

รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NSP-2 ของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่แยก
ได้จากสุกรที่ติดเชื้อมาร่วมของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป

Genetic characterization NSP-2 gene of PRRS viruses isolated from
pigs dually infected with US and EU isolates

โดย
คณะผู้วิจัย

เดชฤทธิ์	นิลอุบล	(หัวหน้าโครงการ)
ธิติมา	ไตรพิพัฒน์	(นักวิจัย)
นายธวัชชัย	หุ้่นสุวรรณ	(นิสิตปริญญาโท)
นายกัญจน์	เทมียะเสน	(นิสิตปริญญาโท)

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง "การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NSP-2 ของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อมาร่วมของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป (Genetic characterization NSP-2 gene of PRRS viruses isolated from pigs dually infected with US and EU isolates)" เป็นโครงการที่จัดทำขึ้นโดยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส ผลของงานวิจัยนี้ทำให้เกิดประโยชน์ในการปรับเปลี่ยนกลยุทธ์ในการควบคุมและกำจัดโรคพอร์อาร์เอสในอนาคต อีกทั้งยังเป็นข้อมูลเพื่อที่จะทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่อนุมัติงบประมาณอุดหนุนการวิจัย เป็นค่าใช้จ่ายของโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณผู้บริหารและเจ้าหน้าที่ส่วนโครงการบูรณาการทุกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการแก่คณะนักวิจัยเป็นอย่างดี

ผศ.น.สพ.ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล

และคณะผู้วิจัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NSP-2 ของเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอส ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อมาร่วมของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป

(ภาษาอังกฤษ) Genetic characterization NSP-2 gene of PRRS viruses isolated from pigs dually infected with US and EU isolates"

ชื่อผู้วิจัย 1ผศ.น.สพ.ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล
นางสาว ธิติมา ไตรพิพัฒน์
นายธวัชชัย หุ่นสุวรรณ
นายกัญจน์ เตมียะเสน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี.....งบประมาณ 2553.....จำนวนเงิน.....700,900.... บาท...

บทคัดย่อ

(ภาษาไทย)

เชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลักคือสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสทั้งสองสายพันธุ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในส่วน Non-structural protein (Nsp) – 2 ของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสในสุกรที่ติดเชื้อมาร่วมทั้งสองสายพันธุ์ และได้ดำเนินงานวิจัยโดย นำซีรัมจากสุกรจากการทดลองที่ผ่านมา แบ่งออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) VR-2332 หรือสายพันธุ์ยุโรป (EU) Lylestad virus และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสรวมทั้งสองสายพันธุ์คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป (MIX) (VR-2332 และ Lylestad virus) ที่ช่วงเวลา 5 10 และ 30 วันหลังการให้เชื้อ มาทำการแยกเชื้อไวรัสและถอดรหัสทางพันธุกรรมส่วนยีน Nsp-2 ทั้งบางส่วน (partial) และทั้งหมด (complete) เพื่อเปรียบเทียบที่ช่วงเวลาต่างกัน ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของลำดับเบสของยีน Nsp-2 พบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่ม MIX มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่ม US และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสต้นแบบสายพันธุ์

อเมริกาเหนือ VR-2332 พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่ม MIX ออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 มีลักษณะพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 และคลัสเตอร์ที่ 2 มีลักษณะพันธุกรรมที่ต่างจากไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 ในขณะที่เชื้อไวรัสลูกหลานของกลุ่ม US อยู่ในคลัสเตอร์ที่ 1 เท่านั้น ส่วนเชื้อไวรัสลูกหลานสายพันธุ์ยุโรปมีลักษณะพันธุกรรมที่เหมือนกับเชื้อไวรัสต้นแบบ Lylestad virus โดยสรุปเชื้อไวรัสลูกหลานของทั้งสองสายพันธุ์มีวิวัฒนาการแยกกันและไม่เกี่ยวข้องกัน แต่ในกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมมีการเกิดการกลายพันธุ์มากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อเดี่ยว

(ภาษาอังกฤษ) PRRS

Two distinct genotypes, European (EU) and North American (NA), of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) are recognized and have emerged separately in each continent. Both genotypes had been isolated in Thailand. The objectives of the study were to investigate genetic evolution of non-structural protein (Nsp)-2 of PRRSV isolated from pigs dually infected with EU and NA isolates. Virus was isolated from serum of 5 pigs of each of 3 treatment groups at 5, 10 and 30 days post infection. Three treatment groups, previously conducted, consisted of EU and US in which pigs in these 2 groups were intranasally challenged with EU and US, respectively. The third group was MIX in which pigs were intranasally challenged with both EU and US isolates. RNA was extracted from viruses and converted to cDNA. PCR was performed on cDNA using specific to Nsp-2 gene. It was demonstrated that progeny viruses belonging to US genotypes were grouped into 2 clusters. Progeny US viruses detected in the US group were grouped in the cluster I only, where as that of the MIX groups were grouped in both clusters suggesting more mutation rate in co-infected than single infected group. Progeny EU viruses, however, were identical to EU isolate used in the challenge. In addition, no recombination was observed. In conclusion, the results suggested that progeny viruses of each genotype independently evolved, but mutation rate was higher in the co-infected than the single infected group.

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์: 0 2218 9583

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข,ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1: บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	3
ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2: วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3: วิธีดำเนินการวิจัย	10
การแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส	11
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 บางส่วน	11
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ทั้งหมด	13
การวิเคราะห์และประเมินผล	14
บทที่ 4: ผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ	15
ผลการวิจัย	15
สรุปผล อภิปรายและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโคลนของไวรัสที่ตรวจเจอและส่งถอดรหัสทางพันธุกรรม ในช่วงเวลาต่างๆ	20
ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส ลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือ	21

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มสุกรที่ได้รับไวรัส ทั้ง 2 สายพันธุ์	2
ภาพที่ 2 แสดงภาพเจลของผลผลิต PCR	30
ภาพที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง	31
ภาพที่ 4 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน Nsp-2 บางส่วนของไวรัส พ็อร์อาร์เอสลูกหลาน (progeny PRRS viruses) สายพันธุ์อเมริกาเหนือที่ ที่แยกได้สุกร 2 กลุ่ม	32 - 33

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

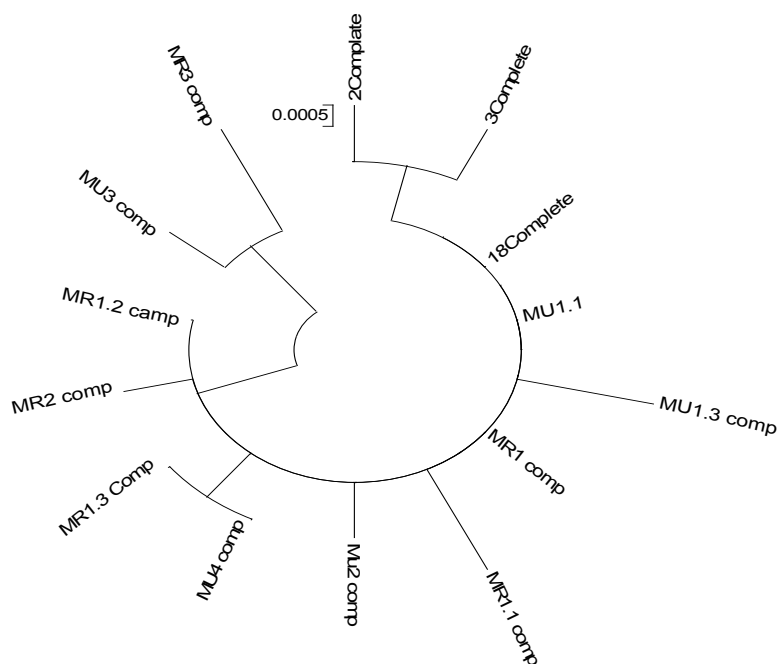
ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพาร์อาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อ ไวรัสพาร์อาร์เอส (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดี่ยวและมีเปลือกหุ้มที่จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) ไวรัสพาร์อาร์เอส ประกอบไปด้วย 8 Open reading frames (ORFs) คือ ORFs 1-7 และสามารถแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American isolates) และสายพันธุ์ยุโรป (European isolates) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา จะพบการระบาดของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก เคยมีการค้นพบสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ได้สร้างความเสียหายมากนัก หลังจากนั้นก็ไม่เคยมีการค้นพบอีกเลย และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากสาเหตุใดในประเทศแถบทวีปยุโรปจะพบการระบาดของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศเช่น เดนมาร์ก ที่สามารถพบไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ซึ่งมีสาเหตุมาจากการนำวัคซีนโรคพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็นไปใช้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานของความชุกสายพันธุ์ของไวรัสชนิดนี้ในประเทศเดนมาร์ก สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 และสามารถแยกเชื้อไวรัส ได้ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป โดยรายงานเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีสายพันธุ์ยุโรป อยู่ประมาณ 66.42% และมีสายพันธุ์อเมริกาเหนืออยู่ประมาณ 33.58% (Thanawongnuwech et al., 2004)และฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ของประเทศไทยพบการติดเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในฟาร์มเดียวกันซึ่งแตกต่างจากการติดเชื้อของประเทศอื่น แต่ในสถานการณ์ปัจจุบันน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเพราะพบไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพิ่มมากขึ้น สาเหตุของการเปลี่ยนแปลงยังไม่ทราบแน่ชัด

ไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งอาร์เอ็นเอไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอไวรัสแล้ว จะไม่มีขบวนการ Proof-reading ที่ใช้ในการตรวจสอบการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้การแปลรหัสนิวคลีโอไทด์มีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดสูง ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ได้ง่าย และไวรัสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง โดยส่วนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่มากที่สุดคือส่วนของ ORF 5 ที่ให้ส่วนประกอบของโปรตีนบนผนังเซลล์ (Glycoprotein 5) (Chang et al., 2002; Meng et al., 1995a; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1998)ที่พบว่าเป็นส่วนที่กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเข้าสู่เซลล์ (Neutralizing antibodies) (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004; Plagemann et al., 2002)นอกจากนั้นแล้ว ไวรัสพาร์อาร์เอส ยังเป็น Quasi-species คือทุกครั้งที่ไวรัสเพิ่มจำนวน ส่วนของ Progeny viruses ที่เกิดขึ้น จะมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตัวตั้งต้น มากหรือน้อยแตกต่างกันไป (Domingo, 1992) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า Progeny viruses ที่เกิดขึ้น

เหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีการดำรงอยู่ในรูปแบบใด เช่น Progeny viruses ทุกตัวสามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ หรือจะมีไวรัสเพียงบางตัวเท่านั้นที่อยู่รอดและพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ ที่กลายไปเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้ ทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยระบาดจากโรคพื่ออาร์อาร์เอสก็ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อตัวเดิมหรือต่างชนิดทำให้โรคพื่ออาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

สุกร 1 ตัวสามารถติดเชื้อได้มากกว่า 1 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้ง สายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ หรือสายพันธุ์ยุโรปทั้งคู่ หรืออาจจะเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ เช่นสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ พบว่า Progeny viruses ของทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวน สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกกันและจะมีบางส่วนที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์ (Genetic recombination) ส่วนสุดท้ายแล้วจะมีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเด่นขึ้นมาหรือไม่ (Dominant mutants) ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ ส่วนในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกันของทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปนั้นยังไม่มีการรายงานถึงผลที่เกิดขึ้น แต่จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลองพบว่า ช่วง passage แรกๆหลังจากที่ได้ทำให้เซลล์มีการติดเชื้อทั้งสองสายพันธุ์พบว่ามีจำนวน plaque ที่มีขนาดต่างกัน เกิดขึ้นมากจำนวนหลาย plaque และเมื่อนำมาตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของส่วน ORF1 และ ORF 5 พบเชื้อทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้น ขนาดของ plaque ที่ต่างขนาดกันจะลดลงตามจำนวน passage ที่เพิ่มขึ้นและสายพันธุ์ที่พบเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ สายพันธุ์ยุโรป หายไป นอกจากนั้นแล้วไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบ มีลักษณะทางพันธุกรรมของ ORF 5 ที่ต่างออกไป โดย progeny viruses ที่แยกได้จากน้ำในปอด (bronchial alveolar fluid lavage) มีลักษณะทางพันธุกรรมของ ORF 5 ที่แตกต่างจากไวรัสตั้งต้นมาก(แผนภาพที่ 1) และพบการเกิด recombination ระหว่างไวรัสสอง prototypes (นิลอุบล, โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551)



