et al., 2001) นอกจากนี้ในระยะหลังมีรายงานถึงบทบาทสำคัญของ IL-10 ในการเหนี่ยวนำให้มีการพัฒนาของ regulatory dendritic cell (DCr) ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการพัฒนาและการทำงานของ pathogen-specific regulatory T cell (Tr1) ซึ่งจะมีผลลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อไป (McGuirk & Mills, 2002, Redpath et al., 2001) แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีกลุ่มวิจัยใดที่สามารถ identify หรือ characterize Tr1 ของสุกรได้ แต่เท่าที่ผ่านมาก็มีผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยที่ชี้ว่าเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้นอาจเกิดขึ้นได้ในสุกรเช่นกัน ตัวอย่างเช่น การ expose เซลล์ PBMC ของสุกรที่เคยได้รับเชื้อ PRRSV มาก่อน ด้วยเชื้อสายพันธุ์เดิมในห้องปฏิบัติการ จะสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 ได้มากกว่าการ expose ต่อเชื้อสายพันธุ์ใหม่ (W. Sada and S.Suradhat, manuscript in preparation) นอกจากนี้ยังมีเหตุการณ์ที่สามารถพบได้ในฟาร์มสุกรที่สอดคล้องกับ prediction จากผลการทดลองดังกล่าว โดยเฉพาะการให้เชื้อ PRRSV ซ้ำแก่สุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อน (ในช่วง gilt acclimatization) มักจะทำให้สุขภาพของสุกรทรุดโทรมลงจากการติดเชื้อแทรกซ้อนต่างๆ มากกว่าการใช้สุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อน นอกจากนี้การให้วัคซีน PRRS ในฟาร์มสุกร ยิ่งมาครั่งมักจะเหนี่ยวนำให้เกิดการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าการกระตุ้น anamnestic response อย่างไรก็ตามควรที่จะต้องมีการศึกษาให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมก่อนที่จะสามารถยืนยันการเกิด Tr1 ในสุกรได้ ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้น บ่งชี้ว่า Tr1 ของสุกรอาจมี marker ที่ต่างจากมนุษย์ เนื่องจากที่ผ่านมาผู้วิจัยไม่พบความสัมพันธ์ของการสร้าง IL-10 กับการแสดงออกของ CD25 แต่อย่างใด

ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อ PRRSV กระตุ้นการสร้าง IL-10 ได้อย่างไร แม้ว่าที่ผ่านมาจะเคยมีรายงานว่า RNA virus หลายชนิดมียีนที่สร้าง IL-10 ได้เอง เพื่อใช้ในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Pestka et al., 2004, Redpath et al., 2001) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการพบยีนที่สร้าง IL-10 หรือ IL-10 homolog ใน PRRSV เป็นที่น่าสังเกตว่า การเพิ่มขึ้นของ IL-10 มักจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของเชื้อไวรัสที่พบในเนื้อเยื่อนั้นๆ (Van Gucht et al., 2004) ข้อมูลนี้ชี้ว่าการสร้าง IL-10 น่าจะเป็นผลมาจากเชื้อไวรัสหรือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย ที่พบว่า structural protein ของไวรัสน่าจะมีส่วนในการกระตุ้นการสร้าง IL-10 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรโดยตรง (Suradhat et al., 2003) นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่ายังมีกลไกอื่นที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10 เพิ่มขึ้นในสุกรภายหลังการติดเชื้อ PRRSV โดยอาศัย interaction ระหว่างเซลล์กลุ่ม monocyte ที่ติดเชื้อ (หรือ antigen presenting cell) กับเซลล์กลุ่ม lymphocyte ในระหว่างการดำเนินไปของโรค โดยจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม (lymphocyte และ monocyte) ที่แยกได้จากเซลล์น้ำล้างปอดของสุกรที่ติดเชื้อ PRRSV มีความสามารถในการสร้าง IL-10 ได้ (Thanawang et al., 2004) หรืออาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อ PRRSV ร่วมกับการเกิด viremia จะ

กระตุ้นให้เซลล์กลุ่ม monocyte ซึ่งรวมถึง antigen presenting cells สร้าง IL-10 มากขึ้นโดยผ่านทางกลไกของ antibody-dependent enhancement (ADE) โดยเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเชื้อ PRRSV จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง non-neutralizing antibody ขึ้นในปริมาณมากอย่างรวดเร็วภายหลังการติดเชื้อ (Lopez & Osorio, 2004, Meier et al., 2003) และเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ ADE ซึ่งจะเอื้อให้เชื้อ PRRSV สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยผ่านทาง Fc receptor ของเซลล์เป้าหมาย (Yoon et al., 1995) โดยที่ผ่านมามีรายงานว่า ADE-mediated ligation ของส่วน Fc receptor บนผิวเซลล์ของ monocyte จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-10 เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลไปกดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการของภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส และการทำงานของ T lymphocyte ในที่สุด (Suhriebier & Linn, 2003) กล่าวโดยสรุปไม่ว่าจะเป็นผลเนื่องมาจากกลไกใดก็ตาม การติดเชื้อ PRRSV ในช่วง active stage นี้จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง IL-10 ที่สูงขึ้นใน microenvironment ของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของทั้งระบบ ซึ่งจะมีผลรบกวนการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างแน่นอน

โรค PRRS ยังคงเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน เฉพาะในประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรค PRRS อาจสูงถึง 90% (ข้อมูลจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สร้างความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศอย่างมากมายมหาศาล ผลกระทบที่ตามมาจากการสูญเสียโดยตรงจากสุกรที่ป่วยด้วยโรค PRRS แล้ว ยังเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เพิ่มขึ้นตามมาจากการติดเชื้อแทรกซ้อน หรือความล้มเหลวจากการให้วัคซีนอื่น (vaccine failure) อันเนื่องจากภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจากอิทธิพลของเชื้อ PRRSV รวมไปถึงการลดความสามารถในการใช้อาหารของสุกรขุน และค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะและวัคซีน แม้ว่าในปัจจุบันมีวัคซีน PRRS ทั้งชนิดเชื้อตายและเชื้อเป็นที่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยอยู่หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปในวงการสัตวแพทย์ว่าวัคซีนเหล่านี้มีข้อจำกัดในแง่ประสิทธิภาพและความปลอดภัย และไม่สามารถนำมาใช้เป็นโปรแกรมการได้เหมือนวัคซีนของสุกรทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันที่ช้า รวมทั้งภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นอาจไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร และจะไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ PRRS ข้ามสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การให้วัคซีนอาจมีผลกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกับการติดเชื้อ PRRSV

ในการวางมาตรการเพื่อใช้สำหรับการการควบคุมและป้องกันโรคหรือการพัฒนาวัคซีนใดๆ จำเป็นต้องอาศัยความรู้พื้นฐาน (basic knowledge) ที่เกี่ยวข้องจากหลายสาขามาผนวกและประยุกต์เข้าด้วยกัน ทั้งยังจะต้องตระหนักถึงอิทธิพลของวัคซีน และ/หรือ ภูมิคุ้มกันที่ได้จากการให้วัคซีนต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรโดยรวมอีกด้วย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันความรู้และความเข้าใจในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ PRRSV กับสุกร และบทบาทของเชื้อที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุกรยังมีอยู่อย่างค่อนข้างจำกัด แม้ว่าผลจากการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเริ่มให้ความกระจ่างในแง่ immunobiology ของเชื้อ PRRSV ขึ้นมาบ้างแล้ว และสามารถยืนยันถึงอิทธิพลในเชิงลบของเชื้อ PRRSV ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของสุกรอย่างเป็นรูปธรรมที่สามารถจะนำไปถ่ายทอดสู่สัตวแพทย์และผู้ปฏิบัติการในพื้นที่ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ PRRS อีกมากมายที่ยังไม่เคยมีการศึกษาหรือยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก ข้อมูลเหล่านี้รวมถึงถึงกลไกและโปรตีนของเชื้อ PRRSV และโฮสต์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง IL-10 ภายหลังการติดเชื้อ และวิธีที่จะสามารถลดหรือยับยั้งการทำงานของกลไกดังกล่าวเมื่อมีการติดเชื้อ PRRSV ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นกุญแจสำคัญในการพัฒนาวัคซีนรุ่นใหม่ ที่จะสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PRRSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจะเป็นตัวแปรสำคัญที่จะนำไปสู่ความสามารถในการควบคุมและป้องกันโรค PRRS อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J. & Lind, P. (2002). Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected *in utero* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9, 1229-1234.
- Albina, E., Carrat, C. & Charley, B. (1998). Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 18, 485-490.
- Bautista, E. M. & Molitor, T. W. (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome in swine. *Viral Immunology*. 10, 83-94.
- Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Polster, U., Weiland, E. & Wege, H. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *Journal of Veterinary Medicine*. B 47, 9-25.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and arteriviridae. *Archived Virology*. 142, 629-633.
- Chung, H.-K. & Chae, C. (2003). Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Comparative Pathology*. 129, 205-212.
- De Bruin, M. G. M., Samson, J. N., Voermans, J. J. M., van Rooij, E. M. A., De Visser, Y. E. & Bianchi, A. T. J. (2000). Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 76, 125-135.
- Depner, K. R., Lange, E., Pontrakulpipat, S. & Fichtner, D. (1999). Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virus infection in weaner pigs. *Journal of Veterinary Medicine*. B 46, 485-491.
- Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J.-P., Fairbrother, J. M. & Oswald, I. P. (1997). A reverse-transcription-polymerase chain reaction method to analyse porcine cytokine gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 58, 287-300.
- Duan, X., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archived Virology*. 142, 2483-2497.
- Duan, X., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (1997b). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time interval after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology*. 56, 9-19.
- Halbur, P. G. (1998). Porcine viral respiratory diseases. In *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*, pp. 1-10. Birmingham, UK.

- Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X. J., Andrews, J. J., Lum, M. A. & Rathje, J. A. (1996). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology*. 33, 159-70.
- Lager, K. M. & Mengeling, W. L. (2000). PRRS: nature of the RNA virus and how it causes disease (A keynote paper). In *16th congress of the International Pig Veterinary Society*, pp. 538-543. Edited by C. Cargill & S. McOrist. Melbourne, Australia: Casual Productions Pty. Ltd.
- Li, H. & Yang, H. (2003). Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. *Veterinary Microbiology*. 95, 295-301.
- Lopez, O. J. & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102, 155-163.
- McGuirk, P. & Mills, K. H. G. (2002). Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends in Immunology*. 23, 450-455.
- Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M. & Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon-gamma 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: implications for current vaccine efficiency and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*. 74, 309-329.
- Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterization of Pestiviruses. *Advanced in Virus Research*. 47, 53-118.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review in Immunology*. 19, 683-765.
- Murtaugh, M. P., Xiao, Z. & Zuckermann, F. A. (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunology*. 15, 533-547.
- Pala, Y., Hussell, T. & Openshaw, P. J. M. (2000). Flow cytometry measurement of intracellular cytokines. *Journal of Immunological Methods*. 243, 107-124.
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review in Immunology*. 22, 929-979.
- Pinyochon, W., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S. & Tantaswasdi, U. (1999). Biological characterization of swine fever virus Thai isolates. *Journal of Thai Veterinary Medical Association*. 50, 107-117 (in Thai with English abstract).
- Redpath, S., Ghazal, P. & Gascoigne, N. R. (2001). Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends in Microbiology*. 9, 86-92.

- Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J. & Benfield, D., A. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Veterinary Pathology*. 32, 361-373.
- Royae, A. R., Husmann, R. J., Dawson, H. D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F. A. & Lunney, J. K. (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in development of the host immune response to PRRSV vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102, 199-216.
- Saalmuller, A., Werner, T. & Fachinger, V. (2002). T-helper cells from naive to committed. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87, 137-145.
- Samsom, J. N., De Bruin, M. G. M., Voermans, J. J. M., Meulenber, J. M., Pol, J. M. A. & Bianchi, A. T. J. (2000). Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8⁺ cells. *Journal of General Virology*. 81, 497-505.
- Suhrbier, A. & Linn, M. L. (2003). Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends in Immunology*. 24, 165-168.
- Suradhat, S. & Damrongwatanapokin, S. (2002). Factors that influenced an effectiveness of classical swine fever vaccine: a case study. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 32 (Suppl.), 163-172 (in Thai with Eng abstract).
- Suradhat, S. & Damrongwatanapokin, S. (2003). The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Veterinary Microbiology*. 92, 187-194.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. & Damrongwatanapokin, S. (2001). The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 83, 177-189.
- Suradhat, S., Sada, W., Buranapraditkun, S. & Damrongwatanapokin, S. (2005). The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106, 197-208.
- Suradhat, S. & Thanawongnuwech, R. (2003). Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 84, 2755-2760.
- Suradhat, S. & Thanawongnuwech, R. (2004). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), vaccine strains on the level of porcine IL-10 gene expression. In *The 18th International Pig Veterinary Society Congress*, pp. 147. Edited by T. G. Blaha & C. Pahlizsch. Humburg, Germany: Druckerei Meyer GmbH.

- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. & Poovorawan, Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 84, 453-459.
- Suvintrakorn, K., Hanveeraphon, A. & Pariyakanok, V. (1993). Efficacy of lapinized swine fever vaccine in piglets born from immune sows. *Journal of Thai Veterinary Medical Association*. 23, 93-103.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F. & Halbur, P. G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine*. 18, 1244-1252.
- Thanawang, P., Yamkleebbua, C., Sriyun, K., Thanawongnuwech, R., Keddangsakonwut, S., Wangnaitham, S. & Suradhat, S. (2004). Semiquantitative analysis of the IL-10 production in bronchoalveolar lavage leukocyte of PRRSV infected pigs. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 34, 29-38.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tasanakit, A. & Damrongwatanapokin, S. (2004). Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Veterinary Microbiology*. 101, 9-21.
- Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L. & Royer, R. L. (1998). Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385) virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Veterinary Pathology*. 35, 398-406.
- Van Gucht, S., Labarque, G. & van Reeth, K. (2004). The combination of PRRSV virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102, 165-178.
- Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory viral infections: correlations with pathology. *Research in Veterinary Science*. 67, 47-52.
- Van Reeth, K. & Nauwynck, H. (2000). Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Veterinary Research*. 31, 187-213.
- Will, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, S. L., Swenson, M. J., McGinley, M. J., Hill, H. T., Platt, K. B., Christopher-Hennings, J. & Nelson, E. A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Veterinary Microbiology*. 55, 231-240.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P. & Murtaugh, M. P. (2004). The level of virus-specific T cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *Journal of Virology*. 78, 5923-5933.
- Yoon, S. L., Zimmerman, J. J., Swenson, M. J., McGinley, M. J., Eernisse, K. A., Brevik, A., Rhinehart, L. L., Frey, M. L., Hill, H. T. & Platt, K. B. (1995). Characterization of the humoral immune response to

porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*. 7, 305-312.

Zuckermann, F. A. (1999). Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 72, 55-66.

Zuckermann, F. A., Husmann, R. J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu de Antonio, E. & Martin, S. (1998). Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 63, 57-67.

Zuckermann, F. A., Martin, S., Husmann, R. J. & Brandt, J. (1999). Use of interleukin-12 to enhance the cellular immune response of swine to an activated herpesvirus vaccine. *Advanced in Veterinary Medicine*. 41, 447-461.

OUTPUT ที่ได้จากโครงการ

1. Suradhat, S., Sada, W., Buranapraditkun, S. and Damrongwatanapokin, S. 2004. Dynamics of CD25 expression and intracellular interferon-gamma production by porcine lymphocytes following the exposure of classical swine fever virus (CSFV) antigen. *In: Proceedings of the 7th International Veterinary Immunology Symposium (IVIS)*, 25-30 July 2004, Quebec city, Canada. p. 142.
2. Suradhat, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., and Thanawongnuwech, R. 2004. Dynamics of CD25 (IL-2R) expression and intracellular cytokine productions by peripheral blood mononuclear cells from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *In: Proceedings of the 7th International Veterinary Immunology Symposium (IVIS)*, 25-30 July 2004, Quebec city, Canada. p. 141.
3. Suradhat, S., Sada, W., Buranapraditkun, S. and Damrongwatanapokin, S. 2005. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106: 197-208. (impact factor 2004; 1.799)
4. Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S. and Thanawongnuwech. 2005. Classical swine fever vaccine: the role of cell mediated immunity and other factors on induction of protective immunity. *In: Classical swine fever handbook*. The Merial Symposium at the 2nd Asian Pig Veterinary Society (APVS) congress, 19-21 September 2005, Manilla, Philippines. (in press)
5. Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. Impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. (submitted to *Vaccine*; impact factor 2004; 2.824)
6. Suradhat, S., Sada, W., Panyatong, R., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S. and Thanawongnuwech, R. The kinetics of IL-10 and IFN- γ production by porcine peripheral blood lymphocytes during an early stage of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. (manuscript in preparation)
7. S. Suradhat การบรรยายหัวข้อ "Immunobiology of PRRSV...the Thai experience" ณ. Vaccine and Infectious Disease Organization (VIDO), University of Saskatchewan, เมือง Saskatoon, Saskatchewan, ประเทศ Canada เมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม 2547

8. Master thesis: Mr. Weerasak Sada (Inter-department in medical microbiology program, Graduate school, Chulalongkorn University). Thesis title: Characterization of cytokine production in the peripheral blood mononuclear cells of pigs recovered from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection and reactivated with heterologous strains.
9. Master thesis: Mr. Raphee Panyathong (Veterinary Pathobiology program, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University). Thesis title: Efficacy of attenuated PRRS vaccine in weanling pigs.
10. Master thesis: Mr. Sawang Kedsangsakonwut (Veterinary Pathobiology program, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University). Thesis title: Effect of PRRSV infection on the efficacy of classical swine fever vaccine.

ภาคผนวก

**DYNAMICS OF CD25 EXPRESSION AND INTRACELLULAR INTERFERON-GAMMA
PRODUCTION BY PORCINE LYMPHOCYTES FOLLOWING THE EXPOSURE OF
CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) ANTIGEN**

S. Suradhat¹, W. Sada¹, S. Buranapraditkun², and S. Damrongwatanapokin³

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

² Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³ National Institute of Animal Health (NIAH), Bangkok, Thailand

Email: Sanipa.S@chula.ac.th

Surface expression of the IL-2R-alpha, CD25, has been widely used for identification activated porcine lymphocyte population. On the other hand, interferon-gamma (IFN- γ) has been shown to be a good indicator of cell-mediated immunity in pigs. To investigate the correlation of the 2 parameters, we established antigen-specific, intracellular IFN- γ staining assay and study the kinetics of the cytokine production in relation to the CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulation.

Five-week-old crossbred pigs were immunized twice with CSF vaccine at 2 weeks interval. Blood samplings were done every 2 weeks until 13 weeks old. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cultured in the presence of CSFV at 1 multiplicity of infection for 40 hours, prior to surface staining of CD4, CD8, CD25 molecules and intracellular staining of IFN- γ . Following vaccination, there was a slight increase in the number of the antigen-specific, memory population (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) in the PBMC, which diminished within a few weeks. The number of antigen-specific cytotoxic T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after that of the memory population, and remained high throughout the experiment. In fact, most of the antigen-specific, CD25⁺ population in the PBMC following vaccination was the CD4⁺CD8⁺ population. Minimal changes in CD25 expression were observed in the naïve CD4⁺ (CD4⁺CD8⁻) population. Although the number of IFN- γ ⁺ cells was somewhat low in the PBMC, the CD4⁺CD8⁺ cells were the major IFN- γ producers in the PBMC throughout the experiment. In a separate experiment, crossbred pigs were immunized once with CSF vaccine and challenged with the virulent strain CSFV (Bangkok 1950) at 7 days post vaccination (dpv). On the challenge day (7 dpv), the number of CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells in the PBMC of the vaccinated group was significantly higher than that of the control non-vaccinated group ($p < 0.05$). Following challenge, the number of CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells declined, while there was an increase in the number of CSFV-specific CD8⁺CD25⁺ cells in the PBMC of vaccinated pigs. In contrast, the majority of activated (CD25⁺) cells in the spleen, at 21 days post infection, possessed the CD4⁺CD8⁺ phenotype and these cells were also found to be the major IFN- γ producers.

Our result suggested that the antigen-specific CD25 expression and the IFN- γ production by porcine lymphocytes may not be tightly associated. In addition, there seems to be the different in the preference of tissue homing among the activated lymphocyte subpopulations. In any cases, the CD4⁺CD8⁺ cells were the major IFN- γ producers in this system.

Kinetics of CD25 expression and interferon-gamma production by porcine lymphocyte subpopulations following the exposure of classical swine fever virus (CSFV) antigen

S. Suradhat¹, W. Sada¹, S. Buranapraditkun², and S. Damrongwatanapokin³

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
² Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
³ National Institute of Animal Health (NIAH), Bangkok, Thailand
 Corresponding author: Sada.w.sichula.ac.th

Surface expression of the IL-2R- α , CD25, has been widely used for identification activated lymphocyte population. On the other hand, interferon-gamma (IFN- γ) has been shown to be a good indicator of cell-mediated immunity in pigs. To investigate the correlation of the 2 parameters, five-week-old crossbred pigs were immunized twice with classical swine fever (CSF) vaccine at 2 weeks interval. Following vaccination, the number of the antigen-specific, memory population (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) in the PBMC slightly increased and diminished within a few weeks. The number of antigen-specific cytotoxic T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after that of the memory population, and remained high throughout the experiment. Most of the CSFV-specific, CD25⁺ population in the PBMC following vaccination was the CD4⁺CD8⁺ population. However, the CD4⁺CD8⁺ cells were the major IFN- γ producers in the PBMC following CSF vaccination.

In another experiment, CSF-vaccinated pigs were challenged with a virulent CSFV, and the kinetics of CD25 expression and cytokine production were monitored. Following of viral exposure, the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs increased markedly in both the vaccinated and control groups. However, there was no significant change in the number of CD25 expressing cells in both groups. Unlike following vaccination, a CD4⁺CD8⁺ T cell population was the major IFN- γ producers following the CSFV challenge. Our results indicated that CD25 expression and IFN- γ production might not be tightly associated in porcine lymphocytes.

Introduction

Recently, detection of antigen-specific IFN- γ production has been used for determining of porcine cell-mediated immunity, and has been related to protective immunity in the classical swine fever model (1, 2). On the other hand, expression of the alpha-subunit of the IL-2 receptor (CD25) has been widely used for studying of lymphocyte activation in various species including pigs (3-5). However, the association between IFN- γ production and CD25 surface expression has never been studied in a pig model.

To investigate the association of the two parameters, we developed CSFV-specific, intracellular IFN- γ staining assay and studied the kinetics of cytokine production in relation to CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations.



Kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by porcine PBMCs following CSFV challenge

Following CSFV challenge, the number of CD25⁺ cells among the lymphocyte subpopulations remained unchanged (Fig. 2). However, exposure to virulent CSFV significantly increased the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs of both vaccinated ($p < 0.05$) and unvaccinated pigs ($p < 0.01$) at 7 dpi. The CD4⁺CD8⁺ population was the major IFN- γ producer in both groups during this stage (Fig. 3).

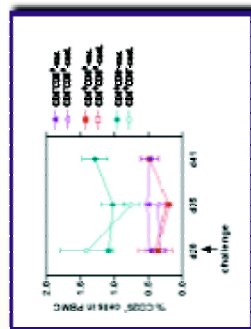


Figure 2. Kinetics of CD25 expression on lymphocyte subsets in the PBMCs of pigs vaccinated with CSF vaccine and challenged with virulent CSFV at 7 dpi. The data represent the mean $\pm$ SEM of the 5 positive cells from 4 animals.

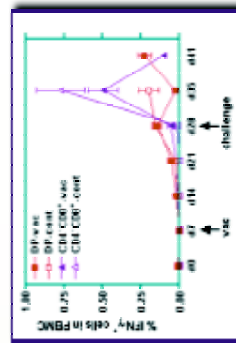


Figure 3. Kinetics of IFN- γ production by different lymphocyte subsets in pigs vaccinated with CSF vaccine and challenged with virulent CSFV at 7 dpi. The data represent the mean $\pm$ SEM of the 5 positive cells from 4 animals.

Our results indicated that CD25 expression and IFN- γ production by porcine lymphocytes may not be tightly associated following the exposure to CSFV antigen. In addition, the result demonstrated the role of CD4⁺CD8⁺ T cell population as the major cytokine producing population in the PBMC following CSFV challenge. Interestingly, the number of IFN- γ producing cells in the unvaccinated group was also markedly increased following challenge. However these pigs did not survive the challenge, suggesting that other factors might involve in the protective mechanism in the vaccinated group.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. J. A. Roth and Dr. R. Platt for their kind contributions of the custom made mAbs. We thank Dr. K. Rungnirattakul, Dr. B. Saphakul, and Dr. P. Mililich for their support and technical assistance. This work is supported by Thailand Research Fund, Chulalongkorn University and Intervet (Thailand) Ltd.

References

- 1) Suradhat S, et al. 2001. Vet Immunol Immunopathol 89: 477-484.
- 2) Suradhat S, et al. 2003. Vet Immunol Immunopathol 95: 187-194.
- 3) Moller and Luning. 1982. Vet Immunol Immunopathol 35: 391-416.
- 4) Quake and Fath. 1994. Vet Immunol Immunopathol 42: 825.
- 5) Peter et al. 2003. Vet. Res. 34:339-346.

Methods

Animal Experiment 1: Cellular response following vaccination with a CSF vaccine
 Control pigs were vaccinated at 5 and 7 weeks of age. Blood sampling was done every 2 weeks, from 3-13 weeks of age.

Animal Experiment 2: Cellular response following a CSFV challenge
 Four-week old, crossbred pigs with comparable maternal derived antibody titres (<15) were immunized intramuscularly once with CSF vaccine. At 21 days post vaccination (dpi), the pigs were challenged intramuscularly with 2x10⁶ TCID₅₀ of the virulent strain of CSFV (Bangkok 1959).

