

ความหลากหลายของยีนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย



นาย รุ่งธรรม เกษโกวิท

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาบาลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาบาลวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VARIATION OF NSP2 GENE OF PRRSV IN THAILAND



Mr. Roongtham Kedkovid

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายของยีนเอ็นเอสพี-2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส  
ในประเทศไทย

โดย

นาย รุ่งธรรม เกษโกวิท

สาขาวิชา

พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

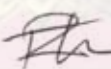
รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารบัณฑิต

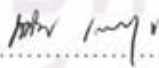
 ..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไสละสูต)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

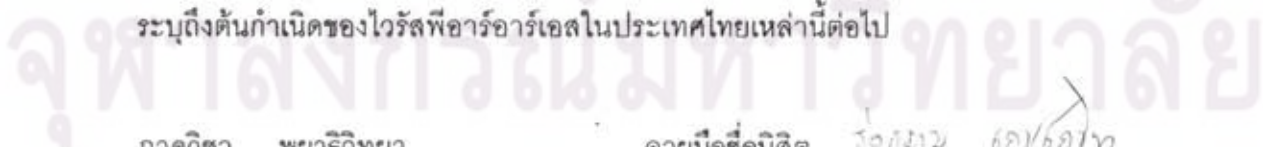
 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

 ..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.พรทิพภา เล็กเจริญสุข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งธรรม เกษโกวิท : ความหลากหลายของยีนเอ็นเอสพี-2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสใน  
ประเทศไทย. (VARIATION OF NSP2 GENE OF PRRSV IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก : ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.  
น.สพ.ดร.อลงกร อมรศิลป์, 79 หน้า.

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่ก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก ไวรัส  
พีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากโดยเฉพาะในส่วนของเอ็นเอสพี  
2 ซึ่งถือเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายสูงของไวรัส และสามารถพบการขาดหายไปของกรด  
อะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ได้ในไวรัสหลายไอโซเลท การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงถึง  
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือใน  
ประเทศไทย โดยทำการศึกษาเอ็นเอสพี 2 ในช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการขาด  
หายไปของกรดอะมิโนในไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั่วไป ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มาจากตัวอย่างไวรัส  
4 ตัวอย่างและตัวอย่างไวรัสที่ได้จากเนื้อเยื่อ 6 ตัวอย่าง (รวมทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง) โดยตัวอย่าง  
ทั้งหมดได้มาจากสุกรจากฟาร์มในจังหวัดต่างๆ ในภาคกลางของประเทศไทยซึ่งเป็นภาคที่มีความ  
หนาแน่นของประชากรสุกรสูง ผลการศึกษาพบว่าจากตัวอย่างที่ศึกษา 10 ตัวอย่าง พบไวรัสที่มี  
การขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยมีตำแหน่งที่เกิดการขาด  
หายไปของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไป และบางตัวอย่างมีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของ  
กรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ MN184 (สหรัฐอเมริกา) ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง  
แต่จากการศึกษาด้านไฟโลเจเนติกพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความสัมพันธ์  
กับเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 หรือของไวรัสจากประเทศอื่นๆ ค่อนข้างน้อย ไวรัสที่มีการขาดหายไป  
ของกรดอะมิโนบริเวณเอ็นเอสพี 2 ที่พบในประเทศไทยมีแนวโน้มว่าเกิดจากการวิวัฒนาการของ  
ไวรัสที่เคยได้รับมาจากต่างประเทศในอดีต แต่มิได้เกิดจากการนำเข้าไวรัสจากต่างประเทศใน  
ปัจจุบัน ทั้งนี้เอ็นเอสพี 2 มีความหลากหลายสูงมาก จึงอาจมีใช้ตัวแทนที่ดีในการศึกษาถึงต้น  
กำเนิดของไวรัส มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้อยีนที่มีความอนุรักษ์มากกว่าในการศึกษาเพื่อ  
ระบุถึงต้นกำเนิดของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยเหล่านี้ต่อไป



ภาควิชา พยาธิวิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต รุ่งธรรม เกษโกวิท  
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก Rr  
ปีการศึกษา 2551 ..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

## 4975571331 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS : PRRSV / NSP2 / THAILAND

ROONGTHAM KEDKOVID : VARIATION OF NSP2 GENE OF PRRSV IN  
THAILAND. ADVISOR : PROF. ROONGROJE THANAWONGNUWECH, Ph.D.,  
CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. ALONGKORN AMONSIN, Ph.D., 79 pp.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a pathogen causing economic losses in swine industrial worldwide. PRRSV has a high degree of genetic variability, especially at the nsp2 which is the most variable PRRSV protein. Several PRRSV isolates show amino acid deletions in the nsp2 protein. This is the first study determining genetic variation of the nsp2 of the North American genotype of Thai PRRSV. Genetic variation of nsp2 was determined at the amino acid position of 296–735 of nsp2 covering many deleted positions those isolates. Four Thai-PRRSV viral isolates (North American genotype) and 4 viruses from tissue samples were used (n = 10) in this study. All samples were from farms in the central region of Thailand, which has a high density swine population. The results showed that 9 out of 10 samples showed truncated nsp2 having different positions of deletion. Some of the truncated virus found in this study contained deleted amino acid positions similar to those of MN184 (USA) which is a highly pathogenic isolate, but the phylogenetic analysis showed that there were no strong phylogenetic relationships between nsp2 of Thai PRRSV and nsp2 of MN184 or of any other viruses in other countries. These truncated viruses found in Thailand might evolve from the introduced virus in the past, but not from the recent introduction based on the phylogenetic analysis. However, nsp2 may not be a good nucleotide region for genetic variation determination. Using conserved genes is suggested for further study.

Department : ..... Veterinary Pathology.....

Field of Study : ..... Veterinary Pathobiology.....

Academic Year : 2008.....

Student's Signature

*Roongtham Kedkovid*

Advisor's Signature

*Ru*

Co-Advisor's Signature

*Alongkorn Amosin*

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.น.สพ.ดร. อลงกรณ์ อมรศิลป์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รศ.สพ.ญ.ดร.พรทิพภา เล็กเจริญสุข ซึ่งได้ให้ความรู้ และคำแนะนำ ตลอดจนความกรุณาในการช่วยตรวจทานและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาปี การศึกษา 2550 บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณบริษัท Intervet Animal Health ที่ให้ความช่วยเหลือด้านงบประมาณในการวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและบุคคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย ตัวอย่าง ไวรัส สารเคมี อุปกรณ์ และความช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบคุณโรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐมและบุคคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านตัวอย่างเนื้อเยื่อ ประวัติ สัตว์ป่วย และความช่วยเหลือต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1    บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2    เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ความเป็นมาและระบาดวิทยาของโรคพรีอาร์อาร์เอส.....	3
2.2 ไวรัสวิทยา.....	4
2.3 พยาธิวิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน.....	7
2.3.1 พยาธิวิทยาของโรคพรีอาร์อาร์เอส.....	7
2.3.2 การติดเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสร่วมกับเชื้อก่อโรคอื่นๆ.....	8
2.3.3 วิทยาภูมิคุ้มกันของโรคพรีอาร์อาร์เอส.....	9
2.3.4 การรบกวนระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอส.....	12
2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพรีอาร์อาร์เอส.....	14
2.5 การสร้างโปรตีนเอ็นเอสพี 2 โดยไวรัสพรีอาร์อาร์เอส.....	16
2.6 การเหนี่ยวนำให้เกิดถุงดีเอ็มวีโดยเอ็นเอสพี 2.....	23
2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 และความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส.....	26
3    วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัย.....	31
3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัส.....	32
3.3 การคัดกรองตัวอย่างด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์.....	32

บทที่	หน้า
3.4 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอและปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	33
3.5 การโคลนและการสกัดพลาสมิด.....	37
3.6 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และการวิเคราะห์ผล.....	37
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
4.1 การตรวจสอบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น.....	40
4.2 การวิเคราะห์รูปแบบของการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2.....	42
4.3 การศึกษาระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม.....	47
4.4 การศึกษาทางด้านไฟโลเจเนติก.....	50
4.5 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของซีสตีนโปรตีนโดเมนและจุดตัด.....	54
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	57
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	57
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	58
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	63
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	79


  
**ศูนย์วิทยทรัพยากร**  
**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
2	โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	35
3	คู่มือโปรแกรมในแต่ละตัวอย่างและชิ้นส่วนของเอ็นเอสพี 2 ที่ได้.....	36
4	ไวรัสฟิอาร์อาร์เอสไอโซเลตต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....	39
5	ขนาดของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงที่ศึกษาของตัวอย่างต่างๆ เทียบกับขนาดของ เอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของ VR2332.....	41
6	ตำแหน่งที่คาดว่าเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ศึกษา.....	45
7	ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน (ร้อยละ).....	48
8	ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน (ร้อยละ) และค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ (ร้อยละ) ของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทย.....	49



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังจีโนมของไวรัสพาร์อาร์เอส.....	6
2	แบบจำลองแสดงตำแหน่งโปรตีนโครงสร้างของไวรัสพาร์อาร์เอส.....	6
3	การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของสุกรต่อไวรัสพาร์อาร์เอส.....	10
4	ขั้นตอนการสร้างโปรตีนที่มีไซโตโครงสร้างของไวรัสพาร์อาร์เอส.....	17
5	แผนผังโดยสังเขปของการตัดยอยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ.....	19
6	อไลน์เมนท์ของซีสดีเอ็นเอของอาร์เทอร์ไวรัส.....	20
7	กระบวนการการตัดยอยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอโดย 2 กระบวนการของไวรัสอีเอวี.....	23
8	ลักษณะของดีเอ็มวีที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	25
9	แผนผังแสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์และส่วนที่มีความหลากหลายสูงบนเอ็นเอสพี 2.....	27
10	อไลน์เมนท์ส่วนหนึ่งของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 MN184B HB-2(sh)/2002 และ SY0608.....	29
11	ตำแหน่งโดยสังเขปของผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่เกิดจากไพรเมอร์บางคู่.....	39
12	แผนผังตำแหน่งการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของตัวอย่างที่ศึกษา.....	46
13	แผนภูมิไฟโลเจเนติกของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ของ ไวรัสพาร์อาร์เอสในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205.....	53
14	อไลน์เมนท์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโดเมนบนเอ็นเอสพี 2 ของ ไวรัสพาร์อาร์เอส ไวรัสอีเอวี และไวรัสแอลดีวี.....	55
15	อไลน์เมนท์ของลำดับกรดอะมิโนในช่วงที่คาดว่าเป็นจุดตัดของระหว่าง เอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3.....	56

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพอร์คอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก สามารถพบมีการระบาดของโรคได้ในฟาร์มเลี้ยงสุกรทั่วโลก สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสจะมีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ ทำให้สุกรไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามเป้าหมาย เกิดความล้มเหลวด้านการรักษา การคัดทิ้ง หรือการตายของสุกร

การระบาดของโรคพอร์คอาร์อาร์เอสเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงก่อนปี พ.ศ. 2530 ต่อมาในช่วงประมาณ พ.ศ. 2534 ได้มีการแยกเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา และได้เริ่มมีการศึกษาถึงความสำคัญของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสในด้านต่างๆ ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา ปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงโปรตีนเอ็นเอสพี 2 (non-structural protein 2) ที่มีขนาดสั้นกว่าปกติ (เกิดการขาดหายไป (deletion) ของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2) ในบางประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาชนจีน และญี่ปุ่น เป็นต้น และในบางประเทศ เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และญี่ปุ่น นั้นพบว่าเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสที่มีเอ็นเอสพี 2 ขนาดสั้นกว่าปกตินี้สามารถพบได้อย่างแพร่หลายทั่วประเทศ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมากว่าเหตุใดเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสที่มีเอ็นเอสพี 2 ขนาดสั้นกว่าปกติเหล่านี้จึงสามารถกลายเป็นเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสที่พบเป็นหลักของบางประเทศได้

นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสบางไอโซเลทที่มีเอ็นเอสพี 2 ที่มีขนาดสั้นกว่าปกตินี้มี ความรุนแรงในการก่อโรคสูง เช่น MN184A MN184B (สหรัฐอเมริกา) และ SY0608 (สาธารณรัฐประชาชนจีน) เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมากว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสได้อย่างไร อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาด้านความสำคัญของเอ็นเอสพี 2 นั้นยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด

จากการศึกษาด้านชีววิทยาที่ผ่านมาในประเทศไทย พบว่าประเทศไทยอาจมีการระบาดของเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสเป็นครั้งแรกตั้งแต่ พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996a) ซึ่งต่อมากสามารถแยกเชื้อไวรัสพอร์คอาร์อาร์เอสได้สำเร็จเป็นครั้งแรกใน พ.ศ. 2539

(Damrongwatanapokin et al., 1996b) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่ผ่านมานั้นยังมิได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับโปรตีนเอ็นเอสพี 2 มากนัก และยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยให้ทราบได้ว่าปัจจุบันสามารถพบเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีเอ็นเอสพี 2 ที่มีขนาดสั้นกว่าปกติได้ในประเทศไทยหรือไม่ และลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยนั้นมีความคล้ายคลึงกับ MN184A MN184B หรือ SY0608 เพียงใด

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 886 – 2,205
2. ศึกษาตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ (หรือกรดอะมิโน) ของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 886 – 2,205
3. ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 886 – 2,205 โดยเปรียบเทียบกับเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของ MN184A และ SY0608
4. ศึกษาความสัมพันธ์ด้านไฟโลเจเนติก (phylogenetic) ระหว่างเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 886 – 2,205 เปรียบเทียบกับเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของไวรัสพาร์อาร์เอสจากประเทศต่างๆ

## 3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทย รวมถึงลักษณะของการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (หรือกรดอะมิโน) ที่เกิดขึ้นบนเอ็นเอสพี 2 ซึ่งจะเป็แนวทางในการศึกษาถึงความสำคัญของการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (หรือกรดอะมิโน) และความหลากหลายของเอ็นเอสพี 2 ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ความเป็นมาและระบาดวิทยาของโรคพาร์อาร์เอส

การระบาดครั้งแรกของโรคพาร์อาร์เอสเกิดขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงประมาณ พ.ศ. 2530 ลักษณะเด่นที่พบในการระบาด คือ พบสุกรที่มีปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจเป็นจำนวนมาก โดยปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์ที่พบได้แก่ การแท้งของแม่สุกรที่ตั้งท้องในระยะท้าย พบมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนลูกกรอก จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอด และจำนวนลูกสุกรอ่อนแอ ปัญหาด้านระบบทางเดินหายใจที่พบได้แก่ อาการปอดอักเสบของลูกสุกรและแม่สุกร การระบาดที่พบสร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก และในเวลาต่อมาได้มีการแพร่ระบาดของกลุ่มอาการเหล่านี้ไปยังทวีปยุโรป และประเทศต่างๆ ทั่วโลกในช่วง พ.ศ. 2533 และ พ.ศ. 2534 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในช่วงเวลานั้นยังไม่สามารถตรวจหาสาเหตุของกลุ่มอาการดังกล่าวได้ (อ้างถึงโดย รุ่งโรจน์, 2548)

การแยกเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสได้สำเร็จเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์ ใน พ.ศ. 2534 โดยตั้งชื่อไวรัสที่แยกเชื้อได้ว่าลีลีสแตดไวรัส (Lelystad virus หรือ LV) (Wensvoort et al., 1991) ซึ่งต่อมาได้กลายเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสพาร์อาร์เอสลุ่มสายพันธุ์ยุโรป ในเวลาต่อมามีการแยกเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสได้ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเช่นกัน และตั้งชื่อไวรัสไอโซเลตนั้นว่า VR2332 (Collins et al., 1992) ซึ่งต่อมาได้กลายเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

จากการศึกษาด้านซีรัมวิทยาที่ผ่านมากในประเทศไทย พบว่ามีความเป็นไปได้ว่าประเทศไทยอาจมีการระบาดของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นครั้งแรกตั้งแต่ พ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996a) ซึ่งต่อมาโรคพาร์อาร์เอสได้แพร่กระจายอย่างกว้างขวางในประเทศไทย (Thanawongnuwech et al., 2004a) การแยกเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยได้สำเร็จเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกใน พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996b) โดยพบว่าไวรัสที่แยกได้นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์อเมริกาเหนือมากกว่า อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมาพบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสทั้ง 2 สายพันธุ์ได้จากสุกรในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย (Thanawongnuwech et al., 2004a)

จากการศึกษาด้านซีรัมวิทยาในประเทศไทยใน พ.ศ. 2539 ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติพบว่า สุกรที่นำเข้ามาจากต่างประเทศนั้นส่วนหนึ่งมีการติดเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสอยู่ก่อนแล้ว (Damrongwatanapokin et al., 1996a) ซึ่งอาจทำให้การแก้ปัญหาโรคพ็อร์อาร์เอสในอนาคตในระดับประเทศนั้นทำได้ยากมากขึ้น จึงได้มีการประสานงานกับกรมปศุสัตว์และได้มีการออกข้อกำหนดห้ามมิให้นำสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสเข้ามาในประเทศไทย โดยเริ่มบังคับใช้ตั้งแต่ พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา

การติดต่อของโรคพ็อร์อาร์เอสเกิดได้หลายทาง (รุ่งโรจน์, 2548) ได้แก่ ทางการหายใจ ทางการกิน ทางระบบสืบพันธุ์ (เช่น จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนไวรัส) และเนื่องจากไวรัสมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมในระดับหนึ่งจึงทำให้การแพร่กระจายของไวรัสนั้นสามารถเกิดได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการแพร่กระจายของโรคพ็อร์อาร์เอสอย่างกว้างขวางจนทำให้เกิดการระบาดของโรค (โดยเฉพาะการระบาดในช่วงแรก) จึงสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเสริม เช่น การเปลี่ยนระบบการผลิตสุกรจากการเลี้ยงแบบรายย่อยมาเป็นการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรมซึ่งมีความหนาแน่นของสุกรในฟาร์มเพิ่มสูงขึ้น การนำเข้าน้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนไวรัสพ็อร์อาร์เอส การนำเข้าสู่สุกรที่มีการติดเชื้ออยู่ก่อนแล้ว และการใช้วัคซีนเชื้อเป็นที่ไวรัสจากวัคซีนสามารถเกิดการกลายพันธุ์และพัฒนากลายเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคได้ (Nielsen et al., 2001) เป็นต้น

## 2. ไวรัสวิทยา

ไวรัสพ็อร์อาร์เอสจัดอยู่ในลำดับนิโดไวรัสเลส (*Nidovirales*) วงศ์อาร์เทอร์วิริดี (*Arteriviridae*) กลุ่มอาร์เทอร์วิไวรัส (*Arterivirus*) ไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันนี้ได้แก่ ไวรัสอีเอวี (equine arteritis virus, EAV) ไวรัสแอลดีวี (lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV) และไวรัสเอสเอสเอฟวี (simian hemorrhagic fever virus, SHFV) ไวรัสพ็อร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 48 – 83 นาโนเมตร มีลักษณะของสายพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอชนิดสายเดี่ยวและเป็นสายบวก (positive single - stranded RNA) จีโนมมีขนาดประมาณ 15.4 กิโลเบส (Meng, 2000)

ไวรัสพ็อร์อาร์เอสสามารถแบ่งตามลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ ชนิดที่ 1 หรือกลุ่มสายพันธุยุโรป มี LV เป็นไวรัสต้นแบบ และชนิดที่ 2 หรือกลุ่มสายพันธุอเมริกาเหนือ มี VR2332 เป็นไวรัสต้นแบบ ไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์นี้แม้ว่าจะสามารถทำให้เกิดกลุ่มอาการของระบบหายใจและระบบสืบพันธุ์ในสุกรเช่นเดียวกัน แต่รายละเอียดปลีกย่อยของลักษณะการ

ก่อโรค ลักษณะทางการเป็นแอนติเจน และลักษณะทางพันธุกรรม ของไวรัสทั้ง 2 มีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999)

จีโนมของไวรัสพาร์อาร์เอสทั้ง 2 สายพันธุ์ประกอบด้วย 9 โออาร์เอฟ (open reading frame, ORF) เรียงจากปลาย 5' คือ โออาร์เอฟ 1 เอ, โออาร์เอฟ 1 บี, โออาร์เอฟ 2 เอ, โออาร์เอฟ 2 บี และโออาร์เอฟ 3 – โออาร์เอฟ 7 (Wootton et al., 2000; Lee and Yoo, 2006) (ภาพที่ 1) โออาร์เอฟ 1 เอ และโออาร์เอฟ 1 บีของไวรัสพาร์อาร์เอสมีขนาดรวมกันประมาณ 12 กิโลเบส ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80 ของจีโนม โดยทั้ง 2 โออาร์เอฟนี้จะแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีใช้โครงสร้างของไวรัสหรือเอ็นเอสพี ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนทั้งสิ้น 13 ชนิด คือ เอ็นเอสพี 1 แอลฟา, เอ็นเอสพี 1 เบต้าและเอ็นเอสพี 2 – เอ็นเอสพี 12 หน้าที่สำคัญของโปรตีนเอ็นเอสพีเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์เจ้าบ้าน ส่วนโออาร์เอฟ 2 เอ, โออาร์เอฟ 2 บีและโออาร์เอฟ 3 – โออาร์เอฟ 7 จะแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัสรวมทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ ไกลโคโปรตีน 2 หรือจีพี 2 (GP2), เอนเวลลอปโปรตีน หรือโปรตีนอี (E), จีพี 3, จีพี 4, จีพี 5, เมทริกซ์โปรตีน หรือโปรตีนเอ็ม (M) และนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน หรือโปรตีนเอ็น (N) ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

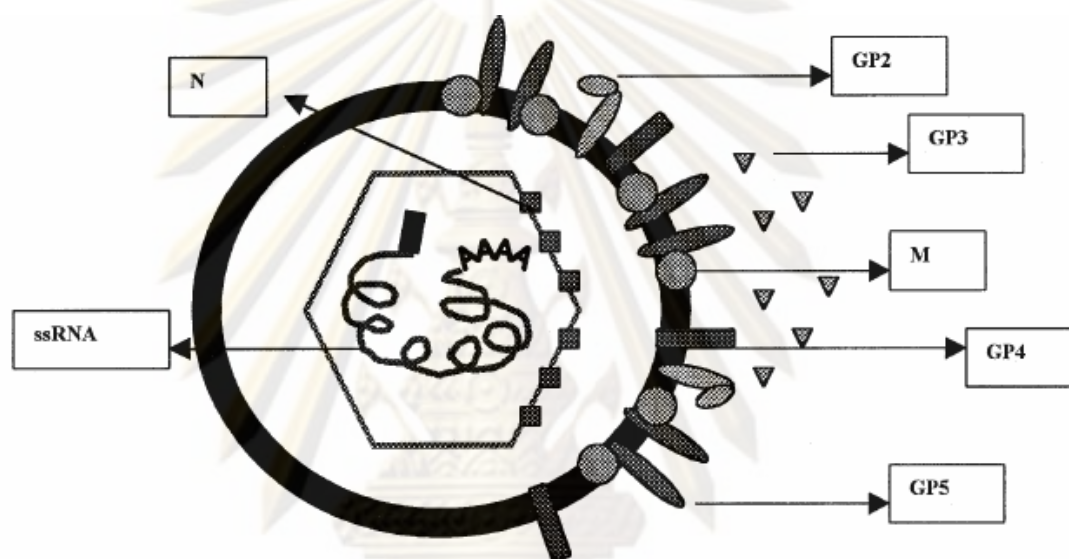
โปรตีนโครงสร้างของไวรัสแบ่งได้เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักและโปรตีนโครงสร้างรอง โปรตีนโครงสร้างหลักคือโปรตีนที่มีการสร้างออกมาในปริมาณที่ค่อนข้างมาก ประกอบด้วยโปรตีนเอ็น โปรตีนเอ็ม และโปรตีนจีพี 5 หน้าที่หลักของโปรตีนเอ็น คือ ทำหน้าที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอของไวรัส เป็นแกนกลางหลักของไวรัส และเป็นโปรตีนที่มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสและนิวคลีโอแลตซ์ของเซลล์เป้าหมายซึ่งมีผลด้านการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Pei et al., 2008) หน้าที่หลักของโปรตีนเอ็ม คือ เป็นโปรตีนที่ใช้ในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย หน้าที่หลักของโปรตีนจีพี 5 คือ เป็นโปรตีนหลักเหนี่ยวนำให้สุกรเกิดการสร้างนิวโทรลไลซิงแอนติบอดี (neutralizing antibody) และนอกจากนี้โปรตีนจีพี 5 ยังทำงานร่วมกับโปรตีนเอ็มเพื่อส่งสัญญาณในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายอีกด้วย (Dea et al., 2000)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แผนผังจีโนมของไวรัสพาร์อาร์เอส เรียงจากปลาย 5' ถึงปลาย 3' คือ 5' แคป, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 1 เอ, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 1 บี, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 2 เอ, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 2 บี, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 3 - โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 7 และโพลีเอเทิล ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Han et al., 2006)



ภาพที่ 2 แบบจำลองแสดงตำแหน่งโปรตีนโครงสร้างของไวรัสพาร์อาร์เอส (Dea et al., 2000)