ภาพที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มสุกรที่ได้รับไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ ตัวอย่างหมายเลข 18 complete เป็นไวรัสตั้งต้น ตัวอย่างหมายเลข 2, 3 complete เป็นไวรัสที่แยกได้จากสุกรในวันที่ 10 วันหลังการติดเชื้อ ตัวอย่างที่เหลือเป็นไวรัสที่แยกได้จากสุกรในวันที่ 30 วันหลังการติดเชื้อ

ยีน Nsp-2 สร้างโปรตีน Nsp-2 ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ polymerase จากรายงานการระบาดของโรค swine high fever ที่ประเทศจีน ได้มีการอ้างว่า สาเหตุเกิดจากไวรัสพ็อร์อาร์เอสที่มีส่วนของยีน Nsp-2 ที่สั้นกว่าปกติ แต่จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยพบว่าไม่ใช่ โดยปกติพบว่าส่วนของยีน Nsp-2 ของไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปมีขนาดที่สั้นกว่าส่วนของยีน Nsp-2 ของไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ การอุบัติขึ้นของไวรัสที่มีขนาดยีน Nsp-2 ที่สั้นกว่าปกติ น่าจะเกิดจาก recombination ของไวรัส 2 prototypes ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ซึ่งผลที่ได้ยังไม่มีการอ้างถึงในวารสารใดมาก่อนและเป็นที่น่าสนใจอย่างมากจากนักวิจัยต่างประเทศดังสังเกตได้จาก งานประชุมวิชาการ PRRS symposium 2008 ได้เชิญให้ผู้วิจัยไปเป็นวิทยากรเพื่อบรรยายเรื่องนี้

จากรายละเอียดที่กล่าวมาข้างต้นที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของไวรัส ผลการทดลองที่ได้และลักษณะการติดเชื้อของไวรัสพ็อร์อาร์เอสในประเทศไทยที่แตกต่างจากการติดเชื้อในประเทศอื่นๆ ทำให้ควรมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพ็อร์อาร์เอส และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบลักษณะพื้นฐานของลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ผู้วิจัยควรจะทำการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการแสดงออกของยีน Nsp-2 จากไวรัสพาร์อาร์เอสที่แยกได้จากสุกรที่มีการติดเชื้อร่วมของสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่เกิดจากการติดเชื้อร่วมของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

นำซีรัมจากสุกร 3 กลุ่มการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมสองสายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ กลุ่มละ 5 ตัวอย่าง ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ มาเพาะเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสโดยวิธี Virus isolation ในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 แล้วทำการตรวจหาไวรัสในเพลทด้วยวิธี Immunofluorescence

หลังจากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยการนำตัวอย่าง มาทำการสกัด RNA ของเชื้อไวรัสที่ได้จากขั้นตอนการแยกเชื้อ เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA นำ cDNA ของตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส โดยตรวจหาชิ้นส่วนพันธุกรรมส่วน Nsp-2

นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ไปทำการ ligate เข้าพลาสมิดโดยใช้ชุด pGEM-Teasy (promega, USA) ทำการ transform พลาสมิด เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยใช้ heat shock ตามชุดทดสอบ เลี้ยงแบคทีเรียที่ transform แล้วใน Difco™LB agar (Becton Dickinson, USA) ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16-20 ชั่วโมงจะได้โคโลนีสีฟ้าและสีขาว ทำการเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 3 – 5 โคโลนี (3 – 5 โคลน) และตั้งเชื้อโคลน แล้วทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™LB Broth ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมงและนำแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Germany) แล้วทำการส่งถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อหาลำดับเบส และจัดแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining

ทฤษฎี สมมติฐานและหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมากกว่าหนึ่ง Isolates จะมีเชื้อเพียง Isolate เดียวเท่านั้นที่เด่นขึ้นมาและเป็นเชื้อใหม่ที่เกิดจากการ recombination ของเชื้อตั้งต้นและส่วนยีน Nsp-2 จะมีขนาดที่สั้นลง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพาร์อาร์เอสในสุกรที่มีการติดเชื้อร่วมทั้งสองสายพันธุ์และคาดว่าจะได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารต่างประเทศ เช่น วารสาร Veterinary Microbiology

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

โรคพ็อดอาร์เอสเป็นโรคติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร ที่ในปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาหลักที่สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก โดยประสิทธิภาพการผลิตสุกรของฟาร์มที่มีการติดเชื้อจะลดต่ำลง เนื่องจากการติดเชื้อในแม่พันธุ์จะทำให้พบปัญหาการแท้งในแม่สุกรทุกระยะของการตั้งท้อง การกลับสัดไม่ตรงรอบ ลูกกรอก ลูกแรกคลอดอ่อนแอ และตายสูงเนื่องจากอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้นมากในหมู่วางอนุบาล ถึงหมูรุ่นขุน จากอาการป่วยด้วยโรคในทางเดินหายใจ (Hill, 1990)

โรคพ็อดอาร์เอสเกิดจากการติดเชื้อไวรัสพ็อดอาร์เอส ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายเดี่ยวและมีเปลือกหุ้ม (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1992) ไวรัสพ็อดอาร์เอส จัดอยู่ใน genus *Arterivirus* ตระกูล *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) โดยถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ Lactate dehydrogenase-elevating virus, Equine arteritis virus และ Simian hemorrhagic fever virus ไวรัสพ็อดอาร์เอส แบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หลัก คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American isolates) และสายพันธุ์ยุโรป (European isolates) ตามทวีปที่มีการค้นพบครั้งแรก

โรคพ็อดอาร์เอส พบครั้งแรกที่ประเทศ อเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2528 ส่วนในยุโรปพบในปี พ.ศ. 2531 แต่ยังไม่สามารถหาสาเหตุได้ จนในปี พ.ศ. 2533 สามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์ และทำการตั้งชื่อว่า Lelystad virus โดยเป็นต้นแบบของไวรัสพ็อดอาร์เอส สายพันธุ์ยุโรป และในประเทศสหรัฐอเมริกาก็สามารถแยกเชื้อไวรัสพ็อดอาร์เอสได้ในปีถัดมาและได้มีการตั้งชื่อว่า ATCC VR-2332 โดยเป็นต้นแบบของไวรัสพ็อดอาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Collins et al., 1992) ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือเช่น สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา จะพบการระบาดของไวรัสพ็อดอาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือเป็นหลัก โดยเคยมีรายงานการค้นพบสายพันธุ์ยุโรปบ้างเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2542 แต่ก็ไม่ได้สร้างความเสียหายมากนักและหลังจากนั้นก็ไม่มีรายงานการค้นพบอีกเลย ในประเทศแถบทวีปยุโรปจะพบการระบาดของไวรัสพ็อดอาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปเป็นหลัก ยกเว้นในบางประเทศเช่น เดนมาร์ก ที่สามารถพบไวรัสพ็อดอาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการนำวัคซีนโรคพ็อดอาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือชนิดเชื้อเป็นไปใช้ (Botner et al., 1994; Botner et al., 1997)

สำหรับประเทศไทย พบการติดเชื้อพ็อดอาร์เอส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2540 เป็นไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และการติดเชื้อพ็อดอาร์เอส ใน ประเทศไทย พบทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ยุโรป โดยพบว่ามี สายพันธุ์ยุโรป อยู่มากกว่า สายพันธุ์อเมริกา (Thanawongnuwech et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามคาดว่า สถานการณ์ปัจจุบันน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากพบสายพันธุ์อเมริกาเหนือมากกว่าสายพันธุ์ยุโรป

เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส มีขนาดมอลโมเลกุล 15 kDa ประกอบไปด้วย 8 Open reading frames (ORFs) คือ ORFs 1-7 (Cavanagh, 1997; Meulenberg, 2000; Meulenberg et al., 1997) โดยส่วนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ ORF 1a และ 1b ที่มีขนาดเป็น 80% ของลำดับเบสทั้งหมด ส่วนนี้จะเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วนประกอบโครงสร้าง (non-structural protein) โดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็น non-coding sequence และเอ็มไซม์ โดยมีตำแหน่งที่ด้าน 5' และ ORFs 2-7 ที่ทำหน้าที่เป็น coding sequence โดยมีตำแหน่งที่ด้าน 3' ของสายนิวคลีโอไทด์ ส่วนของ ORFs 2-5 มีขนาด 29-50, 45-50, 31-35 และ 25 kDa ตามลำดับ โดย ORFs 2-5 นี้จะให้ส่วนประกอบของโปรตีนบนผนังเซลล์ ที่เรียกว่า Glycoproteins 2-5 (GPs 2-5) ส่วน ORF 6 นั้นมีขนาด 18 kDa จะให้ส่วนของ M protein และ ORF 7 ที่มีขนาด 15 kDa ให้ส่วนของ N protein ที่อยู่ในนิวเคลียส

เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส สามารถแบ่งออกได้เป็นสองสายพันธุ์หลักคือ สายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีความเหมือนกันประมาณ 55 – 79% (Murtaugh et al., 1995) ในแต่ละสายพันธุ์ก็สามารถแยกย่อยได้หลาย (isolates) และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมประมาณ (2.5 – 7.9%)(Murtaugh et al., 1998) โดยกลุ่มของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มของไวรัสสายพันธุ์ยุโรปมาก ส่วนของไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากที่สุดคือส่วนของ 5 ส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยที่สุดคือส่วน 1b, 6 และ 7

ไวรัสพาร์อาร์เอสเป็น Quasi-species คือทุกครั้งที่เราเพิ่มจำนวน ส่วนของ Progeny viruses ที่เกิดขึ้นจะมีหลายตัว (isolates) และแต่ละตัวจะมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสตัวตั้งต้น มากหรือน้อยแตกต่างกันไป (Domingo, 1992) โดยมีสาเหตุหลักจากการที่ไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ซึ่งไม่มีขบวนการ Proof reading ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และอาจจะมีขบวนการ Recombination ร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า Progeny viruses ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีการดำรงอยู่ในรูปแบบใด เช่น Progeny viruses ทุกตัวสามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ในทุกๆครั้งที่เกิดการเพิ่มจำนวน หรือจะมีไวรัสเพียงบางตัวเท่านั้นที่อยู่รอดและพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ ที่กลายไปเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอย่างสิ้นเชิง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการเป็นแอนติเจนและส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อเชื้อไวรัสตัวเดิมไม่สามารถจดจำได้เชื้อตัวใหม่ที่เกิดขึ้นได้ ทำให้สามารถเกิดการติดเชื้อได้ใหม่อีกครั้ง ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ฟาร์มที่เคยระบาดจากโรคพาร์อาร์เอสก็ยังสามารถเกิดการระบาดใหม่ได้จากเชื้อตัวเดิมหรือต่างชนิดทำให้โรคพาร์อาร์เอสเป็นโรคที่ยากต่อการควบคุมและป้องกัน

นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า สุกร 1 ตัวสามารถติดเชื้อได้มากกว่า 1 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้ง สายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ หรือสายพันธุ์ยุโรปทั้งคู่ หรืออาจจะเป็นการติดเชื้อร่วมกันของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ เช่นสายพันธุ์อเมริกาเหนือทั้งคู่ พบว่า Progeny viruses ของทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ไวรัสเพิ่มจำนวน สามารถดำรงอยู่ด้วยกันได้ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกลายพันธุ์แยกกันและจะมีบางส่วนที่สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของสอง

สายพันธุ์ (Genetic recombination) ส่วนสุดท้ายแล้วจะมีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเด่นขึ้นมาหรือไม่ (Dominant mutants) ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ ส่วนในกรณีที่มีการติดเชื่อร่วมกันของทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปนั้นยังไม่มีผลการรายงานถึงผลที่เกิดขึ้น