In vitro activation and cellular staining

Prior to flow cytometric analysis, the PBMCs (1x10⁶ cells/ml) were cultured in vitro, in the presence of CSFV (ALD strain) at 1 multiplicity of infection (m.o.i.) for 48 hr. The cells were then harvested for type-color fluorescent staining using the mixture of mAb, anti-CD4-FITC (Pharmingen), anti-CD8-PE-Cy5, and anti-CD25-PE (kindly provided by Dr. J.A. Roth, BU). For intracellular cytokine staining, incubating a 20 hr in vitro activation with CSFV, the groups were treated with GolgiStop (BD Biosciences) and GolgiPlug (BD Biosciences) and further incubated for another 12 hr. Following surface staining, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Perm solution (BD Biosciences) and incubated for 3 hr. In the next step, intracellular IFN- γ staining was performed using biotinylated anti-swine IFN- γ mAb (Bioscience) followed by a streptavidin-FITC (Streptact). Flow cytometric analysis was performed using a FACSscan cytometer (BD Biosciences).

Results & discussion

Kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by porcine PBMCs in vaccinated pigs

Following CSF vaccination, there was a slight increase in the CSFV-specific, memory lymphocyte subpopulation (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells), which diminished within a few weeks. The number of CSFV-specific cytotoxic T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after the memory population, and remained relatively high throughout the experiment (Fig. 1A).

In contrast to the CD25 expression, CD4⁺CD8⁺ T cells were the major IFN- γ producers in PBMCs throughout the experiment, while the number of IFN- γ producing CD4⁺CD8⁺ cells was relatively low and comparable to that of the IFN- γ producing CD4⁺CD8⁺ cells (Fig. 1B).

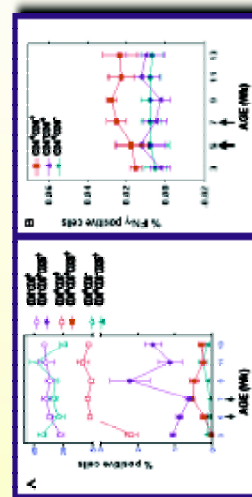


Figure 1. Kinetics of CD25 expression (A), and intracellular IFN- γ production (B) in lymphocyte subsets of PBMCs isolated from pigs vaccinated with CSF vaccine and challenged with virulent CSFV at 7 dpi. Positive PBMCs were collected in the 4th week post-vaccination. The data represent the mean $\pm$ SEM of the 5 positive cells from 4 animals.

**DYNAMICS OF CD25 (IL-2R) EXPRESSION AND INTRACELLULAR CYTOKINE
PRODUCTIONS BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PIGS INFECTED
WITH PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS**

S. Suradhat¹, W. Sada¹, S. Buranapraditkun², and R. Thanawongnuwech¹

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

² Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Email: Sanipa.S@chula.ac.th

Recent studies demonstrated that porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) could induce upregulation of interleukin-10 (IL-10) gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bronchoalveolar lavage leukocytes of the infected pigs within the first week of infection. These findings suggested that induction of systemic IL-10 production in the early stage of infection might be one of the strategies used by PRRSV for modulating the host immune system. In this study, we examined dynamics of the surface expression of a leukocyte activation marker, CD25 (IL-2R- α), and intracellular IL-10 and interferon- γ (IFN- γ) productions in CD4⁺CD8⁻ (naïve Th), CD4⁺CD8⁺ (memory Th) and CD4⁺CD8⁺ (CTL) subpopulations from PBMC of PRRSV infected pigs.

Five, three-week-old, PRRSV-seronegative, crossbred pigs from a commercial farm were intranasally inoculated with 5 ml (2.5 ml/nostril) of the Thai isolated, US genotype, PRRSV (strain 01NP1) at the concentration of $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml. Five uninfected pigs were kept in a separated isolation unit as a control group. Heparinized blood samples were collected and the PBMC were isolated every 24 hr from the inoculating day to 5 days post infection (0-5 dpi), 7 and 10 dpi. The surface expressions of CD4, CD8, CD25, intracellular IL-10 and IFN- γ production of the freshly isolated PBMC were further analyzed by flow cytometry. Following PRRSV inoculation, all infected pigs developed clinical signs of PRRS, including lethargy, leukopenia, respiratory infection symptoms with moderate conjunctivitis. The control pigs remained clinically normal throughout the experiment. The number of IFN- γ producing cells by PBMC from the infected group remained low and was comparable to that of the control group throughout the experiment. However, the number of IL-10 producing cells in the PBMC of the infected pigs was significantly higher than that of the control group during 1-4 dpi and CD4⁺CD8⁺ lymphocytes were the major IL-10 producers. Interestingly, PBMC from the control group exhibited a significant increase in the number of activated (CD25⁺) cells particularly at 2 and 3 dpi. The dominant cellular phenotype of the CD25⁺ cells was CD4⁺CD8⁻. In addition, the increase in CD25 expression was also observed in CD4⁺CD8⁻ population, with much less extent. This result suggested that activation of other uncharacterized leukocyte subpopulation and naïve Th in the control pigs had occurred, possibly due to the stress from blood collecting procedure. In contrast, this kind of cellular activation was much lower, and only observed at 2 dpi in the PRRSV infected group. By 5 dpi, the numbers of CD25⁺ and IL-10⁺ cells in the PBMC of both groups were indifferent through the end of the experiment.

Taken together, our findings demonstrated significant IL-10 production by porcine PBMC in the early stage of PRRSV infection, and that CD4⁺CD8⁺ lymphocyte subpopulation was responsible for IL-10 production during this period. Furthermore, our result implied that early IL-10 production might affect the early non-specific defense mechanism in the infected host.



The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV)

S. Suradhat^{a,*}, W. Sada^b, S. Buranapraditkun^c, S. Damrongwatanapokin^d

^a Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

^b Inter-Department of Medical Microbiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^c Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^d National Institute of Animal Health (NIAH), Bangkok, Thailand

Received 9 September 2004; received in revised form 8 February 2005; accepted 8 February 2005

Abstract

Surface expression of IL-2R-alpha (CD25) is widely used to identify activated lymphocyte populations, while interferon-gamma (IFN- γ) levels have been shown to be a good indicator of cell-mediated immunity (CMI) in pigs. To investigate the relationship between these two parameters, we developed an intracellular cytokine-staining assay and studied the kinetics of cytokine (IFN- γ and interleukin-10, IL-10) production relative to CD25 expression in porcine lymphocyte subpopulations, following immunization with a classical swine fever (CSF) vaccine. The number of activated memory T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) increased slightly in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) population soon after vaccination, then diminished within a few weeks. The number of activated cytotoxic T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after the memory population. Although the number of IFN- γ producing cells detected in this experiment was relatively low, the CD4⁺CD8⁺ T cells were major IFN- γ producers in the PBMCs throughout the experiment. In another experiment, CSF-vaccinated pigs were challenged with a virulent classical swine fever virus (CSFV), and the kinetics of CD25 expression and cytokine productions were monitored. Following exposure to the virus, the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs increased markedly in both the vaccinated and unvaccinated groups. The CD4⁺CD8⁺ cells were major IFN- γ producing cells in vaccinated pigs, while both CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ populations contributed to the IFN- γ production in the control group. Interestingly, the enhanced IFN- γ production was not associated with the upregulation of CD25 expression following the CSFV challenge. In addition, exposure to the virulent CSFV significantly increased interleukin-10 production by the CD4⁺CD8⁺ populations in PBMCs of the unvaccinated pigs. Taken together, our results indicated that CD25 expression and IFN- γ production were not tightly associated in porcine lymphocytes.

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 9583; fax: +66 2 251 1656.

E-mail address: sanipa.s@chula.ac.th (S. Suradhat).

In addition, the CD4⁺CD8⁺ lymphocytes of the PBMCs played a major role in cytokine productions following the CSFV challenge.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Classical swine fever virus; Interferon-gamma; Interleukin-10; CD25; PBMC

1. Introduction

Classical swine fever (CSF) is one of the most important diseases in pigs, causing serious economic losses to the swine industry worldwide. The classical swine fever virus (CSFV) is an enveloped, single-stranded RNA virus in the genus *Pestivirus* (Moennig, 2000). In recent years, there have been a number of studies on the mechanisms of protective immunity to CSFV (reviewed in Van Oirschot, 2003). There seems to be a good correlation between the production of serum neutralizing antibodies and protection from disease. However, in some cases cell-mediated immunity (CMI) was implicated in protection, as neutralizing antibodies were absent (Launais et al., 1978; Rumenapf et al., 1991; Suradhat et al., 2001). T cell responses to CSFV in pigs have reportedly been absent or difficult to detect, and direct evidence regarding the protective role of CMI in CSFV-infected pigs is very limited. Nevertheless, antigen-specific lymphoproliferative activity has been demonstrated in peripheral blood lymphocytes from vaccinated pigs that were protected against CSFV challenge (Remond et al., 1981). In addition, the role of cytotoxic T lymphocytes (CTL) has been confirmed in several studies (Pauly et al., 1998; Armengol et al., 2002; Piriou et al., 2003). However, studies of porcine cellular effector functions are laborious and mostly limited to the inbred minipig model.

The cytokines and other factors associated with CMI have been identified in most species, including pigs (Wood and Seow, 1996; Pescovitz, 1998). Among these, the role of interferon-gamma (IFN- γ) in the induction of CMI responses is well characterized. IFN- γ has been shown to be a good indicator of antiviral immunity in pigs, as well as in other species. In pigs, the measurement of IFN- γ levels has been found to be more useful for detecting the presence of antigen-specific, immunological memory than lymphoproliferative assays (Mateu de Antonio et al., 1998). The detection of antigen-specific IFN- γ

production has been used to assess the cellular immunity of pigs in both pseudorabies (Zuckermann et al., 1998, 1999) and CSFV models (Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003). In recent years, flow cytometric analysis has been extensively applied for studying the kinetics of cellular activation in various lymphocyte populations. The alpha-subunit of the high-affinity IL-2 receptor (CD25) is expressed on the surface of activated lymphocytes (Minami et al., 1993) and has been widely used to identify activated lymphocyte populations in various species including pigs (Dillender and Lunney, 1993; Quade and Roth, 1999; Piriou et al., 2003). However, the association between IFN- γ production and CD25 surface expression has never been studied in a pig model. To investigate the relationship between the two parameters, we developed an antigen-specific, intracellular cytokine (IFN- γ and interleukin-10, IL-10) staining assay and studied the kinetics of cytokine production in relation to CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations.

2. Materials and methods

2.1. Viruses

The CSFV reference strain, ALD strain, was a gift from the National Institute of Animal Health of Japan. The CSFV strain used for challenges was the Thai isolate (Bangkok 1950 strain) from the National Institute of Animal Health of Thailand (NIAH). Viruses were propagated in a SK-6 cell line. Infected cells were collected after 4 days incubation with a stock virus, and subjected to two freeze–thaw cycles. The viral suspension was centrifuged at $1000 \times g$ for 20 min. The collected supernatant is referred to as the stock virus. The stock viruses were kept at -80°C until needed. Viral titers were determined by a peroxidase-linked virus titration assay using a previously described protocol (Pinyochon et al., 1999).

2.2. Monoclonal antibodies

The custom conjugated anti-swine CD8-PE-Cy5 conjugated mAb (76-2-11, IgG_{2a}) and anti-swine CD25-PE conjugated mAb (PGBL25A, IgG₁) were kindly provided by Dr. J.A. Roth (Iowa State University, Ames, USA). Anti-swine CD4-FITC conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}), anti-CD4-PE conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}), and biotinylated anti-swine IFN- γ mAb (P2C11, IgG_{2a}) were obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). The mAb anti-swine IL-10 (945A4C437B1, IgG₁) was obtained from Biosource International Inc. (Nivelles, Belgium). Streptavidin-FITC and goat-anti-mouse IgG₁-FITC conjugates were obtained from Serotec (Oxford, UK).

2.3. Animals and experimental protocols

Before the animal trials, the experimental and animal handling protocols were approved by the Ethics Committee on Experimental Animal Usage and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

2.3.1. Experiment 1: Cellular responses following vaccination with a CSF vaccine

Crossbred pigs, from sows that were routinely vaccinated with CSF vaccine, were maintained at the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University research farm in Nakorn Prathom province. The farm has no evidence of CSF outbreak in the last 2 years. Pigs were intramuscularly immunized twice (1 ml/dose) with a modified live, lapinized, Chinese strain, CSF vaccine (Department of Livestock Development, Thailand) at 5 and 7 weeks of age. Blood sampling was done every 2 weeks, from 3 to 13 weeks of age.

2.3.2. Experiment 2: Cellular responses following a CSFV challenge

Four-week-old, crossbred pigs from a CSF-free commercial farm were brought in and maintained at the animal facility, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Bangkok. Pigs were immunized intramuscularly with a modified live, lapinized, Chinese strain, CSF vaccine (1 ml/dose) (Department of Livestock Development, Thailand). The means of maternal derived serum-neutralizing

titer of all groups were less than 1:8 at the time of vaccination. At 21 days post-vaccination (dpv), the pigs were challenged intramuscularly with 2×10^4 TCID₅₀ of the virulent CSFV, strain Bangkok 1950 (NIAH, Thailand). The control group was not vaccinated but received the same amount of the challenge virus. Naïve pigs were kept in a separate isolation unit throughout the experiment. Clinical signs were monitored daily and porcine peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) were collected every 7 days for 2 weeks after the challenge.

2.4. Isolation of porcine PBMCs

Porcine peripheral blood mononuclear cells were isolated from 10 ml of the heparinized blood samples using Isoprep[®] separation medium (Robbins Scientific Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The purified PBMCs were resuspended at a concentration of 6×10^6 cells/ml in RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% calf serum (Starrate Ltd., Bethungra, NSW, Australia), 2 mM L-glutamine (GIBCO), 100 μ M non-essential amino-acid (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 100 unit/ml of penicillin G, 100 μ g/ml of streptomycin and 0.25 μ g/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution; GIBCO); this solution is referred as the complete medium.

2.5. Flow cytometry

2.5.1. In vitro activation and surface staining

For in vitro activation, 1 ml of freshly isolated PBMCs (6×10^6 cells/ml) were cultured in a well of 24-well plate, in the presence of CSFV (ALD strain) at one multiplicity of infection (m.o.i.) for 40 h. The cells were then harvested for triple-color fluorescent staining. The phenotypic analyses were done using the above mAbs (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE-Cy5, and anti-CD25-PE). Briefly, approximately 2×10^6 cells were washed with PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (Sigma) and 0.1% sodium azide (Sigma) (FACS buffer), and distributed to the wells of 96-well plate. The cells were pelleted by centrifugation at $500 \times g$ for 2 min. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended with

50 μ l of the mixture of the three mAbs at appropriate concentrations, and incubated in the dark at 4 °C for 30 min. After incubation, the cells were washed three times with 150 μ l/well of FACS buffer. After the final wash, the supernatants were removed and the cells were fixed by resuspending the pellet in 200 μ l of 2% formaldehyde. Flow cytometric analyses were performed using a Facscan cytometer (BD Biosciences).

2.5.2. Intracellular cytokine-staining assay

Following *in vitro* activation with CSFV (see above) for 28 h, the protein transport inhibitor monensin (GolgiStop™, BD Biosciences) was added to the cell cultures, and the cells were incubated for another 12 h. In some experiments, PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) were added to the culture 3 h before harvesting. Cells were harvested and stained for surface expression of CD4 and CD8 using a mixture of anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-Cy5 conjugates (see above), resuspended in FACS buffer at the appropriate concentrations. Following the last wash, the cells were fixed and permeabilized by resuspension in 200 μ l/well of Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and incubated for 3 h, in the dark at room temperature. Intracellular IFN- γ staining was performed using biotinylated anti-swine IFN- γ mAb followed by a streptavidin-FITC conjugate resuspended in BD Perm/Wash solution provided with the BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience).

Intracellular IL-10 staining was performed using a mAb anti-swine IL-10 followed by FITC-conjugated, goat-anti-mouse IgG₁ antibody. All of the washing processes following permeabilization were done using the BD Perm/Wash solution, according to the manufacturer's protocol. At the final step, the cells were resuspended in 200 μ l of 2% formaldehyde and kept in the dark at 4 °C until needed. Flow cytometric analysis was performed using a Facscan cytometer (BD Biosciences).

2.6. Flow cytometric analyses

The viability of studied population prior to surface staining, determined by Trypan blue staining, was more than 80%. Numbers of gate events for analyses of surface markers and intracellular cytokines were 10,000 and 100,000, respectively. Lymphocytes were first gated (G1) from the harvested population by size (FSC) and granularity (SSC), this yielded predominantly lymphocyte population with approximately 3% SWC3⁺ cell contamination (data not shown). The numbers of lymphocyte subpopulations (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻, and CD4⁺CD8⁺) were determined by the percentages of CD4 and/or CD8 positive cells from G1. For analyses of triple labeled cells, the G2 (CD8⁺) and G3 (CD4⁺) were selected from the lymphocyte (G1) population and used for determining of the expression of the second (CD4 or CD8) and third parameter (CD25 or cytokine). Since

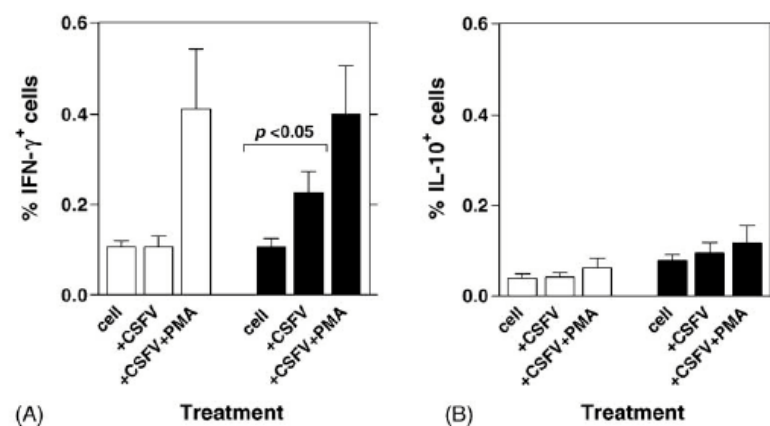


Fig. 1. Levels of IFN- γ (A) and IL-10 (B) positive cells in lymphocyte population from naïve pigs (white bar) and CSFV-primed pigs (black bar). Porcine PBMCs were *in vitro* cultured alone (cell), with CSFV for 40 h (+CSFV), or with CSFV for 40 h and an addition of PMA and ionomycin 3 h prior to cell harvesting (+CSFV + PMA). The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from five animals.

porcine CD8⁺ population exists in CD8^{hi} and CD8^{lo} forms (Zuckermann, 1999), the triple positive, CD4⁺CD8⁺CD25⁺ (or cytokine)⁺, population were determined from G3.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] Version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Either *t*-test or one-way ANOVA, followed by a post-test (Tukey's multiple comparison) when significant differences at the 0.05% confident level were present, was used as indicated.

3. Results

3.1. Interferon- γ production of by porcine lymphocytes in response to the recall antigen

Previously, porcine PBMCs have been shown to produce IFN- γ in response to the recall antigen (classical swine fever virus) by an ELISPOT assay (Suradhat et al., 2001). In this study, using the same in vitro activation system, we established an intracellular cytokine-staining assay to further characterize the CSFV-specific cytokine producing cells. The levels of cytokine production by porcine PBMCs, in response to in vitro CSFV exposure, were determined before vaccination (5 weeks old) and 2 weeks after the second immunization (9 weeks old) (see Section 2.3.1). Our result showed that the CSFV-primed lymphocytes could produce IFN- γ in response to in vitro exposure with CSFV ($p < 0.05$, *t*-test). In addition, the level of IFN- γ producing cells from the vaccinated group was significantly higher ($p < 0.05$, *t*-test) than that from the naïve group (Fig. 1A). Although lymphocytes from the naïve group did not show enhanced IFN- γ production when cultured with CSFV, the lymphocytes from both naïve and vaccinated groups produced comparable level of IFN- γ ⁺ cells when stimulated with PMA and ionomycin (PMA/I). This result indicated that addition of CSFV into the culture system did not affect the ability to produce IFN- γ by the lymphocytes of the naïve pigs (Fig. 1A). In the same study, addition of CSFV or CSFV and PMA/I did not significantly affect the level of IL-10

production by porcine lymphocytes from both groups (Fig. 1B).

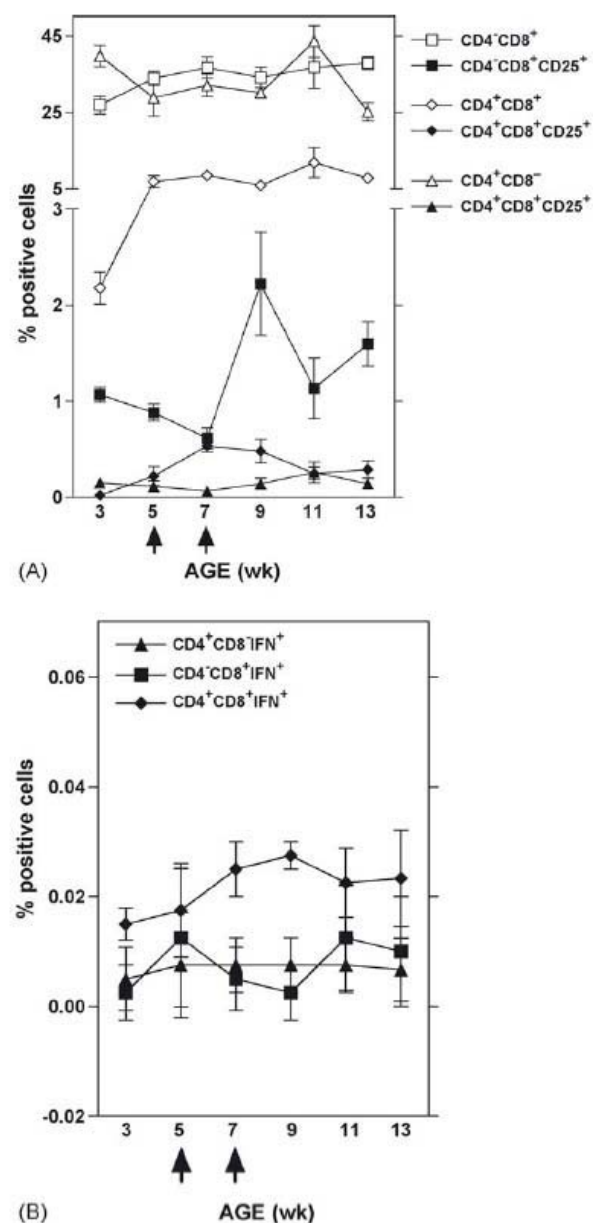


Fig. 2. Kinetics of CD25 surface expression (A), and intracellular IFN- γ production (B) in lymphocyte subsets, in PBMCs isolated from pigs vaccinated twice with CSF vaccines at 5 and 7 weeks (arrow). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

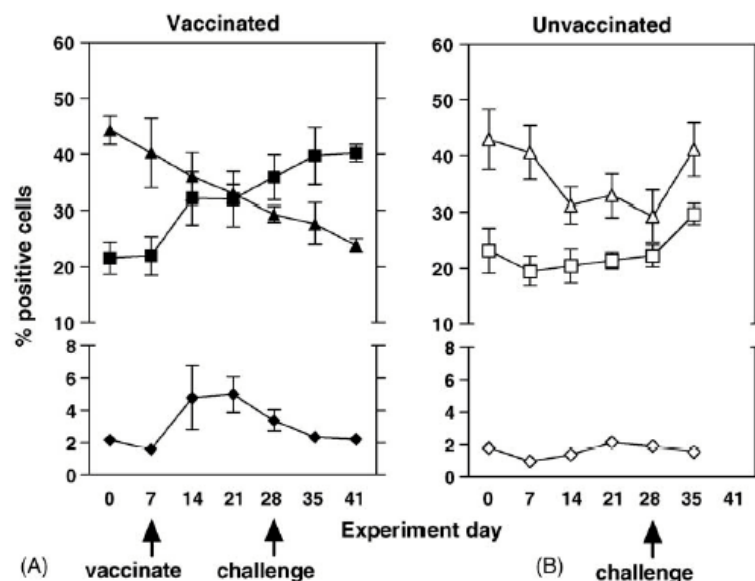


Fig. 3. Percentages of CD4⁺CD8⁻ (triangle), CD4⁻CD8⁺ (square) and CD4⁺CD8⁺ (diamond) cells from PBMCs of the vaccinated (A) and unvaccinated pigs (B). Pigs were immunized on day 7 with CSF vaccine and challenged with the virulent CSFV on at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

3.2. Kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by porcine PBMCs in vaccinated pigs

To investigate the relationships between CSFV-specific IFN- γ production and the expression of the IL-2R (CD25) by porcine PBMCs following vaccination, the two parameters were monitored from the same pigs at the age of 3–13 weeks old (see Section 2.3.1). Following vaccination, there was a slight increase in the activated memory lymphocyte subpopulation (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells), which diminished within a few weeks. The number of activated cytotoxic T cells (CD4⁻CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after the memory population. Most of the activated lymphocyte population detected in PBMCs following in vitro activation carried the CD4⁻CD8⁺ phenotype. It should be noted that total percentage of CD4⁻CD8⁺ T cells in the PBMCs remained relatively stable throughout the experiment. Thus, it is unlikely that the increased number of CD4⁻CD8⁺CD25⁺ T cells was due to a relative increase in the CD4⁻CD8⁺ T cell subpopulation (Fig. 2A). In contrast to the CD25 expression, different T cell subpopulation was found responsible for the

IFN- γ production observed in the PBMCs following CSFV vaccination. The result showed that CD4⁺CD8⁺ T cells were the major IFN- γ producers in PBMCs throughout the experiment, while the number of IFN- γ

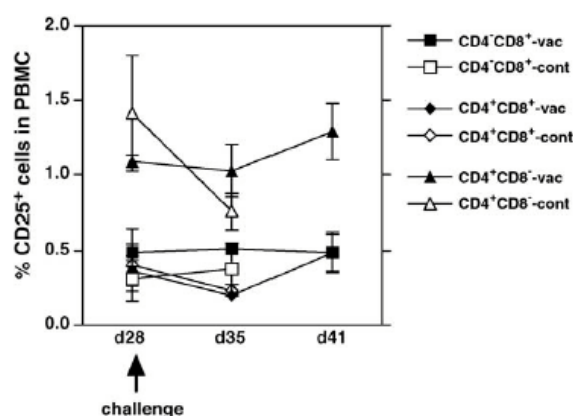


Fig. 4. Kinetics of CD25 surface expression on lymphocyte subsets in the PBMCs of pigs vaccinated with CSF vaccines and challenged with virulent CSFV at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

producing $CD4^+CD8^+$ cells was relatively low and comparable to that of the IFN- γ producing $CD4^+CD8^-$ cells (Fig. 2B). In addition, the kinetic of IFN- γ production was resembled to that of activated $CD4^+CD8^+$ T cells. In this experiment, cellular activation and IFN- γ production in the naive $CD4^+CD8^-$ population following vaccination was minimal (Fig. 2).