โปรตีนโครงสร้างของไวรัสพาร์อาร์เอสได้แก่ โปรตีนจีพี 2, โปรตีนอี, โปรตีนจีพี 3 และโปรตีนจีพี 4 หน้าที่และความสำคัญของโปรตีนอื่นนั้นคาดว่าทำหน้าที่เป็นไอออนแชนแนล (ion-channel) ซึ่งมีความสำคัญในช่วงการปล่อยสารพันธุกรรมออกจากอนุภาคของไวรัสเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ (Lee and Yoo, 2006) ในกรณีของโปรตีนจีพี 4 อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดนิวทروفิลไลซิงแอนติบอดี แต่ข้อมูลที่มีในปัจจุบันนั้นยังมีความขัดแย้งกันอยู่ หน้าที่และความสำคัญของโปรตีนจีพี 2 และจีพี 3 ที่มีการรายงานในปัจจุบันยังมีค่อนข้างจำกัด อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าโปรตีนจีพี 3 นั้นอาจมิได้ประกอบเข้าเป็นส่วนหนึ่งของอนุภาคของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ

ศึกษาเกี่ยวกับการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของไวรัสพาร์อาร์เอสโดยมากจะศึกษาในเซลล์มาโครฟาจบริเวณถุงลม (pulmonary alveolar macrophage, PAM) ซึ่งเป็นเซลล์



เป้าหมายที่สำคัญชนิดหนึ่งของไวรัสพาร์อาร์เอส และในปัจจุบันสามารถระบุถึงโมเลกุลต่างๆ ที่มีความสำคัญได้ในระดับหนึ่ง ไวรัสพาร์อาร์เอสเกาะติดกับเซลล์ PAM ผ่านทางการส่งสัญญาณระหว่างโปรตีนเอ็มของไวรัส หรือคอมเพล็กซ์โปรตีนของโปรตีนเอ็มร่วมกับโปรตีนจีพี 5 (M-GP5 complex) ของไวรัสกับเฮปารินซัลเฟต (heparan sulfate) และตัวรับไซอะโลแอดฮีซิน (sialoadhesin receptor) ของเซลล์ PAM (Delputte et al., 2002; Vanderheijden et al., 2003; Delputte et al., 2004; Delputte et al., 2005) ไวรัสเข้าสู่เอนโดโซมของเซลล์ PAM (internalization) ผ่านทางการส่งสัญญาณระหว่างกรดไซอะลิกบนไวรัสกับตัวรับไซอะโลแอดฮีซินของเซลล์ (Duan et al., 1998; Vanderheijden et al., 2003; Delputte and Nauwynck, 2004; Delputte et al., 2005) ในกรณีของการปลดปล่อยสารพันธุกรรม (uncoating) ของไวรัสในเอนโดโซมนั้นแม้ว่าจะยังมีการศึกษาไม่มากนัก แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการนี้มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน CD163 ที่อยู่บนผิวของเซลล์ PAM (Calvert et al., 2007) และโปรตีนอีของไวรัส (Lee and Yoo, 2006)

การเพิ่มจำนวนหรือการจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอของไวรัสพาร์อาร์เอสนั้นจะเกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมเท่านั้น โดยอาจเกิดขึ้นในโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นถุงที่มีผนัง 2 ชั้นที่เรียกว่า double membrane vesicle หรือ DMV ซึ่งพัฒนามาจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ดังเช่นที่พบในไวรัสอีเอวี (Pedersen et al., 1999) กระบวนการถอดรหัสเป็นเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) เพื่อใช้ในการแปลรหัสเป็นโปรตีนต่างๆ ของไวรัสต่อไปนั้นเกิดขึ้นในลักษณะของช่วงที่ซ้อนทับกัน (nested set) ของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นประการหนึ่งของนิโดไวรัส (Pasternak et al., 2006) ไวรัสที่สมบูรณ์เกิดขึ้นได้เมื่อไวรัสที่มีเพียงนิวคลีโอแคปซิดเกิดการแตกหน่อเข้าไปในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมหรือกอลไจ ซึ่งในช่วงนี้ไวรัสจะนำผนังของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมหรือกอลไจนี้มาใช้เป็นเปลือกหุ้มของไวรัส (Dea et al., 2000)

### 3. พยาธิวิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

#### 3.1 พยาธิวิทยาของโรคพาร์อาร์เอส

ลักษณะการก่อโรคของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปที่พบจากการศึกษาในห้องทดลองนั้นมีความสอดคล้องกัน และโดยมากจะพบรอยโรคในระบบทางเดินหายใจเป็นหลักเช่นเดียวกัน แต่โดยทั่วไปจะพบว่าไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีความรุนแรงในการก่อโรคสูงกว่าสายพันธุ์ยุโรปซึ่งก่อให้เกิดรอยโรคน้อยมาก (Halbur et al., 1995) รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยาที่สำคัญที่พบหลังจากการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในสุกร ได้แก่ การเกิดภาวะปอดอักเสบแบบกระจายทั่วไป (diffuse pneumonia) และการบวมของต่อม

น้ำเหลืองที่ว่างกาย (Halbur et al., 1995; Rossow et al., 1995) นอกจากนี้อาจพบรอยโรคอื่นๆได้ด้วย เช่น การบวมน้ำบริเวณชั้นใต้ผิวหนัง และบริเวณเยื่อตาขาว เป็นต้น (Rossow et al., 1995) รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญ ได้แก่ ภาวะปอดอักเสบแบบหนาตัว (interstitial pneumonia) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในบริเวณเจอร์มินัลเซนเตอร์ (germinal center) ของต่อมน้ำเหลืองที่มีการบวมโต (Halbur et al., 1995; Rossow et al., 1995) รอยโรคที่ปอดนั้นอาจคงอยู่ได้ยาวนานจนถึงช่วงประมาณ 10 – 21 วันหลังได้รับเชื้อ หรืออาจพบได้ยาวนานมากกว่า 1 เดือน ทั้งนี้ขึ้นกับไวรัสที่นำมาศึกษา

### 3.2 การติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมกับเชื้อก่อโรคอื่นๆ

การติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสเพียงอย่างเดียวนั้นโดยมากจะไม่ทำให้เกิดรอยโรคที่รุนแรงมากนัก (ยกเว้นในบางไอโซเลท) แต่หากมีการติดเชื้อแทรกซ้อนก็อาจทำให้มีความรุนแรงของโรคเพิ่มสูงขึ้นได้ ดังเช่นที่พบในการศึกษาการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัสพาร์อาร์เอสและเชื้อก่อโรคอื่นๆ ทั้งไวรัสและแบคทีเรีย เช่น เซอร์โคไวรัสชนิดที่ 2 (Harms et al., 2001) *Streptococcus suis* (Thanawongnuwech et al., 2000) *Salmonella choleraesuis* (Wills et al., 2000) *Mycoplasma hyopneumoniae* (Thanawongnuwech et al., 2004b)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคที่สูงขึ้นในกรณีติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมกับเชื้อไวรัสอื่นๆ นั้นยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน แต่จากหลักฐานต่างๆ ที่พบคาดว่าเกี่ยวข้องกับการที่ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อร่วมกันและอาจเกี่ยวข้องกับการกดภูมิคุ้มกัน (Shi et al., 2008)

การเพิ่มความรุนแรงในกรณีการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมกับแบคทีเรียต่างๆ นั้นแม้จะยังไม่มีคำอธิบายที่แน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด แต่ในปัจจุบันมีหลักฐานจำนวนหนึ่งที่บ่งบอกว่าความรุนแรงที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) และไลโปเทอิคอิก (lipoteichoic, LTA) (ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกตามลำดับ) ของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส (van Gucht et al., 2004) เช่น พบการเพิ่มการสร้างอินเตอร์ลิวคิน (interleukin, IL) 1 $\beta$  ของเซลล์มาโครฟาจบริเวณถุงลมจากสุกรที่ติดเชื้อเมื่อได้รับ LTA (เปรียบเทียบกับ การตอบสนองต่อ LTA ของเซลล์มาโครฟาจ บริเวณถุงลมจากสุกรที่ไม่ติดเชื้อ), พบการเพิ่มการสร้าง IL-6 ของ PBMC จากสุกรที่ติดเชื้อเมื่อได้รับ LPS และเมื่อได้รับ LTA และพบการเพิ่มขึ้นของ IL-1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  ในน้ำล้างปอดของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสร่วมกับการได้รับ LPS เป็นต้น ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบทั้งสิ้น ดังนั้นหากมีการสร้างขึ้นใน

ระดับที่สูงเกินไปก็อาจทำให้เกิดพยาธิสภาพขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรที่ได้รับไวรัสพีอาร์อาร์เอสพร้อมกับ LPS นั้นจะมีอาการทางระบบทางเดินหายใจที่รุนแรงกว่าสุกรที่ได้รับไวรัสหรือ LPS เพียงอย่างเดียว

สาเหตุที่ทำให้ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อ LPS ได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ TLR4, CD14 และ LPS ไบนดิงโปรตีน (van Gucht et al., 2004) ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยจากการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ CD14 และ LPS ไบนดิงโปรตีนในปอดเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ซึ่งส่วนหนึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการรวมกลุ่มของเซลล์ CD14<sup>+</sup> โมโนไซต์ที่บริเวณปอดภายหลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (van Gucht et al., 2004) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนแล้วจะมีผลทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่รุนแรงมากขึ้นจนอาจทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ตามมาได้

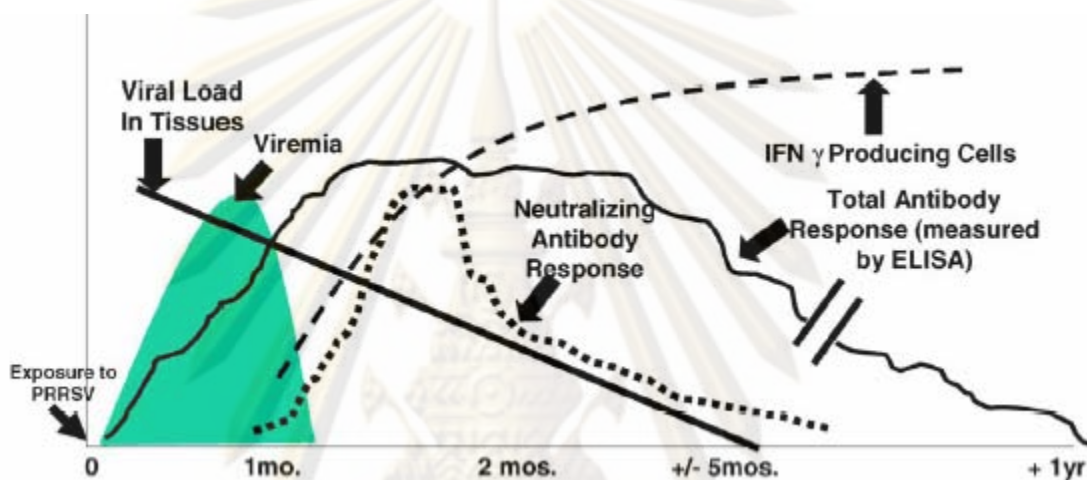
อย่างไรก็ตามการเพิ่มการตอบสนองต่อ LPS และ LTA นี้จะเป็นสาเหตุหลักสำคัญที่ทำให้การติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสพร้อมกับแบคทีเรียอื่นๆ นั้นมีความรุนแรงของโรคที่เพิ่มสูงขึ้นหรือไม่นั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

สาเหตุสำคัญอื่นๆ ที่อาจส่งผลให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสามารถเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่ายและรุนแรงขึ้นโดยมิได้จำเพาะต่อประเภทของเชื้อก่อโรคนั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการที่เซลล์ PAM ที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสจะมีประสิทธิภาพในการทำลายสิ่งแปลกปลอมลดลง (Thanawongnuwech et al., 1997) รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ PAM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ PAM เกิดการตายแบบอะปอพอโตซิส (apoptosis) ได้ (Costers et al., 2008) นอกจากนี้การติดเชื้อแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากการที่เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IL-10 ซึ่งมีความสามารถในการกดภูมิคุ้มกันด้วยก็เป็นได้ (Pampusch et al., 1998; Thanawongnuwech et al., 2001; Johnsen et al., 2002; Suradhat and Thanawongnuwech, 2003; Suradhat et al., 2003)

### 3.3 วิถีภูมิคุ้มกันของโรคพีอาร์อาร์เอส

ภาพรวมของการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของสุกรต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (ภาพที่ 3) มีลักษณะเด่น คือ เมื่อสุกรได้รับไวรัสแล้วจะมีการแพร่กระจายของไวรัสในกระแสเลือดที่ค่อนข้างยาวนานมาก คือประมาณ 3 (Batista et al., 2004) ถึง 6 สัปดาห์ (Wills et al., 1997) ในช่วงนี้แม้จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้แต่แอนติบอดีเหล่านี้

ไม่ได้มีคุณสมบัติเป็นนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีและไม่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัสในกระแสเลือดที่เกิดขึ้นได้ ระดับของนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีนั้นจะเริ่มตรวจพบในช่วงประมาณ 3 – 4 สัปดาห์ (Batista et al., 2004) ซึ่งเป็นช่วงที่การแพร่กระจายของไวรัสในกระแสเลือดเริ่มลดต่ำลง หรือสิ้นสุดลงแล้ว (Nilubol et al., 2004) ระดับของนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีที่พบนั้นจะมีความสอดคล้องกับระดับของเซลล์ที่สร้างอินเตอร์เฟียรอน (interferon, IFN)  $\gamma$  (Lopez and Osorio, 2004)



ภาพที่ 3 การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของสุกรต่อไวรัสพาร์อาร์เอส (Lopez and Osorio, 2004)

สุกรส่วนใหญ่เมื่อได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสได้ในช่วงประมาณ 14 วันหลังได้รับไวรัส (Yoon et al., 1995; Batista et al., 2004; Molina et al., 2008) หรือสุกรบางตัวอาจตอบสนองได้เร็วกว่าทำให้สามารถตรวจพบแอนติบอดีนี้ได้ตั้งแต่ 5 – 7 วันหลังได้รับไวรัส (Yoon et al., 1995) อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่พบในช่วงนี้โดยมากจะไม่สามารถใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแต่อย่างใด (Yoon et al., 1994; Labarque et al., 2000) แอนติบอดีเหล่านี้สามารถตรวจพบได้โดยวิธีอีไลซา (ELISA) เอฟเอ (FA) หรือไอพีเอ็มเอ (IPMA) อย่างไรก็ตามซีรั่มที่ได้จากสุกรในช่วงแรกของการติดเชื้อนี้ (ประมาณ 3 สัปดาห์หลังได้รับไวรัส) ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยานิวทรอลไลซิงได้ (Yoon et al., 1994) นั่นคือแอนติบอดีที่ตรวจพบในช่วงแรกของการติดเชื้อนั้นไม่มีคุณสมบัติเป็นนิวทรอลไลซิงแอนติบอดี

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตามชนิดของไอจี (immunoglobulin, Ig) พบว่า ไอจีเอ็ม (IgM) มีการตอบสนองเร็วที่สุด โดยสามารถตรวจพบ ไอจีเอ็มที่จำเพาะต่อไวรัสได้ตั้งแต่ 5 – 7 วันหลังได้รับไวรัส (Joo et al., 1997) และไอจีเอ็มนี้จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่สูงที่สุดที่ประมาณ 14 วันหลังได้รับเชื้อ จากนั้นจึงลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ประมาณ 21 – 42 วันหลังได้รับเชื้อ (Loemba et al., 1996; Joo et al., 1997) ในกรณีของ IgG นั้นสามารถตรวจพบได้ช้ากว่า IgM โดยเริ่มตรวจพบที่ 7 – 10 วันหลังได้รับเชื้อ (Nelson et al., 1994) แล้วจึงเพิ่มจนถึงระดับสูงสุดที่ช่วงประมาณ 14 – 49 วันหลังได้รับเชื้อ (Nelson et al., 1994; Loemba et al., 1996) หลังจากนั้นระดับของ IgG จะยังคงอยู่ในระดับสูงต่อไปเป็นเวลาหลายเดือน สุดท้ายจึงลดลงมาอยู่ในระดับต่ำที่ประมาณ 300 วันหลังได้รับเชื้อ (Nelson et al., 1994)

นิวทรอลไลซิงแอนติบอดีจะเริ่มตรวจพบได้ในช่วงประมาณ 21 -30 วันหลังได้รับเชื้อ หรือในสุกรบางตัวอาจพบได้เร็วกว่า คือประมาณ 14 วันหลังได้รับเชื้อ หลังจากนั้นระดับของนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งในการศึกษาหนึ่งพบว่านิวทรอลไลซิงแอนติบอดีสามารถขึ้นสูงสุดที่ระดับประมาณ 1:8 – 1:128 ที่ช่วงเวลาประมาณ 30 – 70 วันหลังได้รับเชื้อ และสุกรสามารถมีนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีคงอยู่ในระดับ 1:2 – 1:128 ได้นานถึง 135 วันหลังได้รับเชื้อ (สิ้นสุดการทดลองที่ 135 วันหลังได้รับเชื้อ) (Batista et al., 2004; Lopez and Osorio, 2004)

การพบนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีที่ค่อนข้างล่าช้า นั้นมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาเกี่ยวกับระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนจีพี 5 แม้ว่าโปรตีนจีพี 5 จะมีความสำคัญต่อการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของไวรัสพีอาร์อาร์เอสและโปรตีนจีพี 5 นี้ยังเป็นเป้าหมายสำคัญในการสร้างนิวทรอลไลซิงแอนติบอดีต่อไวรัสดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตามสุกรมีการสร้างแอนติบอดีต่อส่วนที่เป็นเอกโตโดเมนของโปรตีนจีพี 5 (ซึ่งมีส่วนที่คาดว่านิวทรอลไลซิงอีพีโทปอยู่) ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนอื่นของไวรัส (Mulupuri et al., 2008)

จากการศึกษาที่ผ่านมา (Mulupuri et al., 2008) พบว่า IgM ที่จำเพาะกับส่วนเอกโตโดเมนของโปรตีนจีพี 5 นั้นขึ้นสูงสุดที่ช่วง 28 – 35 วันหลังได้รับเชื้อ ในขณะที่ IgM ที่จำเพาะกับโปรตีนเอ็นและเอ็นเอสพี 2 นั้นขึ้นสูงสุดที่ช่วง 7 วันหลังได้รับเชื้อ นอกจากนี้ IgG ที่จำเพาะกับส่วนเอกโตโดเมนของโปรตีนจีพี 5 นั้นก็มีการเพิ่มขึ้นที่ช้ากว่าโปรตีนอื่นๆ ของไวรัสเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการที่สุกรสามารถกำจัดไวรัสพีอาร์อาร์เอสออกจาก

ร่างกายได้ยาก ดังจะเห็นได้จากการมีไวรัสในกระแสเลือดที่ค่อนข้างยาวนาน อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการมีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อส่วนเอกโตโดเมนของโปรตีนจีพี 5 ที่ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีคำตอบที่แน่ชัดว่าจะอะไรคือปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดเหตุการณ์เช่นนี้

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นส่วนใหญ่จะพบมีไวรัสในกระแสเลือดได้จนถึงประมาณ 3 (Batista et al., 2004) ถึง 6 สัปดาห์ (Wills et al., 1997) หลังได้รับไวรัส แต่ภายหลังจากที่สุกรกำจัดไวรัสออกจากกระแสเลือดได้แล้ว ไวรัวยังคงสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทน (persistent infection) ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้อีก โดยเฉพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ทำให้สามารถตรวจพบไวรัสในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของสุกรได้นานกว่า 4 เดือนหลังได้รับเชื้ออีกด้วย (Wills et al., 1997; Batista et al., 2004)

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของสุกรและความสามารถในการเกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทนของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นปัจจุบันยังมีข้อมูลที่ขัดแย้งกันอยู่ โดยในบางการศึกษาพบว่าสุกรอายุน้อยจะมีแนวโน้มในการเกิดการติดเชื้อแบบติดทนได้ยาวนานกว่าสุกรโตเต็มวัย (Bierk et al., 2001; Batista et al., 2002) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสุกรหย่านมสามารถมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทนได้ยาวนานจนถึง 157 วันหลังได้รับไวรัส ในขณะที่สุกรโตเต็มวัยนั้นจะพบมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทนจนถึงประมาณ 42 – 86 วันหลังได้รับเชื้อเท่านั้น อย่างไรก็ตามบางการศึกษาก็พบว่าสุกรโตเต็มวัยสามารถมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทนได้ยาวนานกว่า 135 วัน (Batista et al., 2004) ความแตกต่างของผลการศึกษาทั้ง 2 กลุ่มนี้ส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบนั้นมีความแตกต่างกัน โดยมีความเป็นไปได้ว่าสุกรโตเต็มวัยนั้นสามารถมีการติดเชื้อแบบแฝงติดทนที่ยาวนานได้เช่นกัน แต่จะเกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองเป็นหลัก

### 3.4 การรบกวนระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ปัจจุบันมีหลักฐานจำนวนหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสามารถปรับเปลี่ยนหรือหลบเลี่ยงการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันบางอย่างของสุกรได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเกิดขึ้นได้ค่อนข้างช้าหรือเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าที่ควร และทำให้ไวรัสสามารถอยู่ในร่างกายสุกรได้เป็นระยะเวลาอันยาวนาน รวมถึงมีผลทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ง่ายและมีความรุนแรงมากขึ้นดังที่ได้กล่าวมาแล้วด้วย

ในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้น สุกรจะมีการสร้างไซโตไคน์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ต่างๆ ออกมาน้อยมาก โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์ยุโรปนั้นสามารถ

พบ TNF- $\alpha$  และ IFN ชนิดที่ 1 ในน้ำล้างปอดของสุกรได้น้อยมาก ในขณะที่ระดับของ IL-1 นั้นมีอยู่ในระดับหนึ่ง (41 – 335 U) ไซโตไคน์ 3 ชนิดนี้เป็นไซโตไคน์ที่มักพบว่ามีการสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการติดเชื้อไวรัสที่บริเวณปอด และมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่างๆ แต่ถ้ามีในระดับที่สูงเกินไปก็อาจเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพได้เช่นกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการมีไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ IFN ชนิดที่ 1 ในระดับต่ำนั้นส่งผลให้การติดเชื้อไวรัสพิวอาร์เอส (โดยเฉพาะ LV) เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อบริเวณปอดได้ไม่รุนแรงมากนัก (กรณีที่ไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน) (van Reeth et al., 1999) อย่างไรก็ตามการมีไซโตไคน์เหล่านี้ในระดับต่ำนั้นก็อาจส่งผลให้การกำจัดไวรัสเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าที่ควรเช่นกัน

แม้ว่าในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสพิวอาร์เอส ไวรัสจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น TNF- $\alpha$  และ IFN ชนิดที่ 1 ได้ไม่ได้นัก แต่การเกิดการหนาตัวของผนังถุงลมของปอด (interstitial pneumonia) ภายหลังการติดเชื้อนั้นอาจอธิบายได้จากการที่เชื้อไวรัสพิวอาร์เอสนั้นยังคงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IL-1 ได้ ซึ่ง IL-1 นี้เป็นไซโตไคน์สำคัญที่ใช้ในสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการดึงดูดโมโนไซต์ (van Reeth et al., 1999)

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพิวอาร์เอสสามารถสร้างเซลล์หรือโมเลกุลที่มีความสำคัญในการกำจัดไวรัสออกจากร่างกายได้ค่อนข้างช้า เช่นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่จำเพาะต่อไวรัสพิวอาร์เอส (เริ่มพบการเพิ่มจำนวนที่ประมาณ 4 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ) เซลล์ลิมโฟไซต์ที่หลั่ง IFN $\gamma$  (พบในระดับที่ค่อนข้างต่ำในช่วงประมาณ 10 สัปดาห์แรกของการติดเชื้อ) อินเตอร์เฟียรอนชนิดที่ 1 และนิวทรอฟิลซึ่งแอนติบอดีต่อไวรัสพิวอาร์เอส (เริ่มพบในช่วง 3 – 4 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ) (Lopez and Osorio, 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายังมีหลายปัจจัยที่อาจเป็นสาเหตุให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพิวอาร์เอสสามารถสร้างเซลล์หรือโมเลกุลที่มีความสำคัญในการกำจัดไวรัสออกจากร่างกายได้ค่อนข้างช้า เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเรกูลาตอรีเซลล์ชนิด Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg โดยเดนดริติกเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสพิวอาร์เอส ซึ่งอาจทำให้เกิดความล่าช้าในการสร้างเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสพิวอาร์เอส (Silva-Campa et al., 2009) การมีดีคอย (decoy) อีพิโทปบนโปรตีนจีพี 5 ซึ่งอาจทำให้เกิดการแย่งการสร้างแอนติบอดีกับนิวทรอฟิลซึ่งอีพิโทป และทำให้แอนติบอดีที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ๆนั้นมีความจำเพาะต่ออีพิโทปนี้แต่มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อนิวทรอฟิลซึ่งอีพิโทปน้อยมาก และการเกิดไกลโคซิเลชันในบริเวณที่เป็นนิวทรอฟิลซึ่งอีพิโทปหรือในบริเวณใกล้เคียง (Ostrowski et al., 2002) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่สามารถระบุ

ได้ว่าแต่ละปัจจัยนั้นมีความสำคัญมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้สูงที่ไวรัสนั้นอาจใช้กลไกในการปรับเปลี่ยนหรือหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันของสุกรมากกว่า 1 วิธี