การศึกษาของ Chang และคณะ (2002) (Chang et al., 2002) พบว่า ไวรัสพรีอาร์อาร์เอสเมื่อมีการเพิ่มจำนวนจะมีไวรัสตัวใหม่เกิดขึ้นหลายตัว โดยจะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นแบบสุ่ม (Random mutation) ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนและไม่มีส่วนใดส่วนหนึ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา โดยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือ ORF 5 และในไวรัสตัวใหม่หลายตัวที่เกิดขึ้นจะมีตัวหนึ่งที่เป็นตัวที่สามารถแยกได้ทุกครั้ง (Dominant variant) ในขณะเดียวกันก็มีรายงานพบว่า ไวรัสพรีอาร์อาร์เอสหลายตัวที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแต่ยังอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ถ้าอยู่ร่วมกันจะทำให้เกิดไวรัสตัวใหม่ที่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกันได้ (Genetic recombination) (Mengeling et al., 2000; Mengeling et al., 2003a; Mengeling et al., 2003b)

ฟาร์มสุกรในประเทศไทยส่วนใหญ่พบการติดเชื่อทั้งสองสายพันธุ์โดยในฟาร์มเดียวกันก็สามารถพบการติดเชื่อทั้งสายพันธุ์เดียวคือสายพันธุ์อเมริกาเหนือหรือสายพันธุ์ยุโรป และในฟาร์มที่ติดเชื่อสายพันธุ์เดียวยังสามารถแยกไวรัสได้หลายตัว แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการติดเชื่อที่พบส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื่อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากนั้นแล้ว นอกจากนั้นแล้ว ในประเทศไทยยังได้มีการนำวัคซีนไวรัสพรีอาร์อาร์เอสชนิดเชื่อเป็นมาใช้ซึ่งมีทั้งชนิดที่ผลิตจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ แต่ข้อจำกัดของวัคซีนชนิดนี้คือการที่สุกรที่ถูกฉีดวัคซีนสามารถปล่อยเชื้อไวรัสสุกรที่ไม่ได้ทำวัคซีนได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายตัวของเชื้อไวรัสและการนำวัคซีนไปใช้ในฟาร์มที่มีการติดเชื่ออยู่แล้วอาจจะเป็นการสร้างปัญหาให้แก่ฟาร์มและอาจจะทำให้วัคซีนไวรัสเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกับเชื้อที่มีอยู่ในฟาร์มอยู่แล้วทำให้มีโอกาสสูงที่จะเกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ทำให้สร้างปัญหาสูญเสียให้แก่ฟาร์มมากยิ่งขึ้น

โดยทั่วไปแล้วสุกรที่ติดเชื่อ PRRSV มักจะไม่มีอัตราการตาย แต่พบเหตุการณ์การติดเชื่อไวรัส PRRSV ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงในประเทศจีน (swine high fever) และสหรัฐอเมริกา ซึ่งไวรัสที่พบนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากไวรัสเดิมโดยเฉพาะบริเวณ Nsp-2 ซึ่งพบมี deletion ดังนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนบริเวณ Nsp-2 ของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายมาก (Han et al., 2006) และจัดได้ว่าเป็นบริเวณที่ไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปมีความแตกต่างกันมากที่สุด (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999) เมื่อพิจารณาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีการแยกเชื่อได้จากที่ต่างๆ พบว่า Nsp-2 นั้นประกอบไปด้วยบริเวณที่มีความอนุรักษ์ (conserved regions) และบริเวณที่มีความหลากหลายสูง (hypervariable regions) (Han et al., 2007; Han et al., 2006) บริเวณที่มีความอนุรักษ์ของ NSP2 มีทั้งสิ้น 6 ตำแหน่งหลักคือ 1. กรดอะมิโน 7 ตัวแรกของโปรตีน NSP2 โดยคาดว่ากรดอะมิโนในบริเวณนี้น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับตำแหน่งการตัดของ PCP ของ NSP1 2. บริเวณที่คาดว่า CP ซึ่งมีขนาด

ประมาณ 100 กรดอะมิโน (กรดอะมิโนตำแหน่ง Y47 - C147) และ 3. บริเวณที่คาดว่าเป็น TM อีก 4 ตำแหน่ง (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 876 - 898 911 - 930 963 - 979 และ 989 - 1009) ส่วนบริเวณที่มีความหลากหลายสูงมีทั้งสิ้น 2 ตำแหน่งหลัก ได้แก่ 1. บริเวณของกรดอะมิโนที่อยู่ก่อนหน้าส่วนที่คาดว่าเป็น CP และ 2. บริเวณของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างส่วนที่คาดว่าเป็น CP และส่วนที่คาดว่าเป็น TM

ในบรรดาความหลากหลายที่เกิดขึ้นบน Nsp-2 นั้น สิ่งหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจมากคือการแยกพบเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสที่มีการขาดหายไป (deletion) และการเข้าแทรก (insertion) ของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 นี้ เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Nsp-2 ของไวรัส EAV ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสพ็อร์อาร์เอสนั้น แม้จะมีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนเช่นเดียวกับ NSP2 ของไวรัสพ็อร์อาร์เอส แต่ CP บน Nsp-2 ของ EAV จะไม่สามารถตัดแยก Nsp-2 และ NSP3 ได้ หากเกิดการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 แม้เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีการพยายามเชื่อมโยงระหว่างการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 กับความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสพ็อร์อาร์เอสอีกด้วย อย่างไรก็ตามการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกนี้จะสามารถส่งผลต่อไวรัสพ็อร์อาร์เอส หรือส่งผลกระทบต่อความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและสุกรในระดับใด ปัจจุบันมีการศึกษาในระดับหนึ่งเท่านั้น

ไวรัสพ็อร์อาร์เอสที่มีการรายงานว่ามี การเข้าแทรกของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 คือไวรัสสายพันธุ์ SP (หมายเลข GenBank accession no. AF184212) (Shen et al., 2000) ซึ่งเป็นไวรัสจากวัดซินสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ VR2332 พบว่าไวรัสสายพันธุ์ SP นี้มีกรดอะมิโนเข้าแทรกจำนวน 36 ตัว ร่วมกับการเกิดการแทนที่ (substitution) ของกรดอะมิโนอีก 158 ตัว ตำแหน่งที่มีการเข้าแทรกนี้สามารถเทียบได้กับตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 813 และ 814 ของไวรัสสายพันธุ์ VR2332 (ซึ่งอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายสูง) อย่างไรก็ตามการเข้าแทรกนี้จะ เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ไวรัสมีการอ่อนกำลังลงหรือไม่นั้นยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากไวรัสสายพันธุ์นี้ยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ VR-2332 ที่ตำแหน่งอื่นอีก

ไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีการรายงานว่ามี การขาดหายไปของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 เช่น ไวรัสสายพันธุ์ HB-2(sh)/2002 (หมายเลข GenBank accession no. AY262352) (Gao et al., 2004) สายพันธุ์ SY0608 (หมายเลข GenBank accession no. EU144079) (Li et al., 2007) สายพันธุ์ MN184A (หมายเลข GenBank accession no. DQ176019) และสายพันธุ์ MN184B (หมายเลข GenBank accession no. DQ176020) (Han et al., 2006) เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ VR-2332 แล้ว พบว่าไวรัสสายพันธุ์ HB-2(sh)/2002 (แยกเชื้อได้จากประเทศจีน) พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 รวมทั้งสิ้น 12 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 466 ถึง 467 ไวรัสสายพันธุ์ SY0608 (แยกเชื้อได้จากประเทศจีน) พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 480 และระหว่างตำแหน่งที่ 531 ถึง 559 สายพันธุ์ MN184A และ MN184B (แยกเชื้อได้จากประเทศสหรัฐอเมริกา)

พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 131 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 324 ถึง 434 ตำแหน่งที่ 486 และระหว่างตำแหน่งที่ 505 ถึง 523

จากการที่สามารถตรวจพบไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในบริเวณที่มีความหลากหลายมากของ Nsp-2 ร่วมกับการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสสายพันธุ์ VR2332 ยังคงสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง แม้ว่า Nsp-2 ของไวรัสจะเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนถึง 403 กรดอะมิโนในบริเวณที่เป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูง (Han et al., 2007) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างจาก Nsp-2 ของไวรัส EAV อย่างชัดเจน เนื่องจาก Nsp-2 ของไวรัส EAV ไม่สามารถเกิดการขาดหายไป (หรือการเข้าแทรก) ของกรดอะมิโนที่ Nsp-2 ได้เลย (Snijder et al., 1995) อย่างไรก็ตามการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนในบริเวณที่มีความหลากหลายมากของ Nsp-2 นี้มีขีดจำกัดอยู่เช่นกัน โดยพบว่าไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 324 – 726 ของ NSP2 นั้นยังคงสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เช่นเดียวกับไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 727 – 813 แต่ไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 324 – 813 กลับไม่สามารถเจริญบนเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า Nsp-2 จำเป็นต้องมีความยาวในระดับหนึ่งเพื่อให้สามารถเกิดการพับ (folding) ของโปรตีนได้อย่างถูกต้อง และทำให้ Nsp-2 ยังคงทำหน้าที่ต่างๆได้ (Han et al., 2007)

จากบรรดาไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในบริเวณ Nsp-2 ที่กล่าวมาทั้งหมดแม้ว่าจะมีหลายสายพันธุ์ที่รายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค (virulent strains) แต่มีเพียงสายพันธุ์ SY0608 เท่านั้นที่มีการรายงานว่าสามารถก่อโรคในลักษณะที่แตกต่างไปจากไวรัสพาร์อาร์เอสทั่วไป (Li et al., 2007) ไวรัสสายพันธุ์นี้แยกเชื้อได้มาจากสุกรที่ป่วยและตายจากการระบาดของกลุ่มอาการไข้สูงในประเทศจีนในช่วงปีพ.ศ. 2549 ซึ่งในการระบาดครั้งนั้นมีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก เมื่อนำไวรัสสายพันธุ์นี้ฉีดกลับเข้าสู่สุกรทดลองพบว่าสุกรมีไข้สูง หายใจลำบาก ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีแดง อวัยวะภายในเช่น ปอด ตับ และ ไต มีจุดเลือดออกกระจายอยู่ทั่วไป มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง และเมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนของไวรัสสายพันธุ์นี้ พบว่าที่ Nsp-2 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 ตัว (เทียบกับไวรัสสายพันธุ์ VR2332) อย่างไรก็ตามความเปลี่ยนแปลงที่ Nsp-2 นี้จะเป็นสาเหตุหลักหรือร่วมไปกับการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ของไวรัสสายพันธุ์ SY0608 ซึ่งทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคมกขึ้นนี้ จำเป็นต้องได้รับการศึกษาต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

ไวรัสพาร์อาร์เอส

เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่นำมาใช้ดำเนินงานวิจัยประกอบด้วยเชื้อ 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไวรัสไอโซเลต 4VC10EU และ TRP10US ไวรัสในกลุ่มนี้เป็นเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสแยกได้จากสุกรที่แสดงอาการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส จากฟาร์มสุกรในจังหวัดราชบุรี (field isolates) ช่วงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2553 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไวรัสไอโซเลต UDT10 และ FDT10 ไวรัสในกลุ่มนี้เป็นเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์จีนที่มีความรุนแรง (HP-PRRSV) และมีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 ตัว ที่แยกได้จากสุกรที่แสดงอาการไข้สูงบริเวณลำตัวเป็นปื้นแดง สอดคล้องกับโรค Swine high fever syndrome ในฟาร์มสุกร จังหวัดราชบุรีและอุตรดิตถ์ ของประเทศไทย ช่วงเดือน มีนาคม – เมษายน พ.ศ. 2553 โดยแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) ทั้ง 4 ไอโซเลต ในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MARC-145 ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย จากตัวอย่างเลือดสุกรป่วย ที่ได้รับจากฟาร์มสุกร และยืนยันผลโดยใช้ส่วนพันธุกรรมของยีนโออาร์เอฟ 5 และ Nsp-2 ที่นำไปตรวจสอบกับ Genbank นำเชื้อไวรัสจาก 2 กลุ่มนี้มาใช้เป็นประโยชน์ ในการตรวจสอบ Primers และเป็นชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และรหัสพันธุกรรม