3.3. Kinetics of CD25 expression and cytokine production by porcine PBMCs following CSFV challenge

To determine the kinetics of CD25 expression and cytokine production following the CSFV challenge, crossbred pigs (4 pigs/group) were immunized once with a CSF vaccine and challenged with a virulent

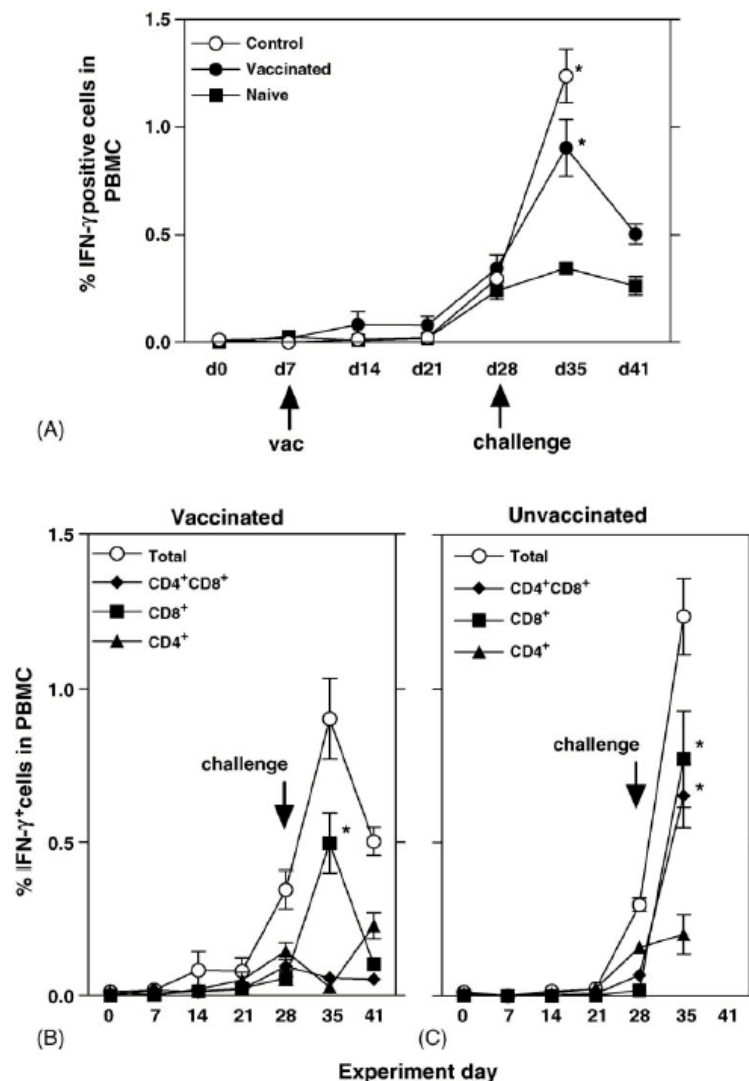


Fig. 5. Kinetics of total IFN- γ production by porcine lymphocytes (A) and by lymphocyte subsets from the PBMCs of vaccinated (B) and unvaccinated (C) group. Pigs were vaccinated with CSF vaccines (day 7) and challenged with virulent CSFV at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The studied lymphocyte subsets included $CD4^+CD8^-$ ($CD4^+$), $CD4^-CD8^+$ ($CD8^+$) and $CD4^+CD8^+$ populations. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals. The symbol (*) indicates significant difference from the data of day 28 ($p < 0.05$, paired t -test).

strain of CSFV (Bangkok 1950) at 21 dpv (Section 2.3.2). Unvaccinated pigs also received the same amount of the challenge virus at the same time. Following the CSFV challenge, the unvaccinated pigs exhibited severe clinical signs of CSF starting from 7 days post-infection (dpi). All of the unvaccinated pigs developed severe leukopenia, with insufficient cells to analyze after the first week of infection, and died within 14 days following the challenge. Therefore, there was no data on the lymphocyte subpopulation from the control pigs after day 35. All of the

vaccinated pigs and naïve pigs remained clinically normal through the end of the experiment.

Following vaccination, the numbers of $CD4^+CD8^+$ and $CD4^+CD8^-$ from vaccinated group slightly increased, compared to those from the control group (Fig. 3). However, due to variation of the lymphocyte numbers from pigs within the same group, the changes in the lymphocyte numbers between days 7 and 14 were not statistically significant. Nevertheless, the number of $CD4^+CD8^+$ cells of the vaccinated group gradually increased, while the number of $CD4^+CD8^-$

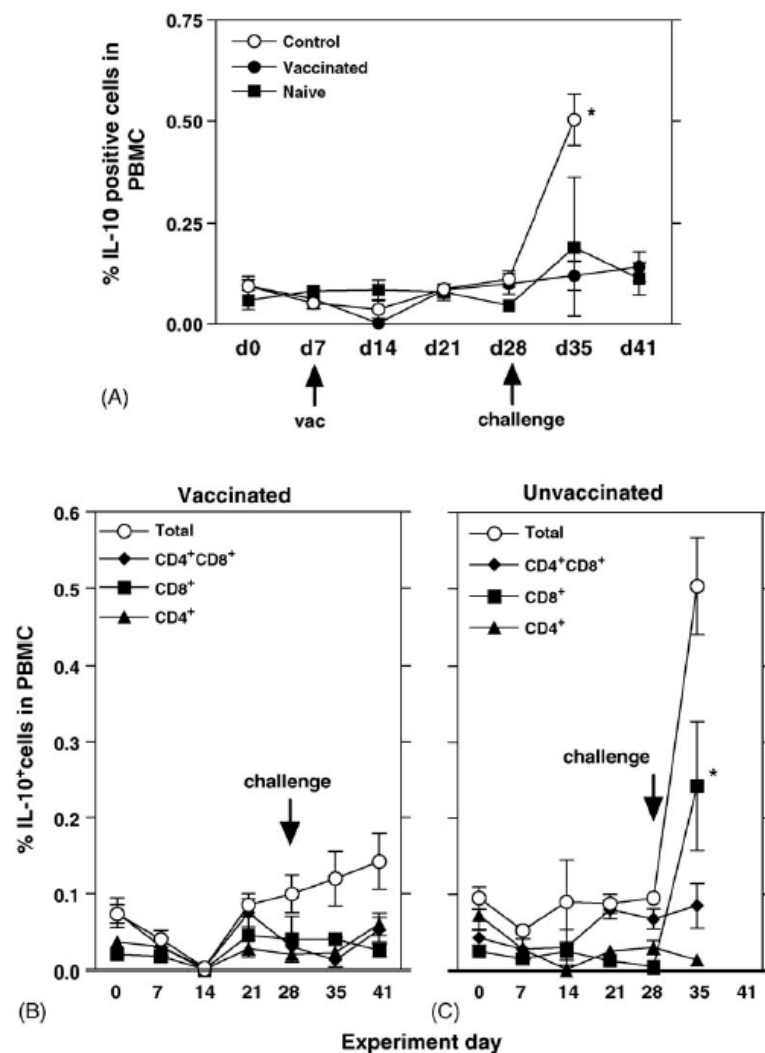


Fig. 6. Kinetics of total IL-10 production by porcine lymphocytes (A) and by lymphocyte subsets from the PBMCs of vaccinated (B) and unvaccinated (C) group (see Fig. 5). The symbol (*) in part (A) indicates significant difference from other groups ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). The symbol (*) in part (C) indicates significant difference from the data of day 28 ($p < 0.05$, paired t -test).

cells decreased, after vaccination through the end of the experiment (Fig. 3A). Numbers of the studied lymphocyte subpopulation of the control group remained relatively unchanged throughout the experiment (Fig. 3B).

At the time of challenge (day 28), no significant differences in the numbers of CD25⁺ and IFN- γ ⁺ cells among the groups were observed (Figs. 4 and 5). Interestingly, the numbers of CD25⁺ cells among the studied populations also remained unchanged following the challenge (Fig. 4). In contrast to the pattern of CD25 expression, there were significant increases in the numbers of IFN- γ producing cells in both vaccinated and unvaccinated groups following challenge (Fig. 5A). Exposure to virulent CSFV significantly increased the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs of both vaccinated ($p < 0.05$, paired t -test) and unvaccinated pigs ($p < 0.01$, paired t -test) at 7 dpi. The numbers of IFN- γ producing cells in the vaccinated group fluctuated after challenge. At day 35, the CD4⁺CD8⁺ population was major IFN- γ producing cells in vaccinated pigs, while both CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ populations contributed to the IFN- γ production in the unvaccinated group (Fig. 5B and C). Although, the number of IFN- γ producing cells in the unvaccinated group markedly increased by 7 dpi, these pigs did not survive the challenge. Interestingly, the number of IL-10 producing cells in the unvaccinated group also significantly increased and higher than the other groups at 7 dpi ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test) (Fig. 6A). The majority of the IL-10 producing cells were the CD4⁺CD8⁺ population (Fig. 6C). No significant changes in IL-10 production were observed in the vaccinated group following the challenge (Fig. 6A).

4. Discussion

Like other species, pigs have typical CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes in their peripheral blood and lymphoid tissues. These cells have been shown to have helper and cytolytic functions, respectively. However, unlike humans and mice, pigs also have an extrathymic double positive lymphocyte population that comprises 8–64% of the circulating pool of small resting T cells (reviewed in Zuckermann,

1999). It was recently shown that the extrathymic naïve Th cells (CD4⁺CD8⁺) can upregulate their CD8 expression upon cellular activation. Therefore, by examining the expression of the CD4 and CD8 molecules, porcine Th populations can be categorized into resting Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺), activated Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺) and memory (or primed) Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺) (Saalmuller et al., 2002). In this experiment, we followed the number of single positive and double positive porcine lymphocyte subsets in PBMCs following exposure to CSF antigen. We also monitored the expression of the activation marker (CD25) and intracellular IFN- γ production in these subpopulations. It should be noted that the PBMCs were cultured *in vitro* with CSFV before flow cytometric analyses. Therefore, kinetics of cellular activation and cytokine production obtained from this experiment would reflect CSFV-specific responses in the PBMCs.

It has been shown in several studies that the level of IFN- γ production can be used as an indicator for cell-mediated immunity in pigs (Mateu de Antonio et al., 1998; Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001). Our result from this study clearly showed that primed porcine PBMCs produced IFN- γ , but not IL-10, in response to secondary exposure to CSFV, and that the response could be measured by flow cytometry (Fig. 1). Following vaccination with CSF vaccine, double-positive (DP), CD4⁺CD8⁺ cells were the major IFN- γ producers in response to *in vitro* activation (Fig. 2). This finding is in agreement with previous reports showing that the DP cells are a memory population, which can produce high levels of IFN- γ in response to a recall antigen or polyclonal activator (Rodriguez-Carreno et al., 2002; Saalmuller et al., 2002). The finding also implies that the IFN- γ producing cells detected by ELISPOT assays following immunization with a CSF vaccine (Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003) were indeed reflecting helper T lymphocyte (Th) activity. It should also be noted that the number of IFN- γ producing cells following vaccination was not as high as that observed following the viral challenge. This finding is consistent with a previous report showing that immunization with a modified live vaccine induces a lower level of cell-mediated response than infection (Piriou et al., 2003). In Experiment 2, the vaccinated group did not show any

significant increase in the number of IFN- γ producing cells following vaccination, compared to a sharp increase in the numbers of IFN- γ producing cells following the CSFV challenge (Fig. 5). The indifference in cytokine production among the groups following vaccination might be partly related to the low levels of detectable IFN- γ producing cells, and the high variation of the numbers of cytokine producing cells from pigs within the same group. In our experience, detection of IFN- γ producing cells following CSF vaccination by flow cytometry is not always as sensitive as the previously reported ELISPOT assay. It should be noted that on day 28 of Experiment 2, the numbers of IFN- γ producing cells in all groups increased considerably without any specific treatment (Fig. 5A). The reason for this fluctuation is not clearly known, but could relate to non-specific activation of the lymphocytes, as there seemed to be increased activity on the cytokine production of the naïve CD4⁺ cell (Fig. 5B and C).

Following vaccination for CSF, there seemed to be two phases of cellular activation measured by the upregulation of surface CD25 expression; early cellular activation of the DP population is followed by the activation of the CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2A). Although the CD25 marker has been used to identify cellular activation in several reports (Dillender and Lunney, 1993; Quade and Roth, 1999; Saalmuller et al., 2002; Piriou et al., 2003), however, we did not see a good correlation between the level of CD25 expression and cytokine production in PBMCs either following vaccination or after challenge (Figs. 2 and 4). In this study, the activated population might not always be the major population producing the cytokine in response to the CSFV antigen. The differences in dynamics of CD25 expression and cytokine production might be related to the specific lymphocyte population in each study. Unlike the cytokine production, which is shown to be antigen-specific (Fig. 1), combining the percentages of CD25⁺ cells from the three studied lymphocyte subpopulations (CD4⁺, CD8⁺, and double positive) contributed to less than 50% of the CD25⁺ cells from total lymphocyte population, in both naïve and primed populations (data not shown). In addition, no significant differences in the numbers of CD25⁺ cells were observed in the challenge pigs regardless of their immunological history (Fig. 4). These results sug-

gested that lymphocytes could also be activated, non-specifically, and upregulated CD25 expression by CSFV. Alternatively, it is also possible that the incubation period for the *in vitro* activation system used in this study is shorter than in previous reports (Saalmuller et al., 2002; Piriou et al., 2003). Therefore, the results could reflect the different dynamics of cellular activation at a different incubation time. Development of the four-color staining assay that simultaneously analyses CD25 expression and IFN- γ production, in addition to the surface markers, will provide a better explanation on this discrepancy.

Following challenge with CSFV, the number of IFN- γ producing cells in the PBMC population increased in both vaccinated and unvaccinated pigs at 7 dpi (Fig. 5). Interestingly, the CD4⁺CD8⁺ population was the subpopulation mainly responsible for IFN- γ production in the PBMCs of both groups following challenge, while there were a significantly less number of IFN- γ producing DP cells in the PBMCs of the vaccinated group during the first week of infection (Fig. 5A). This finding is in agreement with the previous report demonstrating that the activation of CD8⁺ CTLs was observed early (from 15 dpi) in the PBMCs of immunized pigs challenged with CSFV, but the activation of CD4⁺CD8⁺ cells was not observed until 35 dpi (Piriou et al., 2003). As it has been previously shown that the porcine memory population preferentially home to the secondary lymphoid organs (Zuckermann, 1999). The low number of antigen-specific DP cells detected in the PBMCs of primed pigs following the CSFV challenge could simply reflect the difference in tissue homing preference among the subpopulations during an effector phase of the immune response.

It should be noted that porcine gamma-delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes can also expressed the CD8 surface molecules (Pescovitz, 1998). However, the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the PBMCs of young pigs is usually low and they are not the major IFN- γ producers in the PBMCs even when stimulated with a polyclonal T cell activator (Rodriguez-Carreno et al., 2002). In addition, $\gamma\delta$ T cells are more sensitive to CSFV infection and are depleted early after the viral challenge (Pauly et al., 1998). Although the kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by $\gamma\delta$ T lymphocytes were not monitored in this study, it is unlikely that the $\gamma\delta$ T cells be the major IFN- γ

producers observed in the CD4⁺CD8⁺ population following the viral challenge.

Although the number of IFN- γ positive cells was markedly increased in the unvaccinated pigs at 7 dpi (Figs. 3 and 4), these pigs did not survive the CSFV challenge. This phenomenon, which is usually seen in pigs with overwhelming CSFV infections, has been previously demonstrated using an ELISPOT assay (Suradhat et al., 2001). Interestingly, the number of IL-10 producing cells in the PBMCs was also markedly increased in the unvaccinated pigs, while the level of IL-10 production in the vaccinated pigs remained low through the end of the experiment (Fig. 6). The CD8⁺ cells were also found the major IL-10 producer in PBMCs (Fig. 6C). Thus, our results demonstrated that CSFV infection significantly increased the levels of both IFN- γ and IL-10 production in unvaccinated pigs. It should be noted that although CSFV is not usually detected in the PBMC population during the first week of infection, but abrogation of cellular immune responses is observed as early as 5 dpi (Pauly et al., 1998). Interleukin-10 is widely accepted to be a potent immunosuppressive cytokine that can strongly inhibit both innate and specific immune functions (Moore et al., 2001; Redpath et al., 2001). Our findings suggest that cytokine dysregulation could be one of the underlying mechanisms resulting in the immunoinhibitory effect observed following CSFV infection. Recently, the immunoinhibitory effects of viral infection via IL-10 induction have also been observed in hepatitis C virus (Dolganiuc et al., 2003) and human immunodeficiency virus (Almonti et al., 2003) models.

Taken together, our results suggest that CD25 expression and antigen-specific IFN- γ production by porcine lymphocytes may not be tightly associated. Furthermore, different lymphocyte populations appear to be responsible for cytokine production in the PBMCs following CSF vaccination and challenge. Further understanding of the kinetics of the cellular response against CSFV may provide information about the mechanisms of protection and a better strategy for disease control in the future.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. J.A. Roth and Dr. R. Platt for their kind contributions of the custom-made

mAbs and helpful suggestion during preparation of the manuscript. We thank Dr. A. Rovid Spickler for critically reading the manuscript, Dr. K. Ruxrungtham, Dr. S. Supchukul, and Dr. P. Kitikoon for their support and technical assistance. This work is supported by Thailand Research Fund, Chulalongkorn University and Intervet (Thailand) Ltd.

References

- Almonti, J.B., Ball, T.B., Fowke, K.R., 2003. Mechanisms of CD4⁺ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* 84, 1649–1661.
- Armengol, E., Wiesmuller, K.H., Wienhold, D., Buttner, M., Pfaff, E., Jung, G., Saalmuller, A., 2002. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J. Gen. Virol.* 83, 551–560.
- Dillender, M.J., Lunney, J.K., 1993. Characteristics of T lymphocyte cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 35, 301–319.
- Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., Romics, L.J., Mandrekar, P., Zapp, M., Szabo, G., 2003. Hepatitis C virus core and non-structural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 170, 5615–5624.
- Launais, M., Aynaud, J.M., Corthier, G., 1978. Hog cholera virus: active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet. Microbiol.* 3, 31–43.
- Mateu de Antonio, E., Husmann, R.J., Hansen, R., Lunney, J.K., Strom, D., Martin, S., Zuckermann, F.A., 1998. Quantitative detection of porcine interferon-gamma in response to mitogen, superantigen and recall viral antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 265–277.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T., 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245–267.
- Moennig, V., 2000. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* 73, 93–102.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Pauly, T., Konig, M., Thiel, H.-J., Saalmuller, A., 1998. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 79, 31–40.
- Pescovitz, M.D., 1998. Immunology of the pigs. In: Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds.), *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, San Diego, pp. 373–420.
- Pinyochon, W., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Tantawadsi, U., 1999. Biological characterization of swine fever virus Thai isolates. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 50, 107–117 (in Thai, with English abstract).

- Piriou, L., Chevallier, S., Hutet, E., Charley, B., Le Potire, M.-F., Albina, E., 2003. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet. Res.* 34, 389–404.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1999. Antigen-specific in vitro activation of T-lymphocyte subsets of cattle immunized with a modified live bovine herpesvirus 1 vaccine. *Viral Immunol.* 12, 9–21.
- Redpath, S., Ghazal, P., Gascoigne, N.R., 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 9, 86–92.
- Remond, M., Plateau, E., Cruciere, C., 1981. In vitro study of the cellular response of pigs vaccinated against classical swine fever. *Zbl. Vet. Med. B* 28, 743–748.
- Rodriguez-Carreno, M.P., Lopez Fuentès, L., Ezquerro, R.A., Alonso, F., Dominguez, J., 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN- γ producing lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 259, 171–179.
- Rumenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1991. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.* 65, 589–597.
- Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V., 2002. T-helper cells from naïve to committed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 137–145.
- Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S., 2003. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet. Microbiol.* 92, 187–194.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M., Damrongwatanapokin, S., 2001. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83, 177–189.
- Van Oirschot, J.T., 2003. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.* 96, 367–384.
- Wood, P.R., Seow, H.-F., 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 33–34.
- Zuckermann, F.A., 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 55–66.
- Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu de Antonio, E., Martin, S., 1998. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 57–67.
- Zuckermann, F.A., Martin, S., Husmann, R.J., Brandt, J., 1999. Use of interleukin-12 to enhance the cellular immune response of swine to an activated herpesvirus vaccine. *Adv. Vet. Med.* 41, 447–461.

Submitted manuscript ส่งไปเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ ในวารสาร Vaccine (Impact factor 2004; 2.824)

**IMPACT OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS
INFECTION ON THE EFFICACY OF CLASSICAL SWINE FEVER VACCINE**

S. Suradhat^{1*}, S. Kesdaengsakonwut¹, W. Sada², S. Buranapraditkun³,
S. Wongsawang¹, and R. Thanawongnuwech¹

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Inter-department of Medical Microbiology, Graduate School,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

* Corresponding author: Sanipa Suradhat, D.V.M., Ph.D.
Department of Veterinary Microbiology,
Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University,
Henri-Dunant Rd., Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand
Tel: (662) 218-9583
Fax: (662) 251-1656
E-mail: sanipa.s@chula.ac.th

Running title: Impact of PRRSV on CSF vaccination.

Abstract

Recent findings suggest that porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) possesses immunomodulatory properties. To investigate the effect of PRRSV infection on classical swine fever (CSF) vaccine efficacy, twenty-eight, 17-day-old pigs were divided into 5 groups. The experimental group was infected with a Thai PRRSV (01NP1) a week before CSF vaccination and challenged with the virulent CSF virus (Bangkok 1950) 3 weeks later. The control groups received no PRRSV infection, no CSF vaccination, no CSF challenge or in combination were included. The results demonstrated that PRRSV infection significantly reduced the CSF vaccine efficacy and could cause vaccination failure in the field.

Keywords: PRRSV, CSFV, vaccine

1. Introduction

Classical swine fever (CSF) is one of the most important viral infectious diseases of domestic pigs, causing substantial economic losses to the swine industry in most part of the world [1]. Classical swine fever is caused by an enveloped, single-stranded RNA virus, belongs to the pestivirus genus, of the Flaviviridae family [2]. The clinical outcome of CSFV infection is varied, from acute, subacute to chronic forms, depending on the virulence of the virus variants [3]. In endemic areas, vaccination against the CSFV is the most common means for disease control. The CSF vaccine derived from the Chinese (C)-strain, is considered to be safe and very effective in the induction of protective immunity against CSF. The vaccine has been shown to induce complete protection against CSFV infection [4], and has been extensively used for the control of CSF in domestic pigs, in particular in the highly endemic areas. Generally, the C-strain CSF vaccine induces complete clinical protection against either homotypic or heterotypic CSFV strains within the first week after vaccination [5-8]. Although, the C-strain derived CSF vaccines can efficiently induce protective immunity against CSFV infection, several other factors can influence the efficacy of the vaccine. These factors include the level of maternal derived antibodies at the time of vaccination [4, 8-10], vaccination protocol [5], age of the pig and co-infection with other pathogens [11].

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), an enveloped positive-stranded RNA virus, is a member of the family Arteriviridae in the order Nidovirales [12]. Since its emergence in the late 1980's, PRRSV has been recognized worldwide as one of the most economically important pathogens of swine [13]. The major characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) include reproductive failure of the sows and respiratory disease in pigs of all ages. Several studies suggest that PRRSV may negatively modulate the host immune responses. PRRSV infected pigs usually demonstrate prolonged viremia and persistent infection [14]. In addition, weak innate immunity followed by delayed and inefficient specific immunity is usually observed following PRRSV infection [14-16]. Infection with PRRSV can also result in declined local lung defenses leading to secondary bacterial infections which are known as the porcine respiratory disease complex [17]. One of the postulate mechanisms for immunomodulation is an induction of a potent immunosuppressive cytokine, interleukin (IL)-10, both systemically and locally, during an early stage of PRRSV infection [18-21]. Inhibition of the immune cells by IL-10 could be one of the explanations for the suppressed lung defense observed following PRRSV infection, as cell-mediated immunity is believed to play a significant role in respiratory defense mechanisms [22].

Apart from the respiratory defense, several lines of evidence suggest that the immunomodulatory effect of PRRSV may confer a negative impact on the immune responses induced by other vaccines. PRRSV infected pigs exhibit altered magnitude of T cell responses to pseudorabies vaccine [23]. Infection or vaccination with PRRSV appears to decrease the efficacy of *M. hyopneumoniae* bacterin in *M. hyopneumoniae* challenged pigs [24]. Recently, it has been shown that PRRSV infection suppresses the antibody response to CSF vaccine [25] and significantly reduced the CSFV-specific interferon (IFN)- γ production by the CSF vaccine-

primed peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [26]. These findings suggested that PRRSV infection could affect both cell-mediated and humoral immunities induced by the CSF vaccine. However, there is still limited information of PRRSV infection on the efficacy of CSF vaccine against the field challenge. In this study, we investigated the effect of PRRSV infection on the efficacy of CSF vaccine, using a previously established experimental challenge model. In order to understand the mechanism of immunosuppression, the systemic productions of the cytokines, IFN- γ and IL-10, by porcine lymphocytes were monitored by flow cytometry.