#### 4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพาร์อาร์เอส

ไวรัสพาร์อาร์เอสจัดเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก ไม่ว่าจะพิจารณาจากไวรัสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์หรือพิจารณาจากไวรัสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกัน นั่นคือ แม้ว่าจะเป็นไวรัสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (หรือสายพันธุ์ยุโรป) เหมือนกันก็อาจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันเป็นอย่างมากได้

ไวรัสต้นแบบของทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ (VR2332 และ LV) มีความเหมือนกันของจีโนมร้อยละ 60 - 63 (Allende et al., 1999) และเมื่อพิจารณาจากไวรัสหลายๆ สายพันธุ์พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีความเหมือนกันของจีโนมอยู่ในช่วงร้อยละ 64 - 67 ซึ่งถือว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันสูงมาก เมื่อพิจารณาไวรัสที่จัดอยู่ในชนิดเดียวกันก็ยังคงพบว่าจีโนมของไวรัสมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยจีโนมของไวรัสที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือด้วยกันส่วนใหญ่จะมีความเหมือนกันในช่วงร้อยละ 87 - 95 และเมื่อเปรียบเทียบแยกตามโออาร์เอฟพบว่าโออาร์เอฟ 2 - โออาร์เอฟ 7 มีความเหมือนกันของกรดอะมิโนในช่วงร้อยละ 91 - 99 ร้อยละ 86 - 98 ร้อยละ 89 - 99 ร้อยละ 83 - 99 ร้อยละ 98 - 100 และร้อยละ 95 - 100 ตามลำดับ (Meng et al., 1995b; Gao et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2004a) จะเห็นได้ว่าในส่วนของโปรตีนโครงสร้างนั้น โปรตีนจีพี 5 เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนจีพี 5 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างนิวทรอลไลซิงแอนติบอดี ส่วนการศึกษาในโออาร์เอฟ 1 ยังมีไม่มากนักแต่ก็พบว่าในบรรดาโปรตีนจากโออาร์เอฟ 1 นั้น เอ็นเอสพี 2 เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดและอาจเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายที่สุดในบรรดาโปรตีนทั้งหมดของไวรัสพาร์อาร์เอส (Shen et al., 2000; Gao et al., 2004; Ropp et al., 2004; Han et al., 2006) กล่าวโดยสรุปคือไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมสูงมากโดยเฉพาะในส่วนของจีพี 5 และเอ็นเอสพี 2

ความสามารถในการก่อโรคของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ต่างๆ นั้นมีความหลากหลายค่อนข้างมาก (Meng, 2000) แต่ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุและอธิบายได้ว่าสาเหตุของความแตกต่างเหล่านี้เกิดจากยีนหรือโปรตีนใดเป็นหลัก ในหลายการศึกษาพบว่าไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ที่ต่างกันนอกจากจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันแล้วยังมีการแสดงออกในด้านต่างๆ ที่แตกต่างกันด้วย เช่น ความสามารถในการก่อรอยโรคที่ปอด ความสามารถในการก่อรอยโรคที่ระบบประสาท ความสามารถในการก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ หรือ



ความสามารถในการเกิดการติดเชื้อแบบแฝงติดทน (persistent infection) เป็นต้น ดังนั้นจึงทำให้มีการพยายามค้นหาว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของไวรัสส่งผลต่อการก่อโรคอย่างไร และยีนใดมีความสำคัญต่อการก่อโรคแบบต่างๆ ของไวรัส ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญทางด้านระบาดวิทยา การศึกษาที่ผ่านมาโดยมากจะให้ความสำคัญกับโปรตีนโครงสร้างเป็นหลักโดยโปรตีนโครงสร้างที่มีการศึกษาและให้ความสำคัญมากได้แก่ โปรตีนจีพี 5 โปรตีนเอ็นและโปรตีนอี (Verheije et al., 2002; Rowland et al., 2003; Rowland and Yoo, 2003; Plagemann, 2004; Lee et al., 2006; Lee and Yoo, 2006) ซึ่งแม้จะมีการค้นพบความสำคัญต่างๆ เกี่ยวกับโปรตีนเหล่านี้ เช่น โปรตีนจีพี 5 มีความสำคัญเกี่ยวกับนิวทรอลไลซิงแอนติบอดี โดยพบว่านิวทรอลไลซิงแอนติบอดีส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะกับจีพี 5 โดยเฉพาะบริเวณตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 37 – 44 ซึ่งถือเป็นนิวทรอลไลซิงอีพิโทปที่สำคัญ โปรตีนเอ็นมีความสำคัญทางการตรวจวินิจฉัยด้านซีรัมวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีนเอ็นได้เร็ว และยังเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างอาร์เอ็นเอของไวรัสด้วยอีก และโปรตีนอีเป็นโปรตีนที่คาดว่าทำหน้าที่คล้ายเป็นไอออนแชนแนลซึ่งมีความสำคัญต่อการปล่อยอาร์เอ็นเอของไวรัสออกจากอนุภาคของไวรัส อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีคำตอบที่น่าพึงพอใจนักว่าลักษณะพันธุกรรมของโปรตีนโครงสร้างเหล่านี้ส่งผลต่อลักษณะการแสดงออกของไวรัสอย่างไร

สาเหตุหลักที่ทำให้การค้นหาและอธิบายกลไกของความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะการก่อโรคของไวรัสทำได้ลำบากนั้นอาจเนื่องมาจากความสามารถในการก่อโรคของไวรัสไม่จำเป็นต้องขึ้นกับยีนเพียงยีนเดียว และระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม (เช่น ร้อยละของความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนหรือนิวคลีโอไทด์) จะมีความสำคัญหรือไม่นั้น อาจต้องพิจารณาควบคู่ไปกับตำแหน่งที่เกิดความแตกต่างด้วย ดังจะเห็นได้จากกรณีของไวรัสแอลซีเอ็มวี (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) ซึ่งเป็นไวรัสในหนู โดยพบว่าการกลายของกรดอะมิโนเพียง 2 ตัวที่ตำแหน่งที่จำเพาะบนโปรตีนของไวรัสสามารถส่งผลทำให้ไวรัสเปลี่ยนจากลักษณะการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infection) เป็นการติดเชื้อแบบติดทน (Matloubian et al., 1993; Mueller et al., 2007)

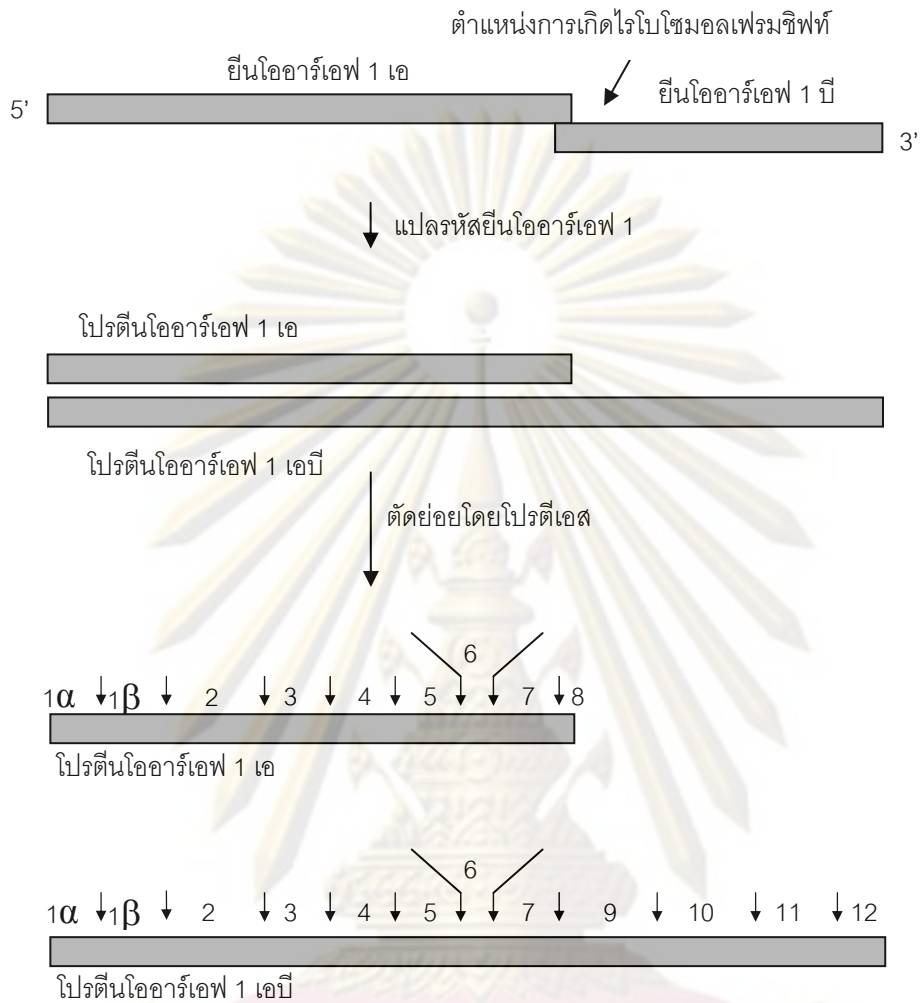
การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่มีไซโครโครงสร้างของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นยังมีการศึกษาไม่มากนัก เนื่องจากหลักฐานที่สำคัญที่บ่งบอกถึงความสำคัญของโปรตีนที่มีไซโครโครงสร้างต่อการก่อโรคของไวรัสนั้นเริ่มมีการค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ และหนึ่งในโปรตีนที่มีไซโครโครงสร้างที่ได้รับความสนใจมากที่สุด คือเอ็นเอสพี 2 ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นเป็นลำดับ

## 5. การสร้างโปรตีนเอ็นเอสพี 2 โดยไวรัสฟิอาร์อาร์เอส

โปรตีนของไวรัสฟิอาร์อาร์เอส (หรือไวรัสอื่นๆ) แบ่งตามหน้าที่ได้เป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่ โปรตีนโครงสร้างและโปรตีนที่มีไซโครสร้าง โปรตีนโครงสร้างคือโปรตีนส่วนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของไวรัส เช่น นิวคลีโอแคปซิดโปรตีน ส่วนโปรตีนที่มีไซโครสร้างคือโปรตีนที่ทำหน้าที่อื่นๆ ที่มิได้ประกอบเป็นโครงสร้างของไวรัส เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของไวรัส ความรู้เกี่ยวกับขั้นตอนในการสร้างหรือหน้าที่ต่างๆ ของโปรตีนที่มีไซโครสร้างของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสนั้นปัจจุบันยังมีไม่มากนัก โดยมากจะเป็นการอ้างอิงมาจากข้อมูลของไวรัสอีเอวีซึ่งถือเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสในวงศ์อาร์เทอร์วิรีดี

โปรตีนที่มีไซโครสร้างของไวรัสบางประเภท เช่น โปรตีนของไวรัสในกลุ่มอาร์เอ็นเอไวรัสสายบวก มีลักษณะที่สำคัญคือโปรตีนเหล่านี้จะสามารถทำหน้าที่ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องก็ต่อเมื่อถูกตัดย่อยเป็นโปรตีนขนาดเล็กลงมาจากโปรตีนเริ่มต้นเดิมเสียก่อน ในกรณีของไวรัสฟิอาร์อาร์เอส เชื่อว่าโปรตีนที่มีไซโครสร้างเริ่มแรกจะสร้างออกมาในลักษณะของโพลีเปปไทด์สายยาว 2 เพียงเส้นเท่านั้น ต่อมาโพลีเปปไทด์ 2 เส้นนี้จะถูกตัดย่อยออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยที่มีขนาดเล็กลงมาจากจำนวนทั้งสิ้น 13 ส่วน ซึ่งได้แก่ เอ็นเอสพี 1 แอลฟา, เอ็นเอสพี 1 เบต้า และ เอ็นเอสพี 2 – เอ็นเอสพี 12 ซึ่งโปรตีนทั้ง 13 ตัวนี้จะไปทำหน้าที่ต่างๆ ที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของไวรัสต่อไป

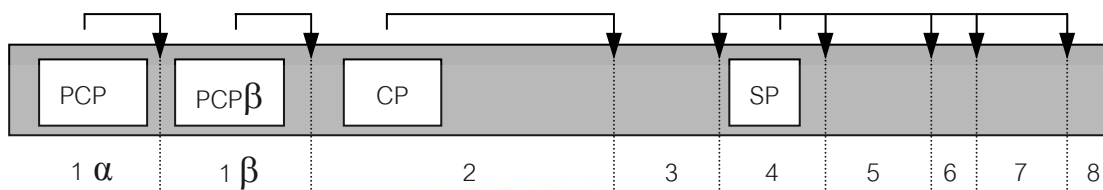
การสร้างโปรตีนที่มีไซโครสร้างของไวรัสในกลุ่มอาร์เทอร์ไวรัสเริ่มขึ้นเมื่อไวรัสมีการแปลรหัสยีนส่วนโออาร์เอฟ 1 เอ ทำให้ได้เป็นโปรตีนเริ่มต้น 2 ชนิด คือโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ และโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอบี (โปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอบี ได้มาจากกระบวนการไรโบโซมอลเฟรมชิฟท์ที่รอยต่อของโออาร์เอฟ 1 เอ และโออาร์เอฟ 1 บี) (den Boon et al., 1991) (ภาพที่ 4) ต่อมาโปรตีนทั้ง 2 นี้จะถูกตัดย่อยต่อโดยโปรตีเอสที่อยู่บนโปรตีนทั้ง 2 เอง ทำให้สุดท้ายได้เป็นโปรตีนที่มีไซโครสร้าง (เอ็นเอสพี) ทั้ง 13 ชนิด ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (Snijder et al., 1992; Snijder et al., 1994; van Dinten et al., 1996)



**ภาพที่ 4** ขั้นตอนการสร้างโปรตีนที่มีไซโครสร้างของไวรัสพีอาร์อาร์เอส เริ่มจากการแปลรหัสยีนไออาร์เอฟ 1 ได้เป็นโปรตีนไออาร์เอฟ 1 เอ ซึ่งในขณะที่มีการแปลรหัสยีนไออาร์เอฟ 1 เอ ในบางครั้งจะเกิดโรโบโซมอลเฟรมชิฟท์ที่บริเวณรอยต่อของยีนไออาร์เอฟ 1 เอ และไออาร์เอฟ 1 บี ทำให้มีการแปลรหัสยีนส่วนไออาร์เอฟ 1 บี เพิ่มตามมาได้เป็นโปรตีนไออาร์เอฟ 1 บี และต่อมาโปรตีนทั้ง 2 นี้จะถูกตัดย่อยโดยโปรตีเอสซึ่งอยู่บนโปรตีนไออาร์เอฟ 1 เอ ทำให้ได้เป็นเอ็นเอสพี 1 แอลฟา, เอ็นเอสพี 1 เบต้า และเอ็นเอสพี 2 – เอ็นเอสพี 12 ตำแหน่งการตัดย่อยแสดงโดยลูกศร (↓) (ดัดแปลงจาก van Dinten et al., 2000)

ตำแหน่งการตัดโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ และโออาร์เอฟ 1 เอบี ด้วยโปรตีเอสของไวรัสพาร์อาร์เอสเพื่อให้ได้เป็นโปรตีนเอ็นเอสพีต่างๆ นั้นปัจจุบันยังไม่มีที่ยืนยันว่าคือตำแหน่งใดบ้าง ข้อมูลส่วนใหญ่มาจากการศึกษาการตัดย่อยของโปรตีนของไวรัสอีเอวีร่วมไปกับการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทั้ง 2 (Snijder et al., 1992; Snijder et al., 1994; van Dinten et al., 1996)

บริเวณที่คาดว่าทำหน้าที่เป็นโปรตีเอสบนโปรตีนโออาร์เอฟ 1 ของไวรัสพาร์อาร์เอสมีทั้งสิ้น 4 แห่ง (ภาพที่ 5) คือ ปาเปนไลค์ซิสตีนโปรตีเอสแอลฟา (papain - like cysteine protease  $\alpha$ , PCP $\alpha$ ), ปาเปนไลค์ซิสตีนโปรตีเอสเบต้า (PCP $\beta$ ), ซิสตีนโปรตีเอส (cystein protease, CP) และเซอรินโปรตีเอส (serine protease, SP) ตำแหน่งของปาเปนไลค์ซิสตีนโปรตีเอสแอลฟาอยู่บริเวณด้านปลายอะมิโนของเอ็นเอสพี 1 มีหน้าที่ในการตัดที่ตำแหน่งระหว่างเอ็นเอสพี 1 แอลฟาและเอ็นเอสพี 1 เบต้า (เอ็นเอสพี 1 แอลฟา/1 เบต้า) โดยคาดว่าตัดระหว่างกรดอะมิโนโพรลีน (P) ที่ตำแหน่ง 165 และกรดอะมิโนกลูตามีน (Q) ที่ตำแหน่ง 166 (165P/Q) (เริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 1 ของ VR2332) ตำแหน่งของปาเปนไลค์ซิสตีนโปรตีเอสเบต้าอยู่ที่บริเวณด้านปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนเอ็นเอสพี 1 มีหน้าที่ในการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 1 เบต้า/2 ซึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนเอ็นเอสพี 1 เบต้าแยกออกจากโปรตีนเอ็นเอสพี 2 การตัดของปาเปนไลค์ซิสตีนโปรตีเอสเบตานั้นคาดว่าตัดระหว่างกรดอะมิโนไทโรซีนและไกลซีนที่ตำแหน่ง 382Y/G (Ziebuhr et al., 2000) ตำแหน่งของซิสตีนโปรตีเอสอยู่ที่บริเวณด้านปลายอะมิโนของโปรตีนเอ็นเอสพี 2 มีหน้าที่ในการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 ซึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนเอ็นเอสพี 2 แยกออกจากโปรตีนเอ็นเอสพี 3 แต่ปัจจุบันยังไม่มีที่ยืนยันตำแหน่งการตัดที่แท้จริงว่าอยู่ระหว่างกรดอะมิโนใด (Allende et al., 1999; Ziebuhr et al., 2000) ซึ่งหมายความว่าปัจจุบันยังไม่ทราบขนาดที่แท้จริงของโปรตีนเอ็นเอสพี 2 นั้นเอง ตำแหน่งของเซอรินโปรตีเอสอยู่ที่บริเวณของโปรตีนเอ็นเอสพี 4 และมีหน้าที่ในการตัดที่ตำแหน่งต่างๆ ที่เหลือบนโปรตีนโออาร์เอฟ 1a และโออาร์เอฟ 1ab เพื่อให้ได้เป็นโปรตีนเอ็นเอสพีทั้ง 13 ตัว อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงตำแหน่งในการตัดที่แน่นอนของเซอรินโปรตีเอสของไวรัสพาร์อาร์เอสแต่อย่างใด



**ภาพที่ 5** แผนผังโดยสังเขปของการตัดย่อยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ ของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสโดยโปรตีเอสของไวรัส กล่องสี่เหลี่ยมสีเทาด้านนอกแสดงโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ กล่องสี่เหลี่ยมสีขาวด้านในแสดงส่วนที่คาดว่าเป็นโปรตีเอสต่างๆ บนโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ ลูกศรและจุดประแสงตำแหน่งการตัดของโปรตีเอสต่างๆ หมายเลขบริเวณด้านล่างกล่องสี่เหลี่ยมแสดงเอ็นเอสพีแต่ละตัว (ดัดแปลงจาก Han et al., 2007)

ปัจจุบันยังไม่มีที่ยืนยันตำแหน่งและขอบเขตที่แน่นอนของซีสตีนโปรตีเอสบนเอ็นเอสพี 2 รวมถึงกรดอะมิโนที่ใช้ในการตัดโปรตีนของซีสตีนโปรตีเอสของไวรัสพรีอาร์อาร์เอส แต่จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสอีเอวี ทำให้คาดว่าซีสตีนโปรตีเอสของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสมีขนาดประมาณ 100 กรดอะมิโน โดยเริ่มจากกรดอะมิโน Y47 จนถึง C147 (เริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332) (Snijder et al., 1995) (ภาพที่ 6) และคาดว่ามีความสำคัญในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 อยู่ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกรดอะมิโนที่คาดว่าเป็นคะตะไลต์ติคดาวย์แอด (catalytic dyad) ของซีสตีนโปรตีเอส ได้แก่ C55 และ H124 และกลุ่มที่ 2 คือกรดอะมิโนที่คาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของซิงค์ฟิงเกอร์ (zinc finger) ได้แก่ C111 C142 และ C147 (Snijder et al., 1995; Ziebuhr et al., 2000; Han et al., 2006)

ที่มาของกรดอะมิโนทั้ง 5 นี้มาจากการศึกษาในไวรัสอีเอวี ซึ่งพบว่ากรดอะมิโน C270 C319 H332 C349 และ C354 (เริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 1 ของไวรัสอีเอวี) มีความสำคัญต่อการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 เป็นอย่างมาก หากมีการกลายของกรดอะมิโนตัวหนึ่งตัวใดจะทำให้ไม่เกิดการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 (Snijder et al., 1995) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสต่างๆ พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 5 นี้มีความอนุรักษ์ในกลุ่มอาร์เทอร์ริไวรัสด้วย (ภาพที่ 6) จึงเป็นที่น่าสนใจว่ากรดอะมิโนทั้ง 5 นี้จะมีความสำคัญในไวรัสพรีอาร์อาร์เอสหรือไวรัสตัวอื่นๆ ในกลุ่มอาร์เทอร์ริไวรัสเช่นเดียวกับในไวรัสอีเอวีหรือไม่ (Snijder et al., 1995; Ziebuhr et al., 2000; Han et al., 2006)

LDV : 382	YSPPGDGACGLHCISAIINDIFGDALCTKLTNCSRDSSEWLSQDQMYQLVM-TARLPATL	440
LV : 421	YSPPTDGCSCGWHVLAAIMNRMINGDFTSPLTQYNRPEDDWASDYDLVQAIQ-CLRLPATV	479
VR : 429	YSPPAEGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPDDWATDEDLVNAIQ-ILRLPAAL	487
EAV : 262	YNPPGDGACGYRCLAFMNGATVVSAGCS-----SDLWCDDELAYRVFQLSPTFTVTI	313
	* ** * +*	* *

LDV : 441	--GHCP SATYKLDCVNQHWTVTKRKGDRALGGLSPECVRGVC	480
LV : 480	VRNRACPNKYLIKLNQVHWEVEVRSQ-MAPRSL SRECVVGV	521
VR : 488	DRNGACTSAKYVLKLEGEHWTVTVTPG-MSPSLLPLECVQGCC	529
EAV : 314	PGGRVCPNAKYAMICDKQHWRVKRAG--VGLCLDESCFRGIC	354
	+ * * +* * * * * + * +	

ภาพที่ 6 อไลน์เมนท์ของซิสตีนโปรตีนของอาร์เทอร์ไวรัส ไวรัสที่ใช้ได้แก่ ไวรัสแอลดีวี, ไวรัสพ็อร์อาร์เอส สายพันธุ์ LV, ไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์ VR2332 และไวรัสอีเอวี (แสดงในภาพด้วยสัญลักษณ์ LDV, LV, VR และ EAV ตามลำดับ) เครื่องหมายบวก (+) แสดงตำแหน่งที่มีความสำคัญในการตัดย่อย และเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ (ดัดแปลงจาก Ziebuhr et al., 2000)

แม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่สามารถยืนยันความสามารถในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 ของส่วนที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนของไวรัสพ็อร์อาร์เอสได้ ซึ่งหมายความว่าตำแหน่งที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนนี้ (Y47 - C147) อาจมิใช่ตำแหน่งของซิสตีนโปรตีนที่แท้จริง แต่ก็พบว่าส่วนที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสามารถในการมีชีวิตอยู่ของไวรัส (Han et al., 2007) โดยพบว่าเมื่อทำการดัดแปลงพันธุกรรมของ VR2332 ทำให้เอ็นเอสพี 2 ของไวรัสเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 47 - 180 ซึ่งครอบคลุมส่วนที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนทั้งหมด จะมีผลทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงทำให้มีความเป็นไปได้มากขึ้นที่ส่วนที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนจะเป็นซิสตีนโปรตีนที่แท้จริงของไวรัสพ็อร์อาร์เอส อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษายืนยันต่อไปว่าตำแหน่งที่คาดว่าเป็นซิสตีนโปรตีนนี้มีความสำคัญต่อการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 2/3 หรือไม่ และตัดที่ตำแหน่งกรดอะมิโนใด

จุดตัดที่แน่นอนระหว่างเอ็นเอสพี 2/3 ของไวรัสพ็อร์อาร์เอสนั้นยังไม่มีการศึกษายืนยันว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด แต่จากการศึกษาเกี่ยวกับซิสตีนโปรตีนที่ผ่านมาพบว่าโดยมากซิสตีนโปรตีนจะทำการตัดระหว่างกรดอะมิโน G/G (Ziebuhr et al., 2000) ซึ่งในกรณีของไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือหลายสายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ยุโรปนั้นสามารถพบกรดอะมิโน G/G ที่มีความอนุรักษ์ได้ถึง 5 ตำแหน่ง ได้แก่ 647G/G 981G/G 1117G/G 1196G/G และ 1197G/G (เริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332) (Han et al., 2006) จึงมี