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ต้นแบบ (Prototype) มีทั้งหมด 2 เชื้อ คือ ไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US, VR-2332) และไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU, Lelystad virus) (ไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ได้รับการอนุเคราะห์จาก น.สพ.ดร. รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ) นำเชื้อในกลุ่มนี้มาใช้ในการตรวจสอบ Primers เป็นชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและรหัสพันธุกรรม และให้เชื้อในสุกรทดลองในการทดลองที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ซึ่งโครงการวิจัยนั้นกลุ่มการทดลองและวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

ก. กลุ่มติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU)

สุกรในกลุ่มนี้มีจำนวน 5 ตัว และทุกตัวได้รับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป Lelystad virus (LV) ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อตัว ที่ความเข้มข้น 10^5 TCID₅₀/มิลลิลิตร เข้าทางจมูกข้างละ 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 ของการทดลอง

ข. กลุ่มติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกา (US)

สุกรในกลุ่มนี้มีจำนวน 5 ตัว และทุกตัวได้รับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกา VR-2332 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อตัว ที่ความเข้มข้น 10^5 TCID₅₀/มิลลิลิตร เข้าทางจมูกข้างละ 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 ของการทดลอง

ค. กลุ่มติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมสองสายพันธุ์ (MIX)

สุกรในกลุ่มนี้มีจำนวน 6 ตัว และทุกตัวได้รับเชื้อไวรัสพัวร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ปริมาณสายพันธุ์ละ 2 มิลลิลิตรต่อตัว ที่ความเข้มข้น 10^5 TCID₅₀/มิลลิลิตร เข้าทางจมูกข้างละ 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 ของการทดลอง

เก็บตัวอย่างซีรัมสุกรวันที่ 5 10 และ 30 วันหลังจากการให้เชื้อ และนำมาเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดลองต่อไป

เชื้อไวรัสกลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อไวรัสลูกหลาน (Progeny viruses) ที่นำมาศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ได้มาจากการแยกเชื้อไวรัสพัวร์อาร์เอสจากซีรัมสุกรที่ได้จากการทดลองในโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ตามที่ได้กล่าวข้างต้น

นำไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบแต่ละชนิดมาเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 ที่เตรียมไว้ 2 วัน หรือมีปริมาณเซลล์สมบูรณ์เต็มพื้นที่ หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM แล้วจึงนำไวรัสแล้วบ่มที่ 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ที่มี 2% FCS บ่มเป็นเวลา 2 วัน และนำไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบ passage แรกเท่านั้นมาใช้ในการฉีดเชื้อพิษทัບ

การแยกเชื้อไวรัสพัวร์อาร์เอส

นำซีรัมจากสุกร 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 - 6 ตัวอย่าง โดยกลุ่มการทดลอง ประกอบด้วย กลุ่มไวรัสพัวร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU) กลุ่มไวรัสพัวร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) และกลุ่มติดเชื้อไวรัสพัวร์อาร์เอสร่วมสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ (MIX) ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ มาเพาะแยกเชื้อไวรัสพัวร์อาร์เอสโดยวิธี Virus isolation โดยนำซีรัมปริมาณ 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยสารเลี้ยงเซลล์ MEM ในอัตราส่วน 1:2 ในหลอดแก้ว เขย่าให้เข้ากัน และดูดสารละลายปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากหลอดแก้วที่ทำการเจือจางมาใส่ใน 1 หลุมของ microculture 96-well plate ที่ได้เลี้ยงเซลล์ MARC-145 เตรียมไว้ก่อนหน้านี้นี้เป็นเวลา 2 วันหรือจนกระทั่งมีปริมาณเซลล์สมบูรณ์เต็มพื้นที่ ทำซ้ำแบบเดิมอีก 1 เพลท และทำการบ่ม microculture 96-well plate ทั้ง 2 เพลทไว้ ที่อุณหภูมิ 37° ซ. ใน CO₂ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายทั้งหมดออก เพื่อใส่ MEM 2% FBS จำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปแทน และทำการบ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน นำเพลท 1 เพลทมาทำการตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยฟอร์มาลีนและย้อมเซลล์ด้วยวิธี direct fluorescent assay (FA) โดยใช้ monoclonal antibody SDOW17 (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Eileen Thacker, USDA, USA) ตามวิธีของ Nilubol et al., 2004 (Nilubol et al., 2004) และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน หลุมที่ให้แสงฟลูออเรสเซนแสดงว่าตัวอย่างซีรัมนั้นมีไวรัสอยู่ นำตัวอย่างซีรัมที่อยู่อีกเพลทมาเพิ่มปริมาณไวรัสเก็บไว้และนำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาสกัด RNA

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 บางส่วน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยการนำตัวอย่างเชื้อไวรัส มาทำการสกัด RNA ของเชื้อไวรัส ที่ได้จากขั้นตอนการแยกเชื้อ โดยใช้ชุดสกัด RNA (Nucleospin RNA virus, Macherey-Nagel, Germany) ตามวิธีที่บรรยายในคู่มือที่ให้มาในชุดสกัด และเก็บรักษา RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำ RNA ที่สกัดได้มาตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ต่อไปตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ โดยขั้นตอนแรกเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้สารดังต่อไปนี้

- 10xRT buffer (500 mM Tris-HCl, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM DTT) จำนวน 2 ไมโครลิตร
- M-MuLV reverse transcriptase (200 unit/ไมโครลิตร) จำนวน 0.025 ไมโครลิตร
- RNase inhibitor (40 unit/ไมโครลิตร) จำนวน 0.25 ไมโครลิตร
- Random primer (17.92 uM) จำนวน 2 ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร
- Total viral RNA ที่สกัดได้จำนวน 10 ไมโครลิตร

นำสารทั้งหมดรวม 20 ไมโครลิตรใส่เครื่อง PCR ตั้งโปรแกรม 42 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อครบเวลาได้ cDNA แล้วเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อต่อไป

นำ cDNA ของตัวอย่างมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสโดยตรวจหาชิ้นส่วนพันธุกรรมส่วน Nsp-2 โดยนำ cDNA มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยเตรียม master mix (Promega, USA) ดังนี้

- Master mix จำนวน 12.5 ไมโครลิตร
- RNase free water จำนวน 9.5 ไมโครลิตร
- สำหรับ Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) ใช้ forward primer AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร reverse primer GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 pmol/ul)
- สำหรับ Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) forward primer GCA CCA GTT CCT GCA CCG C จำนวน 0.5 ไมโครลิตร reverse primer AGG GAG CTG CTT GAT GAC ACA G จำนวน 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 pmol/ul)

นำสารทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR และตั้งโปรแกรมดังนี้

- โปรแกรมสำหรับ Primers ของ ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) ใช้ Initial denature 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 54 องศาเซลเซียส 50 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวม 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ
- โปรแกรมสำหรับ Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ใช้ Initial denature 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาทีรวม 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ไปทำการ ligate เข้าพลาสมิดโดยใช้ชุด pGEM-Teasy (promega, USA) ทำการ transform พลาสมิด เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยใช้ heat shock ตามชุดทดสอบเลี้ยงแบคทีเรียที่ transform แล้วใน Difco™LB agar (Becton Dickinson, USA) ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16-20 ชั่วโมงจะได้โคโลนีสีฟ้าและสีขาว ทำการเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 3 – 5 โคโลนี (3 – 5 โคลน) และตั้งชื่อโคลน แล้วทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™LB Broth ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมงและนำแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Germany) แล้วทำการส่ง sequence (Pacific Science, ประเทศไทย) เพื่อหาลำดับเบส

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ทั้งหมด

นำ cDNA จากสุกร 1 ตัวจากแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มการทดลองประกอบด้วย กลุ่มไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU) กลุ่มไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) และกลุ่มติดเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสร่วมสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ (MIX) ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสโดยตรวจหาชิ้นส่วนพันธุกรรมส่วน Nsp-2 ทั้งหมด โดยนำ cDNA มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ตามที่ได้อ้างไว้ก่อนหน้านี้ (Fang et al., 2004; Yoshii et al., 2008)

- สำหรับ Primers ของ Fang et al., 2004 ใช้ forward primer AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร reverse primer GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 pmol/ul) และมีโปรแกรมดังนี้ Initial denature 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 54 องศา

เซลเซียส 50 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวม 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

- สำหรับ Primers ของ Yoshii et al., 2008 ใช้ forward primer GCA CCA GTT CCT GCA CCG C จำนวน 0.5 ไมโครลิตร reverse primer AGG GAG CTG CTT GAT GAC ACA G จำนวน 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 pmol/ul) และมีโปรแกรมดังนี้ Initial denature 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาทีรวม 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

หลังจากนั้น นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ไปทำการ ligate เข้าพลาสมิด โดยใช้ชุด pGEM-Teasy (promega, USA) ทำการ transform พลาสมิด เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยใช้ heat shock ตามชุดทดสอบเลี้ยงแบคทีเรียที่ transform แล้วใน Difco™LB agar (Becton Dickinson, USA) ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16-20 ชั่วโมงจะได้โคโลนีสีฟ้าและสีขาว ทำการเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 2 – 3 โคโลนี (2 – 3 โคลน) และตั้งชื่อโคลน แล้วทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™LB Broth ที่เติมยา ampicillin ไป 100 mg/ ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมงและนำแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Germany) แล้วทำการส่ง sequence (Pacific Science, ประเทศไทย) เพื่อหาลำดับเบส

การวิเคราะห์และประเมินผล

นำข้อมูลของสายพันธุ์กรมมาจัดเรียงโดยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1997) วิเคราะห์ nucleotide และ amino acid similarities ด้วยโปรแกรม Bioedit และทำการวิเคราะห์สายพันธุ์กรรมของเชื้อในกลุ่มประชากรเดียวกันทั้งช่วงเวลาเดียวกันและต่างช่วงเวลากัน โดยใช้ phylogenetic relationships ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap test คำนวณจาก 1000 replicates ซึ่งแสดงอยู่ที่แต่ละกิ่ง คำนวณ Evolutionary distances ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้วิธี Kimura 2-parameter การจัดการ gap ใช้วิธี Pairwise deletion option และตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม SimPlot

บทที่ 4

ผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัย

การตรวจสอบ Primers ที่ใช้กับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

ได้ทดสอบความสามารถของ Primers 2 คู่ ในการตรวจสอบยีน Nsp-2 บางส่วน โดย Primers 2 คู่นี้ ประกอบด้วย Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) และ Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ได้เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ เมื่อนำ Primers มาตรวจสอบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ต้นแบบต่างๆ ประกอบด้วย สายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 สายพันธุ์ยุโรป Lylestad virus สายพันธุ์จีนทั้งที่ก่อโรครุนแรง และดั้งเดิม ที่แยกได้ในประเทศไทย และไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่ได้จากการทดลองจำนวน 20 ไอโซเลต (กลุ่มติดเชื้อเดียวสายพันธุ์อเมริกาเหนือ หรือสายพันธุ์ยุโรป กลุ่มละ 10 ไอโซเลต)