2. Materials and methods

2.1 Cells and viruses

The CSFV reference strain, ALD strain, was a gift from the National Institute of Animal Health of Japan. The CSFV strain used for challenges was the Thai isolate (Bangkok 1950 strain) from the National Institute of Animal Health of Thailand (NIAH). Viruses were propagated in a SK-6 cell line. Infected cells were collected after 4 days post infection, and subjected to 2 freeze-thaw cycles. The viral suspension was centrifuged at 1000 g for 20 minutes. The stock viruses in supernatant were stored at -80°C until needed. Viral titers were determined by a peroxidase-linked virus titration assay as described previously [27].

Thai PRRSV field isolate (strain 01NP1) was recovered from the pooled sera of PRRSV-infected pigs and designated as the North American genotype [28]. The virus was cultured in MARC-145 cells and stored at -80°C until needed. Virus isolation and titration were performed in Marc-145 cell line as previously described [29].

2.2 Animals and experimental protocols

Twenty-eight, 17-day-old, crossbred pigs from a CSF-free, PRRS-free commercial farm were housed at the animal facility, Faculty of Veterinary Science. The experimental and animal handling protocols were approved by the Ethics Committee on Experimental Animal Usage and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

The pigs were sero-negative to PRRSV, but possessed anti-CSFV maternal derived antibody titers (MDA), due to a routine CSF vaccination program in the sows. Five to seven pigs were randomly grouped into 5 experiment groups (table 1). On day 0 (D0), group C and D were intranasally inoculated with 5 ml (2.5 ml/nostril) of the Thai isolate PRRSV (strain 01NP1), at the titer of 104.5 TCID₅₀/ml. The other groups (A, B and E) were mock infected with an equal volume of MARC-145 lysate. On day 7 (D7), group B and D were immunized intramuscularly with a modified live, lapinized Chinese strain, CSF vaccine (1ml/dose), (Department of Livestock Development, Bangkok, Thailand). Other groups received an equal amount of vaccine diluent. The means maternal derived serum-neutralizing antibody titers of all groups were less than 8 at the time of vaccination. At 21 days post vaccination (D28), the pigs (group A-D) were challenged intramuscularly with 2x10⁴ TCID₅₀ of the virulent CSFV, strain Bangkok 1950 (NIAH, Thailand). The negative control pigs (group E) were kept in a separate isolation unit throughout the experiment. Clinical signs and rectal temperatures were monitored daily. Total leukocyte count

was performed at day 0, 3, 5, 7 and 14 post challenge. Blood and serum samples were collected for CMI assay, virus isolations, and neutralizing antibody titration every week until 2 weeks after the challenge (D41). On D41, all survived pigs were euthanized and necropsied for examination of pathological changes and virus isolation.

2.3 Detection of viral specific antibody titers

Serum neutralizing (SN) antibody titers against CSFV were determined by neutralizing peroxidase linked assay (NPLA) as described previously [5]. SN titer was the reciprocal of the highest dilution of the serum that completely inhibited viral infection.

Total anti-PRRSV antibody titers were determined by a commercial ELISA (HerdChek PRRSV IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) according to the manufacturer's protocol. The nominal cut-off for a positive result was a sample/positive (S/P) ratio of 0.4.

2.4 Isolation of porcine PBMCs

Porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 10 ml of the heparinized blood samples using Isoprep® separation medium (Robbins Scientific Cooperation, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's protocol. The purified PBMCs were resuspended at a concentration of 6×10^6 cells/ml in RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA), supplemented with 10% calf serum (Starrate, Bethungra, NSW, Australia), 2mM L-glutamine (GIBCO), 100 μ M non-essential amino-acid (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 100 unit/ml of penicillin G, 100 μ g/ml of streptomycin and 0.25 mg/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution; GIBCO).

2.5 Antibodies and reagents

The custom PE-Cy5 conjugated anti-swine CD8 monoclonal antibody (mAb) (76-2-11, IgG2a) was kindly provided by Dr. James A. Roth (Iowa State University, Ames, Iowa, USA). Anti-swine CD4-FITC conjugated mAb (74-12-4, IgG2b), anti-CD4-PE conjugated mAb (74-12-4, IgG2b), and biotinylated anti-swine IFN- γ mAb (P2C11, IgG2a) were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). The mAb anti-swine IL-10 (945A4C437B1, IgG1) was from Biosource International Inc (Nivelles, Belgium). Streptavidin-FITC and goat-anti-mouse IgG1-FITC conjugates were from Serotec (Oxford, UK).

2.6 Flow cytometry

2.6.1 In vitro activation and surface staining

One ml of freshly isolated PBMCs (6×10^6 cells/ml) was cultured in a well of 24-well plate, with CSFV (ALD strain) at 1 multiplicity of infection (m.o.i.). At 28 hours post inoculation, the protein transport inhibitor monensin (GolgiStop™, BD Biosciences) was added to the cell cultures, and the cells were incubated for another 12 hr. The cells were harvested for surface marker staining at 40 hours post inoculation. Briefly, approximately 2×10^6 cells were distributed into a well of round-bottom tissue culture treated 96-well-plate, washed with PBS supplemented

with 0.5% bovine serum albumin (Sigma) and 0.1% sodium azide (Sigma) (FACS buffer). Duplicate plates were set identically, one set for intracellular IFN staining and another for intracellular IL-10 staining. The cells were pelleted by centrifugation at 500 g for 2 min. The supernatants were discarded and the pellets were stained with 50 µl of the mixture of the mAbs (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE-Cy5) at their previously titrated optimum dilutions, and incubated in the dark at 4°C for 30 min. The cells were then washed 3 times with 150 µl/well of FACS buffer.

2.6.2 Intracellular cytokine staining

Following the last wash, the cells were fixed and permeabilized in 200 µl/well of Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and incubated for 3 hr, in the dark at room temperature. The cells were washed 3 times with 150 µl/well BD Perm/Wash solution, according to the manufacturer's protocol. Fifty µl of biotinylated mouse anti-swine IFN-γ diluted in BD Perm/Wash solution was added to all wells and incubated in the dark at 4°C for 30 min. After 3 washes, 50 µl of streptavidin-FITC conjugate was added to all wells and incubated in the dark at 4°C for 30 min. All of the washing processes following permeabilization were done using the BD Perm/Wash solution, according to the manufacturer's protocol. At the final step of the 3 washes, the cells were resuspended in 200 µl of 2% formaldehyde, transferred to a centrifuge tube and kept in the dark at 4°C until analyzed. For intracellular IL-10 staining the same method was applied but the primary antibody was mouse anti-swine IL-10 mAb and the secondary antibody was FITC-conjugated, goat-anti-mouse IgG1 antibody. Flow cytometric analysis was performed using a Facscan cytometer (BD Biosciences).

2.6.3 Flow cytometric analyses

The viability of studied population prior to surface staining, determined by Trypan blue staining, was more than 80%. Numbers of events collected for analyses was 100,000. Lymphocytes were first gated (G1) from the harvested population by size (FSC) and granularity (SSC), this yielded predominantly lymphocyte population with approximately 3% SWC3+ cell contamination (data not shown). For analyses of triple labeled cells, the G2 (CD8+) and G3 (CD4+) were selected from the total lymphocyte population (G1) and used for determining of the expression of the second (CD4 or CD8). Since porcine CD8+ population exists in CD8hi and CD8lo forms [30], the triple positive, CD4+CD8+cytokine+, population was determined from G3.

2.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism® version 3.00 for Windows (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA).

3. Results

3.1 Clinical signs and survival rates of the experimental pigs

The detail of the group treatments and number of experimental pigs were shown in Table 1. Following PRRSV infection on day 0 (D0), the pigs (group C and D) developed clinical signs of PRRS during day 2-16. The observed clinical signs included depression, anorexia, conjunctivitis, puffy eyes, and respiratory distress. The respiratory sign was most prominent during day 4-5 and recovered by day 16 of the experiment. Three pigs from group C and one pig

from group D died, from *Haemophilus* spp. infection during day 10-18 post PRRSV infection. The rest of the pigs receiving MARC-145 mocked infected cell lysate (group A, B, and E) remained healthy up to the time of CSFV challenge. No adverse effect was observed following vaccination with CSF vaccine on day 7. The negative control pigs (group E) remained clinically normal until the end of the experiment.

Following the CSFV challenge, the control-vaccinated pigs (group B) remained clinically normal, and did not show significant changes in leukocyte count (figure 1), suggesting that the C-strain vaccine induced complete protection against the CSFV challenge. In contrast, the unvaccinated pigs (group A and C) exhibited a severe clinical picture of CSF including high fever (rectal temperature >40°C), depression, anorexia, leukopenia, respiratory distress, tremor, diarrhoea, petechial haemorrhage of the skin, and nervous signs in the late stage of infection. The challenged pigs were dead or euthanized, due to severe clinical signs, between days 37-39 (group A) and days 33-37 (group C). None of the unvaccinated pigs (group A and C) survived the challenge. The vaccinated pigs that were previously infected with PRRSV (group D) exhibited clinical signs of CSF infection, with a milder degree comparing to the unvaccinated groups. However, the pigs were severe leukopenic comparable to group A and C. Most of the pigs in this group died between days 33-36. At the end of the experiment, there was only one pig from group D survived with evidence of recovering leukocyte number (figure 1). The survival rate of the group D was significantly different ($p < 0.05$, Fisher's exact test) from group B and was statistically indifferent from group A and C. Bacteriological studies revealed significant bacterial complication in the groups A, C and D. The identified bacteria included *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., and *E. coli* (data not shown).

3.2 Virological studies and pathological findings

Following PRRSV infection, PRRSV could be detected in the sera of infected pigs from day 7 and disappeared by day 28 in the non-vaccinated group (group C). Interestingly, in the CSF-vaccinated group (group D), PRRSV could be isolated from the serum samples up to the time of CSFV challenge and persisted until the time of death (table 2).

Classical swine fever virus was detected in the sera from the non-vaccinated groups (A and C) from day 31 and markedly increased until the time of death. No CSFV was detected in the sera of the vaccinated pigs (group B), indicating that these pigs were completely protected by CSF vaccination. In contrast, the vaccinated pigs that were previously infected with PRRSV (group D) exhibited considerably high amounts of CSFV in the sera following the challenge. The reduced CSFV titer detected on day 38 was from the only one survived pig in this group (Table 2). Consistent with the results from sera, significantly high CSFV titers were found in the internal organs of the unprotected pigs (group A, C and D). The PRRSV-infected, vaccinated group (group D) contained significantly higher CSFV titers in the internal organs compared to the vaccinated counterpart (group B). In most of the studied organs, the CSFV titers from the group D were comparable to those from the non-vaccinated control pigs (group A). The PRRSV-infected, non-vaccinated pigs (group C) contained higher amounts of CSFV than the CSFV

challenge group (group A) especially in kidney and lymph nodes. No CSFV was isolated from the pigs from group B and E (table 3). The pathological changes and percentages of pigs exhibited the macroscopic lesions were described in table 4. The findings were consistent with the clinical and virological findings.

3.3 Immunological responses and cytokine productions

The serological study on the level of anti-PRRSV antibodies revealed that the most of the pigs seroconverted (S/P ratio > 0.4) by 2 weeks post infection. It should be noted that the antibody response of the vaccinated group (group D) tended to develop slower than the non-vaccinated group (group C), and that the antibody titers still increased up to the end of the experiment (table 5).

Since the experimental pigs were obtained from a commercial farm, in which CSF vaccination was routinely practiced, the pigs therefore, possessed certain levels of maternal-derived antibody (MDA) titers. On day 7 of the experiment, all of the experimental groups had comparable level of mean MDA titers ($p > 0.05$, ANOVA). The mean titer of every group was less than 32 which has been previously demonstrated to have minimal interfering effect on the induction of anti-CSFV immunity by vaccination [8, 10]. Following vaccination, the vaccinated pigs (group B) seroconverted from 7 days post vaccination. Furthermore, the pigs exhibited enhanced antibody responses following the CSFV challenge, suggesting the induction of anamnestic responses. No significant enhancement in anti-CSFV antibody responses was observed in the PRRSV infected, vaccinated pigs (group D), even after the CSFV challenge (figure 2). At the time of challenge (day 28), the mean anti-CSFV neutralizing titers of group D was significantly lower than that of the group B ($p < 0.05$, student t-test).

The study of CSFV-specific IFN- γ production by flow cytometry revealed no enhancement of IFN- γ production following vaccination in any group. However, following CSFV challenge, significant increases of IFN- γ + cells were observed in all the challenged groups (figure 3) with the evidence of the CD8+ cells as a major IFN- γ producer in every group (data not shown). The vaccinated pigs exhibited a significant enhanced IFN- γ production ($p < 0.05$, paired t-test), which was then reduced to a background level, compared to the control pigs, suggesting that the priming effect and controlled infection occurred in this group (figure 3). The non-vaccinated pigs (group A and C), and the PRRSV-infected, vaccinated pigs (group D) exhibited sharp increases of IFN- γ production following the CSFV challenge. By day 35, the animals in the non-vaccinated, challenged groups (A and C) started to die or were severely leukopenic (see figure 1) with insufficient cell numbers to be analyzed statistically. The data of group D on day 41 was obtained from the only survived pig, which showed recovering signs, with the level of IFN- γ producing cells declined to the background level (figure 3).

Interestingly, when analyzing the same set of cultured cells, there were increasing number of IL-10+ cells in the PRRSV infected group which peaked on day 14, and also following the CSFV challenge. The non-vaccinated, challenged pigs (group A) also exhibited increased IL-10 production following the challenge (figure 3). The CD8+ was the major subpopulation in IL-10

production (figure 4). Due to the high variation of the number of IL-10 producing cells within the group, no statistically difference could be analyzed. Nevertheless, these results demonstrated more fluctuation in IL-10 production in the groups that were previously infected with PRRSV.

4. Discussion

In the endemic area, routine vaccination is one of the most effective strategies for prevention and control of CSF. The modified live, C-strain, CSF vaccine is regarded as one of the most effective CSF vaccines that provides not only clinical but also complete virological protection, i.e. sterile immunity, within a week following vaccination [4, 5]. The C-strain vaccine has been shown to induce heterotypic protection against all the subtypes circulated in Thailand including the recently reported variants found only in Asia, the genogroup 3 [6, 7, 27]. In this study, a complete protection including prevention of leukopenia and viremia, induced by CSF vaccination was again confirmed (group B). However, PRRSV infection prior to CSF vaccination significantly interfered with an induction of anti-CSFV immunity. Although the PRRSV infected group exhibited slight elevation of the mean anti-CSFV SN titer at the first week following vaccination, but the titers constantly declined afterward. By the time of CSFV challenge, the mean SN titer of the PRRSV-infected group (group D) was significantly lower than the non-infected, vaccinated group (group B). No priming effect on either cell-mediated or humoral immune responses was observed in the PRRSV infected, vaccinated group following the CSFV challenge. Furthermore, vaccination during an early stage of PRRSV infection did not protect nor reduce viremia or viral spreading in the challenged pigs. Moreover, remarkably high IFN- γ production by the PBMC, accompanied with secondary bacterial infection, suggesting that overwhelmed CSFV infection occurred in both PRRSV infected group regardless of CSF vaccination status. These findings corresponded with the previous finding that PRRSV infection affected the induction of humoral immune response to CSFV [25]. Furthermore, the effect extended to the cell-mediated immune response as well.

Interestingly, the PRRSV-infected pigs (group C and D) exhibited faster onset of clinical sign and were dead earlier than the non-infected group (group A). This result was in line with the previous report demonstrating that PRRSV infection could accelerate the progress of CSF [31]. There seemed to be prolonged PRRSV-viremia in the vaccinated pigs (group D) compared to the non-vaccinated group (table 2). PRRSV could be detected in the pigs from group D up to day 38 while the PRRSV titer in the group C was undetected by the time of challenge. At present, the reason for this is not clearly known. Further time-course study on the PRRSV titers in both serum samples and tissues will be needed to confirm this phenomenon.

PRRSV infection induces rapid onset of viremia within the first day of infection [32, 33], and viremia lasts up to 1 month [33, 34]. In general, pathogenesis of PRRSV can be defined into 3 phases. The early acute phase involves a rapid onset of viremia and systemic infection of the lymphatic organs. This process occurs during the first 2 weeks of infection, followed by the delayed acute phase that occurs primarily in the lungs during 2-3 weeks post infection. The persistent phase lasts several months after infection [35]. During the early acute phase, PRRSV

rapidly replicates in many cell types including monocytes/macrophages and dendritic cells of the lymphoid organs throughout the body [35, 36]. These cells have been known to involve in an induction of specific immune responses. Therefore, it is conceivable that PRRSV infection may post systemic effect on the immune system of the infected host during the early acute phase of infection. Supporting this notion, it has been previously shown that PRRSV infection can significantly affect the induction of immune responses by several vaccines including the CSF vaccine [23-25].

Previous reports demonstrated that PRRSV infection poorly induced innate immune responses followed by delayed viral-specific immunity, and impaired lung defense mechanism [15-17, 37, 38]. Suppression of T cell responses to PRRSV has been previously suggested [36, 39]. These findings lead to the concept that PRRSV may possess immunomodulatory properties. However, studies related to the immunomodulatory role of PRRSV often give contradicting results [14]. Several factors including stage of PRRSV infection at the time of study, immunological competency of the experimental pigs, and the interaction between PRRSV and the co-infecting pathogens or vaccines, could be responsible to the discrepancy among the observations from different studies.

Although PRRSV replication occurs in lymphoid tissues throughout the body during the acute phase of infection [35], significant cytopathic effect of the immune cells has not been reported in the lymphoid organs or the lungs. No significant changes in the numbers of macrophage, or alteration of the numbers of major T cell subpopulation were observed in blood and lymphoid tissues or lungs [36, 40]. These findings suggest that other mechanism of PRRSV-host interaction could be responsible to the unique immunological picture observed following PRRSV infection. Recently, several studies have shown that PRRSV infection, in particular during the active stage, resulted in systemic and local productions of a potent immunosuppressive cytokine, IL-10 [18-21]. In our experiences, not only the virulent PRRSV strain but the modified live PRRSV vaccine strain could also induce *in vivo* IL-10 production as well (S. Suradhat, unpublished observation). Interleukin 10 has been recognized as an important cytokine that downregulates functions of antigen presenting cells and several effector populations [41]. Moreover, it has been recently shown that IL-10 plays a crucial role in differentiation and function of regulatory dendritic cells (DCr) and facilitates differentiation of pathogen-specific regulatory T cells (Tr1) which downregulate the antigen-specific immune responses. Induction of IL-10 production during the active stage of infection has been known as one of the immune evasion strategies by several intracellular pathogens [42, 43].

We postulated that the early systemic induction of IL-10 could result in systemic inhibition of immune responses to other pathogens during the same period. Prior to the CSFV challenge, IL-10 production of the PRRSV infected groups, following *in vitro* culture with CSFV, fluctuated while no significant change was observed in the other groups (figure 3). The increased IL-10 production in the cultured cells peaked approximately 2 weeks following PRRSV infection. It is unlikely that the IL-10 production was CSFV-specific, since the non-vaccinated, PRRSV infected pigs (group C) also exhibited enhanced IL-10 production. Previously, it has been shown that the

presence of PRRSV in the culture resulted in enhanced IL-10 production by the CSFV-primed PBMC [26]. The enhanced IL-10 production observed in the group C and D was likely due to the carried over PRRSV and/or infected PBMC into the culture system. In addition, increased IL-10 production in the unprotected groups following the CSFV challenge could relate to an overwhelmed CSFV infection. It has been previously shown that PBMC of the CSFV-infected unprotected pigs contained high numbers of IFN- γ and IL-10 producing cells, in particular in the CD8⁺ subpopulation, following the CSFV challenge [44]. However, it should be noted that the recovered pig (group D) still possessed high number of IL-10 producing cells by day 41, suggesting that systemic immunosuppression could still occurred in this pig. This information implied that the recovered animal might be vulnerable to the secondary infection in the field situation.

The result that PRRSV infection significantly inhibited the CSF vaccine efficacy confers several implications to the swine industry, in particular the CSFV-endemic countries with high prevalence of PRRSV. The findings from this study suggest that CSF vaccination during the active PRRSV infection should be avoided. It should be noted that the virulent strain CSFV (Bangkok 1950), used in this experiment, induced acute CSF that resulted in typical clinical signs of CSF with 100% mortality rate in a short period of time. However, with the increased prevalence of subacute and chronic CSF was recently observed in endemic countries particularly in Asia [6, 45], it is likely that CSFV-infected pigs will be able to survive for a longer period. Moreover, the clinical signs of CSF may be masked by other bacterial or viral complications in the field [46]. In this case, the infected pigs would serve as undetected source of CSFV infection in the farm for a long period of time and would certainly complicate the management and control strategies. Therefore, regular monitoring of the herd immunity against the CSFV and PRRSV infection status in the farm would be critical and strongly encouraged in the endemic areas.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. James A. Roth and Ratree Platt (Iowa State University, Ames, Iowa, USA) for their contribution of the monoclonal antibodies used for flow cytometry and suggestions, and Dr. S. Damrongwatanapokin for the CSFV used in the challenge study. We thank Dr. R. Panyatong and S. Lacharoje for the technical assistance and Dr. D. Nilubol for suggestions during the preparation of the manuscript. This study was supported by Thailand Research Fund, Chulalongkorn University, and Chulalongkorn University Graduate School.

References

- [1] Moennig V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol* 2000; 73:93-102.
- [2] Wengler G. Family Flaviviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown FS, editors. *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Berlin, Springer, 1991: 223-33.
- [3] Meyers G, Thiel H-J. Molecular characterization of Pestiviruses. *Adv Virus Res* 1996; 47:53-118.
- [4] Van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 2003; 96:367-84.
- [5] Suradhat S, Intrakamhaeng M, Damrongwatanapokin S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet. Immunol Immunopathol* 2001; 83:177-89.
- [6] Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Pinyochon W, Inui K, Blacksell S, Sawada T. Diversity of classical swine fever virus in Thailand: antigenic and vaccine efficiency studies. *J Thai Vet Med Assoc* 2001; 52:9-19.
- [7] Damrongwatanapokin S, Patchimasiri T, Pinyochon W, Parchariyanon S. Efficacy of classical swine fever DLD vaccine against classical swine fever virus Chiangmai/98 isolate. *J Thai Vet Med Assoc* 2002; 53:5-14.
- [8] Suradhat S, Damrongwatanapokin S. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet Microbiol* 2003; 92:187-94.
- [9] Terpstra C, Wensvoort G. The protective value of vaccine-induced neutralizing antibody titres in swine fever. *Vet Microbiol* 1988; 16:123-28.
- [10] Parchariyanon S, Tantaswasdi U, Pinyochon W, Methiyapun P. Immunity against swine fever vaccine II Immunity against swine fever vaccine in piglets and protection level of maternal immunity in piglets before vaccination. *J Thai Vet Med Assoc* 1994; 45:37-45.
- [11] Suradhat S, Damrongwatanapokin S. Factors that influenced an effectiveness of classical swine fever vaccine: a case study. *Thai J Vet Med* 2002; 32 (Suppl.):163-72 (in Thai with English abstract).
- [12] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 142:629-33.
- [13] Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficiency and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000; 74:309-29.
- [14] Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann FA. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 2002; 15:533-47.
- [15] Meier WA, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 2003; 309:18-31.

- [16] Lopez OJ, Osorio FA. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102:155-63.
- [17] Halbur PG. Porcine viral respiratory diseases. In: *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*. Birmingham, UK; 1998: 1-10.
- [18] Suradhat S, Thanawongnuwech R. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003; 84:2755-60.
- [19] Chung H-K, Chae C. Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Comp Pathol* 2003; 129:205-12.
- [20] Van Gucht S, Labarque G, van Reeth K. The combination of PRRSV virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102:165-78.
- [21] Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Zuckermann FA, et al. Deciphering the involvement of innate immune factors in development of the host immune response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102:199-216.
- [22] Dunkley M, Pabst R, Cripps A. An important role for intestinally derived T cells in respiratory defense. *Immunol Today* 1995; 16:231-36.
- [23] De Bruin MGM, Samson JN, Voermans JJM, van Rooij EMA, De Visser YE, Bianchi ATJ. Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76:125-35.
- [24] Thacker EL, Thacker BJ, Young TF, Halbur PG. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 2000; 18:1244-52.
- [25] Li H, Yang H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. *Vet Microbiol* 2003; 95:295-301.
- [26] Suradhat S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003; 84:453-59.
- [27] Pinyochon W, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Tantaswasdi U. Biological characterization of swine fever virus Thai isolates. *J Thai Vet Med Assoc* 1999; 50:107-17 (in Thai with English abstract).
- [28] Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tasanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 2004; 101:9-21.
- [29] Thanawongnuwech R, Halbur PG, Ackermann MR, Thacker EL, Royer RL. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385) virulence strains of porcine reproductive

- and respiratory syndrome virus (PRRSV) on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet Pathol* 1998; 35:398-406.
- [30] Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72:55-66.
- [31] Depner KR, Lange E, Pontrakulpipat S, Fichtner D. Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virus infection in weaner pigs. *J Vet Med* 1999; B 46:485-91.
- [32] Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA,. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 1995; 32:361-73.
- [33] Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, et al. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 1996; 33:159-70.
- [34] Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time interval after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* 1997; 56:9-19.
- [35] Beyer J, Fichtner D, Schirrmeier H, Polster U, Weiland E, Wege H. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J Vet Med* 2000; B 47:9-25.
- [36] Xiao Z, Batista L, Dee S, Halbur P, Murtaugh MP. The level of virus-specific T cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 2004; 78:5923-33.
- [37] Bautista EM, Molitor TW. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome in swine. *Viral Immunol* 1997; 10:83-94.
- [38] Van Reeth K, Nauwynck H. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet Res* 2000; 31:187-213.
- [39] Aasted B, Bach P, Nielsen J, Lind P. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 9:1229-34.
- [40] Samsom JN, De Bruin MGM, Voermans JJM, Meulenbergh JM, Pol JMA, Bianchi ATJ. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cells. *J Gen Virol* 2000; 81:497-505.
- [41] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- [42] Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 2001; 9:86-92.
- [43] McGuirk P, Mills KHG. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002; 23:450-55.