ความเป็นไปได้ว่าจุดตัดที่แท้จริงระหว่างเอ็นเอสพี 2/3 คือ 1 ใน 5 ตำแหน่งนี้ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันต่อไป อย่างไรก็ตามจุดตัดที่ตำแหน่ง 647G/G จะมีความเป็นไปได้น้อยที่สุดเนื่องจากหากมีการตัดที่ตำแหน่งนี้จะทำให้เอ็นเอสพี 2 ไม่มีส่วนที่คาดว่าเป็นไฮโดรโฟบิก ซึ่งปรากฏในเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอีเอวีและคาดว่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเอ็นเอสพี 2 เป็นอย่างมาก เนื่องจากยังไม่มีที่ยืนยันจุดตัดที่แน่นอนของเอ็นเอสพี 2/3 ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 อาจมีขนาด 1,941 2,943 3,351 3,588 หรือ 3,591 นิวคลีโอไทด์ก็เป็นได้ (Allende et al., 1999; Ziebuhr et al., 2000; Han et al., 2006)

การพิจารณาการตัดโปรตีนโดยโปรตีเอสเหล่านี้มีจุดที่ควรคำนึงคือตำแหน่งในการตัดจะขึ้นกับทั้งลำดับกรดอะมิโนและตำแหน่งของกรดอะมิโน ยกตัวอย่างเช่นในกรณีของไวรัสอีเอวี (Snijder et al., 1992) พบว่าจุดตัดระหว่างเอ็นเอสพี 1/2 คือ G/G ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน G260/G261 แต่ถ้ามีการกลายที่ตำแหน่ง G260 โดยเปลี่ยนจาก G เป็น V (G260 → V) จะทำให้เกิดการตัดที่ตำแหน่ง V260/G261 (ไม่จำเป็นต้องตัดที่ตำแหน่ง 260/261 เสมอไป) ดังนั้นถ้าเหตุการณ์ลักษณะนี้เกิดขึ้นจริงอาจทำให้ไม่มีการสร้างเอ็นเอสพี 2 เกิดขึ้น หรือปาเปโนไลคซิสตินโปรตีเอสอาจเปลี่ยนไปตัดที่ตำแหน่งอื่น นอกจากนี้ในการศึกษาเดิมนี้ยังพบว่าหากมีการกลายที่ตำแหน่ง G260 → A หรือ G261 → A โปรตีนที่ได้จะยังคงสามารถถูกตัดได้โดยปาเปโนไลคซิสตินโปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวคือจุดตัดระหว่างเอ็นเอสพี 1/2 ของไวรัสอีเอวีที่ตำแหน่ง 260/261 นี้อาจเป็นได้ทั้ง G/G A/G หรือ G/A เป็นต้น ดังนั้นการกลายที่ตำแหน่ง 260/261 อาจไม่จำเป็นต้องทำให้การตัดของปาเปโนไลคซิสตินโปรตีเอสเปลี่ยนไป กล่าวโดยสรุปคือ เมื่อมีการกลายเกิดขึ้นที่บริเวณโออาร์เอฟ 1 อาจเป็นการยากที่จะทำนายได้ว่าขอบเขตของเอ็นเอสพีต่างๆ ตลอดจนหน้าที่ต่างๆ ของเอ็นเอสพีจะยังคงเป็นเช่นเดิมหรือไม่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยข้อมูลจากการทดลองมาสนับสนุน

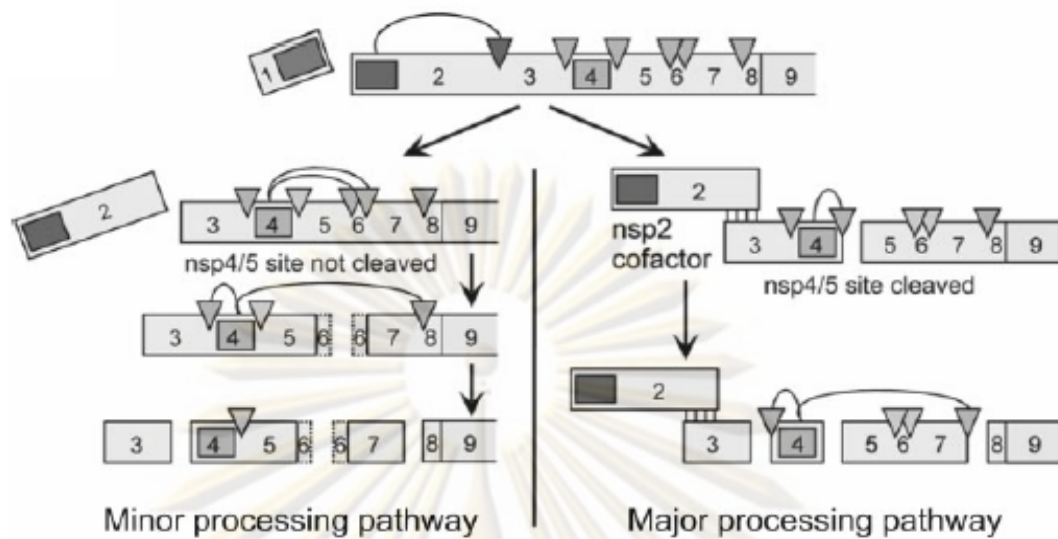
โปรตีนเอ็นเอสพี 2 มีความสำคัญต่อผลลัพธ์สุดท้ายของการตัดย่อยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ โดยโปรตีเอสอื่นๆ ของไวรัสอีเอวีเป็นอย่างมาก โดยจากการศึกษาพบว่าขั้นตอนการตัดย่อยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอของไวรัสอีเอวีเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะ คือ ในลักษณะที่เป็นกระบวนการหลักและกระบวนการรอง (Wassenaar et al., 1997) (ภาพที่ 7) ในขั้นต้นนั้นทั้ง 2 กระบวนการเริ่มต้นในลักษณะเดียวกันคือ ปาเปโนไลคซิสตินโปรตีเอสที่เอ็นเอสพี 1 ทำการตัดให้เอ็นเอสพี 1 แยกเป็นอิสระออกจากโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอที่เหลือ ต่อมาโปรตีนเอ็นเอสพี 2 จะแยกออกมาโดยการตัดของซิสตินโปรตีเอส (อยู่บนเอ็นเอสพี 2) ที่ตำแหน่งระหว่างเอ็นเอสพี 2/3 - 8 จากนั้นในสิ่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการหลัก คือ เอ็นเอสพี 2 จะจับกับเอ็นเอสพี 3 - 8 ที่บริเวณเอ็นเอสพี 3 ซึ่งเชื่อว่าในช่วงนี้เอ็นเอสพี 2 จะทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วมที่จะทำให้เซอร์ริน

โปรตีนเอสที่เอ็นเอสพี 4 สามารถตัดที่ตำแหน่งระหว่างเอ็นเอสพี 4/5 – 8 ได้ ทำให้เอ็นเอสพี 2 ที่จับอยู่กับเอ็นเอสพี 3 – 4 แยกออกจากเอ็นเอสพี 5 – 8 ต่อมาเซอรินโปรตีนเอสของเอ็นเอสพี 4 จะตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 3/4 และเอ็นเอสพี 5 – 7/8 ทำให้ผลลัพธ์สุดท้ายของการตัดย่อยโปรตีนด้วยกระบวนการหลักได้เป็นโปรตีน 4 แบบ คือ 1.) เอ็นเอสพี 2 ที่จับอยู่กับเอ็นเอสพี 3 2.) เอ็นเอสพี 4 อิศระ 3.) เอ็นเอสพี 5 – 7 และ 4.) เอ็นเอสพี 8 อิศระ สำหรับในกระบวนการรองสิ่งที่เกิดขึ้น คือ เอ็นเอสพี 2 ที่แยกออกมานั้นมิได้จับกับเอ็นเอสพี 3 – 8 และเซอรินโปรตีนเอสที่เอ็นเอสพี 4 จะตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 3 – 6/7 – 8 หรือเอ็นเอสพี 3 – 5/6 – 8 ต่อมาเซอรินโปรตีนเอสจะทำการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 3/4 ทำให้เอ็นเอสพี 3 หลุดออกเป็นอิศระและจึงตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 7/8 กล่าวโดยสรุปความแตกต่างของทั้ง 2 กระบวนการนี้คือ ถ้าเอ็นเอสพี 2 ที่หลุดออกมาในช่วงแรก จับกับเอ็นเอสพี 3 – 8 (กระบวนการหลัก) จะมีผลทำให้เซอรินโปรตีนเอสที่เอ็นเอสพี 4 สามารถตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 4/5 ได้ แต่จะไม่มี การตัดที่เอ็นเอสพี 6 ในทางตรงกันข้ามถ้าเอ็นเอสพี 2 ไม่จับเข้ากับเอ็นเอสพี 3 – 8 (กระบวนการรอง) การตัดที่เอ็นเอสพี 4/5 จะไม่เกิดขึ้นแต่จะมีการตัดที่เอ็นเอสพี 5/6 หรือเอ็นเอสพี 6/7 เกิดขึ้นแทน อย่างไรก็ตามเหตุการณ์ในลักษณะนี้จะเกิดกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสหรือไม่นั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

โดยปกติไวรัสจะตัดโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ (และด้านปลายอะมิโนของโออาร์เอฟ 1 เอบี) โดยใช้ทั้ง 2 กระบวนการ แต่ใช้กระบวนการหลักมากกว่ากระบวนการรอง อย่างไรก็ตามผลลัพธ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหลักและกระบวนการรองล้วนมีความสำคัญต่อการจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอของไวรัสทั้งคู่ ไม่สามารถขาดผลลัพธ์สุดท้ายของกระบวนการใดกระบวนการหนึ่งได้ (van Aken et al., 2006) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ทราบว่ากลไกหรือปัจจัยที่ทำให้เอ็นเอสพี 2 สามารถจับกับเอ็นเอสพี 3 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดย่อยแบบกระบวนการหลักตลอดจนความสำคัญของผลลัพธ์ที่ได้จากการตัดย่อยทั้ง 2 ลักษณะคือสิ่งใด

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 7 กระบวนการการตัดย่อยโปรตีนไออาร์เอฟ 1 โดย 2 กระบวนการของไวรัสอีเอวี หมายเลขของเอ็นเอสพีแต่ละตัวแสดงในรูปภาพ จุดตัดของโปรตีนเอสแต่ละตัวแสดงโดยลูกศรและหัวลูกศร ปาเปโนไลค์ซิสตีนโปรตีนเอส, ซิสตีนโปรตีนเอส และเซอร์รีนโปรตีนเอส แสดงโดยกล่องสี่เหลี่ยมภายในเอ็นเอสพี 1, 2 และ 4 ตามลำดับ ในกระบวนการหลักเอ็นเอสพี 2 จะจับกับเอ็นเอสพี 3 - 8 ช่วยให้เกิดการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 4/5 ส่วนในกระบวนการรองเอ็นเอสพี 2 ไม่จับกับเอ็นเอสพี 3 - 8 ทำให้เกิดการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 5/6 และเอ็นเอสพี 6/7 แทนการตัดที่ตำแหน่งเอ็นเอสพี 4/5 (ดัดแปลงจาก van Aken et al., 2006)

## 6. การเหนี่ยวนำให้เกิดถุงดีเอ็มวี (double membrane vesicle, DMV) โดยเอ็นเอสพี 2

อาร์เอ็นเอไวรัสประเภทสายบวกลหลายชนิดเมื่อเกิดกระบวนการการสร้างอาร์เอ็นเอ โปรตีนส่วนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสจะถูกติดเข้ากับเยื่อหุ้มของเซลล์เจ้าบ้าน และทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มนี้ให้เกิดเป็นบริเวณที่มีสถานะที่เหมาะสมกับกระบวนการถ่ายแบบจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอของไวรัส จากการศึกษาในไวรัสอีเอวี (van der Meer et al., 1998; Pedersen et al., 1999) พบว่าภายหลังที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายแล้วจะพบโครงสร้างถุงดีเอ็มวีซึ่งมีลักษณะเป็นถุงที่มีผนัง 2 ชั้น (ภาพที่ 8) เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมที่บริเวณรอบนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งคาดว่าถุงดีเอ็มวีนี้จะพัฒนามาจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมของเซลล์เจ้าบ้าน (ภาพที่ 8d)

ปัจจุบันความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็มวีและไวรัสในวงศ์อาร์เทอร์วิริดีได้รับการยืนยันในระดับหนึ่งเท่านั้น โดยคาดว่าดีเอ็มวีน่าจะมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเพิ่มจำนวน

ของไวรัส เนื่องจากในกรณีของไวรัสอีเอวีพบว่า เมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสแล้วจะสามารถตรวจพบกระบวนการการสร้างอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ที่ดีเอ็มวีนี้เป็นเพียงที่เดียวเท่านั้น (Pedersen et al., 1999)

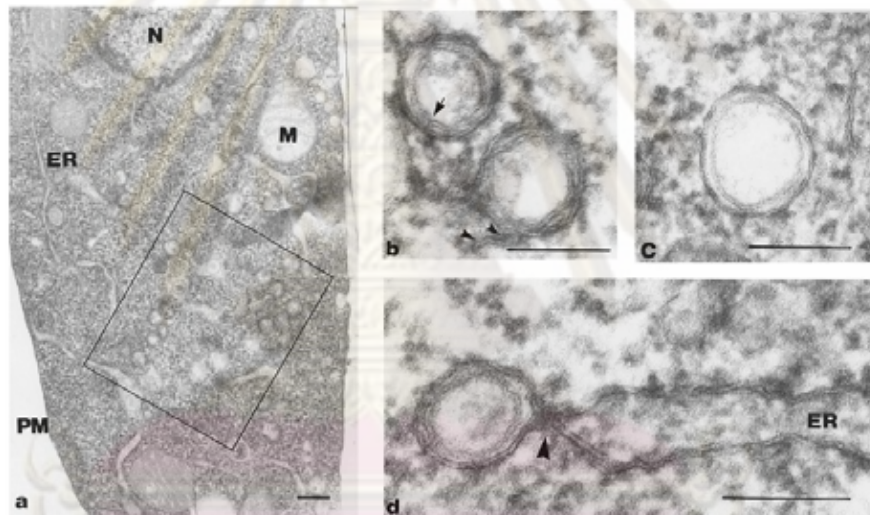
โปรตีนเอ็นเอสพี 2 ร่วมกับเอ็นเอสพี 3 ของไวรัสอีเอวีมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโครงสร้างดีเอ็มวี โดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์ปกติมีการสร้างโปรตีนเอ็นเอสพี 2 ร่วมกับเอ็นเอสพี 3 ขึ้นแล้ว เซลล์นั้นจะสามารถสร้างดีเอ็มวีที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ อย่างไรก็ตามเอ็นเอสพี 2 หรือเอ็นเอสพี 3 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างดีเอ็มวีได้ ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่าเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 จำเป็นต้องทำงานร่วมกันในการเหนี่ยวนำให้เกิดดีเอ็มวี (Snijder et al., 2001)

ถึงแม้ว่าเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างดีเอ็มวีได้แต่สิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือดีเอ็มวีที่สมบูรณ์และสามารถรองรับการสร้างอาร์เอ็นเอของไวรัสได้นั้นอาจยังต้องการปัจจัยต่างๆ อีก โดยหนึ่งในหลักฐานที่สำคัญคือการค้นพบว่าที่ผนังของดีเอ็มวีที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสอีเอวีนั้นสามารถตรวจพบเอ็นเอสพีอื่นๆ นอกจากเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 ได้อีกด้วย (Pedersen et al., 1999) แต่เอ็นเอสพีเหล่านี้จะมีความสำคัญต่อกระบวนการการสร้างอาร์เอ็นเอของไวรัสหรือไม่นั้นยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

การสร้างดีเอ็มวีโดยเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 เชื่อว่าเริ่มต้นจากการที่เอ็นเอสพีทั้ง 2 ติดเข้ากับผนังของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและจากนั้นจึงมีการเหนี่ยวนำให้เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมส่วนนี้พัฒนาเป็นดีเอ็มวี (Pedersen et al., 1999; Snijder et al., 2001) ในขั้นตอนการติดเอ็นเอสพีทั้ง 2 เข้ากับผนังของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมเชื่อว่าเกิดขึ้นได้เนื่องจากที่เอ็นเอสพีทั้ง 2 มีบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกอยู่ ซึ่งส่วนไฮโดรโฟบิกนี้น่าจะเป็นส่วนที่ฝังลงในผนังของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ทำหน้าที่เป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมน) แต่หลังจากที่เอ็นเอสพีทั้ง 2 ติดเข้ากับผนังของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแล้ว ส่วนใดของโปรตีนที่จะทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างดีเอ็มวีนั้นยังไม่มีกรกล่าวถึงแต่อย่างใด

ในกรณีของไวรัสพาร์อาร์เอสพบว่าทั้ง VR2332 (ไวรัสต้นแบบสายพันธุ์อเมริกาเหนือ) และ LV (ไวรัสต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป) เมื่อเข้าสู่เซลล์มาโครฟาจจากบริเวณถุงลมปอดแล้วสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างดีเอ็มวีได้เช่นกัน (Pol et al., 1997) อย่างไรก็ตามยังไม่มีกระบวนการถึงโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดดีเอ็มวีในกรณีของการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

แม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีการศึกษายืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสและการสร้างดีเอ็มวี แต่ก็พบว่าส่วนที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตอยู่ของไวรัส (Han et al., 2007) โดยในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับกรดอะมิโนของส่วนที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนนี้มีความอนุรักษ์ในไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือหลายสายพันธุ์ (Han et al., 2006) จึงมีความเป็นไปได้ว่าส่วนที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนมีความสำคัญต่อไวรัสพาร์อาร์เอส และต่อมาเมื่อมีการทดลองดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์ VR2332 ทำให้ส่วนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสปราศจากส่วนที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนพบว่าความเปลี่ยนแปลงนี้มีผลทำให้ไวรัสที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Han et al., 2007) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ในระดับหนึ่งถึงความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่คาดว่าเป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมนของเอ็นเอสพี 2 ต่อไวรัสพาร์อาร์เอส



**ภาพที่ 8** ลักษณะของดีเอ็มวีที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงปีเอชเค 21 ที่ติดเชื้อไวรัสอีเอวี (a) ภาพโดยรวมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสอีเอวี กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีดีเอ็มวีอยู่เป็นจำนวนมาก (b) ภาพขยายของดีเอ็มวี ลูกศรแสดงบริเวณที่มีการเชื่อมกันของผนังชั้นในและชั้นนอกของดีเอ็มวี ทำให้มีทางเชื่อมระหว่างไซโตพลาสซึมของเซลล์กับภายในดีเอ็มวี หัวลูกศร 2 อันแสดงดีเอ็มวีที่มีผนังชั้นนอกที่มีการเชื่อมต่อกับผนังของเซลล์ (c) ภาพขยายของดีเอ็มวี แสดงลักษณะของดีเอ็มวีที่พบโดยทั่วไปโดยมีลักษณะเป็นวงปิด (d) ดีเอ็มวีที่เชื่อมต่อกับเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม หัวลูกศรแสดงบริเวณที่มีการเชื่อมต่อกัน อักษรย่อ: N, nucleus; M, mitochondrion; ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane เส้นนอนแสดงความยาว 1  $\mu\text{m}$  (a) หรือ 100 nm (b, c และ d) (Pedersen et al., 1999)

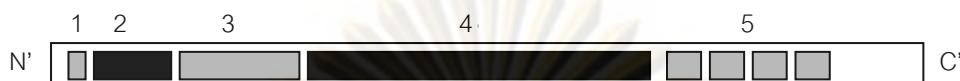
## 7. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 และความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในบริเวณเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายมาก (Han et al., 2006) และจัดได้ว่าเป็นบริเวณที่ไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรปมีความแตกต่างกันมากที่สุด (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999) เมื่อพิจารณาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของไวรัสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีการแยกเชื้อได้จากที่ต่างๆ พบว่าเอ็นเอสพี 2 นั้นประกอบไปด้วยบริเวณที่มีความอนุรักษ์และบริเวณที่มีความหลากหลายสูง (Han et al., 2006; Han et al., 2007) (ภาพที่ 9) บริเวณที่มีความอนุรักษ์ของเอ็นเอสพี 2 มีทั้งสิ้น 6 ตำแหน่งหลักคือ 1.) กรดอะมิโน 7 ตัวแรกของโปรตีนเอ็นเอสพี 2 โดยคาดว่ากรดอะมิโนในบริเวณนี้น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับตำแหน่งการตัดของปาเปน – โคลิซิสตินโปรตีเอสของเอ็นเอสพี 1 2.) บริเวณที่คาดว่าเป็ยซิสตินโปรตีเอสซึ่งมีขนาดประมาณ 100 กรดอะมิโน (กรดอะมิโนตำแหน่ง Y47 - C147) และ 3.) บริเวณที่คาดว่าเป็ยทรานซ์เมมเบรนโดเมนอีก 4 ตำแหน่ง (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 876 – 898 ตำแหน่งที่ 911 – 930 ตำแหน่งที่ 963 – 979 และตำแหน่งที่ 989 - 1009) ส่วนบริเวณที่มีความหลากหลายสูงมีทั้งสิ้น 2 ตำแหน่งหลัก ได้แก่ 1.) บริเวณของกรดอะมิโนที่อยู่ก่อนหน้าส่วนที่คาดว่าเป็ยซิสตินโปรตีเอส และ 2.) บริเวณของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างส่วนที่คาดว่าเป็ยซิสตินโปรตีเอสและส่วนที่คาดว่าเป็ยทรานซ์เมมเบรนโดเมน

จะเห็นได้ว่าบริเวณของกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์จะเป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อไวรัส ในขณะที่บริเวณที่มีความหลากหลายสูงนั้น ณ ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าทำหน้าที่จำเพาะใดๆ โดยเฉพาะบริเวณที่มีความหลากหลายสูงที่อยู่ระหว่างส่วนที่คาดว่าเป็ยซิสตินโปรตีเอสและส่วนที่คาดว่าเป็ยทรานซ์เมมเบรนโดเมนนั้น พบว่านอกจากจะเกิดการแทนที่ (substitution) ของกรดอะมิโนแล้ว (เทียบกับไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบ) ยังสามารถพบการขาดหายไป (deletion) และการเข้าแทรก (insertion) ของกรดอะมิโนได้อีกด้วย

สิ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 คือการแยกพบเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการขาดหายไปและการเข้าแทรกของกรดอะมิโนในบริเวณเอ็นเอสพี 2 โดยมีสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความสนใจ 2 ประการคือ 1. เอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอีเอวีซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสพาร์อาร์เอสนั้นไม่สามารถทนต่อการเกิดการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกของกรดอะมิโนได้ (Snijder et al., 1995) และ 2.

การขาดหายไปของกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 อาจมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของไวรัสพาร์อาร์เอส



ภาพที่ 9 แผนผังแสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์และส่วนที่มีความหลากหลายสูงบนเอ็นเอสพี 2 กล่องสี่เหลี่ยมสีเทา แสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์ กล่องสี่เหลี่ยมสีดำแสดงส่วนที่มีความหลากหลายสูง สามารถแบ่งบริเวณต่างๆ บนเอ็นเอสพี 2 ได้เป็น 5 ส่วน แสดงโดยหมายเลขด้านบนของรูปภาพ ส่วนที่ 1 คือกรดอะมิโน 7 ตัวแรกของเอ็นเอสพี 2 ส่วนที่ 2 คือช่วงกรดอะมิโนตัวที่ 8 – 46 ส่วนที่ 3 คือช่วงกรดอะมิโนตัวที่ 47 – 147 (ส่วนที่คาดว่า เป็นซิสตีนโปรตีเอส) ส่วนที่ 4 คือช่วงกรดอะมิโนตัวที่ 148 – 875 และส่วนที่ 5 คือช่วงกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิกและคาดว่า เป็นทรานซ์เมมเบรนโดเมน ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 876 – 898 ตำแหน่งที่ 911 – 930 ตำแหน่งที่ 963 – 979 และตำแหน่งที่ 989 – 1009 (ดัดแปลงจาก Han et al., 2007)

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอีเอวีนั้นแม้จะมีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนเช่นเดียวกับเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอส แต่ซิสตีนโปรตีเอสบนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอีเอวีนจะไม่สามารถตัดแยกเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 ได้หากเกิดการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกของกรดอะมิโนในบริเวณเอ็นเอสพี 2 แม้เพียงเล็กน้อย (Snijder et al., 1995) ในขณะที่ในกรณีของไวรัสพาร์อาร์เอสนั้นสามารถพบได้ทั้งไวรัสที่มีการขาดหายไปและการเข้าแทรกของกรดอะมิโนที่บริเวณเอ็นเอสพี 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสและของไวรัสอีเอวีนซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบอย่างชัดเจน (Shen et al., 2000; Gao et al., 2004; Han et al., 2006; Li et al., 2007)

ปัจจุบันมีการยืนยันในระดับหนึ่งแล้วว่าบริเวณที่มีความหลากหลายสูงของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสสามารถเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนได้เป็นจำนวนมาก โดยที่ไวรัสยังคงสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้แต่ก็พบว่า การขาดหายไปนี้มีขีดจำกัดอยู่เช่นกัน โดยพบว่าไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 324 – 726 ของเอ็นเอสพี 2 นั้นยังคงสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เช่นเดียวกับไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 727 – 813 แต่ไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนใน 2 ตำแหน่งนี้รวมกัน คือ ตำแหน่งที่ 324 – 813 กลับไม่สามารถเจริญบนเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอ็นเอสพี 2 จำเป็นต้องมีความยาวใน

ระดับหนึ่งเพื่อให้สามารถเกิดการพับของโปรตีนได้อย่างถูกต้อง และทำให้เอ็นเอสพี 2 ยังคงทำหน้าที่ต่างๆได้ (Han et al., 2007)

ไวรัสพรีอาร์อาร์เอสที่มีการรายงานว่ามี การเข้าแทรกของกรดอะมิโนบริเวณเอ็นเอสพี 2 คือไวรัสสายพันธุ์ SP (Shen et al., 2000) ซึ่งเป็นไวรัสจากวัคซีนสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบของกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ VR2332 และสายพันธุ์ 16244B ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้ทั้งคู่ พบว่าไวรัสสายพันธุ์ SP นี้มีกรดอะมิโนเข้าแทรกจำนวน 36 ตัว ร่วมกับการเกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนอีก 158 ตัว (เทียบกับ VR2332) ตำแหน่งที่มีการเข้าแทรกนี้สามารถเทียบได้กับตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 813 และ 814 ของ VR2332 (ซึ่งอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายสูง) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เอ็นเอสพี 2 นี้จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ไวรัสสายพันธุ์ SP มีการอ่อนกำลังลงหรือไม่นั้นยังคงต้องรอการพิสูจน์ต่อไป เนื่องจากไวรัสสายพันธุ์ SP และ 16244B มียังมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณอื่นอีกเช่นกัน (ORF2-7 มีความเหมือนกันร้อยละ 89-95)

สำหรับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีการรายงานว่ามี การขาดหายไปของกรดอะมิโนบริเวณเอ็นเอสพี 2 นั้นมีอยู่หลายไอโซเลท ยกตัวอย่างเช่น HB-2(sh)/2002 (Gao et al., 2004) SY0608 (Li et al., 2007) MN184A และ MN184B (Han et al., 2006) เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ VR2332 แล้วพบว่า HB-2(sh)/2002 ซึ่งแยกเชื้อได้จากประเทศจีนพบการขาดหายไปของกรดอะมิโนบริเวณเอ็นเอสพี 2 รวมทั้งสิ้น 12 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 466 ถึง 467 (ภาพที่ 10) SY0608 ซึ่งแยกเชื้อได้จากประเทศจีนเช่นกัน พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 480 และระหว่างตำแหน่งที่ 531 ถึง 559 (ภาพที่ 10) MN184A และ MN184B (แยกเชื้อได้จากประเทศสหรัฐอเมริกา) พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 131 ตัว เทียบได้เป็นตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 324 ถึง 434 ตำแหน่งที่ 486 และระหว่างตำแหน่งที่ 505 ถึง 523 (ภาพที่ 10) ซึ่งถือเป็นไวรัสพรีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดในปัจจุบัน

```

VR2332 IKLPQVNQCRALVPVVTQKSLDNNVPLTAFSLANYYYRAQGDEVRHRERLTAVLSKLEK 360
MN184B A---LT--RH--AT----R-----
HB-2 TEQ-HA---C-P-----EP-KD-----S-C--P-----NS-----E
SY0608 TEQ-H--S-CT--P---EP-GKD-----S-C--P-----NF-----E

VR2332 VVREEYGLMPTEPGPRPTLPRGLDELKDQMEEDLLKLANAQTTSDMMAWAVEQVDLKTWV 420
MN184B .....
HB-2 --L-----GL---V--S-----A-E--L-A-----A--
SY0608 --L-----S-GL---V--S-----T-A-E--R-A-----A--

VR2332 KNYPRWTPPPPPKVPKPKVKS LPERKVPAPRRKVGSDCGSPVSLGGDVPNSWEDL 480
MN184B .....-F---AES-----SR-L---K-I--R---I---L-D-R---
HB-2 -S---I-----RM-----N-----R--P-KSIL.....
SY0608 -S-----R---R--S-----D-----RFN---GLM-D---GS-E•

VR2332 AVSSPFDLPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLEP 540
MN184B ••GG--F--L--LVAS-----V---RV---L-SSPIVS
HB-2 --GG-LNFS--S-LV--LG---LMPAS-HVS--V-----V---RI---M-----
SY0608 T-GG-LNF---S--M--M---L-PASRRVPKLM---GG--V---R--T.....

VR2332 IPVPPAPRRKFQQVKRLSSAAAIIPPYQDEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGHE 600
MN184B T-----GLR--EGMNL--VTLAC-----L-L-L-ED--A--RR-
HB-2 TF-F--W--S---EEANP---TLTC-----Y-L--LENI---EAG-Q-
SY0608 .....TTLTH-----F-L--S-NM-I-EAG-Q-

```

ภาพที่ 10 ไลน์เม้นท์ส่วนหนึ่งของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 MN184B HB-2(sh)/2002 และ SY0608 กรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์แสดงโดยขีดนอน (-) กรดอะมิโนที่มีการขาดหายไปเมื่อเทียบกับ VR2332 แสดงโดยเครื่องหมายดอกจัน (\*) (Li et al., 2007)

SY0608 นี้แยกเชื้อได้มาจากสุกรที่ป่วยและตายจากการระบาดของกลุ่มอาการไข้สูง (swine high fever syndrome) ในประเทศจีนในช่วงปี พ.ศ. 2549 ซึ่งในการระบาดครั้งนั้นมีสุกรป่วยและตายเป็นจำนวนมาก เมื่อนำไวรัสมาฉีดกลับเข้าสู่กรทดลองพบว่าสุกรมีไข้สูง หายใจลำบาก ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีแดง อวัยวะภายในเช่น ปอด ตับ และ ไต มีจุดเลือดออกกระจายอยู่ทั่วไป มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง (อัตราการตายร้อยละ 50 ซึ่งต่างจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสทั่วไปที่ไม่ทำให้เกิดการตายในสุกรทดลอง) และเมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนของไวรัสสายพันธุ์นี้ พบว่าที่เอ็นเอสพี 2 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 ตัว (เทียบกับ VR2332) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ความเปลี่ยนแปลงที่เอ็นเอสพี 2 นี้จะเป็นสาเหตุหลักทำให้ SY0608 มีความรุนแรงในการก่อโรคมกกว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตามด้วยความรู้ในปัจจุบันยังไม่ทราบว่าความเปลี่ยนแปลงที่เอ็นเอสพี 2 หรือที่โปรตีนตัวอื่นๆ ของ SY0608 ส่งผลให้ความรุนแรงของโรคมักขึ้นได้อย่างไร

จากที่กล่าวมาแล้วว่าปัจจุบันนั้นยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกที่ทำให้ไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันนั้นสามารถก่อโรคที่มีรูปแบบหรือความรุนแรงที่แตกต่างกันได้ ในอดีตความสนใจส่วนใหญ่จะอยู่ที่โปรตีนโครงสร้างของไวรัสเป็นหลักแต่

ในปัจจุบันมีการศึกษาที่สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันได้ว่าโปรตีนที่มีใช้โครงสร้างของไวรัส (แปลรหัสมาจากส่วนโออาร์เอฟ 1) มีอิทธิพลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสได้ โดยเมื่อทำการดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสจากวัคซีน Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV ซึ่งไม่มีความรุนแรงในการก่อโรคให้มียีนโออาร์เอฟ 1 เป็นของ MN184 (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่เอ็นเอสพี 2 ทั้งสิ้น 131 ตัว) กล่าวคือ ไวรัสที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมนั้นจะมีโออาร์เอฟ 1 ของ MN184 แต่มีโออาร์เอฟ 2 - 7 ของไวรัสจากวัคซีน เมื่อทำการฉีดเชื้อไวรัสที่ดัดแปลงพันธุกรรมนี้ให้แก่สุกรทดลอง มีผลทำให้ทำให้สุกรทดลองมีรอยโรคที่ปอดเกิดขึ้นได้ (Wang et al., 2008)

จากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าโปรตีนส่วนโออาร์เอฟ 1 นั้นมีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของไวรัส และเป็นไปได้ว่าเอ็นเอสพี 2 อาจเป็นยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์นี้ แม้ว่าด้วยความรู้ในปัจจุบันจะยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าความเปลี่ยนแปลงของเอ็นเอสพี 2 ที่บริเวณที่มีความหลากหลายสูงส่งผลต่อไวรัสอย่างไรเนื่องจากไม่ทราบหน้าที่ของกรดอะมิโนในบริเวณนี้ แต่ก็มีความหลักฐานที่พบว่าไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณนี้มีความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรง

แม้ว่าปัจจุบันหน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะสามารถแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้หลายสายพันธุ์ แต่ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 นั้นมีการรายงานเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น คือสายพันธุ์ 01NP1.2 หมายเลข GenBank accession no. DQ056373 ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสเหล่านี้จึงน่าจะช่วยเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับการศึกษาด้านต่างๆ ของไวรัสเหล่านี้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. ตัวอย่างที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อ จำนวน 6 ตัวอย่าง และเป็นตัวอย่างไวรัสที่ทำการแยกเชื้อแล้ว จำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อเยื่อเหล่านี้ได้จากการคัดกรองตัวอย่างเนื้อเยื่อจาก 2 แหล่ง คือ 1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่นำมาส่งตรวจ ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ 2. ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสุกรที่ถูกนำมาชันสูตรซาก ณ โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (จังหวัดนครปฐม) โดยในการคัดกรองนั้นจะทำการคัดเลือกเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือมาใช้ในงานวิจัยเท่านั้น สำหรับตัวอย่างไวรัสเป็นไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างเนื้อเยื่อและตัวอย่างไวรัสที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เก็บมาจากสุกรในช่วงปี พ.ศ. 2544 - 2551 จากฟาร์มในจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม จังหวัดราชบุรี และจังหวัดฉะเชิงเทรา

ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่าง	จังหวัดที่ตั้งของฟาร์ม	ปี พ.ศ. ที่เก็บตัวอย่าง	ประเภทของตัวอย่าง
07NP2	นครปฐม	2550	ตัวอย่างไวรัส
07NP4	นครปฐม	2550	ตัวอย่างไวรัส
08RB1	ราชบุรี	2551	ตัวอย่างไวรัส
01CS1/2	ฉะเชิงเทรา	2544	ตัวอย่างไวรัส
8NP154	ราชบุรี	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>1</sup>
78/51	นครปฐม	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>2</sup>
8NP59	ภาคกลาง <sup>3</sup>	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>1</sup>
8NP46	ราชบุรี	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>1</sup>
8NP147	นครปฐม	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>1</sup>
8NP148	ภาคกลาง <sup>3</sup>	2551	ตัวอย่างเนื้อเยื่อ <sup>1</sup>

<sup>1</sup> ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากโรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2</sup> ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>3</sup> ตัวอย่างจากฟาร์มในภาคกลาง แต่ไม่สามารถระบุจังหวัดที่ตั้งได้

## 2. การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) ของไวรัส

การสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อทำโดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาบดให้ร่วมกับทรายละเอียดด้วยครกและสากเพื่อให้อาร์เอ็นเอของไวรัสหลุดออกมา จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อที่บดแล้วมาทำการกระจายตะกอนด้วยสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (Eagle's minimum essential medium) และปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเฉพาะส่วนใส (ซึ่งมีอาร์เอ็นเอของไวรัสอยู่) มาใช้ต่อไป โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างไวรัสและตัวอย่างเนื้อเยื่อ (ที่บดละเอียดแล้ว) ทำโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin<sup>®</sup> RNA Virus (Macherey-Nagel, Germany) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ เก็บรักษาตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

## 3. การคัดกรองตัวอย่างด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (reverse transcription - polymerase chain reaction, RT-PCR)

การคัดกรองตัวอย่างเนื้อเยื่อทำโดย สกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Gilbert et al., 1997) ในแต่ละปฏิกิริยาของอาร์ทีพีซีอาร์นั้นประกอบไปด้วย 1.) Maxime<sup>™</sup> RT-PCR Premix (iNtRON, Korea) ความเข้มข้น 1 เท่า 2.) ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 3.) ฟอว์เวิร์ด (forward) และรีเวิร์ส (reverse) ไพรเมอร์ อย่างละ 5 pmol และ 4.) น้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) (ใช้ปรับปริมาตรรวมของปฏิกิริยาให้เป็น 20 ul) อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์เป็นดังนี้คือ 1.) รีเวิร์สทรานสคริปต์ชัน ใช้อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$  30 นาที 2.) การยับยั้งเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) ใช้อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  5 นาที 3.) ดีเนเจอร์เรชัน (denaturation) ใช้อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  30 วินาที 4.) แอนนีลลิง (annealing) ใช้อุณหภูมิ  $51^{\circ}\text{C}$  30 วินาที 5.) เอ็กซ์เทนชัน (extension) ใช้อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  30 วินาที (ซ้ำขั้นตอนที่ 3 – 5 อีก 34 รอบ) และ 6.) เอ็กซ์เทนชันครั้งสุดท้าย ใช้อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากอาร์ทีพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose - gel electrophoresis)

#### 4. การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA) และปฏิกิริยาพีซีอาร์

การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอของตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่ผ่านการคัดกรองแล้ว และตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากไวรัสใช้วิธีรีเวิร์สทรานสคริปท์ชัน โดยใน 1 ปฏิบัติประกอบไปด้วย 1.) Omniscript RT บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า 2.) dNTP Mix อย่างละ 10 nmol 3.) Omniscript รีเวิร์สทรานสคริปเตส 4 ยูนิต (Qiagen, Germany) 4.) แรนดอมไพรเมอร์ เฮกซะเมอร์ 20 pmol 5.) สารยับยั้งเอนไซม์อาร์เอ็นเอส 4 ยูนิต (New England BioLabs, US) 6.) ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ และ 7.) น้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (ใช้ปรับปริมาตรรวมของปฏิกิริยาให้เป็น 20 ul) เหนียวนำไปให้เกิดปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปท์ชัน ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที เก็บรักษาซีดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 °C จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

ในแต่ละปฏิกิริยาของพีซีอาร์นั้นประกอบไปด้วย 1.) Go Taq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, US) ความเข้มข้น 1 เท่า 2.) พอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ อย่างละ 50 pmol 3.) ตัวอย่างซีดีเอ็นเอ และ 4.) น้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (ใช้ปรับปริมาตรรวมของปฏิกิริยาให้เป็น 50 ul) อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้คือ 1.) ดีเนเจอร์เรชันเริ่มต้น ใช้อุณหภูมิ 95 °C 2 นาที 2.) ดีเนเจอร์เรชัน ใช้อุณหภูมิ 95 °C 30 วินาที 3.) แอนนิลลิง ใช้อุณหภูมิ 50 - 65 °C (ปรับตามความเหมาะสม) 30 วินาที 4.) เอ็กซ์เทนชัน ใช้ อุณหภูมิ 72 °C 30 - 90 วินาที (ปรับตามความเหมาะสม) (ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 - 4 อีก 34 รอบ) และ 5.) เอ็กซ์เทนชันครั้งสุดท้าย ใช้อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที

ไพรเมอร์ที่ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการศึกษาครั้งนี้ (รายละเอียดของไพรเมอร์ ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 2) ส่วนหนึ่งถูกออกแบบให้ครอบคลุมช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 863 - 2,226 ของเอ็นเอสพี 2 ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมบริเวณที่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ของ MN184A (Han et al., 2006) และ SY0608 (Li et al., 2007) และไพรเมอร์อีกส่วนหนึ่งจะ ครอบคลุมเอ็นเอสพี 2 โดยสมบูรณ์ (ตารางที่ 3)

ไพรเมอร์ F10 R10 F11 R11 F12 R12 และ F17 ออกแบบโดยใช้ข้อมูลจากการ ทำอไลน์เมนต์ (alignment) ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสไอโซเลตต่างๆ ที่มีการรายงานอยู่ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ไพรเมอร์ F9 และ R9 ออกแบบตามไพรเมอร์ที่เคยมีการรายงาน ไว้แล้ว (Gao et al., 2004) และไพรเมอร์ที่เหลือออกแบบโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เอ็นเอสพี 2 หลังจากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว

นำผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส โดยย้อมเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์แล้วตรวจสอบการปรากฏของผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ภายใต้แสงยูวี จากนั้นจึงทำการสกัดผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ออกจากเจลโดยการตัดเจลบริเวณที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์มาสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Germany) เก็บรักษาสกัดผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 °C จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ <sup>1</sup>
F10	TGGCACTGCATTTCCGCCAT	169 – 188
R10	TCGGCCAGAGCRGCTGGGAT	547 – 566
F11	GATTGGGATGTTGTGCTYCCTGG	862 – 884
R11	GACARRCTTYGTTYTTTCGAGG	1315 – 1335
F12	TCATCAAGCAGCTCCYTGTC	1867 – 1886
R12	GCACYACGGAAGGTGCAGG	2206 – 2225
F9	AACCCTCTGAAAACCCATC	3227 – 3246
R9	GCCAAAGAGAAACCAACAAC	(+477) – (+496) <sup>2</sup>
F14	TGAYTGGGCYACTGACGAGGA	252 – 272
R15	TCCCACATGCGRGAAAGCCA	2044 – 2063
F15.1	TGCACTTGCCTAGTGGCGTT	527 – 545
R15.1	CCGAGTCAATGACGGCTTGAG	1919 – 1939
F15.2	CTTTGACGATGCCACCATCCC	1277 – 1297
R15.2	TCAATGATGGCTTGAGCCGAG	1914 – 1934
F15.3	GCTGAGGTAATGCACCTGCCTA	517 – 538
R15.3	GACCGCCGAGTCAATGATG	1926 – 1945
F15.4	CCTGCCTGCCTTGATCGACTA	496 – 516
R15.4	GGCGTGTGATCTCCACACTC	1887 – 1906
F15.5	CTGCCGAGCGGATTAAGCGA	1141 – 1160
R15.5	ATGATGGCTTGAGCCGAGTAT	1911 – 1931
F15.6	AGGTTGACCTAAAGGCTTGGG	1244 – 1264
R15.6	CGAGTCGATGATGGCTTGAACG	1917 – 1938
F15.7	TGGGCAGTTGAGCAGGTTGATTTA	1231 – 1254
R15.7	CCGAGTATCTCGGGCGTGTA	1899 – 1918
F17	AGTACCTACAGCGGAGGCTGC	(-236) – (-216) <sup>3</sup>
R17	TCCTCGTCAGTRGCCARTCA	252 – 272
F16	TTTCTCCRAAGATGATACTCG	2137 – 2158
R16	ATAAGGCTGGGCAACCACAG	3287 – 3306

<sup>1</sup>ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าไพรเมอร์จับ โดยคิดอ้างอิงจากเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332

<sup>2</sup>ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าไพรเมอร์จับอยู่นอกเอ็นเอสพี 2 มาทางด้านปลาย 3' (อยู่บนเอ็นเอสพี 3)

<sup>3</sup>ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าไพรเมอร์จับอยู่นอกเอ็นเอสพี 2 มาทางด้านปลาย 5' (อยู่บนเอ็นเอสพี 1)

ตารางที่ 3 คู่มือพรเมอรินแต่ละตัวอย่างและชิ้นส่วนของเอ็นเอสพี 2 ที่ได้

ตัวอย่าง	คู่มือพรเมอรินที่ใช้	ชิ้นส่วนของเอ็นเอสพี 2 ที่ได้
07NP2	F17R17 F10R10 F14R11 F11R11 F11R15 F12R12 F16R16 F9R9	เอ็นเอสพี 2 ที่สมบูรณ์
07NP4	F17R17 F10R10 F14R11 F11R11 F11R15 F12R12 F16R16 F9R9	เอ็นเอสพี 2 ที่สมบูรณ์
08RB1	F17R17 F10R10 F14R11 F11R11 F11R15 F12R12 F16R16 F9R9	เอ็นเอสพี 2 ที่สมบูรณ์
8NP154	F17R17 F10R10 F12R12 F16R16 F9R9 F15.1R15.1	เอ็นเอสพี 2 ที่สมบูรณ์
8/51	F17R17 F10R10 F12R12 F15.3R15.3	1 – 2,205
8NP59	F17R17 F10R10 F12R12 F15.4R15.4	1 – 2,205
01CS1/2	F11R11 F12R12 F15.5R15.5	885 – 2,205
8NP46	F11R11 F12R12 F15.2R15.2	885 – 2,205
8NP147	F11R11 F12R12 F15.6R15.6	885 – 2,205
8NP148	F11R11 F12R12 F15.7R15.7	885 – 2,205

ชิ้นส่วนของเอ็นเอสพี 2 ที่ได้จากพรเมอรินนั้นๆ โดยแสดงเป็นตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์บนเอ็นเอสพี 2 (อ้างอิงจาก VR2332) หรือนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (1 – 3,591)

## 5. การโคลน (clone) และการสกัดพลาสมิด

การโคลนผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิดทำโดยใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega, US) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดสำเร็จรูป ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แทรกอยู่ จากนั้นจึงย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 (Promega, US) ด้วยวิธีการทรานส์ฟอร์มเมชันด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub>-induced transformation) ซึ่งทำให้ได้เป็นได้เป็นรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

การสกัดพลาสมิดออกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เริ่มจากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดโดยนำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* มาเพิ่มจำนวนโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี (LB) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 – 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดออกจากแบคทีเรียด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin<sup>®</sup> plasmid kit (Macherey-Nagel, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดสำเร็จรูป เก็บรักษาพลาสมิดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 °C จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

## 6. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และการวิเคราะห์ผล

ในการศึกษาครั้งนี้ไวรัสแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ประมาณ 3 – 8 คู่ เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ตามที่ระบุไว้ (ตารางที่ 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มามีลักษณะเป็นช่วงที่ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 11) การนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละช่วงเหล่านี้มาต่อกันให้เป็นนิวคลีโอไทด์ 1 เส้นที่สมบูรณ์ทำโดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA4 (Tamura et al., 2007)

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละช่วงทำโดยเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีดีเอ็นเอของเอ็นเอสพี 2 ช่วงที่สนใจมา 3 โคลน ทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องออโตเมทเตดดีเอ็นเอซีควนเซอร์ (automated DNA sequencer) โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน 2 ตัว คือ T7 ฟอรวีรด์ไพรเมอร์และ SP6 รีเวอร์สไพรเมอร์รายงานผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคอนเซนซัสนิวคลีโอไทด์ (consensus nucleotide) และแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยซอฟต์แวร์ MEGA4 (Tamura et al., 2007)

การวิเคราะห์รูปแบบหรือตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยทำโดยใช้วิธีมัลติเปิลไลน์เมนท์ (multiple alignment) ของ

ลำดับกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 ของเอ็นเอสพี 2 (นิวคลีโอไทด์ที่ 888 – 2,205) (อ้างอิงจากตำแหน่งของ VR2332) ด้วยโปรแกรม Clustal W ของซอฟต์แวร์ MEGA4 (Thompson et al., 1994) ลำดับกรดอะมิโนของไวรัสที่นำมาใช้ในการทำอไลน์เมนต์ครั้งนี้แสดงในตารางที่ 4 การทำอไลน์เมนต์ครั้งนี้ กำหนดค่า gap opening penalty = 4 ค่า gap extension penalty = 0.2 โดยใช้ BLOSUM โปรตีนเมทริกซ์และปรับรูปแบบอไลน์เมนต์ที่ได้ตามความเหมาะสมอีกครั้ง

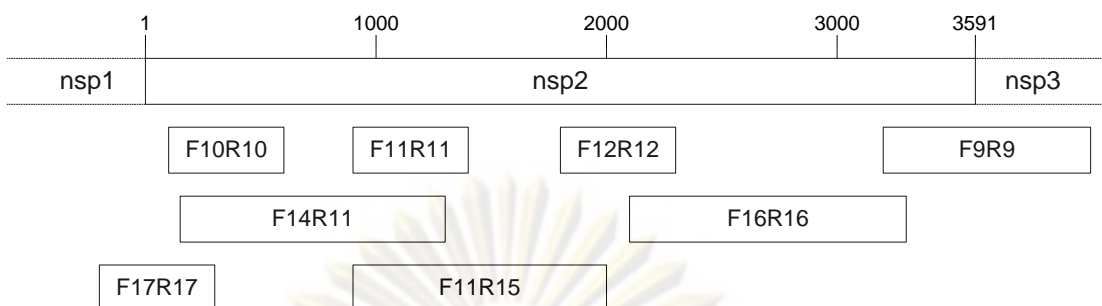
การศึกษาระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ระหว่างไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้และระดับความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับ 01NP1.2 VR2332 MN184 SY0608 และ Lelystad ทำโดยการทำแพร์ไวส์ (pairwise) อไลน์เมนต์ของลำดับกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 ของเอ็นเอสพี 2 ด้วยโปรแกรม Clustal W ของซอฟต์แวร์ MEGA4 (Tamura et al., 2007) และคำนวณค่าร้อยละความเหมือนของกรดอะมิโน (amino acid identity) หรือความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide identity) ของไวรัสแต่ละคู่

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของซิสตีนโปรตีเอส (cysteine protease, CP) โดเมนและจุดตัด ทำโดยการทำอไลน์เมนต์ของลำดับกรดอะมิโนในช่วงซิสตีนโปรตีเอสโดเมนและช่วงที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ของ 07NP2 07NP4 08RB1 8NP59 8NP154 78/51 VR2332 ไวรัสอีเอวี (DQ846750) และไวรัสแอลดีวี (LDU15146)