ผลการตรวจสอบพบว่า Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) เริ่มจับที่ตำแหน่ง 131-722 bp โดยสาย Forward จับที่ตำแหน่งเบส 131 – 150 และสาย Reverse จับที่ตำแหน่งเบส 701 – 722 (F = 131 – 150, R = 701 – 722 bp) และ Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) คู่นี้ให้ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ที่ 666 เบส (ภาพที่ 2) เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่เป็นทั้งไวรัสต้นแบบ (VR-2332) และไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) จากการทดลอง พบว่า Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) สามารถตรวจสอบ Nsp-2 ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่นำมาตรวจสอบได้ทั้งหมด แต่เมื่อนำ Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) มาทดสอบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปและไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) สายพันธุ์ยุโรปที่ได้จากการทดลอง พบว่าให้ผลการตรวจได้ไม่ทั้งหมด และผลการตรวจมีความไม่จำเพาะสูง กล่าวคือ เมื่อตรวจเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ Primers คู่นี้ พบว่าให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำนวน 7 ตัวอย่างจากตัวอย่าง 10 ตัวอย่างที่นำมาตรวจ และ เมื่อนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 7 ตัวอย่างนี้ ไปโคลนลงเวกเตอร์และถอดรหัสพันธุกรรม เมื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้ไปตรวจสอบ โดยการ blast ลำดับเบสผ่าน pubmed พบว่า รหัสพันธุกรรมของตัวอย่างคล้ายกับเชื้อไวรัส PRRSV accession number EU360128 และ PRRSV accession number EU EU360129 (ORF1=191-7636 bp, NSP1-NSP8) ซึ่งเป็นไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยสรุปคือ Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) คู่นี้ ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปได้ และเมื่อนำ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) คู่นี้ไปตรวจสอบการจับกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป Lylestad virus ด้วยโปรแกรม AnnHyb พบว่าไม่สามารถจับได้

เมื่อนำ Primers ชุดนี้มาตรวจสอบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์จีนที่แยกได้ในประเทศไทย ทั้งไอโซเลตดั้งเดิมและไอโซเลตที่มีความรุนแรง (highly pathogenic PRRSV หรือ HP-PRRSV) ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 ตัว พบว่า Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) ชุดนี้สามารถตรวจสอบเชื่อดังกล่าวได้และให้ผลครอบคลุมส่วนกรดอะมิโนที่ขาดหายไป (deletion) (ภาพที่ 3)

ในขณะที่ Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) เริ่มจับที่ตำแหน่ง 362-684 bp โดยสาย Forward จับที่ตำแหน่งเบส 362 – 380 และสาย Reverse จับที่ตำแหน่งเบส 663 – 684 (F = 362 – 380, R = 663 – 684 bp) และ Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ชุดนี้ให้ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ที่เล็กกว่าขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) จาก Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) มาก โดย Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ชุดนี้ให้ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ที่มีขนาด 280 เบส และเมื่อนำ Primers ชุดนี้มาตรวจสอบกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์จีนที่แยกได้ในประเทศไทย ทั้งไอโซเลตดั้งเดิมและไอโซเลตที่มีความรุนแรง (highly pathogenic PRRSV หรือ HP-PRRSV) ที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 30 ตัว พบว่า Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ให้ผลที่ไม่ครอบคลุมส่วน deletion นอกจากนั้นพบว่า Primers ของ H. Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์กรรมส่วน Nsp-2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปได้ ทางผู้วิจัยจึงเลือก Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) เพียงคู่เดียวเพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยในส่วนถัดมา

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 บางส่วน ในสุกรทดลอง

นำซีรัมจากสุกร 3 กลุ่มการทดลอง ประกอบด้วย กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU) และ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ กลุ่มละ 5 ตัวอย่างและจากช่วงเวลาละ 5 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสรวมทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาเหนือ (MIX) กลุ่มละ 6 ตัวอย่างและจากช่วงเวลาละ 6 ตัวอย่าง มาเพาะเชื้อไวรัส สกัดแยกอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อตรวจหาชิ้นส่วนพันธุกรรมส่วน Nsp-2 บางส่วน โดยใช้ primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) หลังจากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) โคลนเข้าพลาสมิดและส่งถอดรหัสพันธุกรรม

จากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่ามีสุกรจำนวน 3 และ 2 ตัวจากกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) ตามลำดับ ที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทั้ง 3 ช่วงเวลา คือวันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ (ตารางที่ 1) ส่วนสุกรที่เหลือ 2 และ 3 ตัวจากกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรป (EU) และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) ตามลำดับ พบว่าให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ช่วงเวลาเดียวกันเท่านั้นคือ คือวันที่ 5 หลังการให้เชื้อ จึงไม่ได้นำตัวอย่างมาถอดรหัสพันธุกรรม และส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสรวมทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกา

เหนือ (MIX) พบว่าสุกร 3 ตัว ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทั้ง 3 ช่วงเวลาคือ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ ส่วนสุกรอีก 3 ตัวที่เหลือ ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แค่ 2 ช่วงเวลาคือ ทั้งวันที่ 5 และ 30 หลังการให้เชื้อ ผู้วิจัยจึงนำข้อมูลส่วนนี้มาเพิ่มเติมในการวิเคราะห์

เมื่อทำการโคลนเข้าพลาสมิดและส่งถอดรหัสพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกไวรัสลูกหลานได้ 162 ไอโซเลตจากกลุ่มการทดลองทั้งหมด 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) แบ่งออกเป็นเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อสายพันธุ์ยุโรป (EU) จำนวน 27 ไอโซเลต แบ่งออกเป็นวันละ 9 ไอโซเลต ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการติดเชื้อตามลำดับ และสามารถแยกไวรัสได้จำนวน 30 ไอโซเลตจากกลุ่มติดเชื้อสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) โดยแบ่งเป็น 8 12 และ 10 ไอโซเลตจาก วันที่ 5 10 และ 30 หลังการติดเชื้อตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อร่วมสองสายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป (MIX) พบว่าสามารถแยกไวรัสได้จำนวน 105 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็น 28 44 และ 33 ไอโซเลตจาก วันที่ 5 10 และ 30 หลังการติดเชื้อตามลำดับ ไวรัสทั้งหมดที่แยกได้พบว่าเป็นไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ หรือสายพันธุ์ยุโรป ไม่สามารถแยกไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่มีส่วนประกอบของทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป (recombination) ได้

เมื่อนำเชื้อไวรัสลูกหลานมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบ ที่ใช้ในการป้องกันคือต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 และต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป Lylestad Virus พบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสร่วม 2 สายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป ให้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับ ต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 นอกจากนั้นยังแบ่งเชื้อไวรัสลูกหลานออกเป็น 2 กลุ่มหรือคลัสเตอร์อย่างชัดเจน เมื่อนำสายพันธุ์รวมตัวแทนจำนวน 2 สายจากแต่ละกลุ่มๆละ 1 สายที่ได้ไปตรวจสอบ โดยการ blast ลำดับเบสผ่าน pubmed พบว่า รหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากคลัสเตอร์ที่ 1 พบว่าคล้ายกับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอส ไอโซเลต VR-2332 accession number AF160664 และไอโซเลต PRRSV RespPRRS MLV accession number AF066183 ส่วนตัวอย่างจากคลัสเตอร์ที่ 2 พบว่าคล้ายกับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอส ไอโซเลต NVSL 97-7895 accession number AY545985 ไอโซเลต NVSL 97-7895 IS1-4-2 accession number AF325691 และ ไอโซเลต Ingelvac PRRS Vet vaccine accession number AF303357

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อนำสายรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลานที่ได้จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปไปตรวจสอบโดยการ blast ลำดับเบสผ่าน pubmed พบว่า รหัสพันธุกรรมของตัวอย่างคล้ายกับเชื้อไวรัส PRRSV accession number EU360128 และ PRRSV accession number EU360129 (ORF1 = 191 – 7636 bp, NSP1-NSP8) ซึ่งเป็นไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ สรุปคือ Primers ของ J. Wu et al., 2008 คู่นี้ ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปได้

แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน Nsp-2 บางส่วน

เนื่องจากการถอดรหัสพันธุกรรมไม่สามารถ ใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ยุโรปได้อย่างถูกต้อง จึงนำผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน Nsp-2 บางส่วน ของไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ รวมทั้งหมดจำนวน 110 สาย โดยที่ยังไม่ได้คัดสายพันธุ์หรือตัวอย่างที่เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ออก มาจัดแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 5 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap test จำนวนจาก 1000 replicates ซึ่งแสดงอยู่ที่แต่ละกิ่ง พบว่าสามารถแบ่งไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ออกเป็น 2 คลัสเตอร์ (cluster) (ภาพที่ 4) ประกอบด้วย คลัสเตอร์ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เชื้อไวรัสลูกหลานในคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นกลุ่มไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสพ็อร์อาร์เอสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 ที่ใช้ในการให้เชื้อสุกรสูง และคลัสเตอร์ที่สองเป็นกลุ่มไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (VR2332) ต่ำกว่าคลัสเตอร์ที่ 1

เชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่อยู่ในคลัสเตอร์ 1 พบว่าเป็นเชื้อที่ตรวจได้จากสุกรในกลุ่มการทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (VR2332) เพียงอย่างเดียว ส่วนเชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่แยกได้จากกลุ่มที่ติดเชื้อพร้อมทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าอยู่ทั้งในคลัสเตอร์ 1 และ 2

เชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ทั้งหมดมาจัดแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ตามวันหลังการติดเชื้อพบว่า เชื้อไวรัสลูกหลานในกลุ่มที่มีการติดเชื้อสายพันธุ์อเมริกาเหนืออย่างเดียวเป็นเชื้อที่อยู่ในคลัสเตอร์ 1 ทุกช่วงเวลาหลังการให้เชื้อ ส่วน เชื้อไวรัสลูกหลานในกลุ่มที่มีการติดเชื้อพร้อมสองสายพันธุ์ พบว่าแยกเชื้อได้ทั้ง 2 คลัสเตอร์ในวันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อ

การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนของ Nsp-2 บางส่วน

เมื่อพบว่า Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) ไม่สามารถใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ยุโรปได้อย่างถูกต้อง จึงนำสายพันธุ์ของยีน Nsp-2 บางส่วนของไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) สายพันธุ์อเมริกาเหนือเท่านั้นมาจัดเรียงและเปลี่ยนเป็นสายกรดอะมิโนเพื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง พบว่า สามารถเริ่มต้นการวิเคราะห์เชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ตั้งแต่กรดอะมิโนลำดับที่ 389 ถึง 641 และสอดคล้องกับลำดับเบสที่ 1167 ถึง 1923 (ภาคผนวก) โดยมีกรดอะมิโน 3 ตัวแรก เริ่มต้นด้วย KDO จากผลการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับผลของการจัดแผนภูมิต้นไม้ กล่าวคือสามารถแบ่งเชื้อไวรัสลูกหลานออกเป็น 2 คลัสเตอร์ได้อย่างชัดเจน

เมื่อนำเชื้อไวรัสลูกหลานของคลัสเตอร์ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ สายพันธุ์ต้นแบบ VR-2332 พบว่าไวรัสลูกหลานของคลัสเตอร์ 1 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ที่ 98.9 – 100.0% และ 97.6 – 100.0% ตามลำดับ (ไม่ได้

แสดงในตาราง) และเมื่อเปรียบเทียบกับคลัสเตอร์ 2 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ 83.3 – 84.5% และ 75.4 – 76.6% ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อไวรัสลูกหลานทั้งหมด ไม่รวมเชื้อไอโซเลตที่มีความเหมือนกัน 100 % (Identical sequence) มาวิเคราะห์หาความเหมือน (% homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในคลัสเตอร์ พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างคลัสเตอร์ 1 และ 2 ที่ 83.6 – 85.1% และของกรดอะมิโนที่ 75.4 – 77.8% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และของกรดอะมิโนสำหรับเชื้อไวรัสลูกหลานคลัสเตอร์ 1 เท่ากับ 98.4 – 99.6% ตามลำดับ และ 98 – 99.6% ตามลำดับ ส่วนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และของกรดอะมิโนสำหรับเชื้อไวรัสลูกหลานคลัสเตอร์ 2 เท่ากับ 98.6 – 99.6% ตามลำดับ และ 98 – 99.6% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ทั้ง 2 คลัสเตอร์มีตำแหน่งกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ต่างไปจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบ คือตำแหน่งที่ 476 ที่เปลี่ยนจาก S เป็น P ตำแหน่งที่ 582 ที่เปลี่ยนจาก H เป็น Y ตำแหน่งที่ 596 ที่เปลี่ยนจาก P เป็น L

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ทั้งหมด

เมื่อทราบผลการเปลี่ยนแปลงของยีน Nsp-2 บางส่วน (ครอบคลุมตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 389 ถึง 641) ทางผู้วิจัยจึงได้ตรวจสอบเพิ่มเติม โดยทำการศึกษายีนส่วน Nsp-2 ทั้งหมดโดยใช้ชุด Primers ตามที่ได้อ้างอิงก่อนหน้า (Fang et al., 2004; Yoshii et al., 2008)