- [44] Suradhat S, Sada W, Buranapraditkun S, Damrongwatanapokin S. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Vet Immunol Immunopathol* 2005; in press
- [45] Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song J-Y, Liou PP, et al. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 2000; 73:137-57.
- [46] Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Vet J* 2003; 165:11-20.

Legends

Figure 1 Total leukocyte count following the CSFV challenge. Experiment pigs were infected with PRRSV (PRRSV) on day 0 and vaccinated with CSF vaccine (Vac) a week later. Three weeks after CSF vaccination, the pigs were challenged with the virulent CSFV (Chall). Blood samples were collected and numbers of leukocyte count were determined at 0, 3, 7 and 14 post challenge. Naïve pigs were included in the study as a negative control. Data represents mean ($\pm$ SD) of total leukocyte count. Group treatments were indicated in the legends. Leukocyte number of $< 9,000 \text{ cell/mm}^3$ is considered leukopenic.

Figure 2 Levels of CSFV-specific serum neutralizing (SN) antibody titers. Pigs were infected with PRRSV (PRRSV) on day 0 (0) and vaccinated with CSF vaccine (Vac) a week later (7). Three weeks after vaccination (28), the pigs were challenged with CSFV (Chall). Group treatments were indicated in the legends. Data represent mean ($\pm$ SD) of the log2 SN titers determined by NPLA.

Figure 3 Total IFN- γ (A) and IL-10 (B) production by porcine peripheral blood lymphocytes. Pigs were infected with PRRSV (PRRSV) on day 0 (0) and vaccinated with CSF vaccine (Vaccine) a week later. Three weeks after vaccination (28), the pigs were challenged with CSFV (CSFV). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 hr before harvesting for flow cytometric analyses. Group treatments were indicated in the legends. The data represent the mean ($\pm$ SEM) of the % cytokine positive cells.

Figure 4 IL-10 productions by porcine peripheral blood lymphocyte subpopulations. IL-10 productions by lymphocyte subpopulations from the pigs that were vaccinated with CSF vaccine (A), and the pigs that were infected with PRRSV (day 0), prior to the CSF vaccination (B). Both groups were challenge with CSFV on day 28. The studied lymphocyte subsets included $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ (CD4^+), $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ (CD8^+) and $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ populations.

Table 1 Experimental protocol and number of survived pigs

Gr.	Treatments			(PRRSV)	(Vaccine)	(CSFV)				Survival
	PRRSV	Vaccine	CSFV	D0	D7	D28	D35	D41	rate ^c (%)	
A	-	-	+	5	5	5	5	0	0	
B	-	+	+	5	5	5	5	5	100	
C	+	-	+	7	7	4 ^a	1	0	0	
D	+	+	+	6	6	5 ^b	2	1	20	
E	-	-	-	5	5	5	5	5	100	

^a Three pigs died from *Haemophilus spp.* infection on D 10, 11 and 18.

^b One pig died from *Haemophilus spp.* infection on D12.

^c Survival rates were calculated from (the number of pigs on D41 / the number of pig on D28) x100.

Table 2 PRRSV and CSFV titers from pooled serum samples collected during the experiment

	D0 (P)	D7 (V)	D14	D28 (C)	D31	D33	D35	D38	D41
PRRSV titer^a									
A (- / - /C)^d	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	na ^c
B (- / Vac /C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (P/ - /C)	-	3.5	<2	-	-	-	-	na	na
D (P/ Vac /C)	-	3.25	3	2.5	2.5	2.25	2.5	-	-
E (- / - / -)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSFV titer									
A (- / - /C)	-	-	-	-	3.63	6.97	7.97	-	na
B (- / Vac /C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (P/ - /C)	-	-	-	-	4.80	6.30	7.80	na	na
D (P/ Vac /C)	-	-	-	-	4.63	6.97	6.97	2.97	-
E (- / - / -)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a viral titers from pooled serum sample (logTCID₅₀/ml)^b Not detected^c Not applicable due to animal death^d Treatments: P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine

Table 3 Classical swine fever virus titers from internal organs of the experimental pigs at the end of the experiment (or at the time of death)

Gr. (treatment)	Viral titers (log TCID ₅₀ /gram)				
	A (-/-/C)	B (-/V/C)	C (P-/-/C)	D (P/V/C)	E (-/-/V)
Brain	4.13 ± 0.60 ^{*a}	0 ^b	4.80 ± 0.71 ^a	2.80 ± 0.17 ^c	0 ^b
Tonsil	4.08 ± 0.19 ^{a,b}	0 ^c	4.55 ± 1.77 ^a	3.25 ± 0.58 ^b	0 ^c
Lung	4.32 ± 0.62 ^a	0 ^b	3.72 ± 1.47 ^{a,c}	2.66 ± 1.05 ^c	0 ^b
Spleen	3.84 ± 0.63 ^a	0 ^b	4.11 ± 2.26 ^a	4.06 ± 1.06 ^a	0 ^b
Kidney	3.81 ± 0.83 ^a	0 ^b	5.14 ± 0.23 ^c	3.45 ± 0.89 ^a	0 ^b
Lymph nodes	3.89 ± 0.63 ^a	0 ^b	5.22 ± 0.83 ^c	3.36 ± 0.42 ^a	0 ^b

* Data represents mean ± SD virus titers (log TCID₅₀/gr)

^{a-c} indicates statistical differences among the experimental groups (ANOVA, $p < 0.05$)

Treatments: P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine

Table 4 Percentages of experimental pigs exhibiting pathological changes that related to CSF

	Experimental group (treatments)				
	A (-/-/C) ^a	B (-/V/C)	C (P/-/C)	D (P/V/C)	E (-/-/)
Pneumonia	100 ^b	0	100	100	0
Lymphadenopathy					
- inguinal ln.	75	0	75	75	0
- tracheobroncheal ln.	75	0	100	75	0
- mandibular ln.	100	0	100	100	0
- mesenteric ln.	40	0	40	40	0
Thymic atrophy	100	0	100	100	0
Haemorrhage					
- skin	60	0	40	20	0
- lymph node	60	0	40	40	0
- kidney	60	0	20	60	0
- tonsil	0	0	0	20	0
- gastric mucosa	0	0	20	0	0
Splenic infarction	0	0	20	75	0
Brain congestion	100	0	100	100	0
Gastric infarction	20	0	20	0	0
Fibrinous pleuritis	0	0	20	0	0
Fibrinous peritonitis	0	0	20	0	0

^a Treatments: P; PRRSV, C; CSFV challenge, V; CSFV Vaccine

^b Percentages of animals with CSF lesion

Table 5 Anti-PRRSV antibody responses and percent PRRSV-seropositive pig during the experiment

GROUPS (Treatment)	Mean S/P ratio ^a (% pig positive)						
	D0 (P)	D7 (Vac)	D14	D21	D28 (C)	D35	D38
A (- / - /C)^c	0 (0)	0.020 (0)	0.016 (0)	0.010 (0)	0.018 (0)	0.017 (0)	0.050 (0)
B (- / V/C)	0 (0)	0.035 (0)	0.012 (0)	0.092 (0)	0.011 (0)	0.041 (0)	0.009 (0)
C (P/ - /C)	0.003 (0)	0.157 (0)	1.095 (80)	1.838 (100)	1.440 (66.67)	1.306 (66.67)	na ^b
D (P/ V /C)	0.002 (0)	0.273 (16.67)	0.959 (60)	1.016 (60)	0.745 (75)	1.061 (100)	2.379 (100)
E (- / - / -)	0.050 (0)	0.016 (0)	0.032 (0)	0.108 (0)	0.010 (0)	0.009 (0)	0.008 (0)

^a Cut-off value for PRRSV-seropositive when S/P ratio ≥ 0.4 (IDEXX[®] ELISA test kit)

^b not applicable due to animal death

^c Treatments: P; PRRSV, C; CSFV challenge, Vac; CSFV Vaccine

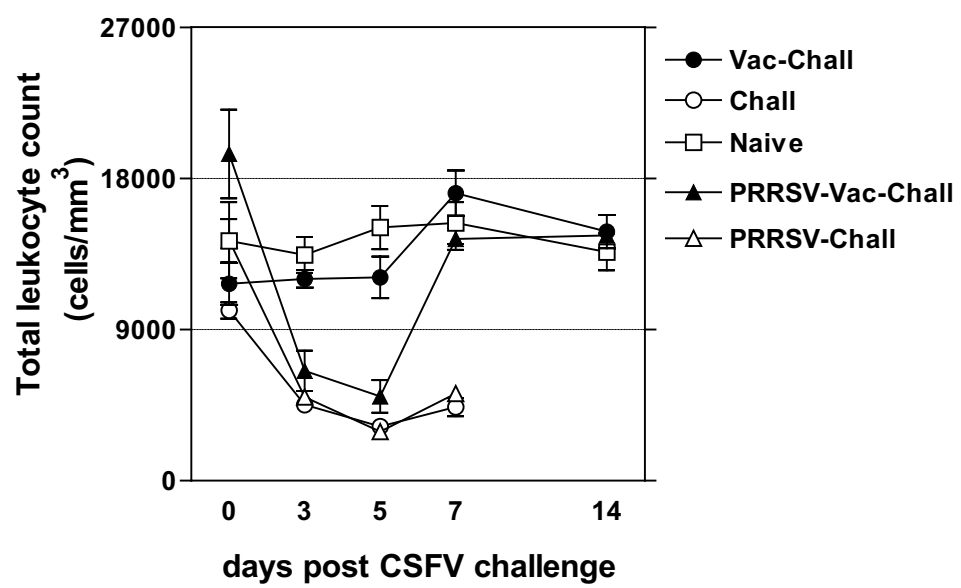


Figure 1 (Suradhat et al.)

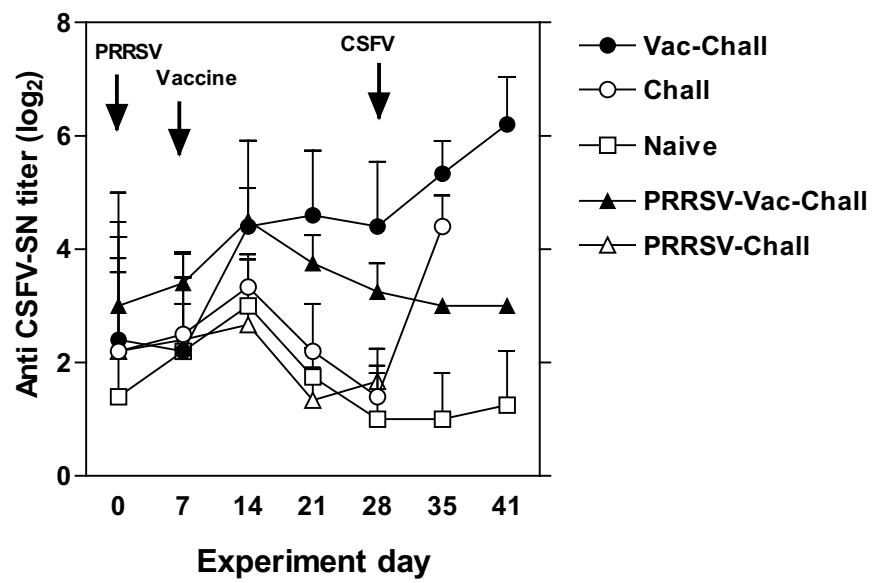


Figure 2 (Suradhat et al.)

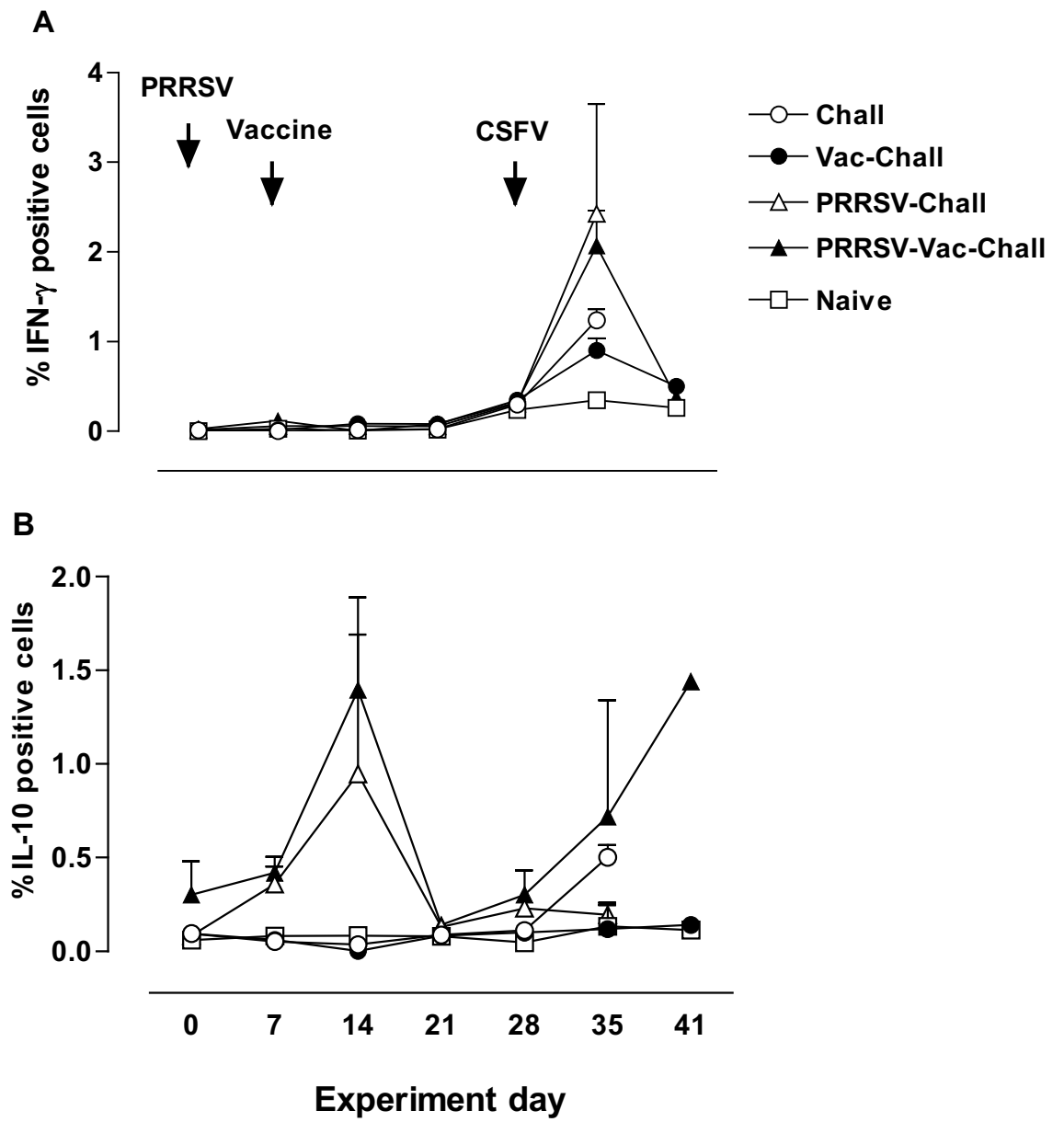


Figure 3 (Suradhat et al.)

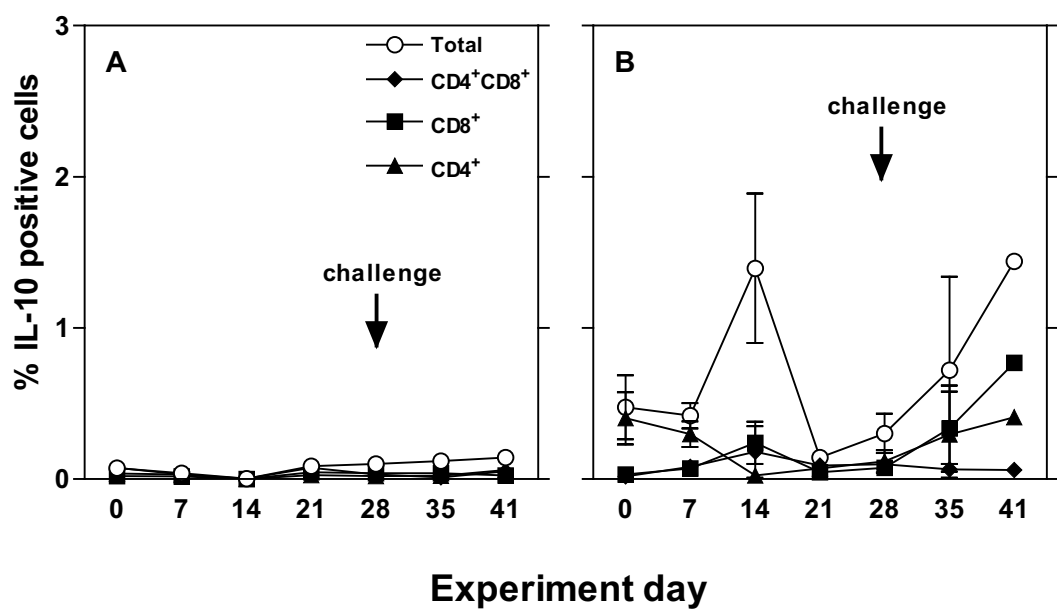


Figure 4 (Suradhat et al.)

Classical swine fever handbook

Classical swine fever vaccine: the role of cell mediated immunity and other factors on induction of protective immunity

Sanipa Suradhat^{1}, Sudarat Damrongwatanapokin² and Roongroje Thanawongnuwech¹*

Summary

Classical swine fever (CSF), caused by classical swine fever virus (CSFV) is one of the most important viral diseases in the swine industry worldwide. During the past 5 years, several techniques for measuring of porcine cell-mediated immunity (CMI) were established and applied in conjunction with other conventional assays, to study factors that influence the induction of anti-CSFV immunity. The studies emphasized the role of cell-mediated immunity in protection against CSFV infection. Although our results showed that the available modified live CSF vaccines in Thailand could induce complete heterotypic protection, several factors including maternal immunity, age at primary vaccination, vaccination protocol and complication by other pathogens, could greatly affect the effectiveness of CSF vaccines in the field.

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand

* Corresponding author e-mail address: Sanipa.s@chula.ac.th

² Virology section, The National Institute of Animal Health (NIAH), Department of Livestock Development, Bangkok 10900, Thailand

Classical swine fever (CSF) is one of the most important diseases in pigs, causing serious economic losses to the swine industry worldwide [1]. Despite tremendous efforts to control the disease during the last decade, CSF continues to cause problems in Thailand and Southeast Asian countries. Classical swine fever virus (CSFV) is an enveloped, single-stranded RNA virus in the genus Pestivirus of the *Flaviviridae* family [2]. Recently, several new genogroups of CSFV have been identified; some are unique to the Asia region [3, 4]. The newly emerged genogroups have become the major strains circulated in the area, causing a milder clinical symptoms ranged from subacute to chronic forms of CSF outbreaks [5, 6].

In the endemic area, routine vaccination is one of the most effective strategies for prevention and control of CSF. However, the increased incidence of subacute CSF during the 90's in Thailand raised several concerns whether the vaccines and vaccination programs were still effective in preventing of CSF in the country. Since the year 2000, we have carried out a research program conducting several studies to assess the efficacy of the CSF vaccines and evaluate factors affecting them. The information from the research program will be further discussed in this article.

Detection of CSFV-specific cell-mediated immune response

Previously, the assessment of anti-CSFV immunity primarily relied on detection of serum neutralizing (SN) antibody of the pigs. However, measuring of SN titers does not allow differentiation between active and passive antibodies, in particular when conducting a vaccine efficacy testing in young pigs with certain level of maternal derived antibody (MDA). In addition, CSFV-specific SN antibodies are usually not detected prior to 2-3 weeks post vaccination. Therefore, in the early challenge study, the evaluation of active humoral immune responses in association with disease protection was not possible, as the challenged pigs are usually died within the first 2 weeks.

Cell-mediated immunity (CMI) is known to have a direct regulatory role on immune responses and is believed to be essential for immunity against intracellular pathogens, including viruses [7]. Previous evidence regarding the protective role of CMI in CSFV-infected pigs is very limited. Nevertheless, antigen-specific lymphoproliferative activity was demonstrated in peripheral blood lymphocytes from vaccinated pigs that were protected against CSFV challenge [8]. In addition, the protective role of cytotoxic T lymphocytes (CTL) has been confirmed in several studies [9-11]. However, the assays used for studies of porcine cellular effector functions are rather laborious, expensive, and not practical for the field trial.

An alternative technique for assessing CMI is to measure the production of cytokines that are known to influence or directly relate to cellular immune responses. Among the cytokines, the role of IFN- γ for induction of CMI has been well characterized. IFN- γ has several effector functions and immunoregulatory roles that involve in the induction of anti-viral immunity, including the activation of CTL, natural killer (NK) cells and phagocytes [7]. Recently, an ELISPOT assay for measuring porcine IFN- γ was established, and IFN- γ was demonstrated as a good indicator of anti-viral immunity in pigs [12]. In addition, the measurement of IFN- γ was

found useful for detecting the presence of antigen-specific, immunological memory over lymphoproliferative assay in pigs. Detection of antigen-specific IFN- γ has been used for assessing the CMI of pigs in a pseudorabies virus (PRV) model [13, 14]. From these evidences, we set the first objective to establish and validate an ELISPOT assay for detection of CSFV-specific IFN- γ producing cells from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The basic principle of the assay, is to detect and enumerate the number of IFN- γ producing cells from the CSFV-stimulated PBMC, i.e. measuring of the CSFV-specific memory T cell [15]. The ELISPOT assay has been successfully established and applied, in conjunction with the viral neutralization assay, to evaluate the efficacy of CSF vaccine and vaccination protocols [15-17]. In addition, we recently established the intracellular cytokine staining technique in which the cytokine producing lymphocyte subpopulation could be further characterized by flow cytometry [18]. The information obtained from these assays will be helpful for a better understanding of the mechanisms required for induction of protective immunity against CSFV and in evaluating the new generation of CSF vaccine in the future.

CSFV-specific cell-mediated immunity and its role in disease protection

CSFV is a cell-associated, and non-cytopathic virus. The replication is restricted in the cytoplasm of the cell and the virus can spread directly from the infected cell to the adjacent cells [19]. This information suggested that both arms of the immune response will be required to achieve complete protection of the infected pigs. Cell-mediated immunity is critical for eliminating viral infected cells and limiting viral spreading in between the cells, while the humoral immunity helps reduce spreading/shedding of the infectious virions.

In recent years, a number of studies have focused on the mechanisms of protective immunity to CSFV. In some cases CMI was implicated in protection, in the absence of neutralizing antibodies [20, 21]. Our finding is also consistent with the previous reports. Following a single vaccination with a modified live CSF vaccine, cell-mediated immune response measuring by the ELISPOT assay was detected as early as 6 days and lasted up to 140 days following vaccination [16]. At day 6 post vaccination, the vaccinated pigs contained significantly higher numbers of the CSFV-specific IFN- γ secreting cells, than the unvaccinated pigs. When challenged with the virulent CSFV on the same day, these pigs were completely protected while all of the unvaccinated pigs died within 2 weeks post infection. It should be noted that the complete protection was achieved in the absence of detectable CSFV-specific neutralizing antibodies. Furthermore, the role of CMI in protection against CSFV infection was also indicated even in the presence of CSFV-specific neutralizing antibodies. In one of our challenge experiments, when the pigs were challenged at 140 days after a single vaccination, good correlation between the level of protection and the level of IFN- γ production, rather than the antibody titer, could still be demonstrated.

Our findings emphasize the significant role of CMI in protection against CSFV. The evidence that the level of viral-specific IFN- γ production, but not antibody response, conferred resistance against PRV challenge was also demonstrated [13]. These results also explain why

the previously available inactivated vaccine, which does not efficiently induce CMI, was not effective in controlling of CSF and PRV infections. It should be also mentioned that, in general, the CSFV-specific SN titer correlates well with the levels of IFN- γ production following vaccination with the modified live vaccine (MLV) [16]. Therefore, routine monitoring of SN titers, i.e. seroprofile, can still be used as an indicator for assessing the effectiveness of CSF vaccine program in the field. Indeed, we strongly recommend evaluation of the status of herd immunity to CSFV as a routine practice for the farms in highly endemic zone.

Factors affecting the effectiveness of CSF vaccines

The vaccines

Recently, several novel CSF vaccines accompanied with the diagnostic tests, allowing differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA) vaccine strategy, have been developed. The detail information with regard to efficacy and safety of these vaccines are extensively reviewed elsewhere [22]. At present, the modified live CSF vaccines have been proven to efficiently induce both CMI and humoral immunity while the subunit vaccines primarily induce humoral immunity in vaccinated animals [22]. Our research work during the past years has focused primarily on the evaluation of factors affecting the effectiveness of the CSF-MLV.

The modified live, C-strain, CSF vaccine is regarded as one of the most effective CSF vaccines that provide not only clinical but also complete virological protection, i.e. sterile immunity, within a week following vaccination [16, 22]. In fact, it has been suggested that the modified live C-strain may be the vaccine of choice in an emergency vaccination protocol [22]. Nevertheless, several strains of modified live vaccines are currently available on the Thai market. In our experiences, all of the tested vaccines including Chinese (both lapinized and tissue culture derived), and GPE⁻ strains induced complete protection against CSFV infection in vaccinated pigs as early as 6 days following a single vaccination. It should be emphasized that the result was obtained under the condition that the pigs had no interfering effect from MDA at the time of vaccination.

Several genogroups of CSFV have been recently isolated in Thailand [4]. Although it is well accepted that the CSF vaccine effectively induces protection against homotypic and heterotypic CSFV strains, an increased prevalence of the newly emerged genogroups during the last decade has raised the concern whether the available vaccines can induce complete protection to all genogroups. Our challenge studies, together with the other previous reports in Thailand, confirmed that the CSF vaccine induced complete protection against the CSFV, including the newly emerged genogroup 2 [4, 23]. Therefore, the increased prevalence of the new genogroups is unlikely due to the inability to induce heterotypic protection by the CSF-MLV.