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก (phylogenetic tree) ใช้โปรแกรม MegAlign (DNASTAR, Madison, WI, USA) โดยใช้อไลน์เมนต์ช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 ของเอ็นเอสพี 2 (อ้างอิงจากตำแหน่งของ VR2332) ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Clustal W ของซอฟต์แวร์ MEGA4 (Tamura et al., 2007) (ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว) การสร้างแผนภูมิต้นไม้ใช้วิธีคลัสตอล (Clustal method) คำนวณค่าบูทสเตรป (bootstrap) ของโหนด (node) โดยคำนวณซ้ำ 2,000 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 11 ตำแหน่งโดยสังเขปของผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่เกิดจากไพรเมอร์บางคู่ เลขด้านบนของเอ็นเอสพี 2 แสดงตำแหน่งต่างๆ บนเอ็นเอสพี 2 (หน่วยเป็นนิวคลีโอไทด์) ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ ที่ 1 – 3,591

ตารางที่ 4 ไวรัสพรีอาร์อาร์เอสไอโซเลตต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้<sup>1</sup>

ไอโซเลต	หมายเลข	ไอโซเลต	หมายเลข
01NP1.2 (Thailand)	DQ056373	CH-1R (China)	EU807840
Lelystad (Netherlands)	M96262	CH2002 (China)	EU880438
VR2332 (USA)	AY150564	CH2003 (China)	EU880440
MN184 (USA)	EF484031	CH2004 (China)	EU880439
NVSL 97-7985 (USA)	AF325691	SHB (China)	EU864232
NVSL 97-7895 (USA)	AY545985	HN1 (China)	AY457635
JA142 (USA)	AY424271	BJ-4 (China)	AF331831
16244B (USA)	AF046869	PRRSV02 (China)	FJ175688
Ingelvac (vaccine)	EF484003	PRRSV03 (China)	FJ175689
RespPRRS (vaccine)	AF0066183	GD (China)	EU109503
SP (vaccine)	AF184212	CH1-a (China)	AY032626
PA8 (Canada)	AF176348	HB-1 (China)	AY150312
17704A (Denmark)	AF303354	HB-2 (China)	AY262352
17738B (Denmark)	AF303355	SY0608 (China)	EU144079
EDRD-1 (Japan)	AB288356	PL97-1 (Korea)	AY585241

<sup>1</sup>ข้อมูลจาก GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. การตรวจสอบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 ของไวรัสพาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้ ในเบื้องต้นพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 จากตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง (จากที่ศึกษาทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง) มีขนาดสั้นกว่าขนาดที่ได้จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (ตารางที่ 5) มีเพียงเอ็นเอสพี 2 ของ 8NP147 เท่านั้นที่มีขนาดตรงตามที่วิเคราะห์ ซึ่งหมายความว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยจากการศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีขนาดสั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332

จากการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 จากตัวอย่าง 07NP2 07NP4 และ 78/51 มีขนาด 1,180 nt ในขณะที่เอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันนี้ของ VR2332 มีขนาด 1,321 nt ซึ่งหมายความว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศไทย ทั้ง 3 ตัวอย่างนี้มีขนาดสั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 ในช่วงนิวคลีโอไทด์เดียวกันจำนวน 141 nt (47 กรดอะมิโน) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันนี้ (ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205) จากตัวอย่าง 08RB1 และ 8NP154 มีขนาด 1,027 nt ซึ่งถือว่าเอ็นเอสพี 2 ในช่วงนี้ของตัวอย่าง 08RB1 และ 8NP154 มีขนาดสั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของ VR2332 จำนวน 294 nt (98 กรดอะมิโน) ในกรณีของตัวอย่าง 01CS1/2 และ 8NP148 พบว่าไวรัสทั้ง 2 มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงนี้ 1,318 nt ซึ่งหมายความว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสทั้ง 2 นี้มีขนาดสั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 จำนวน 3 nt (1 กรดอะมิโน) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงนี้ของเอ็นเอสพี 2 ของตัวอย่าง 8NP59 และ 8NP46 มีขนาด 937 nt และ 1,024 ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดสั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 ในช่วงเดียวกันนี้จำนวน 384 nt (128 กรดอะมิโน) และ 297 nt (99 กรดอะมิโน) ตามลำดับ

จากข้อมูลเบื้องต้นด้านขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 นี้สรุปได้ว่า นอกจาก 8NP147 แล้วตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ มีขนาดของเอ็นเอสพี 2 ที่สั้นกว่าเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของ VR2332 โดยขนาดของเอ็นเอสพี 2 ที่สั้นลงนี้มีจำนวนตั้งแต่ 3 nt (1 กรดอะมิโน) จนถึง 384 nt (128 กรดอะมิโน)

ตารางที่ 5 ขนาดของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงที่ศึกษาของตัวอย่างต่างๆ เทียบกับขนาดของเอ็นเอสพี 2 ในช่วงเดียวกันของ VR2332

ตัวอย่าง	ขนาดของเอ็นเอสพี 2 ช่วงที่ศึกษา <sup>1</sup> (nt)	ผลต่างเมื่อเทียบกับ VR2332 <sup>2</sup> (nt)
07NP2	1,180	-141
07NP4	1,180	-141
08RB1	1,027	-294
8NP154	1,027	-294
78/51	1,180	-141
8NP59	937	-384
01CS1/2	1,318	-3
8NP46	1,024	-297
8NP147	1,321	0
8NP148	1,318	-3

<sup>1</sup>ขนาดของเอ็นเอสพี 2 ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 (1,321 nt)

<sup>2</sup>ผลต่างระหว่างตัวเลขในคอลัมน์ ขนาดของเอ็นเอสพี 2 ช่วงที่ศึกษา (nt) และขนาดในช่วงเดียวกันของ VR2332 (1,321 nt) เครื่องหมายลบแสดงถึงขนาดของเอ็นเอสพี 2 ช่วงที่ศึกษามีขนาดน้อยกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332

## 2. การวิเคราะห์รูปแบบของการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2

เมื่อทำการศึกษาดำเนินการที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสจากตัวอย่างในประเทศไทยเพื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 (Han et al., 2006) และ SY0608 (Li et al., 2007) พบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนแตกต่างกันไป โดยมีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนรวมทั้งสิ้น 3 ตำแหน่ง ซึ่งบางตำแหน่งนั้นมีความใกล้เคียงกับตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 12) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าปัจจุบันในประเทศไทยมีไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีเอ็นเอสพี 2 ที่มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184

จากการศึกษาโดยการทำอไลน์เมนท์ของเอ็นเอสพี 2 ช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 (นิวคลีโอไทด์ที่ 886 – 2,205) ของไวรัสในประเทศไทยร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือจากประเทศต่างๆ พบว่าไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 รวมทั้งสิ้น 3 ตำแหน่งโดยสังเขป (A B และ C ดังภาพที่ 12) ได้แก่ ตำแหน่งประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 300 – 430 (ตำแหน่ง A ในภาพที่ 12) ตำแหน่งประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 460 – 475 (ตำแหน่ง B ในภาพที่ 12) และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 513 (ตำแหน่ง C ในภาพที่ 12) (ตำแหน่งต่างๆ คิดเทียบกับตำแหน่งบนเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332)

จากการศึกษาพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของ 07NP2 07NP4 และ 78/51 มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนเป็นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 12) โดยเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสทั้ง 3 นี้มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 2 ตำแหน่ง ได้แก่การขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 328 – 365 (38 กรดอะมิโน) และช่วงกรดอะมิโนที่ 466 – 474 (9 กรดอะมิโน) (อ้างอิงจากตำแหน่งบนเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332) ตัวอย่าง 8NP154 และ 08RB1 มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 เป็นเช่นเดียวกัน โดยมีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 333 – 429 (97 กรดอะมิโน) และที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 471 (1 กรดอะมิโน) เอ็นเอสพี 2 ของตัวอย่าง 8NP46 ก็มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนเป็นเช่นเดียวกับเอ็นเอสพี 2 ของตัวอย่าง 8NP154 และ 08RB1 แต่จะมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 513 (1 กรดอะมิโน) เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ตำแหน่ง ตัวอย่าง 8NP59 มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 รวมทั้งสิ้น 2 ตำแหน่งคือช่วงกรดอะมิโนที่ 303 – 429 (127 กรดอะมิโน) และที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่

471 (1 กรดอะมิโน) ตัวอย่าง 01CS1/2 และ 8NP148 มีรูปแบบการการขาดหายไปของกรดอะมิโนในลักษณะเดียวกัน คือมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 471 (1 กรดอะมิโน)

เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 และ SY0608 แล้วพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่จากการศึกษาในครั้งนี้มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับของ MN184 เนื่องจากพบการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ซ้อนทับหรือเหลื่อมซ้อนกันกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 (ภาพที่ 12) โดยเฉพาะการขาดหายไปของกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโน (N terminus) (ตำแหน่ง A ในภาพที่ 12) อย่างไรก็ตามการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่พบในช่วงนี้ (ตำแหน่ง A) ของไวรัสในประเทศไทยโดยมากจะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ MN184 มีเพียง 8NP59 เท่านั้นที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงตำแหน่ง A ที่มีขนาดกว้างกว่าการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 (127 กรดอะมิโนของ 8NP59 เปรียบเทียบกับ 111 กรดอะมิโนของ MN184) นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของ 8NP46 ยังมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซิล (C terminus) (ตำแหน่ง C ในภาพที่ 12) ซึ่งซ้อนอยู่ในการขาดหายไปของกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซิลของ MN184 อีกด้วย

จากภาพที่ 12 เมื่อพิจารณาดำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนของไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้จะพบว่าจากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง พบมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง A (ประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 300 – 430) จำนวน 7 ตัวอย่าง ขนาดของการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่พบมีความหลากหลายในระดับหนึ่ง โดยสามารถพบการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้ได้ 3 ขนาด คือ ขนาด 38 กรดอะมิโน (07NP2 07NP4 และ 78/51) ขนาด 97 กรดอะมิโน (8NP46 8NP154 และ 08RB1) และขนาด 127 กรดอะมิโน (8NP59)

ไวรัสในประเทศไทยที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง B (ประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 460 – 475) มีจำนวน 9 ตัวอย่างจากที่ศึกษาทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง จาก 9 ตัวอย่างที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง B นี้ มีอยู่ 6 ตัวอย่างที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกัน คือที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 471 (1 กรดอะมิโน) ซึ่งได้แก่ตัวอย่าง 01CS1/2 8NP148 8NP46 8NP154 08RB1 และ 8NP59 ในส่วนของ 3 ตัวอย่างที่เหลือ ซึ่งได้แก่ 07NP2 07NP4 และ 78/51 มีตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้เป็นเช่นเดียวกันโดยจะมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่กว้างกว่าการขาดหายไปของกรดอะมิโนของไวรัสที่กล่าวมาแล้ว คือ มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนจำนวน 9 กรดอะมิโน ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 466 -

474 ไวรัสในประเทศไทยที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง C (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 513) มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น คือ 8NP46

จากการศึกษาตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยพบว่ามีไวรัสจากบางตัวอย่างที่มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 ซึ่งได้แก่ 07NP2 07NP4 78/51 8NP46 8NP154 08RB1 และ 8NP59 อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบตัวอย่างที่มีลักษณะการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับ SY0608 แต่อย่างใด (ในส่วนของ 07NP2 07NP4 08RB1 และ 8NP154 ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ที่สมบูรณ์นั้นไม่พบมีการขาดหายไปหรือการเข้าแทรกของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดอีกนอกจากตำแหน่งที่กล่าวมาแล้ว)

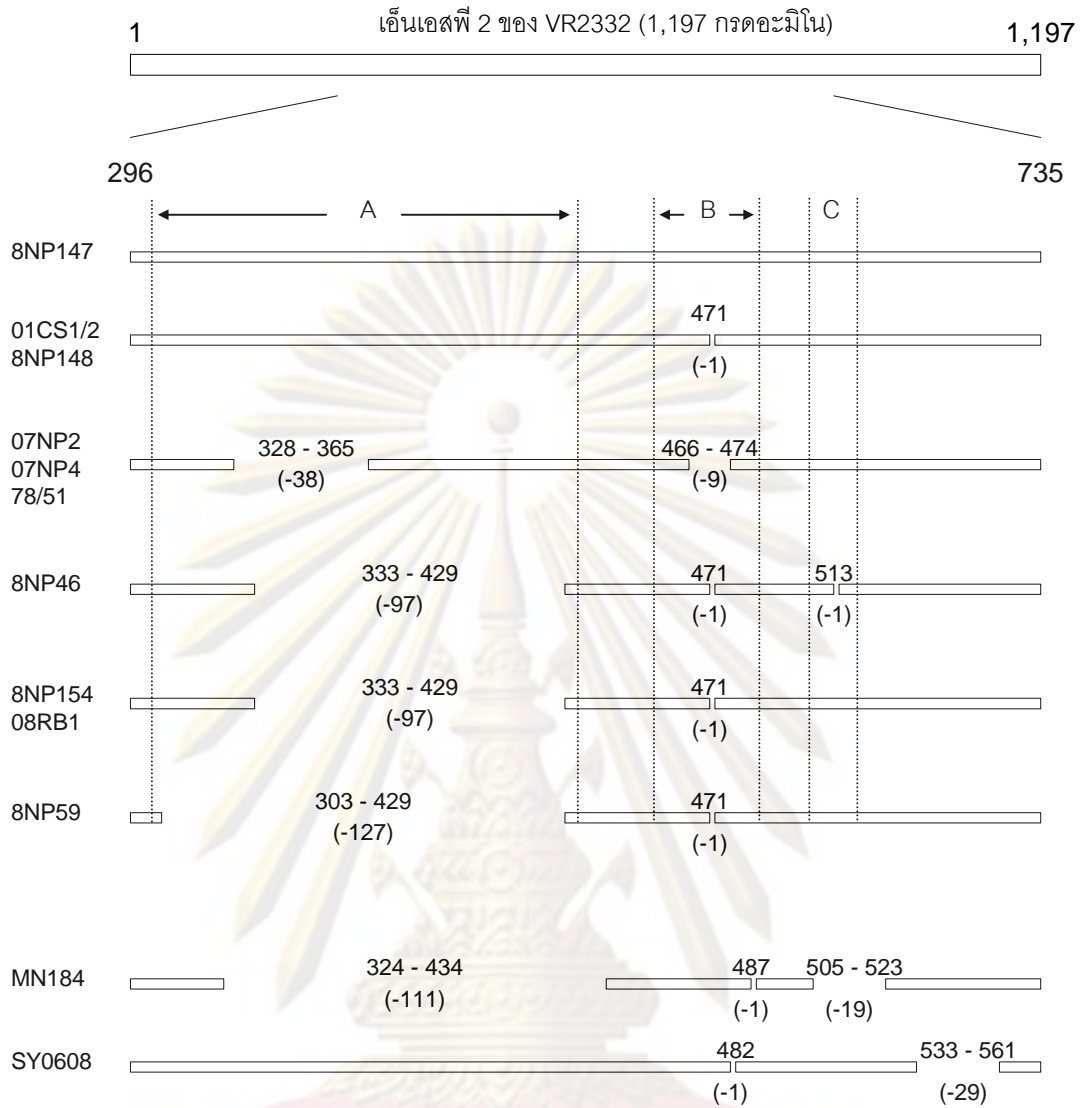


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ตำแหน่งที่คาดว่าเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่าง	ตำแหน่งที่คาดว่าเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโน <sup>1</sup> (ตำแหน่งของกรดอะมิโน)	ขนาดของการขาดหายไปของกรดอะมิโน (กรดอะมิโน)	ขนาดรวมของการขาดหายไปของกรดอะมิโน (กรดอะมิโน)
07NP2	328 - 365	38	47
	466 - 474	9	
07NP4	328 - 365	38	47
	466 - 474	9	
78/51	328 - 365	38	47
	466 - 474	9	
8NP154	333 - 429	97	98
	471	1	
08RB1	333 - 429	97	98
	471	1	
8NP46	333 - 429	97	99
	471	1	
	513	1	
8NP59	303 - 429	127	128
	471	1	
01CS1/2	471	1	1
8NP148	471	1	1
8NP147	-	-	-

<sup>1</sup>ตำแหน่งที่เกิดการการขาดหายไปของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับ VR2332 โดยเริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 เป็นกรดอะมิโนตัวที่ 1



ภาพที่ 12 แผนผังตำแหน่งการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของตัวอย่างที่ศึกษา และ MN184 และ SY0608 ในช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 ตัวเลขแสดงตำแหน่งการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนเป็นตำแหน่งที่อ้างอิงจาก VR2332 ตัวเลขในวงเล็บแสดงปริมาณการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในตำแหน่งนั้นๆ (แสดงเป็นจำนวนกรดอะมิโน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3. การศึกษาระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม

แม้ว่าไวรัสพรีอาร์อาร์เอสบางส่วนจากการศึกษาในครั้งนี้จะมีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ที่คล้ายคลึงกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีความแตกต่างจากทั้ง MN184 และ SY0608 ค่อนข้างมาก โดยพบว่าค่าความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่างเอ็นเอสพี 2 ช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 375 ของไวรัสพรีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบกับ MN184 และ SY0608 มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 60.0 – 65.0 และร้อยละ 69.5 – 75.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างจาก 01NP1.2 ซึ่งเป็นไวรัสพรีอาร์อาร์เอสไอโซเลทแรกของประเทศไทยที่ทำการถอดรหัสสมบูรณ์ทั้งจีโนม (แยกชื่อได้ใน พ.ศ. 2544) โดยมีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนประมาณร้อยละ 65.4 – 74.9 และเมื่อเทียบกับ VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของสายพันธุ์อเมริกาเหนือพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่าประมาณร้อยละ 65.7 – 75.3 อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Lylestad ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของสายพันธุ์ยุโรปพบว่ามีค่าประมาณร้อยละ 37.8 – 40.5 เท่านั้น (ตารางที่ 7)

ไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ดังจะเห็นได้จากค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเหล่านี้มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 77.0 – 99.7 และมีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนตั้งแต่ร้อยละ 68.1 – 99.5 (ตารางที่ 8) ตัวอย่างคู่ที่มีค่าความเหมือนมากที่สุดคือคู่ระหว่าง 07NP2 และ 07NP4 ซึ่งเป็นไวรัสจากฟาร์มเดียวกัน (จังหวัดนครปฐม) แต่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกันประมาณ 3 เดือน ในขณะที่ตัวอย่างคู่ที่มีค่าต่ำสุดคือคู่ระหว่าง 8NP147 และ 8NP154 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ตามลำดับ

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน (ร้อยละ) <sup>1</sup>

ตัวอย่าง	ค่าความเหมือนของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับ				
	VR2332	01NP1.2	MN184	SY0608	Lelystad
07NP2	69.9	69.7	63.3	72.1	38.3
07NP4	69.7	69.4	63.6	72.1	38.3
08RB1	65.7	65.4	60.0	69.5	40.0
8NP154	67.5	67.2	63.9	72.1	40.5
78/51	68.9	68.7	65.0	71.3	38.4
8NP59	66.9	66.6	62.7	73.7	40.8
01CS1/2	75.3	74.9	62.9	75.5	37.8
8NP46	67.7	67.4	62.3	73.9	40.2
8NP147	72.5	72.0	62.7	75.1	39.5
8NP148	74.2	73.8	60.7	72.1	38.8

<sup>1</sup>คำนวณจากการทำอไลน์เมนต์ช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 (ตำแหน่งอ้างอิงจาก VR2332)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน (ร้อยละ) และค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ (ร้อยละ) ของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทย<sup>1</sup>

	07NP2	07NP4	08RB1	8NP154	78/51	8NP59	01CS1/2	8NP46	8NP147	8NP148
07NP2	-	99.5	76.6	76.0	96.2	77.0	75.6	79.0	71.5	72.5
07NP4	99.7	-	76.6	76.3	96.2	77.3	75.8	79.0	71.8	72.8
08RB1	83.0	83.1	-	80.4	75.0	76.6	77.8	84.5	71.0	74.0
8NP154	82.0	82.0	84.9	-	76.3	92.6	74.9	88.6	68.1	74.0
78/51	98.1	98.2	82.5	81.4	-	77.0	74.0	78.7	70.2	71.8
8NP59	82.0	82.0	82.7	95.0	81.5	-	74.0	85.5	67.9	72.8
01CS1/2	82.0	82.0	84.4	82.5	81.5	82.3	-	77.7	75.2	88.6
8NP46	83.3	83.3	87.8	92.3	83.0	90.2	83.4	-	71.0	74.5
8NP147	78.0	77.9	78.0	77.0	77.4	77.5	81.5	77.8	-	72.0
8NP148	79.4	79.5	81.2	79.6	79.1	79.3	92.5	79.7	79.3	-

<sup>1</sup> ด้านบนของแนวทแยงมุมแสดงค่าความเหมือนของกรดอะมิโน ด้านล่างของแนวทแยงมุมแสดงค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ ค่าที่ได้คำนวณจากการทำอไลน์เมนต์ช่วงกรดอะมิโนที่ 296 – 735 (ตำแหน่งอ้างอิงจาก VR2332) ตัวหนาแสดงค่ามากที่สุดของค่าความเหมือนของกรดอะมิโนและค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ ตัวเลขขีดเส้นใต้แสดงค่าน้อยที่สุดของค่าความเหมือนของกรดอะมิโนและค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์

#### 4. การศึกษาทางด้านไฟโลเจเนติก

การศึกษาความสัมพันธ์ด้านไฟโลเจเนติกของเอ็นเอสพี 2 ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 ของไวรัสในประเทศไทยและไวรัสจากประเทศอื่นๆ ที่เคยมีการรายงานมาแล้ว รวมทั้งสิ้น 39 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีความเกี่ยวพันกันค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศอื่นๆ ซึ่งเห็นได้จากการที่เอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยส่วนใหญ่ (ทุกตัวอย่างยกเว้น 8NP147) มีลักษณะการจับกลุ่มในแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกเป็นโมโนไฟเลติกกรุป (monophyletic group) (ภาพที่ 13) แยกออกจากไวรัสจากประเทศอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีเพียงไวรัสจากตัวอย่าง 8NP147 เท่านั้นที่อยู่นอกสายของไวรัสในประเทศไทยและไม่มีการจับกลุ่มกับเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสใดๆ ทั้งสิ้น

จากภาพที่ 13 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทย MN184 และ SY0608 พบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยจากการศึกษาในครั้งนี้ทั้งหมดมีความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมกับเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 และ SY0608 ค่อนข้างน้อย แม้ว่าไวรัสจากประเทศไทยบางส่วนจะมีรูปแบบการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับ MN184 ก็ตาม ดังจะเห็นได้จากการที่เอ็นเอสพี 2 ของไวรัสเหล่านี้มีการเรียงตัวอยู่บนสายที่แตกต่างกันบนแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก โดยเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในประเทศไทย (ทุกตัวอย่าง ยกเว้น 8NP147) มีการจับกลุ่มอยู่ภายในคลัสเตอร์เดียวกันคือ คลัสเตอร์ C ซึ่งแยกออกจากเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศอื่นๆ อย่างชัดเจน ได้แก่ คลัสเตอร์ A ซึ่งเป็นไวรัสจากประเทศจีน (SY0608 อยู่ในคลัสเตอร์นี้) คลัสเตอร์ B ซึ่งเป็นไวรัสบางส่วนจากประเทศสหรัฐอเมริกา และคลัสเตอร์ D ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไวรัสที่พบในช่วงแรกๆ เช่น VR2332 (ไวรัสจากประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นไวรัสต้นแบบของสายพันธุ์อเมริกาเหนือ) (Collins et al., 1992) PL97-1 (ไวรัสไอโซเลทแรกของประเทศเกาหลี) (Kang et al., 2004) และ 01NP1.2 (ประเทศไทย) เป็นต้น หรือเป็นไวรัสที่มีความเกี่ยวข้องกับวัคซีน เช่น ไวรัสที่ใช้เป็นสายพันธุ์ต้นกำเนิดของวัคซีน (VR2332) วัคซีนวัคซีน (RespPRRS Ingelvac และ SP) และไวรัสที่กลายมาจากไวรัสวัคซีน (vaccine-derived field isolates) (17704A และ 17738B) เป็นต้น

จากภาพที่ 13 จะพบว่าภายในคลัสเตอร์ C นั้น ประกอบไปด้วยไวรัสในประเทศไทยที่เก็บตัวอย่างใน พ.ศ. 2544 (01CS1/2) พ.ศ. 2550 (07NP2 และ 07NP4) และ พ.ศ. 2551 (8NP154 8NP59 8NP46 08RB1 78/51 และ 8NP148) ซึ่งบ่งบอกว่านับตั้งแต่ พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาจนถึง พ.ศ. 2551 นั้น ลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้น

ยังคงมีความเกี่ยวพันกันค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสในประเทศไทยและไวรัสจากประเทศอื่นๆ ข้อบ่งชี้ที่มีความชัดเจนมากขึ้นเมื่อพบว่า 01CS1/2 และ 8NP148 ซึ่งมีระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างแตกต่างกันถึง 7 ปี ยังคงจับกลุ่มอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน คือคลัสเตอร์ 3c ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำไอน์แมนที่พบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสทั้ง 2 ตัวอย่างนี้มีค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ที่สูงถึงร้อยละ 92.5 (ตารางที่ 8)