ได้สายพันธุ์กรรมกลับมาทั้งหมด 18 สาย แต่พบว่าสามารถถอดรหัสที่ถูกต้องได้เพียง 4 สาย ประกอบด้วยสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปอย่างละ 2 สาย และเมื่อนำไป blast ลำดับเบสผ่าน pubmed พบว่า รหัสพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอส ไอโซเลต VR-2332 accession number AF160664 และไอโซเลต PRRSV RespPRRS MLV accession number AF066183 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสสายพันธุ์ยุโรปเหนือ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอส ไอโซเลต Lylestad virus accession number M96262

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสุกรและจำนวนโคลนที่ได้ในแต่ละช่วงเวลาหลังการติดเชื้อ

กลุ่มการทดลอง	5 วันหลังการติดเชื้อ		10 วันหลังการติดเชื้อ		30 วันหลังการติดเชื้อ		รวมจำนวนโคลนในแต่ละกลุ่ม ^ก
	จำนวนตัวอย่างสุกร	จำนวนโคลน	จำนวนตัวอย่างสุกร	จำนวนโคลน	จำนวนตัวอย่างสุกร	จำนวนโคลน	
-สายพันธุ์ยุโรป	3	9	3	9	3	9	27
-สายพันธุ์อเมริกาเหนือ	2	8	2	12	2	10	30
-ติดเชื้อร่วมทั้งสองสายพันธุ์	6	28	3	44	6	33	105
รวมจำนวนโคลนแต่ละช่วงเวลา ^ข	45		65		52		162 ^ค

^ก แสดงจำนวนโคลนทั้งในแต่ละกลุ่มทั้ง 3 ช่วงเวลา

^ข แสดงจำนวนโคลนของทั้ง 3 กลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลาหลังการติดเชื้อ

^ค แสดงจำนวนโคลนทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของไวรัสลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

	คลัสเตอร์ 1 (Cluster I)	คลัสเตอร์ 2 (Cluster II)
คลัสเตอร์ 1 (Cluster I)	98.4 – 99.6 ^ก	83.6 – 85.1
	98.0 – 99.6 ^ข	98.6 – 100
คลัสเตอร์ 2 (Cluster II)	75.4 – 77.8	98.0 – 99.6

^ก ตัวเลขหนาในตารางพื้นสีเทาแสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์

^ข ตัวเลขปกติในตารางสีพื้นแสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) ของลำดับลำดับกรดอะมิโน

สรุปผล อภิปรายและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากยีน Nsp-2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ มีความยาว 2937 เบส และประกอบด้วยกรดอะมิโน 979 ตัว สำหรับเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนสายพันธุ์ยุโรป มีความยาว 2580 เบส และประกอบด้วยกรดอะมิโน 860 ตัว นอกจากนั้นแล้วยีน Nsp-2 มีความเหมือนที่ประมาณ 60 – 63 เปอร์เซ็นต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้น (Fang et al., 2004; Han et al., 2006)

การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนที่มีขนาดใหญ่ที่มีความสลับซับซ้อนเนื่องจากต้องใช้ชุด Primers จำนวนหลายคู่เพื่อตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนแต่ละท่อน ดังนั้นในช่วงแรกทางผู้วิจัยจึงเลือกเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน Nsp-2 เท่านั้น โดยเลือกส่วนที่มีความสำคัญ เช่นส่วนที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตามที่ได้มีการอ้างถึงว่ามีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการโรค (Feng et al., 2008)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน Nsp-2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส ในสุกรที่มีการติดเชื้อร่วมของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป และได้ดำเนินงานวิจัยโดย นำไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่แยกได้จากสุกร 3 กลุ่มการทดลอง แบ่งออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) หรือสายพันธุ์ยุโรป (EU) และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมทั้งสองสายพันธุ์คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป (MIX) ที่ช่วงเวลา 5 10 และ 30 วันหลังการให้เชื้อ มาทำการถอดรหัสทางพันธุกรรมส่วนยีน Nsp-2 ทั้งบางส่วน (partial) และทั้งหมด (complete)

ผลการทดลองตรวจรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) พบว่า สามารถแยกเชื้อไวรัสได้หลายไอโซเลตจากช่วงเวลาต่างๆ โดยเฉพาะช่วงแรกของการติดเชื้อ (5 และ 10 วันหลังติดเชื้อ) ที่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จำนวนหลายไอโซเลตและมากกว่าจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ที่ 30 วันหลังติดเชื้อ เหตุผลน่าจะมาจากการแยกเชื้อไวรัสจากซีรัม ที่โดยปกติแล้วสุกรจะอยู่ในสภาวะ viremia หรือช่วงเวลาติดเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือดได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากการติดเชื้อ หลังจากนั้นเชื้อไวรัสจะกระจายอยู่ตามเซลล์หรืออวัยวะต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นการติดเชื้อแบบถาวร (persistent infection) สาเหตุที่งานวิจัยครั้งนี้เลือกที่จะแยกเชื้อไวรัสจากทางกระแสเลือดอย่างเดียวเนื่องจาก ต้องการศึกษาวិวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อในสุกรตัวเดียว การแยกเชื้อจากอวัยวะอาจไม่สามารถศึกษาวิวัฒนาการได้

เมื่อนำเชื้อไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) แต่ละไอโซเลตของมาโคลนและถอดรหัสทางพันธุกรรมส่วนยีน Nsp-2 พบว่าไวรัสลูกหลาน (progeny viruses) ที่ตรวจพบมีทั้งสายพันธุ์ยุโรป และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ตามกลุ่มที่ได้รับเชื้อ และไม่พบไอโซเลตที่มีลักษณะคล้ายการผสมข้ามสายพันธุ์ของทั้งสองสายพันธุ์ (recombinant viruses) ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของลำดับเบสของยีน Nsp-2 บางส่วน พบว่าเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อร่วมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อของสายพันธุ์อเมริกาเหนือเพียงอย่างเดียว และเมื่อ

เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสลูกหลานของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ที่แยกได้จากกลุ่มติดเชื้อร่วมของ 2 สายพันธุ์ ออกได้เป็น 2 กลุ่ม (cluster) โดยกลุ่ม (cluster) ที่ 1 มีลักษณะพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ที่ 98.9 – 100.0% และ 97.6 – 100.0% ตามลำดับ และกลุ่ม (cluster) ที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 น้อยกว่ากลุ่ม (cluster) ที่ 1 โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ 83.3 – 84.5% และ 75.4 – 76.6% ตามลำดับเท่านั้น

เมื่อนำรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมและติดเชื้อเดี่ยวมาจัดเรียงและแสดงด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสลูกหลานออกเป็น 2 คลัสเตอร์ใหญ่ โดยเชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อเดี่ยวอยู่ในคลัสเตอร์ 1 แต่เชื้อไวรัสลูกหลานที่แยกได้จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมอยู่ทั้งในคลัสเตอร์ 1 และ 2

จากผลการทดลองในเบื้องต้นจากการวิเคราะห์ด้วยยีน Nsp-2 พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีนส่วนนี้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในกลุ่มที่มีการติดเชื้อเดี่ยว ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือหรือยุโรป แต่ในกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมของทั้งสองสายพันธุ์พบว่า สามารถแยกไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ และพบการเปลี่ยนแปลงที่สูงกว่าในไวรัสลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ในส่วนของไวรัสลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือนี้พบที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 คลัสเตอร์ คลัสเตอร์ 1 เป็นไวรัสลูกหลานที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ และคลัสเตอร์ 2 เป็นไวรัสลูกหลานที่มีลักษณะไม่ใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ ไวรัสลูกหลานของทั้งสองสายพันธุ์แยกกันวิวัฒนาการและไม่เกี่ยวข้องกัน ดังสังเกตจากการที่ไม่มีการปรากฏตัวของเชื้อไวรัสที่มีการผสมข้ามสายพันธุ์

ข้อสรุป

โดยสรุปภายหลังการให้เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส สุกรหนึ่งตัวสามารถตรวจพบไวรัสพาร์อาร์เอสได้หลายไอโซเลตที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมต่างกันออกไป และในกรณีที่สุกรติดเชื้อร่วมของไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ สามารถพบเชื้อไวรัสได้ทั้งสองสายพันธุ์ในช่วงเวลาเดียวกัน โดยไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์แยกกันเกิดการวิวัฒนาการ ไม่พบการผสมข้ามสายพันธุ์ของยีนส่วน Nsp-2 นี้และเฉพาะเชื้อไวรัสลูกหลานสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่ในกลุ่มที่ติดเชื้อร่วมที่มีการกลายพันธุ์มากกว่า ทำให้พบความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มที่ติดเชื้อเดี่ยว ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไม่ขึ้นอยู่กับเวลาในช่วงการทดลองนี้ การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในระดับสารพันธุกรรม (nucleic acid) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากการกลายพันธุ์ของไวรัสพาร์อาร์เอสเองซึ่งมีลักษณะเป็น Quasi-species ในสุกรตัวหนึ่ง และการที่ clone sequence จาก 1 ตัวอย่าง ได้ลำดับเบสมากกว่า 3 แบบ เป็นการยืนยันการมีอยู่ของไวรัสหลายสายพันธุ์ในสุกรหนึ่งตัว และไวรัสจากช่วงเวลาเดียวกันไม่ได้อยู่ในก้านเดียวกันทั้งหมดของแผนภูมิต้นไม้บ่งบอกการเปลี่ยนแปลงตัวเองของไวรัสซึ่งการศึกษาถึงสาเหตุสำคัญที่ซ่อนอยู่ของการที่ไวรัสเปลี่ยนแปลงตัวนั้นยังไม่ชัดเจน หรือจากการได้รับไวรัสสายพันธุ์อื่นจากภายนอก

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่พบว่า Primers ของ J. Wu และคณะ (Wu et al., 2009) ไม่สามารถใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุยุโรปได้อย่างถูกต้อง ทำให้อาจมีข้อมูลบางอย่างที่ไม่ครบถ้วน จึงมีความจำเป็นต้องใช้หรือออกแบบ Primers คู่ใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวนผลผลิตและวิเคราะห์ศึกษาชิ้นส่วน Nsp-2 ทั้งหมดของเชื้อสายพันธุยุโรปได้อย่างถูกต้อง แม้ว่าทางผู้วิจัยได้ลองใช้ Primers คู่อื่นเช่น Primers ใช้ชุด Primers ตามที่ได้อ้างอิงไว้ก่อนหน้านี้ (Fang et al., 2004; Yoshii et al., 2008) แต่ก็ประสบปัญหาเรื่องขนาดของผลผลิต (PCR product) ที่มีขนาดใหญ่ ตลอดจนความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของ Primers คู่นี้ที่ยังไม่น่าพอใจ

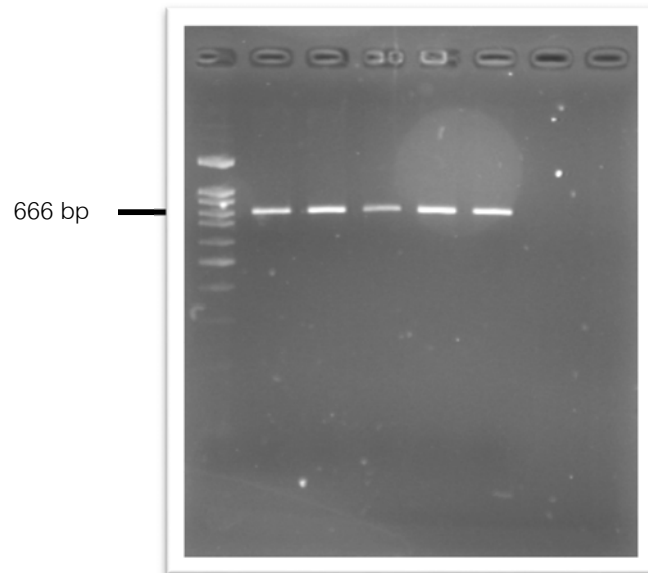
เอกสารอ้างอิง

- Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1999, North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 307-315.
- Botner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 1994, Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 40, 351-360.
- Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997, Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 141, 497-499.
- Cavanagh, D., 1997, Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142, 629-633.
- Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002, Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* 76, 4750-4763.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126.
- Domingo, E., 1992, Genetic variation and quasi-species. *Curr Opin Genet Dev* 2, 61-63.
- Fang, Y., Kim, D.Y., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R., 2004, Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res* 100, 229-235.
- Feng, Y., Zhao, T., Nguyen, T., Inui, K., Ma, Y., Nguyen, T.H., Nguyen, V.C., Liu, D., Bui, Q.A., To, L.T., Wang, C., Tian, K., Gao, G.F., 2008, Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis* 14, 1774-1776.