Although, our group and others have shown that the C-strain MLV effectively induce CSF protective immunity in immunized pigs. It should be noted that certain conditions are required to achieve optimal protection by CSF vaccination (see below). The efficacy of extra-label vaccine usage, for example vaccination in combination with other vaccines or oral vaccination with the vaccine registered for systemic administration, should be verified only by the challenge study. In

one of our studies, while no difference was observed in the levels of serum neutralizing antibody, a combination of C-strain MLV with a live gE-deleted PrV vaccine, resulted in significant reduction of cell-mediated immune response against CSFV, and subsequently induced less protection [16]. Although oral vaccination has been discussed in the European countries for the purpose of controlling CSF in wild boars [22], it should be noted that vaccine stabilizer and a higher dose of the vaccine virus are required to obtain such protection in the vaccinated boars [24]. More information on protection study will be needed to evaluate the effectiveness of this vaccination regimen in domestic pigs. Thus, oral vaccination using commercially available CSF-MLV in domestic pigs is not recommended at the moment.

The pigs

From our experiences during the CSF research program, MDA is regarded as the most common factor affecting an induction of protective immunity in vaccinated piglets in the field. Piglets are born agammaglobulinaemia and acquire early passive immunity via colostrum. Thus, the levels of MDA in piglets correlate well with the levels of SN titer in sows and, in case of CSFV, gradually decline with a half-life of approximately 2 weeks [25]. Generally, it is well accepted that optimal protection can be achieved by vaccination of the pigs with MDA titers of $\leq 1:32$ [26, 27]. This can be problematic in the highly endemic area where natural exposure in the sows, resulting high level of anti-CSFV SN titers, can occur unnoticeably. Although high levels of MDA may confer some degrees of protection in the piglets, in our experience, even the MDA titer of 1:128 could not protect the pigs from CSFV challenge in our model. One previous report demonstrates that the MDA titers of more than 1:256 is required to obtain complete protection in piglets [27]. Furthermore, it takes longer time for the MDA level to decline to the level that does not interfere the effectiveness of CSF vaccination, i.e. longer window of susceptibility. Our recent result also supports the previous work, in which MDA of more than 1:32 significantly interfered the induction of protective immunity by CSF-MLV [23]. It should be noted that in some experiments, piglets that were vaccinated in the presence of high MDA titers never showed seroconversion [27], or anamnestic response to the CSFV challenge [23]. Although, these pigs survived the challenge and the protective value of CMI was implicated, it was unlikely that complete virological protection, i.e. protection of viremia and viral shedding, would be achieved in the absence of humoral immunity. Moreover, with the increased prevalence of subacute and chronic CSF cases during the past years, infected pigs may survive for a longer period of time without obvious clinical signs of CSF infection. One of our challenge studies, using the moderate virulent CSFV, for the challenge virus, clearly showed that primary immunization of the pigs with high MDA titers resulted in vaccine failure. However, all the challenged pigs survived the CSFV infection and viremia was observed in both control and vaccinated, with high MDA titer, groups. This picture will certainly complicate the disease control program as the infected pigs would become the undetected source of infection in the farm. Together, these findings highlight the significance of routine serosurveillance and the use of other laboratory tools for monitoring of the herd status.

Apart from MDA, the influence of age of the piglets at the time of primary immunization was also investigated. We conducted the experiment exploring the influence of the pig age at primary immunization on the effectiveness of a CSF vaccine. Piglets at the age of 3-5 weeks, with comparable levels of MDA titers, were immunized twice at 2 weeks interval with the lapinized C-strain MLV. Both cell-mediated and antibody immune responses were followed up to 10 weeks post vaccination. The result clearly showed that pigs immunized at the older age had more numbers of CSFV-specific IFN- γ producing cells in the PBMC and higher CSFV-specific SN titers at the end of the experiment [17]. Although CSFV challenge was not included in this study, the results clearly demonstrated that at the age of 3-5 weeks, younger pigs are less immunocompetent than the older ones. The finding is also consistent with the previous knowledge that porcine immune system is fully matured at the age of 4 weeks [28]. This information should be kept in mind when emergency vaccination is implemented, under professional discretion, to the very young, i.e. suckling, pigs. It is highly recommended that the emergency vaccination protocol should be adjusted back to the normal vaccine protocol once the crisis is over.

Complication by other pathogens

As shown through our series of experiment, induction of protective immunity against CSFV infection depends on several factors. It should be pointed out that most of the challenge studies were conducted in isolation units where disease complications by other pathogens were minimized. The results and interpretations obtained from these experiments could underestimate the clinical outcomes that actually occurred in the field, where pigs can be exposed to several pathogens at the same time. Several pathogens, mycotoxins and chemicals were known to negatively modulate the immune system, and, therefore can significantly interfere the effectiveness of CSF vaccination protocol. In our experience, coinfection of PRV at the time of CSFV challenge resulted in fatal infection in vaccinated pigs, despite the successful immunization against CSFV prior to CSFV challenge (S. Suradhat, unpublished observation). Therefore, the influence of other pathogens on the immune system and/or interaction with CSFV also needed be taken into consideration in the field practice. Improvement of biosecurity and routine monitoring of the herd status will be crucial for preventing of such complications.

Since its emergence in the late 1980's, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) has become one of the most economically important pathogens of the swine industry [29]. In Thailand, the prevalence of PRRSV infection is believed to be more than 80% [30]. Several lines of evidence suggested that PRRSV could negatively modulate the immune system. Our recent findings demonstrated that PRRSV induced a very potent immunosuppressive cytokine, interleukin-10 (IL-10), during an early stage of infection [31]. Furthermore, the presence of PRRSV in the culture suppressed IFN- γ production by the CSFV-primed PBMC when stimulated with the recall antigen [32]. Recently, we conducted the CSFV challenge experiment in order to explore the effect of PRRSV infection on the efficacy of CSF vaccine. Seventeen days old pigs were infected with the Thai PRRSV isolate a week prior to vaccination with the CSF-MLV. Three weeks after vaccination, the pigs were challenged with a

virulent CSFV. The results demonstrated that PRRSV infection significantly interfered the induction of CSFV-specific immune responses, and resulted in vaccine failure (Suradhat et al., manuscript in preparation). This finding implied that CSF vaccination during the active stage of PRRSV infection should be avoided.

Final remarks

During the past few years, we have explored several factors that could influence the effectiveness of CSF vaccines in the field. Our results, together with the previous reports, affirm that the available CSF vaccines, when used properly, can effectively induce protective immunity against CSFV infection. In our opinion, the CSF vaccine failure observed in the field is primarily due to the lack of understanding in epidemiology, mechanisms of immunological protection, pathogenesis, and the importance of biosecurity. Sharing of the information among the veterinarians and farmers, and strengthen of the disease surveillance program will be required for a successful CSF preventive program which, in our hope, will eventually lead to eradication of CSF.

Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. Ratree Platt for helpful comments during the manuscript preparation.

References

- 1 Moennig, V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol* 2000; 73:93-102.
- 2 Wengler, G. Family *Flaviviridae*. In: Francki, RIB, Fauquet, CM, Knudson, DL, Brown, F, editors. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Berlin, Springer, 1991:223-33.
- 3 Paton, DJ, McGoldrick, A, Greiser-Wilke, I, Parchariyanon, S, Song, J-Y, Liou, PP et al. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 2000; 73:137-57.
- 4 Parchariyanon, S, Damrongwatanapokin, S, Pinyochon, W, Inui, K, Blacksell, S, Sawada, T. Diversity of classical swine fever virus in Thailand: antigenic and vaccine efficiency studies. *J Thai Vet Med Assoc* 2001; 52:9-19.
- 5 Parchariyanon, S, Damrongwatanapokin, S, Pinyochon, W. [Status of Classical swine fever disease]. *NIAH Newsletter* 1999; 8(3):1-3. (in Thai)
- 6 Damrongwatanapokin, S, Patchimasiri, T, Pinyochon, W, Parchariyanon, S. Efficacy of classical swine fever DLD vaccine against classical swine fever virus Chiangmai/98 isolate. *J Thai Vet Med Assoc* 2002; 53:5-14.
- 7 Janeway, CA, Jr., Travers, P, Walport, M, Capra, JD. Host defense against infection. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. London, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999:363-415.

- 8 Remond, M, Plateau, E, Cruciere, C. In vitro study of the cellular response of pigs vaccinated against classical swine fever. *Zbl Vet Med B* 1981; 28:743-48.
- 9 Pauly, T, Konig, M, Thiel, H-J, Saalmuller, A. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Gen Virol* 1998; 79:31-40.
- 10 Armengol, E, Wiesmuller, KH, Wienhold, D, Buttner, M, Pfaff, E, Jung, G et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol* 2002; 83:551-60.
- 11 Piriou, L, Chevallier, S, Hutet, E, Charley, B, Le Potire, M-F, Albina, E. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res* 2003; 34:389-404.
- 12 Mateu de Antonio, E, Husmann, RJ, Hansen, R, Lunney, JK, Strom, D, Martin, S et al. Quantitative detection of porcine interferon-gamma in response to mitogen, superantigen and recall viral antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 61:265-77.
- 13 Zuckermann, FA, Husmann, RJ, Schwartz, R, Brandt, J, Mateu de Antonio, E, Martin, S. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63:57-67.
- 14 Zuckermann, FA, Martin, S, Husmann, RJ, Brandt, J. Use of interleukin-12 to enhance the cellular immune response of swine to an activated herpesvirus vaccine. *Adv Vet Med* 1999; 41:447-61.
- 15 Suradhat, S, Damrongwatanapokin, S. Establishment of an ELISPOT assay for detection of classical swine fever virus specific interferon-gamma secreting cells from porcine peripheral blood mononuclear cells. In: Cargill, C, McOrist, S, editors. *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. Melbourne, Casual Productions Pty Ltd, 2000; 619.
- 16 Suradhat, S, Intrakamhaeng, M, Damrongwatanapokin, S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83:177-89.
- 17 Suradhat, S, Damrongwatanapokin, S. Factors that influenced an effectiveness of classical swine fever vaccine: a case study. *Thai J Vet Med* 2002; 32 (Suppl.):163-72 (in Thai with Eng abstract).
- 18 Suradhat, S, Sada, W, Buranapraditkun, S, Damrongwatanapokin, S. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Vet Immunol Immunopathol* 2005; in press.
- 19 Van Oirschot, JT. Classical swine fever (Hog cholera). In: Straw, BE, D'Allaire, S, Mengeling, WL, Taylor, DJ, editors. *Disease of Swine*. Ames, Iowa State University Press, 1999:159-72.

- 20 Launais, M, Aynaud, JM, Corthier, G. Hog cholera virus: active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet Microbiol* 1978; 3:31-43.
- 21 Rumenapf, T, Stark, R, Meyers, G, Thiel, H-J. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 1991; 65:589-97.
- 22 Van Oirschot, JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 2003; 96:367-84.
- 23 Suradhat, S, Damrongwatanapokin, S. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet Microbiol* 2003; 92:187-94.
- 24 Kaden, V, Lange, E, Fischer, U, Strebelow, G. Oral immunization of wild boar against classical swine fever: evaluation of the first field study in Germany. *Vet Microbiol* 2000; 73:239-52.
- 25 Coggins, L. Study of hog cholera colostral antibody and its effect on active hog cholera immunisation. *Am J Vet Res* 1964; 25:613-16.
- 26 Suvintrakorn, K, Hanveeraphon, A, Pariyakanok, V. Efficacy of lapinized swine fever vaccine in piglets born from immune sows. *J Thai Vet Med Assoc* 1993; 23:93-103. (in Thai with Eng abstract)
- 27 Parchariyanon, S, Tantaswasdi, U, Pinyochon, W, Methiyapun, P. Immunity against swine fever vaccine II Immunity against swine fever vaccine in piglets and protection level of maternal immunity in piglets before vaccination. *J Thai Vet Med Assoc* 1994; 45:37-45. (in Thai with Eng abstract)
- 28 Povey, RC, Carman, PS. Technical basis of vaccination. In: Pastoret, P-P, Blancou, J, Vannier, P, Verschueren, C, editors. *Veterinary Vaccinology*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 1997:519-80.
- 29 Meng, XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficiency and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000; 74:309-29.
- 30 Thanawongnuwech, R, Amonsin, A, Tasanakit, A, Damrongwatanapokin, S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 2004; 101:9-21.
- 31 Suradhat, S, Thanawongnuwech, R. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003; 84:2755-60.
- 32 Suradhat, S, Thanawongnuwech, R, Poovorawan, Y. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003; 84:453-59.

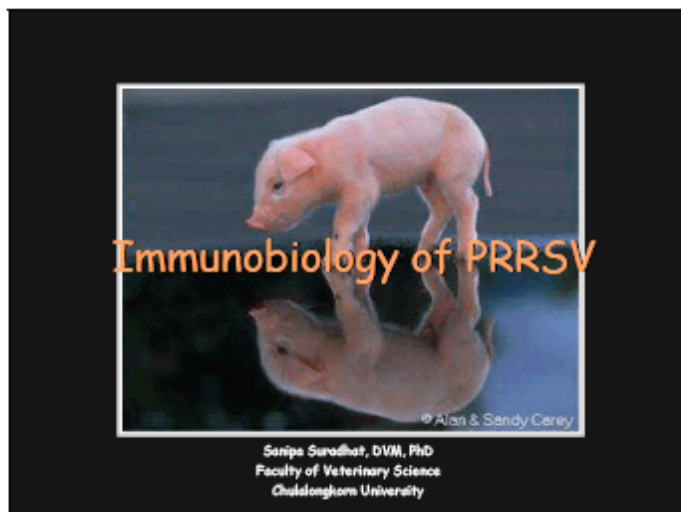
Slide ประกอบการบรรยาย ณ. Vaccine and Infectious Disease Organization, Saskatoon, Canada

วันที่ 23 กรกฎาคม 2547

Slide 1



Slide 2



Slide 3



Slide 4

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

- **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)**
 - Positive-stranded, enveloped RNA virus
 - *Arteriviridae*, order *Nidovirales*
 - First isolated in 1991 (The Netherlands)
 - 2 major strain: North American, European strain
- **Porcine reproductive and respiratory syndrome**
 - Reproductive failure >> abortion storm
 - Respiratory infection >> Porcine respiratory disease complex (PRRSV + *Mycoplasma spp* + Bacterial infection)

Slide 5

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)



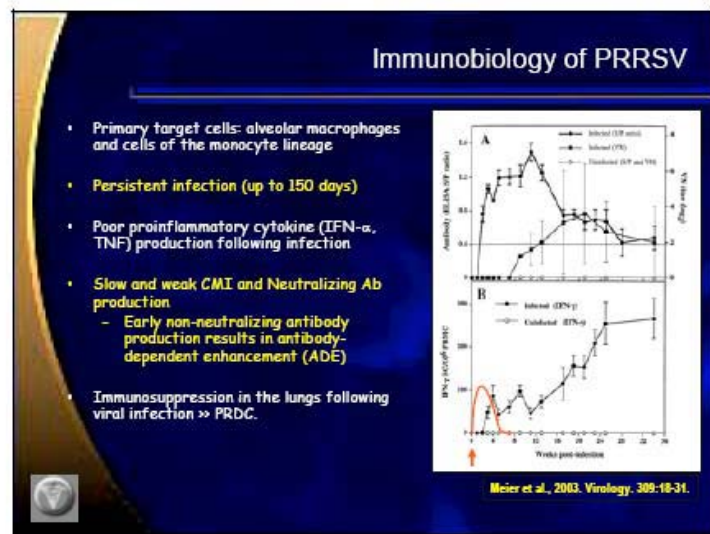
Slide 6

Porcine respiratory disease complex (PRDC)

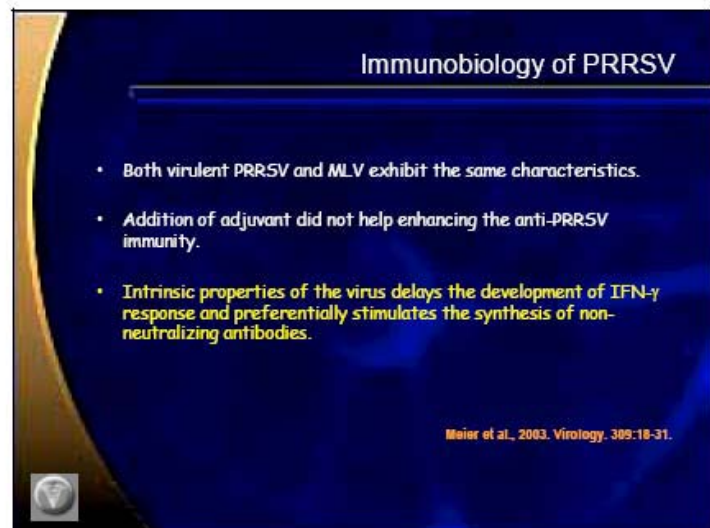
PRRSV, SIV,
Mycoplasma spp.,
Pasteurella spp.,
Other bacterial
complications



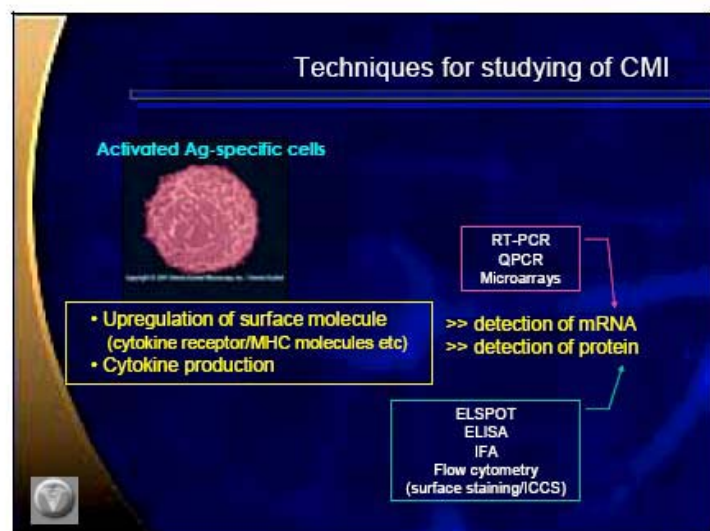
Slide 7



Slide 8



Slide 9



Slide 10

Objectives

To study an *in vitro* effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on the level of cytokine production by porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC), using the multiplex-PCR assay

Duration: 1 yr (August 2001- August 2002)

Slide 11

Th dichotomy

Selected gene for mRNA studies (MPCR)

Th1: IFN- γ , IL2
Th2: IL4, IL10
Control gene: GAPDH

The diagram illustrates the Th dichotomy. At the top, Th1 (blue circle) and Th2 (orange circle) cells are shown. Th1 cells produce IFN- γ , IL2, and IL10. Th2 cells produce IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, and IL17. These cytokines interact with various target cells: Macrophages, Tc cells, B cells, and Mast cells. The diagram also shows the production of cytokines by these target cells, such as IFN- γ by Tc cells, IL4 by B cells, and IL6 by Mast cells. The diagram is a complex network of arrows and circles representing the interactions between these cells and their secreted cytokines.

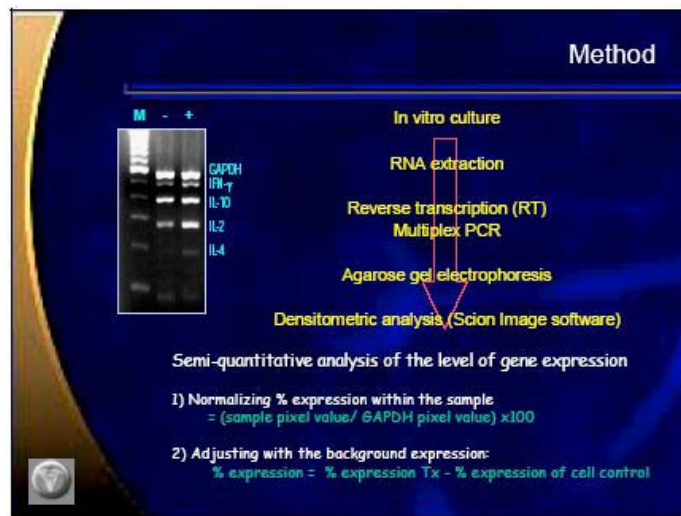
Slide 12

Specific aim 1: Establishment of the multiplex PCR assay

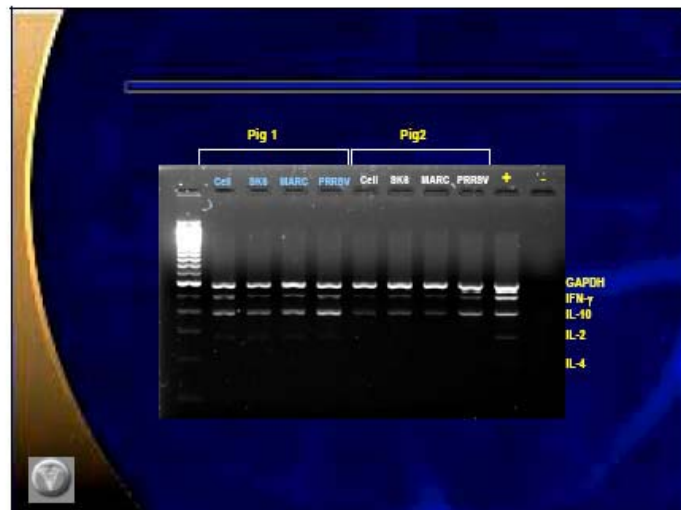
- Multiplex PCR that simultaneously analyses IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and GAPDH gene expression was established.
- Products were confirmed by sequence analysis.

The gel electrophoresis image shows two panels. The left panel shows a DNA ladder (M) and lanes 1, 2, 3, 4, and 5. The right panel shows a DNA ladder (M) and lanes for GAPDH, IFN- γ , IL-10, IL-2, and IL-4. The GAPDH lane shows a single band at approximately 100 bp. The IFN- γ lane shows a single band at approximately 300 bp. The IL-10 lane shows a single band at approximately 400 bp. The IL-2 lane shows a single band at approximately 200 bp. The IL-4 lane shows a single band at approximately 150 bp.

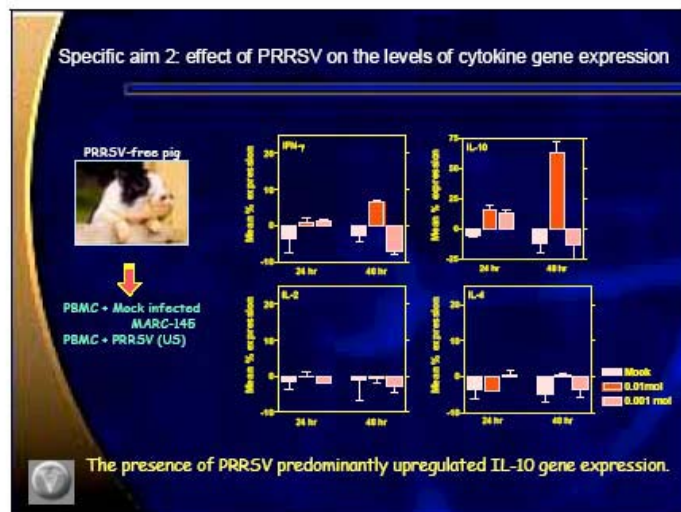
Slide 13



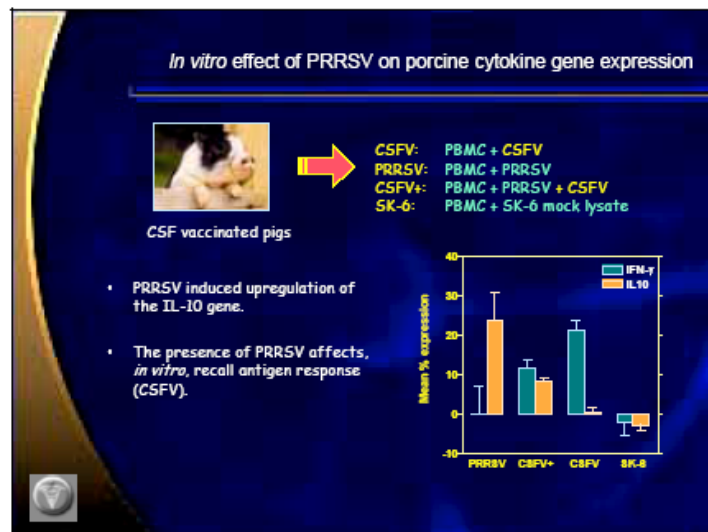
Slide 14



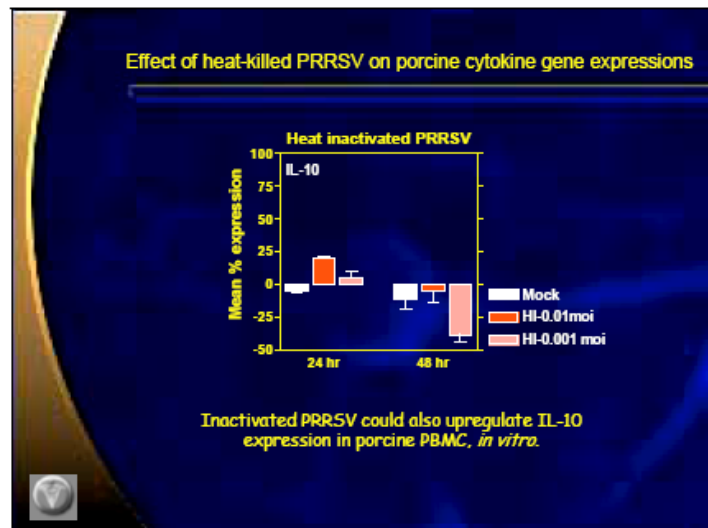
Slide 15



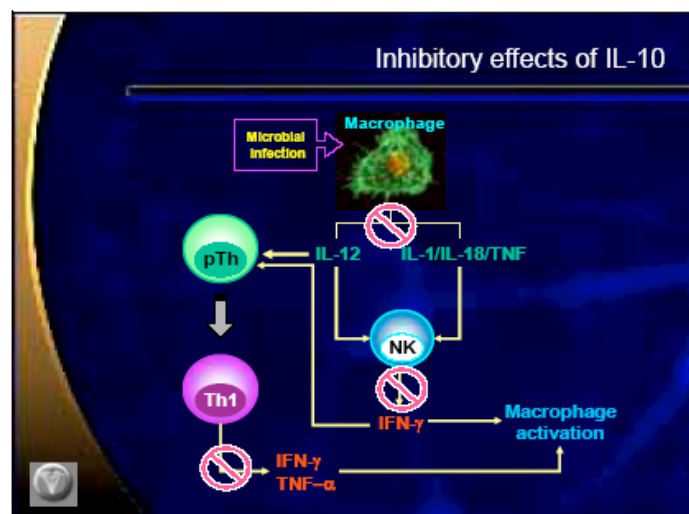
Slide 16



Slide 17



Slide 18



Slide 19

Conclusion & discussion

- We established a multiplex PCR that allowed a semi-quantitative analysis of the IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expressions from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC).
- Both live and inactivated PRRSV predominantly upregulated IL-10 gene expression in porcine PBMC.
- The presence of PRRSV in the culture could affect the recall antigen response.