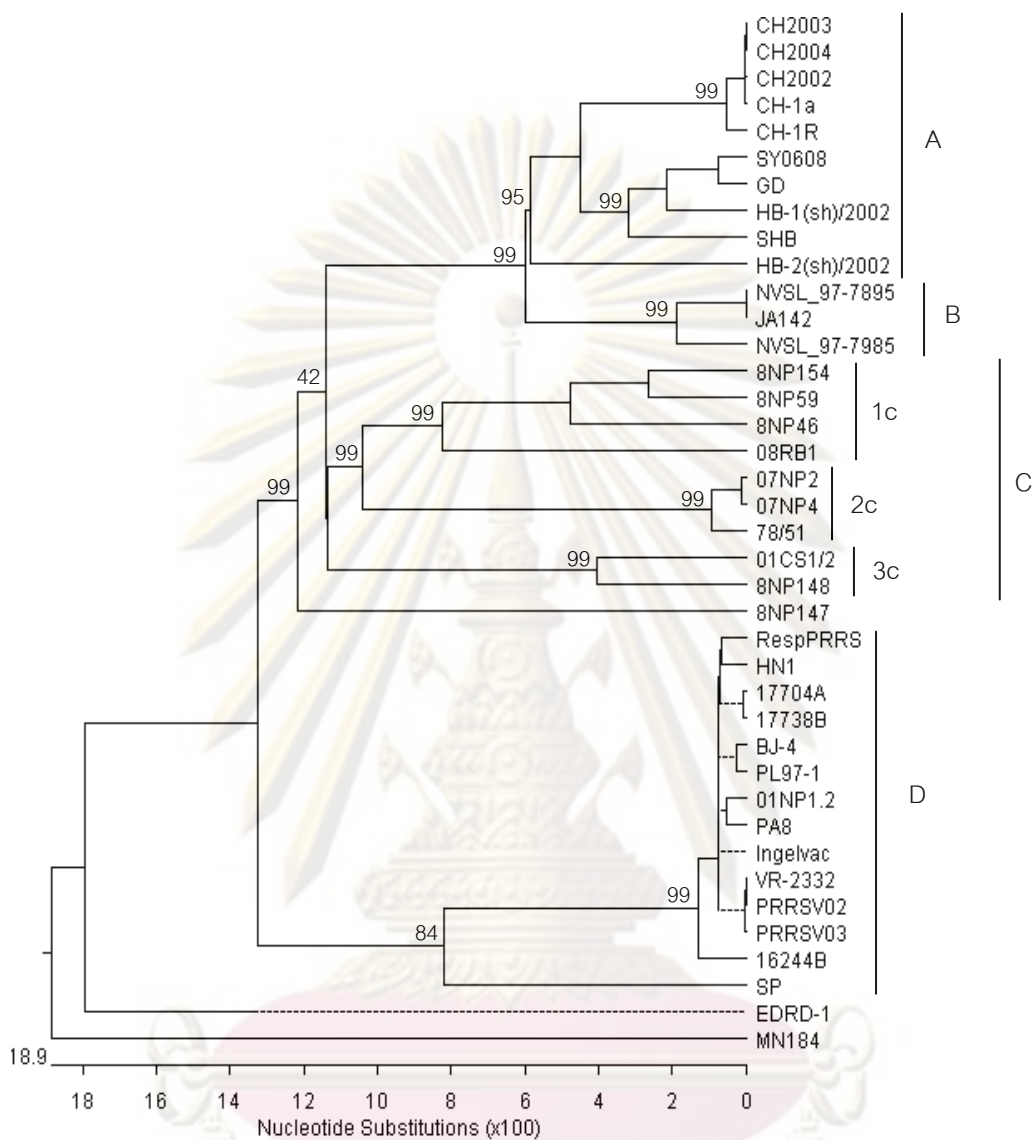
ภายในคลัสเตอร์ C ซึ่งเป็นไวรัสในประเทศไทยที่ศึกษาในครั้งนี้ (ยกเว้น 8NP147) สามารถแบ่งได้เป็น 3 คลัสเตอร์ย่อย (ภาพที่ 13) คือ คลัสเตอร์ 1c (ประกอบด้วยไวรัสจากตัวอย่าง 08RB1 8NP154 8NP46 และ 8NP59) คลัสเตอร์ 2c (ประกอบด้วยไวรัสจากตัวอย่าง 07NP2 07NP4 และ 78/51) และ คลัสเตอร์ 3c (ประกอบด้วยไวรัสจากตัวอย่าง 01CS1/2 และ 8NP148) จากแผนภูมิจะเห็นได้ว่าจะมีความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 และการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ในระดับหนึ่งเท่านั้น โดยในคลัสเตอร์ 1c ประกอบไปด้วยตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดราชบุรี (ยกเว้นตัวอย่าง 8NP59 ที่ไม่สามารถระบุจังหวัดที่ตั้งได้) คลัสเตอร์ 2c ประกอบไปด้วยตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดนครปฐม และคลัสเตอร์ 3c ประกอบไปด้วยตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา (ยกเว้นตัวอย่าง 8NP148 ที่ไม่สามารถระบุจังหวัดที่ตั้งได้) อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าตัวอย่าง 8NP147 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐมเช่นเดียวกันนั้นแยกออกมาจากคลัสเตอร์ C ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องกับเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอื่นๆ ในประเทศไทยจากการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างน้อย (เมื่อเทียบกับไวรัสอื่นๆ ในประเทศไทย)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 และลักษณะการจับกลุ่มของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยบนแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก พบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในแต่ละคลัสเตอร์นั้นมีรูปแบบการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันมาก (ภาพที่ 12) โดยพบว่า 8NP147 ซึ่งเป็นเพียงตัวอย่างเดียวที่ไม่พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนนั้นอยู่แยกออกมาจากคลัสเตอร์ C ของไวรัสในประเทศไทย ตัวอย่าง 01CS1/2 และ 8NP148 ซึ่งมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 471 จับกลุ่มอยู่ในคลัสเตอร์ 3c ตัวอย่าง 07NP2 07NP4 และ 78/51 ซึ่งมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 328 – 365 และ 466 - 474 จับกลุ่มอยู่ในคลัสเตอร์ 2c และตัวอย่าง 08RB1 8NP154 และ 8NP46 ซึ่งมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 333 – 429 และ 471 จับกลุ่มอยู่ในคลัสเตอร์ 1c นอกจากนี้ตัวอย่าง 8NP59 ซึ่งมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับ 08RB1 8NP154 และ 8NP46 แต่มีช่วงที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนกว้างกว่านั้นก็จัดอยู่ในคลัสเตอร์ 1c นี้เช่นกัน

ข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้บ่งบอกว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความ  
เกี่ยวพันทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสจากประเทศอื่น ซึ่งข้อมูลในส่วนนี้  
มีความสอดคล้องกับระเบียบของกรมปศุสัตว์ที่ระบุว่าสุกรที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (สำหรับใช้ทำ  
พันธุ์) ต้องปลอดจากโรคพรีอาร์อาร์เอส ซึ่งจากระเบียบนี้น่าจะมีผลทำให้โอกาสในการรับไวรัสพรี  
อาร์อาร์เอสจากต่างประเทศเข้ามามีน้อยลง และส่งผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสใน  
ประเทศนั้นมีความเกี่ยวพันกันสูงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสจากต่างประเทศ ดังนั้นเมื่อ  
พิจารณาจากข้อมูลเหล่านี้จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ไวรัสพรีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่มีการขาด  
หายไปของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับ MN184 นั้นมิได้เกิดจากการรับเอาเชื้อไวรัสสายพันธุ์  
MN184 เข้ามาในประเทศโดยตรงแต่อย่างใด



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสฟลูออไรด์ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 สร้างแผนภูมิด้วยวิธีคลัสตอล โดยใช้โปรแกรม MegAlign (DNASTAR, Madison, WI, USA) ตัวเลขแสดงค่า bootstrap ของบางโหนด (node) ตัวอักษรภาษาอังกฤษด้านขวาแสดงคลัสเตอร์ของไวรัส

## 5. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของซิสตีนโปรตีเอสโดเมนและจุดตัด

เอ็นเอสพี 2 ของนิโดไวรัส (nidovirus) มีคุณสมบัติเป็นโปรตีเอสโดยสามารถตัดย่อยเอ็นเอสพี 2 ให้แยกออกจากเอ็นเอสพี 3 ได้ คุณสมบัติในการเป็นโปรตีเอสนี้คาดว่าเกิดจากการที่เอ็นเอสพี 2 มีซิสตีนโปรตีเอสโดเมนอยู่ โดยทั่วไปแล้วซิสตีนโปรตีเอสโดเมนของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือคาดว่ามีความยาวประมาณ 101 กรดอะมิโน โดยอยู่ในช่วงกรดอะมิโนที่ 429 – 529 ของ ORF1a (Ziebuhr et al., 2000) หรือคิดเป็นช่วงกรดอะมิโนที่ 47 – 147 ของเอ็นเอสพี 2

จากการทำอไลน์เมนต์ของกรดอะมิโนของซิสตีนโปรตีเอสโดเมนของไวรัสในประเทศไทย (07NP2 07NP4 78/51 8NP154 และ 08RB1) และ VR2332 พบว่าลำดับกรดอะมิโนในช่วงซิสตีนโปรตีเอสโดเมนนั้น มีความอนุรักษ์ภายในกลุ่มไวรัสฟิอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือสูงมาก (ภาพที่ 14) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา (Han et al., 2006)

ผลจากการอไลน์เมนต์ของซิสตีนโปรตีเอสโดเมนของไวรัสในประเทศไทยเหล่านี้ ร่วมกับ VR2332 Lelystad และไวรัสอื่นๆ ในกลุ่มอาร์เทอร์รีไวรัสได้แก่ ไวรัสอีเอวีและไวรัสแอลดีวี ยังพบด้วยว่าไวรัสในประเทศไทยเหล่านี้ยังคงมีความอนุรักษ์ในส่วนของกรดอะมิโนซิสตีน (C) ตำแหน่งที่ 55 111 142 และ 147 และกรดอะมิโนฮิสติดีน (H) ตำแหน่งที่ 56 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์ในกลุ่มอาร์เทอร์รีไวรัสและเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในการตัดย่อยของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสอีเอวีเป็นอย่างมาก (Snijder et al., 1995; Ziebuhr et al., 2000)

เมื่อทำการศึกษากรดอะมิโนที่คาดว่าเป็จุดตัดระหว่างเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 ของไวรัสในประเทศไทย 4 ตัว ได้แก่ 07NP2 07NP4 08RB1 และ 8NP154 พบว่าจุดตัดที่เคยมีการเสนอไว้ ซึ่งได้แก่ 647G/G 981G/G 1117G/G 1196G/G และ 1197G/G (Han et al., 2006) ยังคงมีความอนุรักษ์ในไวรัสเหล่านี้ทั้งสิ้น (ภาพที่ 15) ซึ่งทำให้ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับจุดตัดที่แน่นอนระหว่างเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3



```

*****
VR2332 : 47 YSPPAEGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNAIQIL-RLPAALDRNGACTSAK 115
07NP2 : 47 YSPPAEGNCGWHCISAIVNRMVNSKFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNAIQIL-RLPAALDRNGACVSAK 115
07NP4 : 47 YSPPAEGNCGWHCISAIVNRMVNSKFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNAIQIL-RLPAALDRNGACVSAK 115
78/51 : 47 YSPPAEGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNAIQIL-RLPAALDRNGACVSAK 115
8NP154 : 47 YSPPADGNCGWHCISAIVNRMVNSKFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNTIQIL-RLPAALDRNGACVSAK 115
08RB1 : 47 YSPPADGNCGWHCISAIVNRMVNSKFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNTIQIL-RLPAALDRNGACVSAK 115
8NP59 : 47 YSPPAEGNCGWHCISAIVNHMMSKGFETTLPERARPTDDWATDEDLVNTIQIL-RLPAALDRNGACASAK 115
Lelystad : 37 YSPPTDGS CGWHVLA AIMNRMINGDFTSPLTQYNRPEDD WASDYDLVQAIQCL-RLPATVVRNRACPNK 105
EAV : 2 YNPPGDGACGYRCLAFMNG-----ATVVSAGCSSDLWCDEDELAYRVFQLSPTFTVTIPGGRVCPNAK 63
LDV : 2 YSPPGDGACGLHCISAIINDIFGDALCTKLTNCSRDSSEWLSQDMYQLVMTA-RLPATL---GHCP SAT 67
* * * * *

```

```

*****
VR2332 : 116 YVLKLEGEHWTVTVTPG-MSPSLLPLECVQGCC 147
07NP2 : 116 YVLKLVGEHWTVSVTPG-MPPSLLPLECVQGCC 147
07NP4 : 116 YVLKLVGEHWTVSVTPG-MPPSLLPLECVQGCC 147
78/51 : 116 YVLKLVGEHWTVSVTPG-MPPSLLPLECVQGCC 147
8NP154 : 116 YVLKLEGEHWTVSVTPG-MAPSLLPLECVQGCC 147
08RB1 : 116 YVLKLEGEHWTVSVTPG-MVPSLLPLECVQGCC 147
8NP59 : 116 YVLKLEGVHWTASVSPE-MSPSLLPLECIQGCC 147
Lelystad : 106 YLIKLVGVHWEVEVRSG-MAPRSLRECVVGV 137
EAV : 64 YAMICDKQHWRVKRAG--VGLCLDESCFRGTC 94
LDV : 68 YKLDCVNQHWTVTKRKGDRALGGLSPECVRGB 100
* * * * *

```

ภาพที่ 14 อไลน์เมนท์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโดเมนบนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพ็อดอาร์เอส ไวรัสอีเอวี และไวรัสแอลดีวี แรงาสีเทาแสดงกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในการตัดย่อยของซีสตีนโปรตีนโดเมนของไวรัสอีเอวี เครื่องหมายดอกจันทน์ตัวหนา (\*) ด้านบนของอไลน์เมนท์แสดงตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ระหว่างไวรัสพ็อดอาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ เครื่องหมายดอกจันทน์ (\*) ด้านล่างของอไลน์เมนท์แสดงตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ระหว่างไวรัสพ็อดอาร์เอส ไวรัสอีเอวี และไวรัสแอลดีวี ตัวเลขแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน โดยเริ่มนับจากกรดอะมิโนตัวแรกของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสแต่ละชนิด

<b>VR2332</b>	: 641	QAIIDSGGPCSGHL	654	975	ILGRLLGGARCIWH	988
<b>07NP2</b>	: 594	QAIIDSGGPCSGHL	607	928	ILGRLLGGARYVWH	941
<b>07NP4</b>	: 594	QAIIDSGGPCSGHL	607	928	ILGRLLGGARYVWH	941
<b>8NP154</b>	: 543	QAVIDSGGPCSGHL	556	877	ILGRLLGGARYVWH	890
<b>08RB1</b>	: 543	QAIIDSGGPCSGHL	556	877	ILGRLLGGARYIWH	890
		** *****			***** **	
↓						
<b>VR2332</b>	: 1,111	LRVLQAGGAMVAKA	1,124	1,190	QISKPSGGG	1,198
<b>07NP2</b>	: 1,064	LRVLQAGGAMVAEA	1,077	1,143	QISKPLGGG	1,151
<b>07NP4</b>	: 1,064	LRVLQAGGAMVAEA	1,077	1,143	QISKPLGGG	1,151
<b>8NP154</b>	: 1,013	LRVLQAGGAMVAEA	1,026	1,092	QISKPSGGG	1,100
<b>08RB1</b>	: 1,013	LRVLQAGGAMVAEA	1,026	1,092	QISKPSGGG	1,100
		***** *			***** ***	

ภาพที่ 15 อไลน์เมนต์ของลำดับกรดอะมิโนในช่วงที่คาดว่าเป็นจุดตัดของระหว่างเอ็นเอสพี 2 และเอ็นเอสพี 3 ทั้ง 5 ตำแหน่ง (Han et al., 2006) แรเงาสีเทาแสดงจุดที่คาดว่าเป็นจุดตัด GG ลูกศร (↓) แสดงจุดตัดที่ตำแหน่ง G/G เครื่องหมายดอกจันทรัดแสดงกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์ ตัวเลขแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนของบนเอ็นเอสพี 2

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 1. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย โดยมีจุดประสงค์หลักคือการศึกษาว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนเกิดขึ้นหรือไม่ และรูปแบบของการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่พบมีลักษณะคล้ายคลึงกับ MN184 และ SY0608 หรือไม่ อย่างไร ซึ่งจากการศึกษาพบว่า จากไวรัสที่ศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง พบไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง (ทุกตัวอย่างยกเว้น 8NP147) (ภาพที่ 12) และมีอยู่ประมาณ 4 – 7 ตัวอย่างที่มีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 คล้ายคลึงกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 แต่ไม่มีตัวอย่างใดที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับ SY0608 (ภาพที่ 12)

เอ็นเอสพี 2 ของ MN184 และไวรัสจากตัวอย่าง 07NP2 07NP4 78/51 08RB1 8NP154 8NP59 และ 8NP46 มีตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนบางส่วนที่เหลื่อมซ้อนกัน โดยไวรัสในประเทศไทยเหล่านี้มีตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ซ้อนอยู่ในตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนช่วงกรดอะมิโนที่ 324 – 434 (111 กรดอะมิโน) ของ MN184 มีเพียงไวรัสจากตัวอย่าง 8NP59 เท่านั้นที่มีตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้กว้างกว่าการขาดหายไปของกรดอะมิโนของ MN184 (deletion ของ 8NP59 อยู่ในช่วงกรดอะมิโนที่ 303 – 429 ในขณะที่ของ MN184 อยู่ในช่วงกรดอะมิโนที่ 324 – 434)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าไวรัสจากตัวอย่างเหล่านี้จะมีตำแหน่งการขาดหายไปของกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 ที่คล้ายคลึงกับ MN184 แต่จากข้อมูลด้านไฟโลเจเนติกนั้นบ่งบอกว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศไทยเหล่านี้และ MN184 มีความเกี่ยวพันทางด้านพันธุกรรมไม่มากนัก

การศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าไวรัสในประเทศไทยเหล่านี้เกิดจากรับเอาไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาหรือไม่ เนื่องจากเอ็นเอสพี 2 มีความหลากหลายสูง ซึ่งอาจมีไซต์ตัวแทนที่ดีในการศึกษาต้นกำเนิดของไวรัส จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงพันธุกรรมส่วนอื่นๆ ของไวรัสที่มีความอนุรักษ์เพื่อที่จะสามารถบ่งบอกถึงต้นกำเนิดของไวรัสเหล่านี้ได้

## 2. อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจุบันประเทศไทยมีไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีเอ็นเอสพี 2 ที่มีขนาดเล็กกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 ซึ่งเป็นไวรัสต้นแบบของไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยผลจากการทำไลน์เมนท์บ่งบอกว่าตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนของไวรัสในประเทศไทยเหล่านี้ มีบางส่วนที่มีการซ้อนทับกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนในปลายอะมิโนของลำดับกรดอะมิโนของเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 (ภาพที่ 12) อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ระหว่างไวรัสในประเทศไทยและ MN184 นั้นมีความเกี่ยวพันกันค่อนข้างน้อย

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายสูง โดยพบว่าค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเหล่านี้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 77.0 – 99.7 ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากโดยทั่วไปแล้วลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 นั้นมีความหลากหลายสูงอยู่แล้ว (Allende et al., 1999; Shen et al., 2000; Wootton et al., 2000; Fang et al., 2004; Gao et al., 2004) และการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการศึกษาเอ็นเอสพี 2 ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 885 – 2,205 ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีความหลากหลายสูงของเอ็นเอสพี 2 อีกด้วย (Han et al., 2006) อย่างไรก็ตามแม้ว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในประเทศอื่นๆ แล้วพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความเกี่ยวพันกันทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างสูงและมีความแตกต่างจากเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศอื่นๆ ค่อนข้างชัดเจน ดังจะเห็นได้จากลักษณะการจับกลุ่มบนแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกในภาพที่ 13 ซึ่งพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยส่วนใหญ่จับกลุ่มแยกออกมาจากไวรัสจากประเทศอื่นๆ

สาเหตุที่ทำให้เอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความเกี่ยวพันกันทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างสูงและมีความแตกต่างจากเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศอื่นๆ ส่วนหนึ่งอาจเกิดขึ้นจากลักษณะการแพร่กระจายของไวรัส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแพร่กระจายของไวรัสระหว่างประเทศไทยและประเทศอื่นๆ มีไม่สูงมากนัก กล่าวคือ มีการรับเอาไวรัสพีอาร์อาร์เอสจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทยหรือมีการแพร่กระจายของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย ออกสู่ประเทศอื่นๆ ค่อนข้างน้อย จึงทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสในประเทศไทยมีลักษณะที่จำเพาะที่แตกต่างจากไวรัสจากประเทศอื่นๆ

สิ่งหนึ่งที่สนับสนุนสมมติฐานข้างต้นที่กล่าวว่าการแพร่กระจายของไวรัสระหว่างประเทศไทยและประเทศอื่นๆ เกิดขึ้นน้อย คือ ภูมิลักษณ์ของกรมปศุสัตว์ซึ่งห้ามมิให้นำสุกรที่มีการติดไวรัสพาร์อาร์เอสเข้ามาในประเทศไทย โดยสุกรจากต่างประเทศที่จะนำเข้ามาในประเทศไทยนั้นต้องให้ผลเป็นลบจากการตรวจโรคพาร์อาร์เอสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาเท่านั้น ภูมิลักษณ์นี้ได้เริ่มใช้มาตั้งแต่ พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา ดังนั้นแม้ว่าในช่วงก่อน พ.ศ. 2539 จะมีการนำเข้าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทย (Damrongwatanapokin et al., 1996a) แต่หลังจาก พ.ศ. 2539 จนถึงปัจจุบันการแพร่กระจายของไวรัสระหว่างประเทศไทยและประเทศอื่นๆ น่าจะเกิดขึ้นน้อยมากและส่งผลทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยส่วนใหญ่มีความแตกต่างจากไวรัสในประเทศอื่นๆ ดังที่พบในการศึกษาครั้งนี้

ลักษณะการจับกลุ่มของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยบนแผนภูมิไฟโลเจเนติก (ภาพที่ 13) จากการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโออาร์เอฟ 5 ของไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่ผ่านมา (Thanawongnuwech et al., 2004a) นั่นคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 และโออาร์เอฟ 5 ของไวรัสพาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือในประเทศไทยนั้นมีการจับกลุ่มเป็นคลัสเตอร์ที่แยกออกจากกลุ่มของไวรัสของประเทศอื่นๆ ข้อมูลนี้จึงเป็นอีกหลักฐานหนึ่งที่บ่งบอกว่าลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสประเทศไทยนั้นมีความจำเพาะและแตกต่างจากไวรัสจากประเทศอื่นๆ ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากลักษณะการแพร่กระจายของไวรัสระหว่างประเทศนั้นมึ้น้อยมาก ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

อย่างไรก็ตามจะพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของ 8NP147 นั้นแยกออกมาจากคลัสเตอร์ของไวรัสในประเทศไทย (ภาพที่ 13) ซึ่งบ่งบอกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสตัวอื่นๆ ในประเทศไทยแล้ว เอ็นเอสพี 2 ของ 8NP147 นั้นมีความแตกต่างค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามยังมีอาจสรุปได้ว่า 8NP147 นั้นมีบรรพบุรุษที่แตกต่างจากไวรัสในประเทศไทยตัวอื่นๆ เนื่องจากการศึกษาด้านไฟโลเจเนติกในครั้งนี้ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงที่มีความหลากหลายค่อนข้างสูง และเอ็นเอสพี 2 ช่วงที่ทำการศึกษาของ 8NP147 นั้นก็มีความแตกต่างจากเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสตัวอื่นๆ ในประเทศไทยค่อนข้างมาก (ตารางที่ 8) ซึ่งอาจทำให้ผลการทำเอ็นเอสพี 2 ของ 8NP147 เป็นตัวแทนที่ไม่ดีนักในการศึกษาด้านไฟโลเจเนติก อาจจำเป็นต้องใช้พันธุกรรมส่วนอื่นที่มีความอนุรักษ์มากกว่า เช่น โออาร์เอฟ 7 (Meng et al., 1995a; Murtaugh et al., 1995) มาใช้ประกอบในการวิเคราะห์