- Gao, Z.Q., Guo, X., Yang, H.C., 2004, Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of virology* 149, 1341-1351.
- Han, J., Liu, G., Wang, Y., Faaberg, K.S., 2007, Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture. *J Virol* 81, 9878-9890.
- Han, J., Wang, Y., Faaberg, K.S., 2006, Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 122, 175-182.
- Hill, H.T., 1990, Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/ respiratory syndrome). *Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting*, 29-31.
- Hu, H., Li, X., Zhang, Z., Shuai, J., Chen, N., Liu, G., Fang, W., 2009, Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses predominant in southeastern China from 2004 to 2007 were from a common source and underwent further divergence. *Arch Virol* 154, 391-398.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W., Jiang, P., 2007, Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J* 174, 577-584.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1995a, Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol* 140, 745-755.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Morozov, I., 1995b, Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 12), 3181-3188.
- Mengeling, W.L., Clouser, D.F., Vorwald, A.C., Lager, K.M., 2000, Genetic recombination among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proc Conf Research Workers Animal Disease*, pp. 134.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F., 2003a, Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol* 93, 25-38.

- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Koehler, K.J., 2003b, Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 93, 13-24.
- Meulenbergh, J.J., 2000, PRRSV, the virus. *Vet Res* 31, 11-21.
- Meulenbergh, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997, Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55, 197-202.
- Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., 1995, Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* 140, 1451-1460.
- Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., Laber, J., Elam, M., Kapur, V., 1998, Genetic variation in the PRRS virus. *Adv Exp Med Biol* 440, 787-794.
- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 1999, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73, 270-280.
- Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M., Harris, D.L., 2004, The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol* 102, 11-18.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002, Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76, 4241-4250.
- Plagemann, P.G., 2004, GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res* 102, 225-230.
- Plagemann, P.G., Rowland, R.R., Faaberg, K.S., 2002, The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol* 147, 2327-2347.
- Shen, S., Kwang, J., Liu, W., Liu, D.X., 2000, Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

- and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Archives of virology* 145, 871-883.
- Snijder, E.J., Wassenaar, A.L., Spaan, W.J., Gorbalenya, A.E., 1995, The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. *The Journal of biological chemistry* 270, 16671-16676.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004, Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 101, 9-21.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T., Terpstra, C., 1992, Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol* 33, 185-193.
- Wu, J., Li, J., Tian, F., Ren, S., Yu, M., Chen, J., Lan, Z., Zhang, X., Yoo, D., Wang, J., 2009, Genetic variation and pathogenicity of highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China. *Arch Virol* 154, 1589-1597.
- Yoshii, M., Okinaga, T., Miyazaki, A., Kato, K., Ikeda, H., Tsunemitsu, H., 2008, Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type--porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 153, 1323-1334.



ภาพที่ 2 แสดงภาพเจลของผลผลิต PCR จาก Primers ของ J. Wu et al., 2008 โดยเลนที่ 1 เป็น Marker เลนที่ 2-5 เป็นตัวอย่าง และเลนที่ 6 เป็นตัวอย่างควบคุมบวก (PRRSV VR-2332)

```

      410      420      430      440      450      460      470      480
VR2332  TTSDMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTPPPPPPKVQPRKTKPKVKSLEPKKVPAPARRKVRSDCGSPVSLGGDVSNSWEDLA
CH-1R   ATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWTPPPPPPRVQPRRTKPKVKSLEPKKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGWEDLT
WUH1    ATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWTPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
HEB1    ATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLLEDKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
07QN    ATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWTPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEGKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
07NM    ATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWTPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
UDT0810_E02 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKGYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKVPAPARRKVRSDCGSPVLTGDNVNPNGSEE-T
UDT0810_C02 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKGYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKVPAPARRKVRSDCGSPVLTGDNVNPNGSEE-T
UD1210_(31)14-1 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
UD1210_(31)14-2 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
1-13(30)UD-1 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
UD1210_(30)13-2 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
FDT10_3/2 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
FST03I1_54-4.1 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
FST0611_G03 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
FST0611_F03 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
FST0611_E03 ATSEMMARAAEQVDLKAWVKSYPRWAPPPPPPRVQPRRTKSVKSLPEDKPIAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNGSEE-T
US65DPI-2 GTSEMMAWAAEQVDLKAWVKNYPRWTPPPPPPRVQPRKTKPKVKSLEPKKVPAPARRKVRSDCGSPVILMGDNVNPNSWEDLT

      490      500      510      520      530      540      550      560
VR2332  VSSPFDLPTPPEPATPSSSELVIVSSQCFIRPATPLSEPAPIAPAPRGTVSREVTPLSEPIPVPAARRKQVQKRLSSAAA
CH-1R   VGGPLDFPTPSEPMTPLEPVLMPASQHIIPRVTPLSGAPVAPARRTVSREMTPLSEPIFVSAARRKQVQVEANPAAT
WUH1    VGGPLNFPTPSEPMTPMSPEVLVPAARRVVKLITPLSGAPVAPARRTVT-----T
HEB1    VGGPLNFPTPSEPMTPMSPEVLVPAARRVVKLMTPLSGSAPVAPARRTVT-----T
07QN    VGGPLNFPTPSEPMTPMSPEVLMPASRRVVKLMTPLSGSAPVAPARRTVT-----T
07NM    VGGPLNFPTPSEPMTPMSPEVLVPAARRVVKLMTPLSGSAPVAPARRTVT-----T
UDT0810_E02 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
UDT0810_C02 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
UD1210_(31)14-1 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
UD1210_(31)14-2 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
1-13(30)UD-1 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
UD1210_(30)13-2 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
FDT10_3/2 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
FST03I1_54-4.1 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
FST0611_G03 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
FST0611_F03 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
FST0611_E03 VGGPLNFPTPSEIMTPMSPEVLVPAASQFVPELMTPLIGSAPVAPARRTVT-----T
US65DPI-2 VGGPLDLSTSPPEVTPLELVVSAQYTFRATPLGGAPVAPARGAVSREVTLLSEPIILVPAASQRKQVQVEKANLAAA

      570      580      590      600      610      620      630      640
VR2332  IPPYQNEPLDLSASSQTEHEASPPAPPQSGGVVGVGEGHEAETLSEISDMSGNIKASVSSSSSLSSVIRITRPKYS
CH-1R   TLTHQDEPLDLSASSQTEYEASPLAPLQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
WUH1    TLTHQDEPLDLSASSQTEYDAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDIPNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
HEB1    TLTHQDEPLDLSASSRTEYEAFFLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
07QN    TLTHQDEPLDLSASSQTEYEAFFLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
07NM    TLTHQDEPLDLSASSQTEYEAFFLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
UDT0810_E02 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
UDT0810_C02 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
UD1210_(31)14-1 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
UD1210_(31)14-2 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
1-13(30)UD-1 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
UD1210_(30)13-2 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
FDT10_3/2 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
FST03I1_54-4.1 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
FST0611_G03 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
FST0611_F03 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
FST0611_E03 TLTHQDEPLDLSASSQTEYKAFPLAPSQNGMILEAGGQEAEEVLSSEISDILNDTNPAPVSSSSSLSSVKITRPKYS
US65DPI-2 TLAYQDEPLDLSASSQTEYEASPLAPLQSTGILEVGGQEAEEVLSSEISDIPDDINPAPASSGSLSSIRITRPKYS

```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (Highly pathogenic PRRSV) ที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไอโซเลต VR-2332 CH-1R WUH1 HEB1 07QN และ 07NM

ภาพที่ 4 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน Nsp-2 บางส่วนของไวรัสพาร์อาร์เอสลูกหลาน (progeny PRRS viruses) สายพันธุ์อเมริกาเหนือที่แยกได้สุกร 2 กลุ่มคือ กลุ่มติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (US) และกลุ่มติดเชื้อร่วมของสองสายพันธุ์ (MIX) ณ วันที่ 5 10 และ 30 หลังการให้เชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส แสดงโดยวิธี Neighbor-Joining และมีค่า Bootstrap test คำนวณจาก 1000 replicates แสดงอยู่ที่แต่ละกิ่ง (จุดแดง แสดงไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR-2332 ไวรัสต้นแบบที่ใช้ในการฉีดเชื้อ US parent)

- ★ ชื่อไวรัสจะประกอบด้วย 4 กลุ่มคือ (กลุ่มทดลอง)(เบอร์สุกร) – (วันหลังการให้เชื้อ) – โคลน – ยีน โดย กลุ่มทดลองเป็น US หรือ MIX ตัวอย่างเช่น MIX5LT – 10DPI – 11 – NSP2 คือไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่แยกไวรัสได้จากกลุ่ม MIX เบอร์สุกร 5LT จากตัวอย่างของวันที่ 10 หลังการให้เชื้อพิษ

ภาคผนวก

VR2332/NSP2_par

US6-5DPI-32-NSP2

US6-5DPI-31-NSP2

US6-5DPI-22-NSP2

US6-5DPI-21-NSP2

US6-5DPI-12-NSP2

US6-10DPI-32-NSP2

US6-10DPI-11-NSP2

US6-10DPI-21-NSP2

US6-10DPI-12-NSP2

US6-10DPI-22-NSP2

US6-10DPI-31-NSP2

US6-30DPI-31-NSP2

US6-30DPI-32-NSP2

US6-30DPI-22-NSP2

US6-30DPI-21-NSP2

US6-30DPI-12-NSP2

US6-30DPI-122-NSP2

US4-5DPI-32-NSP2

US4-5DPI-31-NSP2

US4-5DPI-22-NSP2

US4-5DPI-21-NSP2

US4-5DPI-12-NSP2

US4-5DPI-11-NSP2

US4-10DPI-32-NSP2

US4-10DPI-31-NSP2

US4-10DPI-22-NSP2

US4-10DPI-21-NSP2

US4-10DPI-12-NSP2

US4-10DPI-11-NSP2

US4-30DPI-112-NSP2

US4-30DPI-212-NSP2

US4-30DPI-12-NSP2

US4-30DPI-11-NSP2

MIX8LT-5DPI-32-NSP2

MIX8LT-5DPI-31-NSP2

MIX8LT-10DPI-12-NSP2

MIX8LT-10DPI-11-NSP2

MIX8LT-30DPI-32-NSP2

MIX8LT-30DPI-31-NSP2

MIX8LT-30DPI-22-NSP2

MIX8LT-30DPI-21-NSP2

MIX8LT-30DPI-13-NSP2

MIX8LT-30DPI-12-NSP2

MIX7LT-5DPI-32-NSP2

MIX7LT-5DPI-31-NSP2

MIX7LT-5DPI-22-NSP2

MIX7LT-5DPI-21-NSP2

MIX7LT-5DPI-11-NSP2

MIX7LT-5DPI-112-NSP2

MIX7LT-10DPI-32-NSP2

MIX7LT-10DPI-31-NSP2

MIX7LT-10DPI-11-NSP2

MIX7LT-10DPI-21-NSP2

MIX7LT-10DPI-12-NSP2

MIX7LT-10DPI-22R-NSP2

MIX7LT-30DPI-32-NSP2

MIX7LT-30DPI-31-NSP2

MIX7LT-30DPI-22-NSP2

MIX7LT-30DPI-21-NSP2

MIX7LT-30DPI-12-NSP2

MIX7LT-30DPI-11-NSP2

MIX5LT-5DPI-32-NSP2

MIX5LT-5DPI-31-NSP2

MIX5LT-5DPI-22-NSP2

MIX5LT-5DPI-21-NSP2

MIX5LT-5DPI-12-NSP2

MIX5LT-5DPI-11-NSP2

MIX5LT-10DPI-31-NSP2

MIX5LT-10DPI-32-NSP2

MIX5LT-10DPI-22-NSP2

MIX5LT-10DPI-12-NSP2

MIX5LT-10DPI-11-NSP2

MIX5LT-10DPI-21-FNSP2

MIX5LT-30DPI-32-NSP2

MIX5LT-30DPI-31-NSP2

MIX5LT-30DPI-22-NSP2

MIX5LT-30DPI-21-NSP2

MIX5LT-30DPI-12-NSP2

MIX5LT-30DPI-11-NSP2

MIX4RT-10DPI-22-NSP2

MIX4RT-10DPI-21-NSP2

MIX4RT-10DPI-12-NSP2

MIX4RT-10DPI-121-NSP2

MIX4RT-10DPI-11-NSP2

MIX4RT-10DPI-111-NSP2

MIX2LT-5DPI-32-NSP2

MIX2LT-5DPI-31-NSP2

Sequence alignment visualization showing amino acid positions 390-460 for various NSP2 variants. The top line shows the reference sequence: KDQMEEDLLKLANAQTTSDDMMAWAVEQVDLKTWVKNYPRWTPPPPPKVQPRKTKPVKSLPERKPVPAAPRRKVGSDCGSP. Subsequent lines show individual variants with colored dots indicating differences. Some variants have specific amino acid substitutions highlighted in red (e.g., R, A, E, I) or blue (e.g., T, P, G). For example, MIX8LT-5DPI-32-NSP2 has R at position 395, A at 396, E at 397, A at 398, and A at 399. MIX7LT-10DPI-11-NSP2 has E at position 455. MIX5LT-5DPI-12-NSP2 has R at position 410. MIX4RT-10DPI-11-NSP2 has G at position 455. MIX2LT-5DPI-31-NSP2 has G at position 455.


```

MIX8LT-30DPI-13-NSP2 .....Y.....L.....
MIX8LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-5DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-112-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-10DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-10DPI-22R-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-12-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-5DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-22-NSP2 .....G.....L.....
MIX5LT-5DPI-21-NSP2 .....G.....L.....
MIX5LT-5DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-10DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-12-NSP2 .....P.....L.....
MIX5LT-10DPI-11-NSP2 .....P.....L.....
MIX5LT-10DPI-21-FNSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-30DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX4RT-10DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-12-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-121-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-111-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX2LT-5DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-32-NSP2 .....A.....L.....C
MIX2LT-10DPI-31-NSP2 .....A.....L.....C
MIX2LT-10DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....C
MIX2LT-10DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....P
MIX2LT-30DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....P
MIX2LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-312-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX2LT-10DPI-311-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX1LT-10DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....

```

630 640

.|...|...|.

SSVRITRPKYSAQ

```

VR2332/NSP2_par
US6-5DPI-32-NSP2
US6-5DPI-31-NSP2
US6-5DPI-22-NSP2
US6-5DPI-21-NSP2
US6-5DPI-12-NSP2
US6-10DPI-32-NSP2
US6-10DPI-11-NSP2
US6-10DPI-21-NSP2
US6-10DPI-12-NSP2
US6-10DPI-22-NSP2
US6-10DPI-31-NSP2
US6-30DPI-31-NSP2
US6-30DPI-32-NSP2
US6-30DPI-22-NSP2
US6-30DPI-21-NSP2
US6-30DPI-12-NSP2
US6-30DPI-122-NSP2
US4-5DPI-32-NSP2

```

US4-5DPI-31-NSP2
US4-5DPI-22-NSP2
US4-5DPI-21-NSP2
US4-5DPI-12-NSP2
US4-5DPI-11-NSP2
US4-10DPI-32-NSP2
US4-10DPI-31-NSP2
US4-10DPI-22-NSP2
US4-10DPI-21-NSP2
US4-10DPI-12-NSP2
US4-10DPI-11-NSP2
US4-30DPI-112-NSP2
US4-30DPI-212-NSP2
US4-30DPI-12-NSP2
US4-30DPI-11-NSP2
MIX8LT-5DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX8LT-5DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX8LT-10DPI-12-NSP2
MIX8LT-10DPI-11-NSP2
MIX8LT-30DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX8LT-30DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX8LT-30DPI-22-NSP2
MIX8LT-30DPI-21-NSP2
MIX8LT-30DPI-13-NSP2
MIX8LT-30DPI-12-NSP2
MIX7LT-5DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-112-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-11-NSP2
MIX7LT-10DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-12-NSP2
MIX7LT-10DPI-22R-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-32-NSP2 ..IS.....
MIX7LT-30DPI-31-NSP2 ..IS.....
MIX7LT-30DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-12-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX5LT-5DPI-32-NSP2
MIX5LT-5DPI-31-NSP2
MIX5LT-5DPI-22-NSP2
MIX5LT-5DPI-21-NSP2
MIX5LT-5DPI-12-NSP2
MIX5LT-5DPI-11-NSP2
MIX5LT-10DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-12-NSP2
MIX5LT-10DPI-11-NSP2
MIX5LT-10DPI-21-FNSP2 ..I.....
MIX5LT-30DPI-32-NSP2
MIX5LT-30DPI-31-NSP2
MIX5LT-30DPI-22-NSP2
MIX5LT-30DPI-21-NSP2
MIX5LT-30DPI-12-NSP2
MIX5LT-30DPI-11-NSP2
MIX4RT-10DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-12-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-121-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-111-NSP2 ..I.....
MIX2LT-5DPI-32-NSP2
MIX2LT-5DPI-31-NSP2
MIX2LT-5DPI-22-NSP2 ...G.....
MIX2LT-5DPI-21-NSP2 ...G.....
MIX2LT-5DPI-12-NSP2
MIX2LT-5DPI-11-NSP2
MIX2LT-10DPI-32-NSP2
MIX2LT-10DPI-31-NSP2
MIX2LT-10DPI-22-NSP2
MIX2LT-10DPI-21-NSP2
MIX2LT-10DPI-12-NSP2
MIX2LT-10DPI-11-NSP2
MIX2LT-30DPI-32-NSP2
MIX2LT-30DPI-31-NSP2
MIX2LT-30DPI-22-NSP2
MIX2LT-30DPI-21-NSP2
MIX2LT-30DPI-12-NSP2
MIX2LT-30DPI-11-NSP2
MIX2LT-10DPI-312-NSP2 ..I.....
MIX2LT-10DPI-311-NSP2 ..I.....
MIX1LT-10DPI-22-NSP2
MIX1LT-10DPI-21-NSP2
MIX1LT-10DPI-12-NSP2


```

MIX8LT-30DPI-13-NSP2 .....Y.....L.....
MIX8LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-5DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-5DPI-112-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-10DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX7LT-10DPI-22R-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILEA.Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILEA.Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-12-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDG.N.PA..G..
MIX7LT-30DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDG.N.PA..G..
MIX5LT-5DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-22-NSP2 .....G.....L.....
MIX5LT-5DPI-21-NSP2 .....G.....L.....
MIX5LT-5DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-5DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-10DPI-31-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-32-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L...T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-10DPI-12-NSP2 .....P.....L.....
MIX5LT-10DPI-11-NSP2 .....P.....L.....
MIX5LT-10DPI-21-FNSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L...T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX5LT-30DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX5LT-30DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX4RT-10DPI-22-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-21-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-12-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q..G.V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-121-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-11-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX4RT-10DPI-111-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX2LT-5DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-5DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-32-NSP2 .....A.....L.....C
MIX2LT-10DPI-31-NSP2 .....A.....L.....C
MIX2LT-10DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....C
MIX2LT-10DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-32-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-31-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....P
MIX2LT-30DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....P
MIX2LT-30DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-30DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....
MIX2LT-10DPI-312-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX2LT-10DPI-311-NSP2 Q..H...EKANL...TLA.D.....Y...L.L.T.ILE..Q...V...IPDD.N.PA..G..
MIX1LT-10DPI-22-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-21-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-12-NSP2 .....Y.....L.....
MIX1LT-10DPI-11-NSP2 .....Y.....L.....

```

630 640

.|...|...|.

SSVRITRPKYSAQ

```

VR2332/NSP2_par
US6-5DPI-32-NSP2
US6-5DPI-31-NSP2
US6-5DPI-22-NSP2
US6-5DPI-21-NSP2
US6-5DPI-12-NSP2
US6-10DPI-32-NSP2
US6-10DPI-11-NSP2
US6-10DPI-21-NSP2
US6-10DPI-12-NSP2
US6-10DPI-22-NSP2
US6-10DPI-31-NSP2
US6-30DPI-31-NSP2
US6-30DPI-32-NSP2
US6-30DPI-22-NSP2
US6-30DPI-21-NSP2
US6-30DPI-12-NSP2
US6-30DPI-122-NSP2
US4-5DPI-32-NSP2

```

US4-5DPI-31-NSP2
US4-5DPI-22-NSP2
US4-5DPI-21-NSP2
US4-5DPI-12-NSP2
US4-5DPI-11-NSP2
US4-10DPI-32-NSP2
US4-10DPI-31-NSP2
US4-10DPI-22-NSP2
US4-10DPI-21-NSP2
US4-10DPI-12-NSP2
US4-10DPI-11-NSP2
US4-30DPI-112-NSP2
US4-30DPI-212-NSP2
US4-30DPI-12-NSP2
US4-30DPI-11-NSP2
MIX8LT-5DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX8LT-5DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX8LT-10DPI-12-NSP2
MIX8LT-10DPI-11-NSP2
MIX8LT-30DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX8LT-30DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX8LT-30DPI-22-NSP2
MIX8LT-30DPI-21-NSP2
MIX8LT-30DPI-13-NSP2
MIX8LT-30DPI-12-NSP2
MIX7LT-5DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX7LT-5DPI-112-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-11-NSP2
MIX7LT-10DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-10DPI-12-NSP2
MIX7LT-10DPI-22R-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-32-NSP2 ..IS.....
MIX7LT-30DPI-31-NSP2 ..IS.....
MIX7LT-30DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-12-NSP2 ..I.....
MIX7LT-30DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX5LT-5DPI-32-NSP2
MIX5LT-5DPI-31-NSP2
MIX5LT-5DPI-22-NSP2
MIX5LT-5DPI-21-NSP2
MIX5LT-5DPI-12-NSP2
MIX5LT-5DPI-11-NSP2
MIX5LT-10DPI-31-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-32-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX5LT-10DPI-12-NSP2
MIX5LT-10DPI-11-NSP2
MIX5LT-10DPI-21-FNSP2 ..I.....
MIX5LT-30DPI-32-NSP2
MIX5LT-30DPI-31-NSP2
MIX5LT-30DPI-22-NSP2
MIX5LT-30DPI-21-NSP2
MIX5LT-30DPI-12-NSP2
MIX5LT-30DPI-11-NSP2
MIX4RT-10DPI-22-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-21-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-12-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-121-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-11-NSP2 ..I.....
MIX4RT-10DPI-111-NSP2 ..I.....
MIX2LT-5DPI-32-NSP2
MIX2LT-5DPI-31-NSP2
MIX2LT-5DPI-22-NSP2 ...G.....
MIX2LT-5DPI-21-NSP2 ...G.....
MIX2LT-5DPI-12-NSP2
MIX2LT-5DPI-11-NSP2
MIX2LT-10DPI-32-NSP2
MIX2LT-10DPI-31-NSP2
MIX2LT-10DPI-22-NSP2
MIX2LT-10DPI-21-NSP2
MIX2LT-10DPI-12-NSP2
MIX2LT-10DPI-11-NSP2
MIX2LT-30DPI-32-NSP2
MIX2LT-30DPI-31-NSP2
MIX2LT-30DPI-22-NSP2
MIX2LT-30DPI-21-NSP2
MIX2LT-30DPI-12-NSP2
MIX2LT-30DPI-11-NSP2
MIX2LT-10DPI-312-NSP2 ..I.....
MIX2LT-10DPI-311-NSP2 ..I.....
MIX1LT-10DPI-22-NSP2
MIX1LT-10DPI-21-NSP2
MIX1LT-10DPI-12-NSP2