Our study implies that the induction of IL-10 production may be one of the strategies used by PRRSV to modulate the host immune responses.

(Suradhat et al. J.Gen.Virol. 2003. 84:453-459.)

Slide 20

In vivo effect of PRRSV on IL-10 gene expression

Thai isolate PRRSV
 1) US strain (01NP1)
 2) EU strain (02S83)
 3) control (uninfected pigs)

↓

Day 0 5 9 12 15

Sample collection

- PBMC (5, 12 dpi) >> MPCR
- BAL (5, 9, 15 dpi) >> MPCR, IFA, differential cell count
- serum
- viral isolation
- lung score/clinical signs
- etc.

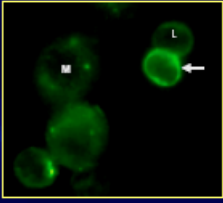


Rachadapisakesompoch Endowment fund 2002-3

Slide 21

In vivo effect of PRRSV on IL-10 gene expression

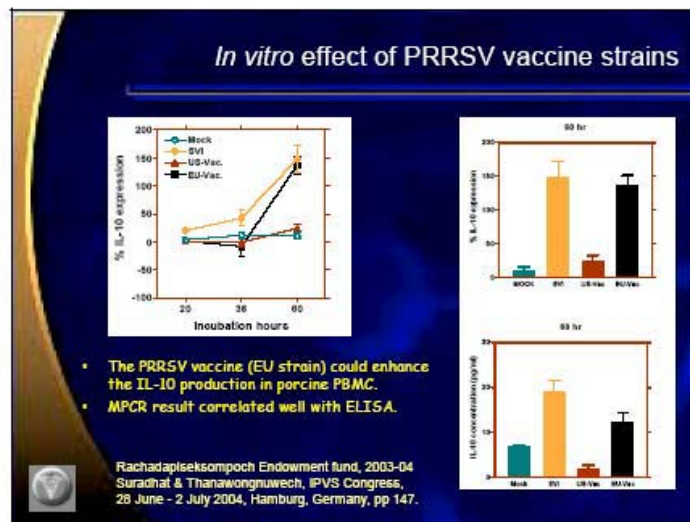
- Upregulation of IL-10 gene expression was observed, *in vivo*, earlier in the PBMC (5 dpi), followed by in the BAL (9 dpi).
- Despite the differences in disease outcomes, both N. American and EU PRRSV comparably upregulate IL-10 gene expression in the leukocytes of infected pigs.
- Peripheral leukocytes may influence the level of cytokine production in the lungs of infected pigs.



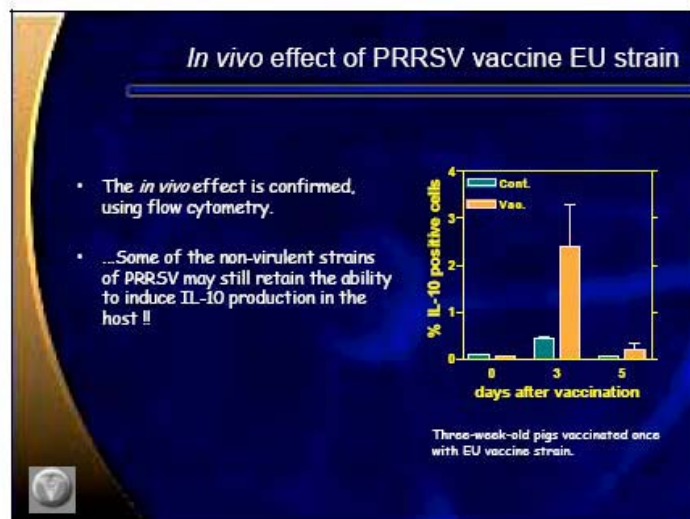
IL-10 producing cells in BAL (IFA)

Suradhat & Thanawongnuwech. J. Gen. Virol. 2003. 84:2755-2760.
 Thanawang et al. Thai J.Vet. Med. 2004. 34:29-38.

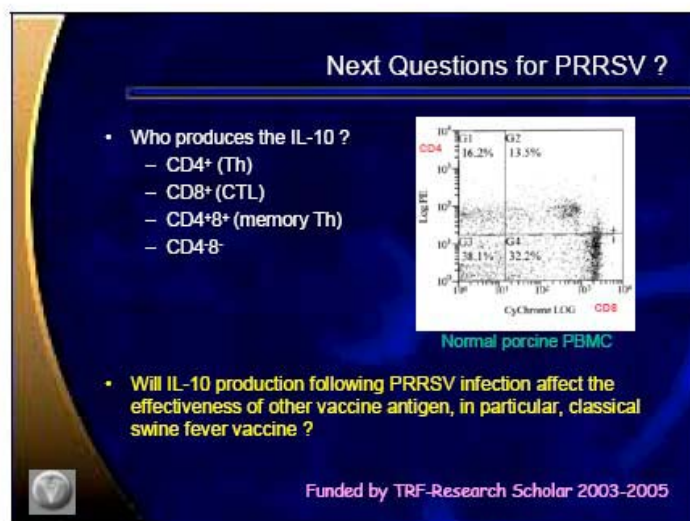
Slide 22



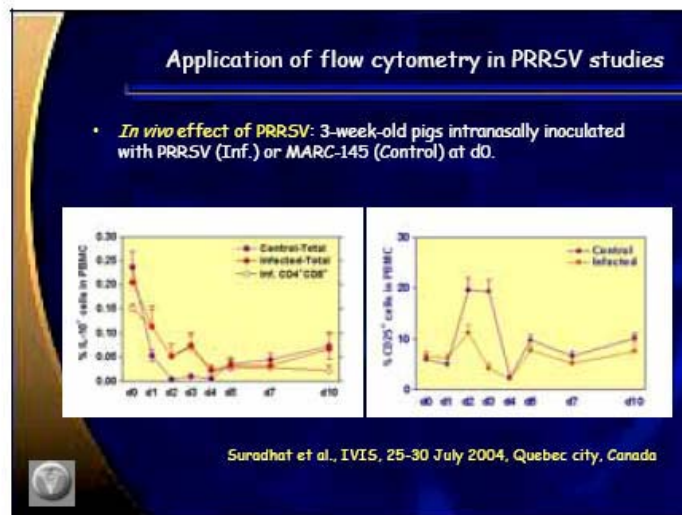
Slide 23



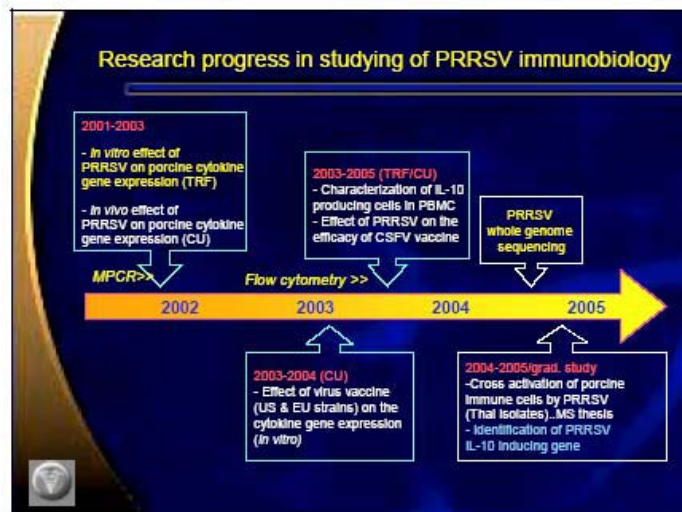
Slide 24



Slide 25



Slide 26



Slide 27

Acknowledgements

- The Thailand Research Fund
- Chulalongkorn University
- Dr. Y. Poonvarawan et al. (CU MED)
- Dr. R. Thanawongnuwech et al. (CU VET SCI)
- Dr. S. Damrongwatanapokin et al. (NIAH, DLD)
- Dr. K. Ruengtham (CU MED)
- Dr. J. Roth et al., Iowa State University (USA)
- Dr. D. Yoo, University of Guelph (Canada)
- Dr. R. Brownlie, VIDO (Canada)
- AHTSO, CP
- Intervet (Thailand) Co. Ltd.

Special thanks to

- Dr. W. Sada
- Ms. S. Buranapraditkun
- Ms. T. Tripipat
- 6th year Vet. students: madoaw, kong, neung, & the gang.



The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV)

S. Suradhat ^{a,*}, W. Sada ^b, S. Buranapraditkun ^c, S. Damrongwatanapokin ^d

^a *Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*

^b *Inter-Department of Medical Microbiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

^c *Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

^d *National Institute of Animal Health (NIAH), Bangkok, Thailand*

Received 9 September 2004; received in revised form 8 February 2005; accepted 8 February 2005

Abstract

Surface expression of IL-2R-alpha (CD25) is widely used to identify activated lymphocyte populations, while interferon-gamma (IFN- γ) levels have been shown to be a good indicator of cell-mediated immunity (CMI) in pigs. To investigate the relationship between these two parameters, we developed an intracellular cytokine-staining assay and studied the kinetics of cytokine (IFN- γ and interleukin-10, IL-10) production relative to CD25 expression in porcine lymphocyte subpopulations, following immunization with a classical swine fever (CSF) vaccine. The number of activated memory T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) increased slightly in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) population soon after vaccination, then diminished within a few weeks. The number of activated cytotoxic T cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺ cells) peaked approximately 2 weeks after the memory population. Although the number of IFN- γ producing cells detected in this experiment was relatively low, the CD4⁺CD8⁺ T cells were major IFN- γ producers in the PBMCs throughout the experiment. In another experiment, CSF-vaccinated pigs were challenged with a virulent classical swine fever virus (CSFV), and the kinetics of CD25 expression and cytokine productions were monitored. Following exposure to the virus, the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs increased markedly in both the vaccinated and unvaccinated groups. The CD4⁺CD8⁺ cells were major IFN- γ producing cells in vaccinated pigs, while both CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ populations contributed to the IFN- γ production in the control group. Interestingly, the enhanced IFN- γ production was not associated with the upregulation of CD25 expression following the CSFV challenge. In addition, exposure to the virulent CSFV significantly increased interleukin-10 production by the CD4⁺CD8⁺ populations in PBMCs of the unvaccinated pigs. Taken together, our results indicated that CD25 expression and IFN- γ production were not tightly associated in porcine lymphocytes.

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 9583; fax: +66 2 251 1656.

E-mail address: sanipa.s@chula.ac.th (S. Suradhat).

In addition, the CD4⁺CD8⁺ lymphocytes of the PBMCs played a major role in cytokine productions following the CSFV challenge.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Classical swine fever virus; Interferon-gamma; Interleukin-10; CD25; PBMC

1. Introduction

Classical swine fever (CSF) is one of the most important diseases in pigs, causing serious economic losses to the swine industry worldwide. The classical swine fever virus (CSFV) is an enveloped, single-stranded RNA virus in the genus *Pestivirus* (Moennig, 2000). In recent years, there have been a number of studies on the mechanisms of protective immunity to CSFV (reviewed in Van Oirschot, 2003). There seems to be a good correlation between the production of serum neutralizing antibodies and protection from disease. However, in some cases cell-mediated immunity (CMI) was implicated in protection, as neutralizing antibodies were absent (Launais et al., 1978; Rumenapf et al., 1991; Suradhat et al., 2001). T cell responses to CSFV in pigs have reportedly been absent or difficult to detect, and direct evidence regarding the protective role of CMI in CSFV-infected pigs is very limited. Nevertheless, antigen-specific lymphoproliferative activity has been demonstrated in peripheral blood lymphocytes from vaccinated pigs that were protected against CSFV challenge (Remond et al., 1981). In addition, the role of cytotoxic T lymphocytes (CTL) has been confirmed in several studies (Pauly et al., 1998; Armengol et al., 2002; Piriou et al., 2003). However, studies of porcine cellular effector functions are laborious and mostly limited to the inbred minipig model.

The cytokines and other factors associated with CMI have been identified in most species, including pigs (Wood and Seow, 1996; Pescovitz, 1998). Among these, the role of interferon-gamma (IFN- γ) in the induction of CMI responses is well characterized. IFN- γ has been shown to be a good indicator of antiviral immunity in pigs, as well as in other species. In pigs, the measurement of IFN- γ levels has been found to be more useful for detecting the presence of antigen-specific, immunological memory than lymphoproliferative assays (Mateu de Antonio et al., 1998). The detection of antigen-specific IFN- γ

production has been used to assess the cellular immunity of pigs in both pseudorabies (Zuckermann et al., 1998, 1999) and CSFV models (Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003). In recent years, flow cytometric analysis has been extensively applied for studying the kinetics of cellular activation in various lymphocyte populations. The alpha-subunit of the high-affinity IL-2 receptor (CD25) is expressed on the surface of activated lymphocytes (Minami et al., 1993) and has been widely used to identify activated lymphocyte populations in various species including pigs (Dillender and Lunney, 1993; Quade and Roth, 1999; Piriou et al., 2003). However, the association between IFN- γ production and CD25 surface expression has never been studied in a pig model. To investigate the relationship between the two parameters, we developed an antigen-specific, intracellular cytokine (IFN- γ and interleukin-10, IL-10) staining assay and studied the kinetics of cytokine production in relation to CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations.

2. Materials and methods

2.1. Viruses

The CSFV reference strain, ALD strain, was a gift from the National Institute of Animal Health of Japan. The CSFV strain used for challenges was the Thai isolate (Bangkok 1950 strain) from the National Institute of Animal Health of Thailand (NIAH). Viruses were propagated in a SK-6 cell line. Infected cells were collected after 4 days incubation with a stock virus, and subjected to two freeze–thaw cycles. The viral suspension was centrifuged at $1000 \times g$ for 20 min. The collected supernatant is referred to as the stock virus. The stock viruses were kept at -80°C until needed. Viral titers were determined by a peroxidase-linked virus titration assay using a previously described protocol (Pinyochon et al., 1999).

2.2. Monoclonal antibodies

The custom conjugated anti-swine CD8-PE-Cy5 conjugated mAb (76-2-11, IgG_{2a}) and anti-swine CD25-PE conjugated mAb (PGBL25A, IgG₁) were kindly provided by Dr. J.A. Roth (Iowa State University, Ames, USA). Anti-swine CD4-FITC conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}), anti-CD4-PE conjugated mAb (74-12-4, IgG_{2b}), and biotinylated anti-swine IFN- γ mAb (P2C11, IgG_{2a}) were obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). The mAb anti-swine IL-10 (945A4C437B1, IgG₁) was obtained from Biosource International Inc. (Nivelles, Belgium). Streptavidin-FITC and goat-anti-mouse IgG₁-FITC conjugates were obtained from Serotec (Oxford, UK).

2.3. Animals and experimental protocols

Before the animal trials, the experimental and animal handling protocols were approved by the Ethics Committee on Experimental Animal Usage and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

2.3.1. Experiment 1: Cellular responses following vaccination with a CSF vaccine

Crossbred pigs, from sows that were routinely vaccinated with CSF vaccine, were maintained at the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University research farm in Nakorn Prathom province. The farm has no evidence of CSF outbreak in the last 2 years. Pigs were intramuscularly immunized twice (1 ml/dose) with a modified live, lapinized, Chinese strain, CSF vaccine (Department of Livestock Development, Thailand) at 5 and 7 weeks of age. Blood sampling was done every 2 weeks, from 3 to 13 weeks of age.

2.3.2. Experiment 2: Cellular responses following a CSFV challenge

Four-week-old, crossbred pigs from a CSF-free commercial farm were brought in and maintained at the animal facility, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Bangkok. Pigs were immunized intramuscularly with a modified live, lapinized, Chinese strain, CSF vaccine (1 ml/dose) (Department of Livestock Development, Thailand). The means of maternal derived serum-neutralizing

titer of all groups were less than 1:8 at the time of vaccination. At 21 days post-vaccination (dpv), the pigs were challenged intramuscularly with 2×10^4 TCID₅₀ of the virulent CSFV, strain Bangkok 1950 (NIAH, Thailand). The control group was not vaccinated but received the same amount of the challenge virus. Naïve pigs were kept in a separate isolation unit throughout the experiment. Clinical signs were monitored daily and porcine peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) were collected every 7 days for 2 weeks after the challenge.

2.4. Isolation of porcine PBMCs

Porcine peripheral blood mononuclear cells were isolated from 10 ml of the heparinized blood samples using Isoprep[®] separation medium (Robbins Scientific Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The purified PBMCs were resuspended at a concentration of 6×10^6 cells/ml in RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% calf serum (Starrate Ltd., Bethungra, NSW, Australia), 2 mM L-glutamine (GIBCO), 100 μ M non-essential amino-acid (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 100 unit/ml of penicillin G, 100 μ g/ml of streptomycin and 0.25 μ g/ml of amphotericin B (antibiotic/antimycotic solution; GIBCO); this solution is referred as the complete medium.

2.5. Flow cytometry

2.5.1. In vitro activation and surface staining

For in vitro activation, 1 ml of freshly isolated PBMCs (6×10^6 cells/ml) were cultured in a well of 24-well plate, in the presence of CSFV (ALD strain) at one multiplicity of infection (m.o.i.) for 40 h. The cells were then harvested for triple-color fluorescent staining. The phenotypic analyses were done using the above mAbs (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE-Cy5, and anti-CD25-PE). Briefly, approximately 2×10^6 cells were washed with PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (Sigma) and 0.1% sodium azide (Sigma) (FACS buffer), and distributed to the wells of 96-well plate. The cells were pelleted by centrifugation at $500 \times g$ for 2 min. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended with

50 μ l of the mixture of the three mAbs at appropriate concentrations, and incubated in the dark at 4 °C for 30 min. After incubation, the cells were washed three times with 150 μ l/well of FACS buffer. After the final wash, the supernatants were removed and the cells were fixed by resuspending the pellet in 200 μ l of 2% formaldehyde. Flow cytometric analyses were performed using a Facscan cytometer (BD Biosciences).

2.5.2. Intracellular cytokine-staining assay

Following *in vitro* activation with CSFV (see above) for 28 h, the protein transport inhibitor monensin (GolgiStop™, BD Biosciences) was added to the cell cultures, and the cells were incubated for another 12 h. In some experiments, PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) were added to the culture 3 h before harvesting. Cells were harvested and stained for surface expression of CD4 and CD8 using a mixture of anti-CD4-PE and anti-CD8-PE-Cy5 conjugates (see above), resuspended in FACS buffer at the appropriate concentrations. Following the last wash, the cells were fixed and permeabilized by resuspension in 200 μ l/well of Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and incubated for 3 h, in the dark at room temperature. Intracellular IFN- γ staining was performed using biotinylated anti-swine IFN- γ mAb followed by a streptavidin-FITC conjugate resuspended in BD Perm/Wash solution provided with the BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience).

Intracellular IL-10 staining was performed using a mAb anti-swine IL-10 followed by FITC-conjugated, goat-anti-mouse IgG₁ antibody. All of the washing processes following permeabilization were done using the BD Perm/Wash solution, according to the manufacturer's protocol. At the final step, the cells were resuspended in 200 μ l of 2% formaldehyde and kept in the dark at 4 °C until needed. Flow cytometric analysis was performed using a Facscan cytometer (BD Biosciences).

2.6. Flow cytometric analyses

The viability of studied population prior to surface staining, determined by Trypan blue staining, was more than 80%. Numbers of gate events for analyses of surface markers and intracellular cytokines were 10,000 and 100,000, respectively. Lymphocytes were first gated (G1) from the harvested population by size (FSC) and granularity (SSC), this yielded predominantly lymphocyte population with approximately 3% SWC3⁺ cell contamination (data not shown). The numbers of lymphocyte subpopulations (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻, and CD4⁺CD8⁺) were determined by the percentages of CD4 and/or CD8 positive cells from G1. For analyses of triple labeled cells, the G2 (CD8⁺) and G3 (CD4⁺) were selected from the lymphocyte (G1) population and used for determining the expression of the second (CD4 or CD8) and third parameter (CD25 or cytokine). Since

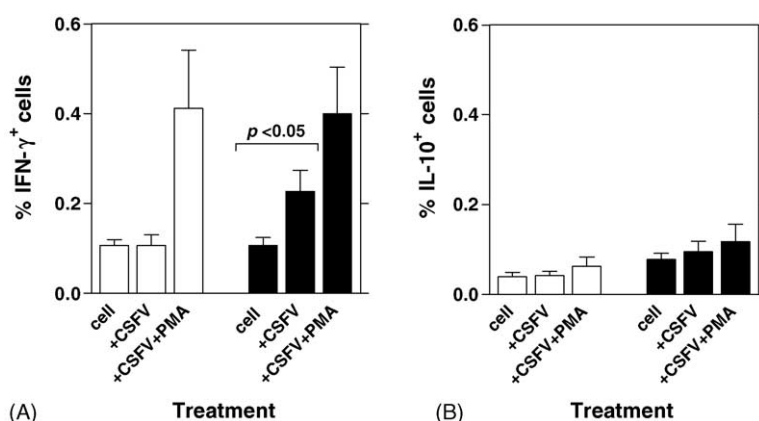


Fig. 1. Levels of IFN- γ (A) and IL-10 (B) positive cells in lymphocyte population from naïve pigs (white bar) and CSFV-primed pigs (black bar). Porcine PBMCs were *in vitro* cultured alone (cell), with CSFV for 40 h (+CSFV), or with CSFV for 40 h and an addition of PMA and ionomycin 3 h prior to cell harvesting (+CSFV + PMA). The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from five animals.

porcine CD8⁺ population exists in CD8^{hi} and CD8^{lo} forms (Zuckermann, 1999), the triple positive, CD4⁺CD8⁺CD25⁺ (or cytokine)⁺, population were determined from G3.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] Version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Either *t*-test or one-way ANOVA, followed by a post-test (Tukey's multiple comparison) when significant differences at the 0.05% confident level were present, was used as indicated.

3. Results

3.1. Interferon- γ production of by porcine lymphocytes in response to the recall antigen

Previously, porcine PBMCs have been shown to produce IFN- γ in response to the recall antigen (classical swine fever virus) by an ELISPOT assay (Suradhat et al., 2001). In this study, using the same in vitro activation system, we established an intracellular cytokine-staining assay to further characterize the CSFV-specific cytokine producing cells. The levels of cytokine production by porcine PBMCs, in response to in vitro CSFV exposure, were determined before vaccination (5 weeks old) and 2 weeks after the second immunization (9 weeks old) (see Section 2.3.1). Our result showed that the CSFV-primed lymphocytes could produce IFN- γ in response to in vitro exposure with CSFV ($p < 0.05$, *t*-test). In addition, the level of IFN- γ producing cells from the vaccinated group was significantly higher ($p < 0.05$, *t*-test) than that from the naïve group (Fig. 1A). Although lymphocytes from the naïve group did not show enhanced IFN- γ production when cultured with CSFV, the lymphocytes from both naïve and vaccinated groups produced comparable level of IFN- γ ⁺ cells when stimulated with PMA and ionomycin (PMA/I). This result indicated that addition of CSFV into the culture system did not affect the ability to produce IFN- γ by the lymphocytes of the naïve pigs (Fig. 1A). In the same study, addition of CSFV or CSFV and PMA/I did not significantly affect the level of IL-10

production by porcine lymphocytes from both groups (Fig. 1B).

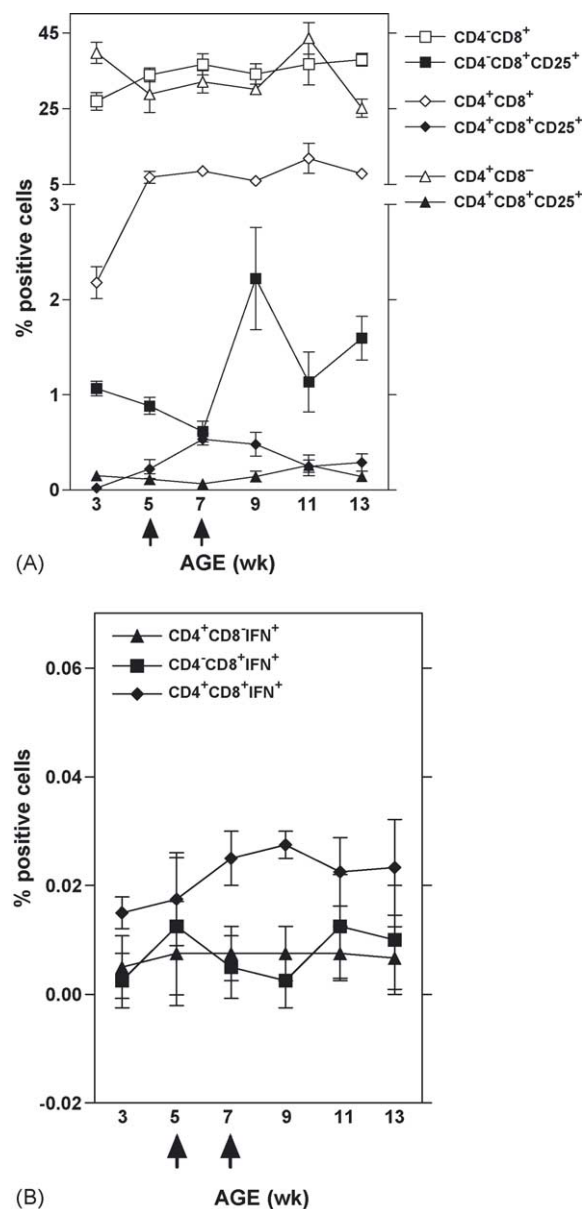


Fig. 2. Kinetics of CD25 surface expression (A), and intracellular IFN- γ production (B) in lymphocyte subsets, in PBMCs isolated from pigs vaccinated twice with CSF vaccines at 5 and 7 weeks (arrow). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

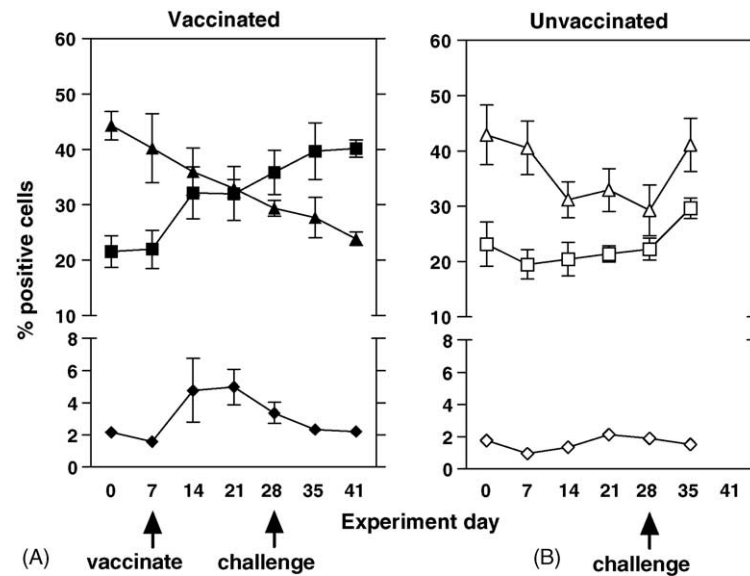


Fig. 3. Percentages of $CD4^+CD8^-$ (triangle), $CD4^-CD8^+$ (square) and $CD4^+CD8^+$ (diamond) cells from PBMCs of the vaccinated (A) and unvaccinated pigs (B). Pigs were immunized on day 7 with CSF vaccine and challenged with the virulent CSFV on at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

3.2. Kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by porcine PBMCs in vaccinated pigs

To investigate the relationships between CSFV-specific IFN- γ production and the expression of the IL-2R (CD25) by porcine PBMCs following vaccination, the two parameters were monitored from the same pigs at the age of 3–13 weeks old (see Section 2.3.1). Following vaccination, there was a slight increase in the activated memory lymphocyte subpopulation ($CD4^+CD8^+CD25^+$ cells), which diminished within a few weeks. The number of activated cytotoxic T cells ($CD4^-CD8^+CD25^+$ cells) peaked approximately 2 weeks after the memory population. Most of the activated lymphocyte population detected in PBMCs following in vitro activation carried the $CD4^-CD8^+$ phenotype. It should be noted that total percentage of $CD4^-CD8^+$ T cells in the PBMCs remained relatively stable throughout the experiment. Thus, it is unlikely that the increased number of $CD4^-CD8^+CD25^+$ T cells was due to a relative increase in the $CD4^-CD8^+$ T cell subpopulation (Fig. 2A). In contrast to the CD25 expression, different T cell subpopulation was found responsible for the

IFN- γ production observed in the PBMCs following CSFV vaccination. The result showed that $CD4^+CD8^+$ T cells were the major IFN- γ producers in PBMCs throughout the experiment, while the number of IFN- γ

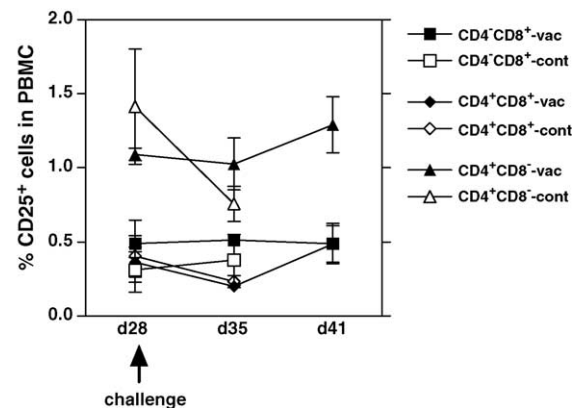


Fig. 4. Kinetics of CD25 surface expression on lymphocyte subsets in the PBMCs of pigs vaccinated with CSF vaccines and challenged with virulent CSFV at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals.

producing $CD4^+CD8^+$ cells was relatively low and comparable to that of the IFN- γ producing $CD4^+CD8^-$ cells (Fig. 2B). In addition, the kinetic of IFN- γ production was resembled to that of activated $CD4^+CD8^+$ T cells. In this experiment, cellular activation and IFN- γ production in the naive $CD4^+CD8^-$ population following vaccination was minimal (Fig. 2).

3.3. Kinetics of CD25 expression and cytokine production by porcine PBMCs following CSFV challenge

To determine the kinetics of CD25 expression and cytokine production following the CSFV challenge, crossbred pigs (4 pigs/group) were immunized once with a CSF vaccine and challenged with a virulent

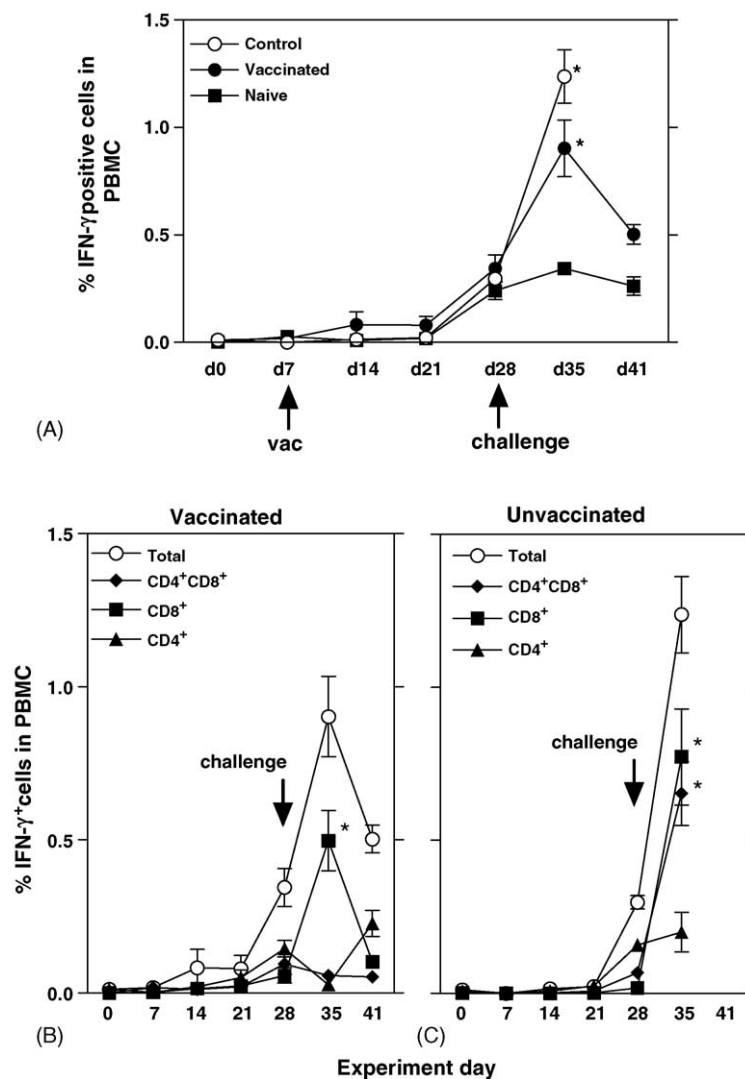


Fig. 5. Kinetics of total IFN- γ production by porcine lymphocytes (A) and by lymphocyte subsets from the PBMCs of vaccinated (B) and unvaccinated (C) group. Pigs were vaccinated with CSF vaccines (day 7) and challenged with virulent CSFV at 21 dpv (day 28). Porcine PBMCs were cultured in vitro with CSFV for 40 h before flow cytometric analyses. The studied lymphocyte subsets included $CD4^+CD8^-$ ($CD4^+$), $CD4^-CD8^+$ ($CD8^+$) and $CD4^+CD8^+$ populations. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the percentage positive cells from four animals. The symbol (*) indicates significant difference from the data of day 28 ($p < 0.05$, paired t -test).

strain of CSFV (Bangkok 1950) at 21 dpv (Section 2.3.2). Unvaccinated pigs also received the same amount of the challenge virus at the same time. Following the CSFV challenge, the unvaccinated pigs exhibited severe clinical signs of CSF starting from 7 days post-infection (dpi). All of the unvaccinated pigs developed severe leukopenia, with insufficient cells to analyze after the first week of infection, and died within 14 days following the challenge. Therefore, there was no data on the lymphocyte subpopulation from the control pigs after day 35. All of the

vaccinated pigs and naïve pigs remained clinically normal through the end of the experiment.

Following vaccination, the numbers of $CD4^+CD8^+$ and $CD4^+CD8^-$ from vaccinated group slightly increased, compared to those from the control group (Fig. 3). However, due to variation of the lymphocyte numbers from pigs within the same group, the changes in the lymphocyte numbers between days 7 and 14 were not statistically significant. Nevertheless, the number of $CD4^+CD8^-$ cells of the vaccinated group gradually increased, while the number of $CD4^+CD8^-$

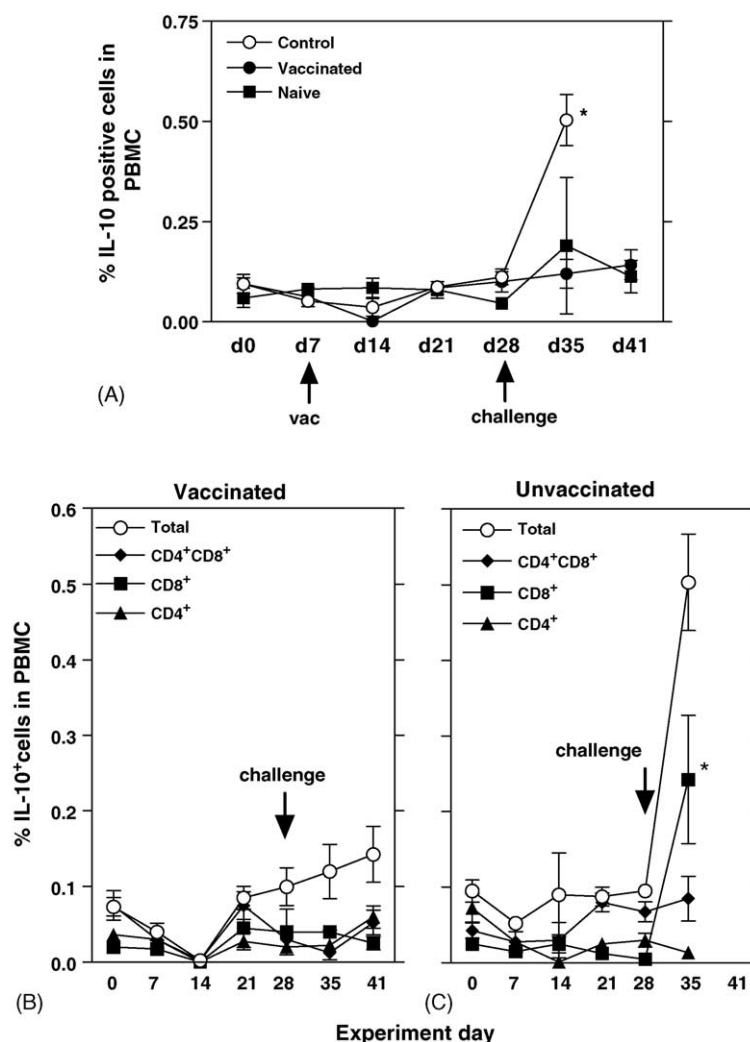


Fig. 6. Kinetics of total IL-10 production by porcine lymphocytes (A) and by lymphocyte subsets from the PBMCs of vaccinated (B) and unvaccinated (C) group (see Fig. 5). The symbol (*) in part (A) indicates significant difference from other groups ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). The symbol (*) in part (C) indicates significant difference from the data of day 28 ($p < 0.05$, paired t -test).

cells decreased, after vaccination through the end of the experiment (Fig. 3A). Numbers of the studied lymphocyte subpopulation of the control group remained relatively unchanged throughout the experiment (Fig. 3B).

At the time of challenge (day 28), no significant differences in the numbers of CD25⁺ and IFN- γ ⁺ cells among the groups were observed (Figs. 4 and 5). Interestingly, the numbers of CD25⁺ cells among the studied populations also remained unchanged following the challenge (Fig. 4). In contrast to the pattern of CD25 expression, there were significant increases in the numbers of IFN- γ producing cells in both vaccinated and unvaccinated groups following challenge (Fig. 5A). Exposure to virulent CSFV significantly increased the number of IFN- γ producing cells in the PBMCs of both vaccinated ($p < 0.05$, paired t -test) and unvaccinated pigs ($p < 0.01$, paired t -test) at 7 dpi. The numbers of IFN- γ producing cells in the vaccinated group fluctuated after challenge. At day 35, the CD4⁺CD8⁺ population was major IFN- γ producing cells in vaccinated pigs, while both CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ populations contributed to the IFN- γ production in the unvaccinated group (Fig. 5B and C). Although, the number of IFN- γ producing cells in the unvaccinated group markedly increased by 7 dpi, these pigs did not survive the challenge. Interestingly, the number of IL-10 producing cells in the unvaccinated group also significantly increased and higher than the other groups at 7 dpi ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test) (Fig. 6A). The majority of the IL-10 producing cells were the CD4⁺CD8⁺ population (Fig. 6C). No significant changes in IL-10 production were observed in the vaccinated group following the challenge (Fig. 6A).

4. Discussion

Like other species, pigs have typical CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes in their peripheral blood and lymphoid tissues. These cells have been shown to have helper and cytolytic functions, respectively. However, unlike humans and mice, pigs also have an extrathymic double positive lymphocyte population that comprises 8–64% of the circulating pool of small resting T cells (reviewed in Zuckermann,

1999). It was recently shown that the extrathymic naïve Th cells (CD4⁺CD8⁺) can upregulate their CD8 expression upon cellular activation. Therefore, by examining the expression of the CD4 and CD8 molecules, porcine Th populations can be categorized into resting Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺), activated Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺) and memory (or primed) Th cells (CD4⁺CD8⁺CD25⁺) (Saalmuller et al., 2002). In this experiment, we followed the number of single positive and double positive porcine lymphocyte subsets in PBMCs following exposure to CSF antigen. We also monitored the expression of the activation marker (CD25) and intracellular IFN- γ production in these subpopulations. It should be noted that the PBMCs were cultured in vitro with CSFV before flow cytometric analyses. Therefore, kinetics of cellular activation and cytokine production obtained from this experiment would reflect CSFV-specific responses in the PBMCs.

It has been shown in several studies that the level of IFN- γ production can be used as an indicator for cell-mediated immunity in pigs (Mateu de Antonio et al., 1998; Zuckermann et al., 1998; Suradhat et al., 2001). Our result from this study clearly showed that primed porcine PBMCs produced IFN- γ , but not IL-10, in response to secondary exposure to CSFV, and that the response could be measured by flow cytometry (Fig. 1). Following vaccination with CSF vaccine, double-positive (DP), CD4⁺CD8⁺ cells were the major IFN- γ producers in response to in vitro activation (Fig. 2). This finding is in agreement with previous reports showing that the DP cells are a memory population, which can produce high levels of IFN- γ in response to a recall antigen or polyclonal activator (Rodriguez-Carreno et al., 2002; Saalmuller et al., 2002). The finding also implies that the IFN- γ producing cells detected by ELISPOT assays following immunization with a CSF vaccine (Suradhat et al., 2001; Suradhat and Damrongwatanapokin, 2003) were indeed reflecting helper T lymphocyte (Th) activity. It should also be noted that the number of IFN- γ producing cells following vaccination was not as high as that observed following the viral challenge. This finding is consistent with a previous report showing that immunization with a modified live vaccine induces a lower level of cell-mediated response than infection (Piriou et al., 2003). In Experiment 2, the vaccinated group did not show any

significant increase in the number of IFN- γ producing cells following vaccination, compared to a sharp increase in the numbers of IFN- γ producing cells following the CSFV challenge (Fig. 5). The indifference in cytokine production among the groups following vaccination might be partly related to the low levels of detectable IFN- γ producing cells, and the high variation of the numbers of cytokine producing cells from pigs within the same group. In our experience, detection of IFN- γ producing cells following CSF vaccination by flow cytometry is not always as sensitive as the previously reported ELISPOT assay. It should be noted that on day 28 of Experiment 2, the numbers of IFN- γ producing cells in all groups increased considerably without any specific treatment (Fig. 5A). The reason for this fluctuation is not clearly known, but could relate to non-specific activation of the lymphocytes, as there seemed to be increased activity on the cytokine production of the naïve CD4⁺ cell (Fig. 5B and C).

Following vaccination for CSF, there seemed to be two phases of cellular activation measured by the upregulation of surface CD25 expression; early cellular activation of the DP population is followed by the activation of the CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2A). Although the CD25 marker has been used to identify cellular activation in several reports (Dillender and Lunney, 1993; Quade and Roth, 1999; Saalmuller et al., 2002; Piriou et al., 2003), however, we did not see a good correlation between the level of CD25 expression and cytokine production in PBMCs either following vaccination or after challenge (Figs. 2 and 4). In this study, the activated population might not always be the major population producing the cytokine in response to the CSFV antigen. The differences in dynamics of CD25 expression and cytokine production might be related to the specific lymphocyte population in each study. Unlike the cytokine production, which is shown to be antigen-specific (Fig. 1), combining the percentages of CD25⁺ cells from the three studied lymphocyte subpopulations (CD4⁺, CD8⁺, and double positive) contributed to less than 50% of the CD25⁺ cells from total lymphocyte population, in both naïve and primed populations (data not shown). In addition, no significant differences in the numbers of CD25⁺ cells were observed in the challenge pigs regardless of their immunological history (Fig. 4). These results sug-

gested that lymphocytes could also be activated, non-specifically, and upregulated CD25 expression by CSFV. Alternatively, it is also possible that the incubation period for the *in vitro* activation system used in this study is shorter than in previous reports (Saalmuller et al., 2002; Piriou et al., 2003). Therefore, the results could reflect the different dynamics of cellular activation at a different incubation time. Development of the four-color staining assay that simultaneously analyses CD25 expression and IFN- γ production, in addition to the surface markers, will provide a better explanation on this discrepancy.

Following challenge with CSFV, the number of IFN- γ producing cells in the PBMC population increased in both vaccinated and unvaccinated pigs at 7 dpi (Fig. 5). Interestingly, the CD4⁺CD8⁺ population was the subpopulation mainly responsible for IFN- γ production in the PBMCs of both groups following challenge, while there were a significantly less number of IFN- γ producing DP cells in the PBMCs of the vaccinated group during the first week of infection (Fig. 5A). This finding is in agreement with the previous report demonstrating that the activation of CD8⁺ CTLs was observed early (from 15 dpi) in the PBMCs of immunized pigs challenged with CSFV, but the activation of CD4⁺CD8⁺ cells was not observed until 35 dpi (Piriou et al., 2003). As it has been previously shown that the porcine memory population preferentially home to the secondary lymphoid organs (Zuckermann, 1999). The low number of antigen-specific DP cells detected in the PBMCs of primed pigs following the CSFV challenge could simply reflect the difference in tissue homing preference among the subpopulations during an effector phase of the immune response.

It should be noted that porcine gamma-delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes can also express the CD8 surface molecules (Pescovitz, 1998). However, the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the PBMCs of young pigs is usually low and they are not the major IFN- γ producers in the PBMCs even when stimulated with a polyclonal T cell activator (Rodriguez-Carreno et al., 2002). In addition, $\gamma\delta$ T cells are more sensitive to CSFV infection and are depleted early after the viral challenge (Pauly et al., 1998). Although the kinetics of CD25 expression and IFN- γ production by $\gamma\delta$ T lymphocytes were not monitored in this study, it is unlikely that the $\gamma\delta$ T cells be the major IFN- γ

producers observed in the CD4⁺CD8⁺ population following the viral challenge.

Although the number of IFN- γ positive cells was markedly increased in the unvaccinated pigs at 7 dpi (Figs. 3 and 4), these pigs did not survive the CSFV challenge. This phenomenon, which is usually seen in pigs with overwhelming CSFV infections, has been previously demonstrated using an ELISPOT assay (Suradhat et al., 2001). Interestingly, the number of IL-10 producing cells in the PBMCs was also markedly increased in the unvaccinated pigs, while the level of IL-10 production in the vaccinated pigs remained low through the end of the experiment (Fig. 6). The CD8⁺ cells were also found the major IL-10 producer in PBMCs (Fig. 6C). Thus, our results demonstrated that CSFV infection significantly increased the levels of both IFN- γ and IL-10 production in unvaccinated pigs. It should be noted that although CSFV is not usually detected in the PBMC population during the first week of infection, but abrogation of cellular immune responses is observed as early as 5 dpi (Pauly et al., 1998). Interleukin-10 is widely accepted to be a potent immunosuppressive cytokine that can strongly inhibit both innate and specific immune functions (Moore et al., 2001; Redpath et al., 2001). Our findings suggest that cytokine dysregulation could be one of the underlying mechanisms resulting in the immunoinhibitory effect observed following CSFV infection. Recently, the immunoinhibitory effects of viral infection via IL-10 induction have also been observed in hepatitis C virus (Dolganiuc et al., 2003) and human immunodeficiency virus (Almonti et al., 2003) models.

Taken together, our results suggest that CD25 expression and antigen-specific IFN- γ production by porcine lymphocytes may not be tightly associated. Furthermore, different lymphocyte populations appear to be responsible for cytokine production in the PBMCs following CSFV vaccination and challenge. Further understanding of the kinetics of the cellular response against CSFV may provide information about the mechanisms of protection and a better strategy for disease control in the future.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. J.A. Roth and Dr. R. Platt for their kind contributions of the custom-made

mAbs and helpful suggestion during preparation of the manuscript. We thank Dr. A. Rovid Spickler for critically reading the manuscript, Dr. K. Ruksungtham, Dr. S. Supchukul, and Dr. P. Kitikoon for their support and technical assistance. This work is supported by Thailand Research Fund, Chulalongkorn University and Intervet (Thailand) Ltd.

References

- Almonti, J.B., Ball, T.B., Fowke, K.R., 2003. Mechanisms of CD4⁺ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* 84, 1649–1661.
- Armengol, E., Wiesmuller, K.H., Wienhold, D., Buttner, M., Pfaff, E., Jung, G., Saalmuller, A., 2002. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J. Gen. Virol.* 83, 551–560.
- Dillender, M.J., Lunney, J.K., 1993. Characteristics of T lymphocyte cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 35, 301–319.
- Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., Romics, L.J., Mandrekar, P., Zapp, M., Szabo, G., 2003. Hepatitis C virus core and non-structural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 170, 5615–5624.
- Launais, M., Aynaud, J.M., Corthier, G., 1978. Hog cholera virus: active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity. *Vet. Microbiol.* 3, 31–43.
- Mateu de Antonio, E., Husmann, R.J., Hansen, R., Lunney, J.K., Strom, D., Martin, S., Zuckermann, F.A., 1998. Quantitative detection of porcine interferon-gamma in response to mitogen, superantigen and recall viral antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 265–277.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T., 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245–267.
- Moennig, V., 2000. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* 73, 93–102.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Pauly, T., Konig, M., Thiel, H.-J., Saalmuller, A., 1998. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 79, 31–40.
- Pescovitz, M.D., 1998. Immunology of the pigs. In: Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds.), *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, San Diego, pp. 373–420.
- Pinyochon, W., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Tantaswasdi, U., 1999. Biological characterization of swine fever virus Thai isolates. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 50, 107–117 (in Thai, with English abstract).

- Piriou, L., Chevallier, S., Hutet, E., Charley, B., Le Potire, M.-F., Albina, E., 2003. Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet. Res.* 34, 389–404.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1999. Antigen-specific in vitro activation of T-lymphocyte subsets of cattle immunized with a modified live bovine herpesvirus 1 vaccine. *Viral Immunol.* 12, 9–21.
- Redpath, S., Ghazal, P., Gascoigne, N.R., 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 9, 86–92.
- Remond, M., Plateau, E., Cruciere, C., 1981. In vitro study of the cellular response of pigs vaccinated against classical swine fever. *Zbl. Vet. Med. B* 28, 743–748.
- Rodriguez-Carreno, M.P., Lopez Fuertes, L., Ezquerro, R.A., Alonso, F., Dominguez, J., 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN- γ producing lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 259, 171–179.
- Rumenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1991. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.* 65, 589–597.
- Saalmuller, A., Werner, T., Fachinger, V., 2002. T-helper cells from naive to committed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 137–145.
- Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S., 2003. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet. Microbiol.* 92, 187–194.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M., Damrongwatanapokin, S., 2001. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83, 177–189.
- Van Oirschot, J.T., 2003. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.* 96, 367–384.
- Wood, P.R., Seow, H.-F., 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 33–34.
- Zuckermann, F.A., 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 55–66.
- Zuckermann, F.A., Husmann, R.J., Schwartz, R., Brandt, J., Mateu de Antonio, E., Martin, S., 1998. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 57–67.
- Zuckermann, F.A., Martin, S., Husmann, R.J., Brandt, J., 1999. Use of interleukin-12 to enhance the cellular immune response of swine to an activated herpesvirus vaccine. *Adv. Vet. Med.* 41, 447–461.