แม้ว่าในการศึกษานี้จะพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีความเกี่ยวพันกันค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสจากประเทศอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าไวรัสในประเทศไทยที่มีเอ็นเอสพี 2 ขนาดสั้นกว่า VR2332 เหล่านี้เกิดจากการรับเอาไวรัสภายนอกที่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็นเอสพี 2 อยู่ก่อนแล้วเข้ามาในประเทศไทยโดยตรง หรือเกิดจากการที่ไวรัสในประเทศไทยเองนั้นเกิดการกลายพันธุ์จนมีเอ็นเอสพี 2 ที่มีขนาดสั้นลงกว่าไวรัสต้นแบบ VR2332 เนื่องจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การศึกษาไวรัสในอดีตของประเทศไทยมีค่อนข้างจำกัด จึงไม่สามารถระบุได้ว่าความหลากหลายของเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในประเทศไทยในช่วงแรกเป็นเช่นไรและมีความแตกต่างจากเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสในปัจจุบันเพียงใด และในทางเดียวกันหากการศึกษาในประเทศอื่นๆ มีน้อยก็จะเป็นการยากที่จะระบุได้อย่างมีประสิทธิภาพว่าลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสในประเทศไทยนั้นมีความเกี่ยวข้องหรือใกล้เคียงกับไวรัสจากประเทศใด เหตุผลอีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ เป็นไปได้ว่าเอ็นเอสพี 2 นั้นอาจมีใช้ตัวแทนที่ดีนักในการใช้ศึกษาถึงต้นกำเนิดของไวรัสเนื่องจากเอ็นเอสพี 2 มีความหลากหลายสูงมาก ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาด้านไฟโลเจเนติกอาจมิได้บ่งบอกถึงต้นกำเนิดของไวรัสที่นำมาศึกษา มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้พันธุกรรมส่วนอื่นที่มีความอนุรักษ์มากกว่ามาใช้ในการศึกษาร่วมด้วย เช่น โอลิอาร์เอฟ 7 เป็นต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าช่วงกรดอะมิโนที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทยสามารถแบ่งโดยสังเขปได้เป็น 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 300 – 430 ของเอ็นเอสพี 2 (ตำแหน่ง A ภาพที่ 12) ตำแหน่งประมาณช่วงกรดอะมิโนที่ 460 – 475 (ตำแหน่ง B ภาพที่ 12) และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 513 (ตำแหน่ง C ภาพที่ 12) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ในปัจจุบันที่กล่าวถึงความสำคัญของการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนของลำดับกรดอะมิโนในทั้ง 3 ช่วงนี้ หรือแม้แต่การเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งอื่นๆ บนเอ็นเอสพี 2 ซึ่งมีผลทำให้เอ็นเอสพี 2 มีขนาดสั้นลงนั้นยังมีค่อนข้างจำกัด

แม้ว่าปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับการสร้างไวรัสที่เป็นอินเฟคเชียสโคลน (infectious clone) นั้นจะแพร่หลายมากขึ้น และด้วยวิธีการนี้นักวิจัยสามารถสร้างไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมตามที่ต้องการและศึกษาถึงผลที่ตามมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ อย่างไรก็ตามการศึกษารวมถึงผลของการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ต่อลักษณะต่างๆ ของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นอาจมีอุปสรรคบางประการในการวิเคราะห์ผล เนื่องจากรายละเอียดบางอย่างเกี่ยวกับการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ผู้วิจัยต้องการเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นนั้นอาจส่งผลที่แตกต่างกัน เช่น ตำแหน่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่

แตกต่างกัน หรือขนาดของการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน อาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน (Han et al., 2007) นอกจากนี้รายละเอียดอื่นๆ เช่น ไวรัส 2 ไอโซเลทที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ในตำแหน่งเดียวกัน แต่ไวรัสทั้ง 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 ที่แตกต่างกันก็อาจมีความเป็นไปได้ที่ไวรัสทั้ง 2 นี้จะมีลักษณะที่แสดงออกที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงได้

ในการศึกษาที่ผ่านมา รวมถึงการศึกษาในประเทศไทยในครั้งนี้พบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลาย ๆ ไอโซเลทที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 นั้น โดยมากจะมีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนอยู่ในช่วงประมาณกรดอะมิโนที่ 300 – 800 ของเอ็นเอสพี 2 (Nielsen et al., 2001; Gao et al., 2004; Han et al., 2006; Li et al., 2007; Yoshii et al., 2008; Kim et al., 2009) สาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้สามารถพบไวรัสหลายไอโซเลทที่มีการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้ แต่ยังไม่พบไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงอื่นนั้น อาจเนื่องมาจากการเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้ไม่มีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของไวรัส (แต่อาจมีผลในด้านอื่น เช่น ความสามารถในการก่อโรค เป็นต้น) ในขณะที่การขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งอื่นๆ อาจส่งผลเสียที่ร้ายแรงต่อไวรัสและทำให้ไวรัสไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (Han et al., 2007)

หลักฐานสำคัญที่ทำให้เกิดแนวความคิดนี้มาจากการศึกษาทางด้านรีเวิร์สเจเนติก (reverse genetic) ที่ผ่านมา (Han et al., 2007) ซึ่งพบว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 นั้นสามารถเกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงกรดอะมิโนที่ 324 – 726 (403 กรดอะมิโน) ได้ โดยที่ไวรัสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนนั้นยังสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้อยู่ ในขณะที่การขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 ในช่วงประมาณกรดอะมิโน 323 ตัวแรก หรือการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงประมาณกรดอะมิโนตัวที่ 876 เป็นต้นไปนั้น ส่งผลทำให้ไวรัส VR2332 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไปได้ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมากว่าไวรัสไอโซเลทอื่นๆ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจาก VR2332 นั้นเมื่อมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนเกิดขึ้นบนเอ็นเอสพี 2 ในช่วงกรดอะมิโน 300 ตัวแรก หรือช่วงกรดอะมิโนตัวที่ 876 เป็นต้นไป จะให้ผลการทดลองที่เหมือนกับการศึกษาใน VR2332 นี้หรือไม่ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจด้วยว่าเมื่อทำการศึกษาในตัวสุกรแล้วจะให้ผลการศึกษาเป็นเช่นไร

มีความเป็นไปได้สูงมากที่การขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วง 300 กรดอะมิโนแรกซึ่งครอบคลุมส่วนที่เป็นโปรตีนเอสโตเมนของเอ็นเอสพี 2 ไว้ด้วยนั้น จะทำให้กระบวนการการตัดย่อยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ หรือโออาร์เอฟ 1 เอบี นั้นผิดเพี้ยนไปจากเดิม เนื่องจากโปรตีนเอสบน

เอ็นเอสพี 2 นั้นเป็นโปรตีนที่จำเป็นตัวหนึ่งที่จะทำให้การตัดย่อยโปรตีนโออาร์เอฟ 1 เอ และโออาร์เอฟ 1 เอบี เกิดขึ้นได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งภายหลังการตัดย่อยนี้จะทำให้ได้เป็นโปรตีนต่างๆ ที่ไวรัสจะนำมาใช้ในการดำรงชีวิตภายในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นถ้ามีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้ไวรัสจึงไม่น่าจะสามารถเติบโตเพิ่มจำนวนได้ ในกรณีของการขาดหายไปของกรดอะมิโนช่วงประมาณกรดอะมิโนตัวที่ 876 เป็นต้นไป ซึ่งครอบคลุมส่วนที่เป็นทรานซ์เมมเบรนของเอ็นเอสพี 2 ซึ่งมีความสำคัญในการช่วยให้เอ็นเอสพี 2 นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมของเซลล์เจ้าบ้านให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีความจำเป็นในการถ่ายแบบของอาร์เอ็นเอของไวรัส ดังนั้นการขาดหายไปของกรดอะมิโนในช่วงนี้จึงน่าจะส่งผลทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้เช่นกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 และความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบไวรัสพีอาร์อาร์เอสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง ได้แก่ MN184 (Han et al., 2006) และ SY0608 (Li et al., 2007) ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่น่าสนใจร่วมกันประการหนึ่ง คือเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสทั้ง 2 มีขนาดเล็กกว่าเอ็นเอสพี 2 ของไวรัสต้นแบบ VR2332 หรือกล่าวคือ มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนเกิดขึ้นบนเอ็นเอสพี 2 ของ MN184 และ SY0608 นั่นเอง ซึ่งจากการค้นพบไวรัสทั้ง 2 นี้ทำให้เกิดความสนใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของเอ็นเอสพี 2 และความสามารถในการก่อโรคของไวรัสพีอาร์อาร์เอสตามมา (Rowland, 2007) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเอ็นเอสพี 2 กับความรุนแรงในการก่อโรคหรือความสัมพันธ์ระหว่างการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ของเอ็นเอสพี 2 กับความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนั้นยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด

แม้ว่าในปัจจุบันจะมีไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลายไอโซเลทที่มีเอ็นเอสพี 2 ที่มีขนาดเล็กกว่าเอ็นเอสพี 2 ของ VR2332 และมีการรายงานว่าเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้อย่างรุนแรง (highly virulence) ยกตัวอย่างเช่น MN184A MN184B (Han et al., 2006) P129 (Kim et al., 2009) และ SY0608 (Li et al., 2007) เป็นต้น แต่จากการศึกษาด้านรีเวิร์สเจเนติกที่ผ่านมา (Kim et al., 2009) บ่งบอกว่าขนาดของเอ็นเอสพี 2 ที่เล็กลงนั้นไม่น่าจะเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้ไวรัสมีความรุนแรงในการก่อโรคสูงขึ้น

จากการศึกษาเปรียบเทียบรอยโรคที่ปอดของสุกรที่ได้รับอินเฟคชันโคลนที่สร้างขึ้นจาก P129 (P129-Mlu-SgrA) ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง เปรียบเทียบกับสุกรที่ได้รับ P129-Mlu-SgrA ที่มีการปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณเอ็นเอสพี 2 ให้มี



การขาดหายไปของกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นโดยมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนขนาด 131 กรดอะมิโน ในช่วงกรดอะมิโนที่ 1,074 – 1,204 ของ ORF1a (หรือคิดเป็นกรดอะมิโนที่ 663 – 793 ของ เอ็นเอสพี 2) (P129-tag) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า P129-Mlu-SgrA นั้นสามารถก่อรอยโรคที่ปอดได้ เช่นเดียวกับไวรัส P129 หรือไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการก่อโรคอื่นๆ คือพบลักษณะของถุงลมที่มีเซลล์แมคโครฟาจแทรกอยู่ภายใน และพบการเข้าแทรกของเซลล์ลิมโฟไซต์บริเวณผนังของถุงลม ในขณะที่ P129-tag infectious clone นั้นสามารถเพิ่มจำนวนในตัวสุกรได้น้อยกว่า P129-Mlu-SgrA และก่อรอยโรคที่ปอดของสุกรทดลองน้อยมาก โดยพบว่าความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด (Kim et al., 2009) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการมีขนาดของเอ็นเอสพี 2 ที่เล็กลงเพียงอย่างเดียวนั้นไม่น่าจะเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ไวรัสพาร์อาร์เอสมีความสามารถในการก่อโรคที่สูงขึ้น ดังนั้นไวรัสพาร์อาร์เอสที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่พบในประเทศไทยนั้นแม้ว่าจะได้มาจากสุกรป่วยแต่ก็มีความเป็นไปได้ที่ไวรัสพาร์อาร์เอสเหล่านี้อาจมิได้มีความรุนแรงในการก่อโรคที่สูงเช่นเดียวกับ MN184 หรือ SY0608 แต่อย่างใด ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปว่าไวรัสพาร์อาร์เอสในประเทศไทยที่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนบนเอ็นเอสพี 2 นั้น (ซึ่งมีตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของกรดอะมิโนต่างไปจาก P129-tag) สามารถก่อโรคได้อย่างรุนแรงหรือไม่ และความรุนแรงในการก่อโรคนั้นเกิดจากอิทธิพลของเอ็นเอสพี 2 มากหรือน้อยเพียงใด

### 3. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโออาร์เอฟ 7 ของไวรัสเหล่านี้ เพื่อศึกษาถึงต้นกำเนิดของไวรัส และควรมีการศึกษาถึงพยาธิวิทยาของไวรัสจากการศึกษาในครั้งนี้เพิ่มเติมเพื่อระบุถึงความสามารถหรือความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสเหล่านี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2548. พยาธิวิทยาโรคพอร์คัวรีเอส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ปออยท์กราฟิค.

### ภาษาอังกฤษ

Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R. and 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: 307-315.

Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Deen, J. and Pijoan, C. 2002. Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. Can. J. Vet. Res. 66: 196-200.

Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H.S., Xiao, Z. and Murtaugh, M. 2004. Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. Can. J. Vet. Res. 68: 267-273.

Bierk, M.D., Dee, S.A., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E. and Molitor, T.W. 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. Can. J. Vet. Res. 65: 261-266.

Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G. and Welch, S.K. 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J. Virol. 81, 14: 7371-7379.

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. and 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.

Costers, S., Lefebvre, D.J., Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. Arch. Virol. 153: 1453-1465.

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

Damrongwatanapokin, S., Patchimasiri, T., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996b. Experimental inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus (local strain) in weaning pigs. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 47: 23-34.

Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B. and Rogan, D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch. Virol. 145: 659-688.

Delputte, P.L., Costers, S. and Nauwynck, H.J. 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. J. Gen. Virol. 86: 1441-1445.

Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S. and Nauwynck, H.J. 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 179-188.

Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J. 2004. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. J. Virol. 78: 8094-8101.

- Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J. and Pensaert, M.B. 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. J. Virol. 76: 4312-4320.
- den Boon, J.A., Snijder, E.J., Chirnside, E.D., de Vries, A.A., Horzinek, M.C. and Spaan, W.J. 1991. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. J. Virol. 65: 2910-2920.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W. and Pensaert, M.B. 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. J. Virol. 72: 4520-4523.
- Fang, Y., Kim, D.Y., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A. and 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.
- Gao, Z.Q., Guo, X. and Yang, H.C. 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. Arch. Virol. 149: 1341-1351.
- Gilbert, S.A., Larochelle, R., Magar, R., Cho, H.J. and Deregt, D. 1997. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. J. Clin Microbiol. 35: 264-267.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32: 648-660.
- Han, J., Liu, G., Wang, Y. and 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. and Faaberg, K.S. 2006. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res. 122: 175-182.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I. and Paul, P.S. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 38: 528-539.
- Johnsen, C.K., Botner, A., Kamstrup, S., Lind, P. and Nielsen, J. 2002. Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: association of sustained expression of IFN-gamma and IL-10 after viral clearance. Viral Immunol. 15: 549-556.
- Joo, H.S., Park, B.K., Dee, S.A. and Pijoan, C. 1997. Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome syndrome virus. Vet. Microbiol. 55: 303-307.
- Kang, S.Y., Yun, S.I., Park, H.S., Park, C.K., Choi, H.S. and Lee, Y.M. 2004. Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res. 104: 165-179.
- Kim, D.Y., Kaiser, T.J., Horlen, K., Keith, M.L., Taylor, L.P., Jolie, R., Calvert, J.G. and Rowland, R.R. 2009. Insertion and deletion in a non-essential region of the nonstructural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity. Virus Genes. 38: 118-128.
- Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., van Reeth, K. and Pensaert, M.B. 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J. Gen. Virol. 81: 1327-1334.

- Lee, C., Hodgins, D., Calvert, J.G., Welch, S.K., Jolie, R. and Yoo, D. 2006. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. Virology. 346: 238-250.
- Lee, C. and Yoo, D. 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. Virology. 355: 30-43.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W. and 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.
- Loemba, H.D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D. and Dea, S. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 141: 751-761.
- Lopez, O.J. and Osorio, F.A. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 155-163.
- Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T. and Ahmed, R. 1993. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. J. Virol. 67: 7340-7349.
- Meng, X.J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet. Microbiol. 74: 309-329.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G. and 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. and 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: 3181-3188.
- Molina, R.M., Cha, S.H., Chittick, W., Lawson, S., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J., Evans, R., Rowland, R.R. and Zimmerman, J.J. 2008. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 126: 283-292.
- Mueller, S.N., Matloubian, M., Clemens, D.M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Gangappa, S., Larsen, C.P. and Ahmed, R. 2007. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 15430-15435.
- Mulupuri, P., Zimmerman, J.J., Hermann, J., Johnson, C.R., Cano, J.P., Yu, W., Dee, S.A. and Murtaugh, M.P. 2008. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. J. Virol. 82: 358-370.
- Murtaugh, M.P., Elam, M.R. and 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.
- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P. and Faaberg, K.S. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J. Virol. 73: 270-280.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Benfield, D.A. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 410-415.

- Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A. and Storgaard, T. 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. J. Gen. Virol. 82: 1263-1272.
- Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M. and 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. and 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.
- Pampusch, M.S., Bennaars, A.M., Harsch, S. and Murtaugh, M.P. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 61: 279-289.
- Pasternak, A.O., Spaan, W.J. and Snijder, E.J. 2006. Nidovirus transcription: how to make sense. J. Gen. Virol. 87: 1403-1421.
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N. and Snijder, E.J. 1999. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. J. Virol. 73: 2016-2026.
- Pei, Y., Hodgins, D.C., Lee, C., Calvert, J.G., Welch, S.K., Jolie, R., Keith, M. and Yoo, D. 2008. Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. Virus Res. 135: 107-114.
- Plagemann, P.G. 2004. The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 263-275.



- Pol, J.M., Wagenaar, F. and Reus, J.E. 1997. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. Vet. Microbiol. 55: 203-208.
- Ropp, S.L., Wees, C.E., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., Benfield, D.A. and Faaberg, K.S. 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. J. Virol. 78: 3684-3703.
- Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J. and Benfield, D.A. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. Vet. Pathol. 32: 361-373.
- Rowland, R.R. 2007. The stealthy nature of PRRSV infection: The dangers posed by that ever-changing mystery swine disease. Vet. J. 174: 451.
- Rowland, R.R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D. and Benfield, D.A. 2003. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. Virology. 316: 135-145.
- Rowland, R.R. and Yoo, D. 2003. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. Virus Res. 95: 23-33.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Reséndiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W. and Hernández, J. 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology. 387: 373-379.
- Shi, K., Li, H., Guo, X., Ge, X., Jia, H., Zheng, S. and Yang, H. 2008. Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally

with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. Vet. Microbiol. 129: 367-377.

Shen, S., Kwang, J., Liu, W. and 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. Arch. Virol. 145: 871-883.

Snijder, E.J., van Tol, H., Roos, N. and Pedersen, K.W. 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. J. Gen. Virol. 82: 985-994.

Snijder, E.J., Wassenaar, A.L. and Spaan, W.J. 1992. The 5' end of the equine arteritis virus replicase gene encodes a papainlike cysteine protease. J. Virol. 66: 7040-7048.

Snijder, E.J., Wassenaar, A.L. and Spaan, W.J. 1994. Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. J. Virol. 68: 5755-5764.

Snijder, E.J., Wassenaar, A.L., Spaan, W.J. and Gorbalenya, A.E. 1995. The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. J. Biol. Chem. 270: 16671-16676.

Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2003. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 84: 2755-2760.

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 84: 453-459.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.

- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A. and Damrongwatanapokin, S. 2004a. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet. Microbiol. 101: 9-21.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P. and Thacker, E.L. 2004b. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 901-8.
- Thanawongnuwech, R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A., Royer, R.L. and Thacker, B.J. 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. Vet. Pathol. 37: 143-152.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L. and Halbur, P.G. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). Vet. Immunol. Immunopathol. 59: 323-335.
- Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J. and Thacker, E.L. 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. Vet. Immunol. Immunopathol. 79: 115-127.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- van Aken, D., Zevenhoven-Dobbe, J., Gorbalenya, A.E. and Snijder, E.J. 2006. Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7. J. Gen. Virol. 87: 3473-3482.

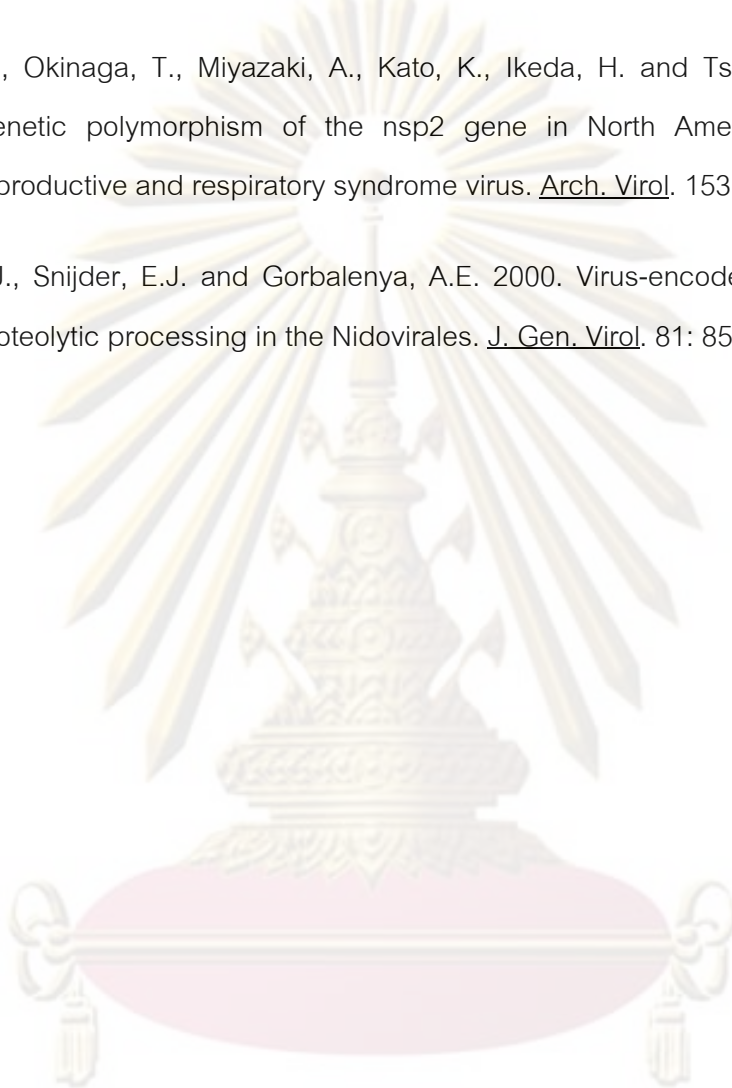
- van der Meer, Y., van Tol, H., Locker, J.K. and Snijder, E.J. 1998. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex. J. Virol. 72: 6689-6698.
- van Dinten, L.C., Wassenaar, A.L., Gorbalenya, A.E., Spaan, W.J. and Snijder, E.J. 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. J. Virol. 70: 6625-6633.
- van Dinten, L.C., van Tol, H., Gorbalenya, A.E. and Snijder, E.J. 2000. The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication, and virion biogenesis. J. Virol. 74: 5213-5223.
- van Gucht, S., Labarque, G. and van Reeth, K. 2004. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 165-178.
- van Reeth, K. 1997. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet. Microbiol. 55: 223-230.
- van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. and Pensaert, M. 1999. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. Res. Vet. Sci. 67: 47-52.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A. and Nauwynck, H.J. 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. J. Virol. 77: 8207-8215.

- Verheije, M.H., Olsthoorn, R.C., Kroese, M.V., Rottier, P.J. and Meulenber, J.J. 2002. Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication. J. Virol. 76: 1521-1526.
- Wang, Y., Liang, Y., Han, J., Burkhart, K.M., Vaughn, E.M., Roof, M.B. and Faaberg, K.S. 2008. Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence. Virology. 371: 418-429.
- Wassenaar, A.L., Spaan, W.J., Gorbalenya, A.E. and Snijder, E.J. 1997. Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that NSP2 acts as a cofactor for the NSP4 serine protease. J. Virol. 71: 9313-9322.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F. and et al. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13: 121-130.
- Wills, R.W., Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Yoon, K.J., Ladely, S. and Zimmerman, J.J. 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and Salmonella choleraesuis in swine. Vet. Microbiol. 71: 177-192.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet. Microbiol. 55: 231-240.
- Wootton, S., Yoo, D. and Rogan, D. 2000. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. Arch. Virol. 145: 2297-2323.
- Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M. and Molitor, T.W. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 289-292.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 305-312.

Yoshii, M., Okinaga, T., Miyazaki, A., Kato, K., Ikeda, H. and Tsunemitsu, H. 2008. Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type--porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 153: 1323-1334.

Ziebuhr, J., Snijder, E.J. and Gorbalenya, A.E. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. J. Gen. Virol. 81: 853-879.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การเตรียมแบคทีเรีย *E. coli* และการทรานส์ฟอร์มเมชัน

### ขั้นตอนการปฏิบัติ

- a) นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โคโลนีเดี่ยว มาเพิ่มจำนวนโดยใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- b) บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน)
- c) นำแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- d) ปั่นตกตะกอนแบคทีเรียที่ 1,500 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
- e) ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสออกและทำการกระจายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร
- f) ตั้งบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วทำการปั่นตกตะกอน (ดังข้อ d)
- g) ดูดสารละลายส่วนใสออกและทำการกระจายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและกลีเซอรอลปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- h) แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร และทำการเก็บที่อุณหภูมิ - 80 °C จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป
- i) นำแบคทีเรีย *E. coli* (200 ไมโครลิตร) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  เรียบร้อยแล้วที่อยู่ในหลอดทดลอง 1.5 ไมโครลิตร ออกมาจากอุณหภูมิ - 80 °C แล้วนำมาตั้งไว้บนน้ำแข็งให้ละลาย
- j) เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pGEM-T-Easy ลงไปในแบคทีเรีย ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นตั้งหลอดทดลองไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- k) นำหลอดทดลองจากข้อ j) มาอุ่นที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และทำการบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- l) ปั่นตกตะกอนแบคทีเรียที่ 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- m) ดูดส่วนใสทิ้งประมาณ 600 ไมโครลิตร
- n) กระจายตะกอนแบคทีเรียแล้วทำการเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Amp/X-Gal/IPTG ชนิดอุ่นที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ
- o) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน)
- p) เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีเป็นสีขาวมาใช้งานต่อไป



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ.รุ่งธรรม เกษโกวิท เกิดวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2549



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย