บทความวิชาการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.tci-thaijo.org/index.php/jmvm/

การพัฒนาวัคซีนรูปแบบใหม่ต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกร

ทิพวัลย์ จันทะฟอง[1,#]

[1]ภาควิชาพรีคลินิก สาขาไวรัสวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRSV) เป็นสาเหตุของโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตสุกรลดลง ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก ความเสียหายที่เกิดขึ้น คือ พบกลุ่มอาการความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์และแท้งในช่วงท้ายของการตั้งท้องในแม่สุกร ร่วมกับการแสดงอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจในลูกสุกร ในปัจจุบันโรคพีอาร์อาร์เอสเป็นโรคประจำถิ่นที่พบได้ในหลายประเทศทั่วทวีปเอเชีย อาทิ จีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ ไต้หวัน และไทย เนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไวรัสที่สามารถตรวจพบได้เป็นประจำในสุกร จึงมีหลากหลายมาตรการเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถหมุนเวียนและเกิดการติดเชื้อซ้ำในฝูงสุกรจำนวนมาก การใช้วัคซีนจึงกลายเป็นแนวทางหลักในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อไวรัส ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะและยาต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ งานวิจัยหลายๆงานในปัจจุบันมุ่งเน้นศึกษาการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งมีทั้งในระดับการทดลองและระดับการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนในภาคสนาม อย่างไรก็ตามวัคซีนเหล่านี้ยังคงมีข้อด้อยหลายประการ ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไป ในบทความวิชาการฉบับนี้ได้รวบรวมความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนพีอาร์อาร์เอสในรูปแบบใหม่ องค์ความรู้จากบทความนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนรูปแบบใหม่ในอนาคตต่อไป ซึ่งจะช่วยให้สัตวแพทย์และผู้ที่เกี่ยวข้องสามารถพัฒนามาตรการในการควบคุมและกำจัดไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: วัคซีน วัคซีนรูปแบบใหม่ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สุกร

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2561. 13(1): 85-99.

E-mail address: jantafong1980@gmail.com

Development of Novel Vaccines Against PRRS Viruses in Pigs

Tippawan Jantafong[1,#]

[1]Department of Pre-clinic, Faculty of Veterinary Medicine,
Mahanakorn University of Technology, 140 Cheum-samphan road, Nongchok, Bangkok 10530 Thailand

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a causative agent of a devastating disease that namely Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) brought huge losses to pork production in swine industry worldwide. The disease is characterized by massive reproductive failure and late term abortion in sows as well as respiratory disorder in piglets. In the present, PRRS is endemic in several countries in Asia such as China, Japan, South Korea, Taiwan and Thailand. As, PRRSV has become one of the most common viruses affecting swine population, several control strategies were established. However, these viruses still circulate and re-infection occurs in many swine herds. Of all control and prevention measures, vaccination is the main approach for control and eradication of PRRSV infection in swine herds since no specific treatment and no any antiviral drug is available for curing and control of PRRS. Thus, several studies have focused on the development of an effective vaccine against PRRSV in both experimental trials and field studies. Nevertheless, these vaccines still have several drawbacks. Thus, development of an effective PRRSV vaccine is one of the most interesting areas. This present review article provides the knowledge of recent novel PRRSV vaccine development. The information from this review article can be applied for further study about PRRSV vaccine development, resulting in enlighten veterinary practitioners and other related persons to develop more effective control measures aiming to PRRSV eradication.

Keywords: Vaccine, Novel vaccine, PRRS virus, Pig

[#]Corresponding author
E-mail address: jantafong1980@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(1): 85-99.

บทนำ

โรคพีอาร์อาร์เอส หรือ PRRS เป็นปัญหาสำคัญที่พบมากในแหล่งที่มีการเลี้ยงสุกรแบบอุตสาหกรรม โดยเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค คือ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับสุกร คือ พบกลุ่มอาการความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์และการแท้งในช่วงท้ายของการตั้งท้องในแม่สุกร ร่วมกับการแสดงอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจในลูกสุกร ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตสุกรลดลง ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก อาทิในสหรัฐอเมริกาโรคพีอาร์อาร์เอสสร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจไปกว่า 664 ล้านเหรียญต่อปี (Holtkamp *et al.*, 2013) ในขณะที่พบการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสครั้งใหญ่ในประเทศจีน ซึ่งไวรัสที่พบเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (highly pathogenic PRRSV; HP-PRRSV) ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มมากขึ้น (Tian *et al.*, 2007) โดยพบสุกรป่วยจากสายพันธุ์ HP-PRRSV หลายล้านตัว ต่อมาพบการแพร่ระบาดไปยังประเทศเวียดนามและกัมพูชา ซึ่งส่งผลเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยพบความเสียหายเนื่องจากไวรัสพีอาร์อาร์เอสอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาความชุกรายปีของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (annual surveillance) จากซีรั่มสุกรจำนวน 21,272 ตัวอย่าง ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2556 ใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกร้อยละ 20.60 โดยพบความชุกของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (NA) สูงที่สุด (ร้อยละ 53.48) รองลงมา ได้แก่ สายพันธุ์ HP (ร้อยละ 29.43) EU (ร้อยละ 15.99) และ mixed strain (ร้อยละ 1.10) ตามลำดับ (Jantafong *et al.*, 2015) นับตั้งแต่มีการพบไวรัสครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2532 เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ถึงแม้จะมีความพยายามอย่างมากจากภาครัฐและเอกชนเพื่อจัดการกับปัญหาดังกล่าวแต่ยังไม่ได้ข้อสรุปที่สามารถแก้ปัญหาได้อย่างแท้จริง

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นไวรัสที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ในการก่อโรคในสุกรทั้งในประเทศไทยและอีกหลายประเทศทั่วโลก ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสยังไม่กระจ่างชัดนัก โดยองค์ความรู้ที่ทราบ คือ เซลล์เป้าหมายในการแบ่งตัวของไวรัส คือ dendritic cell, monocyte และ macrophage มีรายงานว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถกดภูมิคุ้มกันได้ทั้ง ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และ ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immunity) ในปัจจุบันยังไม่มีแนวทางในการแก้ปัญหาเฉพาะสำหรับกรณีการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอส การสร้างภูมิคุ้มกันในสุกรจึงเป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรค วัคซีนที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (commercial vaccine) ส่วนใหญ่เป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นประเภท modified live vaccine (MLV) อาทิ Ingelvac®-PRRS, Amervac®-PRRS และ Pyrsvac-183 ซึ่งเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกา ในขณะที่วัคซีนชนิดเชื้อตาย (inactivated vaccine) มีข้อจำกัดในการใช้ค่อนข้างมาก คือ ให้ผลในการตอบสนองทางภูมิต้มกันต่ำ ดังนั้นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นประเภท MLV จึงได้รับการยอมรับมากกว่าเนื่องจากมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากกว่า และสามารถช่วยลดอาการทางคลินิกของระบบทางเดินหายใจได้ อย่างไรก็ตามการทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นประเภท MLV

ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ อาทิ ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ ภูมิคุ้มกันที่เหนี่ยวนำโดยวัคซีนจะให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน (homologous strain) แต่ไม่มีความสามารถในการคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ (cross protective) ให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นค่อนข้างล่าช้าหลังการทำวัคซีน นอกจากนี้ไวรัสสามารถแฝงตัวอยู่ในร่างกายสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นได้เป็นระยะเวลานาน และมีรายงานการขับไวรัสผ่านทางรกและน้ำเชื้อ และที่สำคัญที่สุด คือ การกลับมาก่อโรคของวัคซีนชนิดเชื้อเป็น (revert to virulence) (Charerntantanakul, 2012)

แม้ในปัจจุบันจะมีการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อพีอาร์อาร์เอสอย่างต่อเนื่อง แต่ยังไม่มีวัคซีนชนิดใดที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ทั้งในแง่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลากหลายสายพันธุ์ (Ruenphet *et al*., 2017) และความปลอดภัยของวัคซีนเอง ดังนั้นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ควรทำการพัฒนาวัคซีนต่อโรคพีอาร์อาร์เอสให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค มีความปลอดภัยสูงและใช้ประโยชน์ได้ทางการค้า

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; PRRSV)

ปัจจุบันโรคพีอาร์อาร์เอสกลายเป็นโรคประจำถิ่นที่พบได้ในประชากรสุกรเกือบทั่วโลก ซึ่งสร้างความสูญเสียเป็นอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร อาการทางคลินิกโดยทั่วไปในสุกรพ่อแม่พันธุ์จะพบกลุ่มอาการในระบบสืบพันธุ์ และมักพบการแท้งในช่วงท้ายของการตั้งท้อง หรือลูกสุกรอ่อนแอหลังคลอด พบภาวะลูกกรอก และคุณภาพน้ำเชื้อในสุกรพ่อพันธุ์ต่ำลง ในขณะที่พบกลุ่มอาการในระบบทางเดินหายใจในสุกรทุกช่วงอายุ (Rowland, 2007) โดยไวรัสที่ก่อโรคพีอาร์อาร์เอส คือ PRRSV ซึ่งเป็นไวรัสขนาดเล็ก ที่มี enveloped หุ้ม มีลักษณะสารพันธุกรรมแบบ single-stranded, positive-sense RNA (Collins et al., 1992) ไวรัส PRRSV เป็นสมาชิกในวงศ์ Arteriviridae ซึ่งจัดอยู่ใน order Nidovirales (Snijder and Meulenberg, 1998) จีโนมของไวรัสประกอบด้วย 9 กรอบการอ่านรหัส (open reading frames; ORFs) ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b และ ORF3 - ORF7 โดย ORF1a และ ORF1b อยู่ด้าน 5' ของจีโนมมีขนาดประมาณร้อยละ 75 ของจีโนมทั้งหมด และถูกแปลรหัสเป็น non-structural protein (nsp) 14 ชนิด มีหน้าที่สร้าง RNA polymerase ของไวรัส (Ziebuhrand *et al*., 2000) ส่วน ORFs ที่อยู่ด้านปลาย 3' จะเป็นรหัสสำหรับโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) 7 ชนิด (Meng *et al*., 1996) โดย ORF2a, ORF3, ORF4 และ ORF5 เป็นรหัสสำหรับ glycosylated proteins GP2a, GP3, GP4 และ GP5 ตามลำดับ ส่วน ORF2b และ ORF6 ถูกแปลรหัสเป็น glycosylated proteins E และ M ตามลำดับ ในขณะที่ ORF7 ถูกแปลรหัสเป็น nucleocapsid protein (N) (Dea *et al*., 2000; Spilman *et al*., 2009) GP5 protein เป็น envelope glycoprotein ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากประกอบด้วย neutralization epitopes จำนวนมาก (Ostrowski *et al*., 2002) ที่มีหน้าที่เป็นโปรตีนกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenic protein) ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ดังนั้น GP5 จึงเป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับการพัฒนาวัคซีน อย่างไรก็ตาม PRRSV GP5 vaccine ที่ถูกพัฒนาขึ้นส่วนใหญ่พบว่าการกระตุ้น neutralizing

antibodies เกิดล่าช้าและการตอบสนองค่อนข้างต่ำ (Jiang *et al.*, 2007) ซึ่งบ่งชี้ว่าอาจมีปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ GP5 protein

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนา PRRSV vaccine

กลไกในการก่อโรคของไวรัส (Pathogenesis)

เชื้อไวรัส PRRSV เข้าสู่ร่างกายสุกรโดยอาศัยการจับกัน (interaction) ระหว่าง อนุภาคไวรัสกับตัวรับบนผิวเซลล์ของ host หลากหลายชนิด อาทิ CD163, Heparan sulfate, Sialoadhesin และ CD151 ไวรัสเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่เยื่อบุทางเดินหายใจ โดยเฉพาะใน porcine alveolar macrophages (PAMs) ในเยื่อหุ้มปอด และเซลล์ในกลุ่ม monocyte/macrophages lineage หรือเซลล์ในระบบน้ำเหลืองข้างเคียง (Thanawongnuwech *et al.*, 2000) การที่ไวรัสมีกลุ่มเซลล์เป้าหมายเป็น monocyte/macrophages lineage ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ส่งผลให้การทำงานของระบบดังกล่าวลดประสิทธิภาพลง นอกจากนี้ ไวรัสมีความสามารถแฝงอยู่ในร่างกายสุกรเป็นเวลานานหลายสัปดาห์หรืออาจพบนานหลายเดือน (persistent infection) (Zimmerman *et al.*, 1992) การติดเชื้อแบบ persistent infection เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การกำจัดไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นไปด้วยความยากลำบาก เนื่องจากไวรัสมักซ่อนตัวอยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองโดยเฉพาะในต่อมทอนซิล การตรวจทางซีรั่มวิทยาโดยวิธี ELISA ไม่พบความแตกต่างระหว่างสุกรที่เป็นพาหะและสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นประเภท MLV จากข้อมูลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีความสามารถในการกดภูมิคุ้มกันให้ลดลง และส่งผลให้สุกรติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่าย

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune response)

กลไกในการกดภูมิคุ้มกันของไวรัสพีอาร์อาร์เอสเป็นปัญหาสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีน โดยหลังการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถตรวจพบ neutralizing antibodies ค่อนข้างล่าช้ากว่าไวรัสชนิดอื่น โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (Meier *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบการตอบสนองที่ลดลงของสารสื่อการอักเสบ (inflammatory cytokines) ซึ่งประกอบด้วย type 1 interferons (IFN-α, IFN-β), TNF-α และ interleukin-1 (IL-1) (Van Reeth *et al.*, 1999) โดยพบว่า nsp1-β มีผลต่อการยับยั้ง TLR3-mediated signaling pathways ส่งผลต่อการสร้าง IFN-β ลดลง (Beura *et al.*, 2010) ในขณะที่ nsp2 มีผลกดการสร้าง IL-1 และ TNF-α (Chen *et al.*, 2010) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า ไวรัสพีอาร์อาร์เอส มีกลไกในการยับยั้งการสร้าง early cytokine ของทั้ง macrophages และ dendritic cells ส่งผลให้ประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบโดยกำเนิดลดลง (innate immunity) การสร้าง neutralizing antibodies ค่อนข้างล่าช้า นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการกดการสร้าง cytokine ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immunity) โดยเฉพาะ IFN-γ และส่งผลต่อการตอบสนองของ cytotoxic T cell ที่ลดลง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัส (Heterogeneity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอีกปัจจัยที่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวัคซีน โดยเมื่อเร็วๆนี้ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ได้ถูกจัดจำแนกใหม่อยู่ใน *Porartevirus* genus ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 2 genotypes คือ PRRSV-1 หรือ type 1 (European;

EU) และ PRRSV-2 หรือ type 2 (North American; NA) (Adams *et al*., 2016) โดยมีความใกล้ชิดกันในลำดับเบสเพียงร้อยละ 67 ในขณะที่อาการทางคลินิกคล้ายคลึงกัน (Kappes and Faaberg, 2015) ส่วนไวรัสสายพันธุ์เดียวกันแต่ต่าง strain พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมในสายพันธุ์เดียวกันพบว่า M gene เป็นส่วนอนุรักษ์มากที่สุด ในขณะที่ GP5 gene เป็นส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุด (Dea *et al*., 2000) Jantafong *et al*. (2015) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่พบในประเทศไทยและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า PRRSV-2 เป็นสายพันธุ์ที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งภูมิภาค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HP-PRRSV strain เป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้นในสุกรในประเทศไทย จากความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวส่งผลให้วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนเท่านั้น แต่ไม่มีความคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ (Cross protection) นอกจากนี้มีรายงานการเกิด quasispecies ในไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ (Schommer and Kleiboeker, 2006) ทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลาย strain ในสุกรตัวเดียวกัน ซึ่งส่งผลให้การป้องกันโรคด้วยวัคซีนไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

วัคซีนทางการค้าต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

วัคซีนต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในเชิงการค้าส่วนใหญ่จะผลิตในรูปของ modified live virus (MLV) vaccine และ inactivated vaccine (ตารางที่ 1) ในปัจจุบันพบว่า PRRSV inactivated vaccine มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร โดยมีรายงานว่าหลังจากการฉีดวัคซีนเชื้อตายแม้ว่าสุกรจะมีการสร้าง neutralizing antibodies แต่ความสามารถในการคุ้มโรคค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า neutralizing antibodies ที่กระตุ้นด้วยวัคซีนเชื้อตายที่ฉีดให้กับแม่สุกรอุ้มท้องไม่สามารถป้องกันลูกสุกรจากการติดเชื้อไวรัสได้ ในขณะที่ความปลอดภัยมีค่อนข้างสูง (Vanhee *et al*., 2009) เนื่องจากไม่สามารถก่อโรคจากวัคซีนได้ ดังนั้น inactivated vaccine จึงไม่เหมาะสำหรับการใช้เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส แต่เหมาะสำหรับในกรณีที่ใช้ในการรักษาสุกรที่ป่วยด้วยโรคพีอาร์อาร์เอส หรือใช้เป็น therapeutic vaccine (Nan *et al*., 2017)

ดังนั้นจึงมีการพัฒนา PRRSV MLV vaccine กันอย่างแพร่หลาย โดย PRRSV MLV vaccine ชนิดแรกที่ผลิตขึ้นใช้ในเชิงการค้า คือ RespPRRS® ซึ่งปัจจุบันถูกพัฒนาเรื่อยมาเป็น Ingelvac® PRRS MLV โดยวัคซีนดังกล่าวเตรียมจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง หลายๆ passage เพื่อลดความรุนแรงของไวรัสลง หลังจากนั้น PRRSV MLV vaccine ได้ถูกพัฒนามากขึ้นทั้งในยุโรปและอเมริกา (Mengeling, 2005) ถึงแม้ว่า PRRSV MLV vaccine จะมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า PRRSV inactivated vaccine แต่จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าวัคซีนดังกล่าวยังขาดประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยที่ดีพอ โดยพบว่าไม่มีวัคซีนทางการค้าชนิดใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ และความสามารถในการป้องกันโรคต่ำสำหรับไวรัสต่างสายพันธุ์ หากมีการใช้วัคซีนที่ประกอบด้วยไวรัสพีอาร์อาร์เอสหลายสาย

ตารางที่ 1 วัคซีนชนิด Inactivated vaccine และ MLV ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในเชิงการค้า

ชื่อวัคซีนทางการค้า	บริษัทผู้ผลิต	ชนิดวัคซีน	สายพันธุ์ไวรัส
Progressis®	Merial	Inactivated vaccine	PRRSV-1 (EU)
Ingelvac® PRRS KV	Boehringer Ingelheim	Inactivated vaccine	PRRSV-1 (EU)
Suipravac-PRRS	Hipra	Inactivated vaccine	PRRSV-1 (EU)
Suivac PRRS-INe	Dyntec	Inactivated vaccine	PRRSV-1 (EU)
Suivac PRRS-IN	Dyntec	Inactivated vaccine	PRRSV-1 (EU)
Ingelvac® PRRS MLV	Boehringer Ingelheim	MLV vaccine	PRRSV-2 (NA)
ReproCyc® PRRS-PLE	Boehringer Ingelheim	MLV vaccine	PRRSV-2 (NA)
Ingelvac® PRRS ATP	Boehringer Ingelheim	MLV vaccine	PRRSV-2 (NA)
Fostera® PRRS	Zoetis	MLV vaccine	PRRSV-2 (NA)
Porcilis PRRS®	Merck	MLV vaccine	PRRSV-1 (EU)
Amervac-PRRS®	Hipra	MLV vaccine	PRRSV-1 (EU)
Pyrsvac-183®	Syva	MLV vaccine	PRRSV-1 (EU)
Ingelvac PRRSFLEX® EU	Boehringer Ingelheim	MLV vaccine	PRRSV-1 (EU)
ReproCyc® PRRS EU	Boehringer Ingelheim	MLV vaccine	PRRSV-1 (EU)

พันธุ์ อาจก่อให้เกิดความรุนแรงของวัคซีนขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไวรัสวัคซีนสามารถขับออกจากสุกร (virus shedding) ที่ได้รับ PRRSV MLV vaccine และติดต่อไปยังสุกรที่ปลอดเชื้อได้ (Mengeling *et al.*, 2003) ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้ MLV vaccine ยังไม่มีความปลอดภัยเพียงพอ เนื่องจากไวรัสอาจกลายพันธุ์กลับสู่สภาวะที่ก่อโรคได้ (reversion to virulence)

การพัฒนา PRRSV vaccine รูปแบบใหม่

ตลอดหลายสิบปีที่ผ่านมา PRRSV vaccine รูปแบบใหม่ได้มีการการพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยเทคนิคต่างๆ มากมาย อาทิ DNA vaccine, Subunit vaccine, Inactive virus vaccine, Insect cell-derived vaccine หรือ Virus vector vaccine เพื่อมาทดแทนวัคซีนทางการค้าที่ประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก รายละเอียดของประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอสแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2 อย่างไรก็ตาม วัคซีนรูปแบบใหม่เหล่านี้ส่วนใหญ่ยังอยู่ในขั้นการทดลอง (PRRSV experimental vaccine) หากการพัฒนาวัคซีนดังกล่าวประสบผลสำเร็จ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้อัตราการป่วยและอัตราการตายในสุกรลดลง ช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรได้เป็นอย่างดี ในบทความฉบับนี้ได้สรุปงานวิจัยที่น่าสนใจในปัจจุบัน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนรูปแบบใหม่ในอนาคตต่อไป

ตารางที่ 2 PRRSV วัคซีนรูปแบบใหม่ที่กำลังพัฒนา (ดัดแปลงจาก Charerntantanakul, 2012)

ชนิดวัคซีน	ยีนเป้าหมาย	การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity)		ประสิทธิภาพการป้องกันโรค (Protection)	
		HI	CMI	Homologous	Heterologous
DNA vaccine	ORF1-7	+	+	+	⊗
Subunit vaccine	GP5	+/-	+/-	-	⊗
Synthetic peptide vaccine	GP5	-	-	⊗	-
Adenovirus vector vaccine	GP3, 4, 5	+	+	⊗	⊗
PRV vector vaccine	GP5, M	+	+	+	⊗
Poxvirus vector vaccine	GP3, 5, M	+	+	+	⊗
TGEV vector vaccine	GP5, M	+	⊗	+	⊗
Alphavirus-derived replicon	GP5, M	+	+	+	+
Bacterial vector vaccine	GP5, M	+	-	+	⊗
Insect cell-derived vaccine	ORF3, 5, 7	+	⊗	+	⊗
Plant-derived vaccine	GP5	+	+	⊗	⊗
Gene-deleted MLV	nsp2 epitope	+	⊗	⊗	⊗

(+) คือ กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี (–) คือ ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (+/-) คือ กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ต่ำ (⊗) คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

การพัฒนา PRRSV DNA vaccine

การพัฒนาวัคซีนต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในรูปแบบ DNA vaccine ได้ถูกพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง Cui *et al*. (2016) ทำการพัฒนา GP5 Mosaic T-cell DNA vaccine โดยทำการทดลองฉีดวัคซีนในลูกสุกรด้วยวิธี gene gun หรือ electroporation หลังจากนั้นทำการ challenge ไวรัส PRRSV-2 สายพันธุ์ VR2332 ผลการทดลองบ่งชี้ว่ามีการตอบสนองของ lymphocyte เพิ่มมากขึ้น ระดับการแสดงออกของ IFN-γ เพิ่มสูงขึ้น ระดับของ IL-10 ลดลง ในขณะที่ปริมาณการสร้าง virus-specific antibodies เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน แม้วัคซีนรูปแบบนี้จะมีความปลอดภัยค่อนข้างสูงแต่ประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังไม่ดีนักเมื่อเทียบกับการใช้ PRRSV MLV vaccine จากการศึกษาของ Sirisereewan *et al*. (2017) ได้ทำการประยุกต์ใช้ DNA vaccine ในแง่การเป็น prime-boost immunization ของ PRRSV MLV vaccine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อให้ดียิ่งขึ้น โดยนักวิจัยพบว่าหากทำการฉีดวัคซีนชนิด DNA vaccine ที่บรรจุส่วน PRRSV-truncated nucleocapsid protein (pORF7t) ให้แก่สุกรหลังจากนั้น 14 วันจึงทำการฉีด PRRSV MLV vaccine ผลการทดลองสรุปได้ว่า สุกรที่ได้รับวัคซีนรูปแบบดังกล่าวมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้ง cell-mediated immunity (CMI) และ humoral immunity (HI) ที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว

การพัฒนา PRRSV subunit vaccines โดยใช้ viral vector vaccines

PRRSV subunit vaccine เป็นวัคซีนที่ได้จากการแยกหรือสังเคราะห์ส่วนประกอบ structural

protein โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นวัคซีนรูปแบบหนึ่งที่ทำการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เพื่อลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคจากวัคซีนรูปแบบเดิม โดยการพัฒนา PRRSV subunit vaccine จะอาศัย vector หลากหลายชนิด อาทิเช่น plasmid DNA bacteria, Baculovirus, Adenovirus, Fowl pox virus หรือ Pseudorabies virus ในการ express PRRSV antigens อาทิเช่น GP5, M หรือ GP3 ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่า host ที่ได้รับวัคซีนชนิด GP5/M หรือ GP5/GP3 antigen มีปริมาณการสร้าง neutralizing antibodies เพิ่มสูงขึ้น และการตอบสนองของ lymphocyte proliferation ที่ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ host ที่ได้รับวัคซีนชนิด GP5, M หรือ GP3 อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว (Jiang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญของการพัฒนา PRRSV subunit vaccine คือความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ซึ่งจากการทดลองส่วนใหญ่วัคซีนที่ผลิตขึ้นมามีความสามารถในการคุ้มโรคเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น อีกทั้งการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเกิดได้ในระยะสั้น Jiang *et al*. (2008) ได้ทำการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในรูป live recombinant vector vaccine โดยใช้ recombinant adenovirus (rAds) เป็น vector ให้มีการแสดงออกร่วมกันของ PRRSV structural protein หลายชนิด คือ GP3-GP5, GP4-GP5 และ GP3-GP4-GP5 fusion protein ผลการทดลองพบว่าหนู mice ที่ถูก inoculated ด้วย rAds expressing fusion protein มีปริมาณ neutralizing antibodies เพิ่มสูงขึ้น และการตอบสนองของ lymphocyte ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ rAds ที่ไม่มี PRRSV protein และที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ rAds expressing GP3-GP5 และ GP3-GP4-GP5 fusion protein สามารถกระตุ้น cytotoxic T-lymphocyte (CTL) อย่างจำเพาะเจาะจงได้ ซึ่งบ่งชี้ว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้ง CMI และ HI และเหมาะสำหรับการพัฒนาเป็น PRRSV vaccine สำหรับใช้ในสุกรต่อไป ต่อมาได้มีเพิ่มประสิทธิภาพของ rAd-based vaccine โดย heat shock protein (HSP) 70 และ granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ถูก express ร่วมกับ GP3-GP5 fusion protein โดยโปรตีนทั้งสองชนิดทำหน้าที่เป็น genetic adjuvants และเมื่อทำการทดสอบวัคซีนดังกล่าวในสุกร พบว่ามีการสร้าง neutralizing antibodies และ IFN-γ ในระดับสูงในขณะที่พยาธิสภาพในปอดลดลง (Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009)

Alphavirus vector ได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้เป็น viral expression vector โดยเฉพาะ Semliki Forest virus (SFV) vector ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็น alphavirus replicon-based DNA หรือ viral vector vaccines สำหรับการสร้างวัคซีนรูปแบบใหม่ในไวรัสหลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบ CMI และ HI ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ alphavirus ยังมีคุณสมบัติที่สำคัญอีก 3 ประการ คือ self-amplification, high-level expression of heterologous protein และ เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเกิดขบวนการ apoptosis จากคุณสมบัติทั้งหมดของ alphavirus vector จึงมีกลุ่มนักวิจัยได้ทำการพัฒนา suicidal DNA vaccine โดยทำการสร้าง SFV replicon-based DNA vaccine vector ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GP5 และ M

ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส เมื่อทำการทดสอบ immunogenicity และ protective efficiency ของวัคซีนในสุกร พบว่ามีการสร้าง PRRSV-specific neutralizing antibodies และมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ CMI ที่เพิ่มสูงขึ้น แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลังได้รับวัคซีนพบว่าค่อนข้างจำกัด (Jiang *et al*., 2009)

การพัฒนา PRRSV gene-deletion marker vaccines

วัคซีนในรูป PRRSV gene-deletion marker สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ (natural infection) กับสุกรที่ได้รับวัคซีนได้ เมื่อทำการทดสอบภูมิคุ้มกันของสุกรด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา ซึ่งเป็นประโยชน์ในทางระบาดวิทยา ต่อการควบคุมและการกำจัดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดย nsp2 เป็นยีนเป้าหมายสำหรับใช้เป็น deletion marker เนื่องจากยีน nsp2 ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Chen *et al*., 2010) Fang *et al*. (2008) ได้ทำการพัฒนา PRRSV gene-deletion marker vaccines โดยทำการสร้าง recombinant type I PRRSV (strain SD01-08) ที่มีโปรตีนติดตามชนิด Green Fluorescent Protein (GFP) โดยทำการ delete immunogenic epitope (ES4) ภายใน nsp2 gene อย่างไรก็ตามวัคซีนดังกล่าวยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไปในอนาคต

การพัฒนา PRRSV insect cell-derived vaccine

Baculovirus expression system เป็นระบบที่ถูกนำมาใช้ในการสร้างวัคซีนกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นระบบที่ให้ผลผลิต recombinant proteins จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการทำหน้าที่เป็นระบบนำส่ง gene ทั้งใน mammalian cell lines และ in vivo อีกด้วย (Kost *et al*., 2005) Zheng *et al*. (2010) ทำการสร้าง PRRSV infectious clone ด้วยระบบ baculovirus expression ผลการทดลองพบว่า recombinant baculovirus (AcAPRRSV) สามารถสร้างเป็นอนุภาคไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดใหม่ที่ยีน nsp2 และ N protein ถูก delete ออกไป นอกจากนี้ infectious PRRSV ที่ผลิตขึ้นยังมีความไวในการทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 ติดเชื้อได้เช่นเดียวกับ parental PRRSV strain อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการทำให้ mammalian culture cell (BHK-21 และ Vero cell) ซึ่งไม่มีความไวในการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สามารถติดเชื้อไวรัสได้ ซึ่งจากองค์ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนา PRRSV vaccine ได้ในอนาคต

นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุง recombinant baculovirus ให้เป็น pseudotyped baculovirus ที่มีการแสดงออกของ glycoprotein G ของไวรัส vesicular stomatitis virus (VSV-G) บนผิวเซลล์ของ baculovirus เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของขบวนการ transduction และเพิ่ม host range ให้มากขึ้น จากการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิด VSV-G pseudotyped baculoviruses มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด HI และ CMI ได้ในระดับสูง เมื่อเทียบกับ baculovirus expression vector แบบเดิม ดังนั้น pseudotyped baculoviruses ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดย pseudotyped baculovirus (BV-SFV-5m6) ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสมระหว่าง polyhedron promoter/VSV-G และ cytomegalovirus (CMV) promoter/SFV replicon เป็น vaccine vector สำหรับการแสดงออกของโปรตีน GP5 และ M ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส เมื่อทำการทดสอบความเป็นแอนติเจนของ

วัคซีนทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* พบว่าวัคซีนดังกล่าวมีความสามารถในการแสดงออกของโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพใน mammalian cells และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะได้ในระดับสูง นอกจากนี้ยังพบการสร้าง neutralizing antibodies ต่อไวรัสทั้งชนิด homologous และ heterologous ในขณะที่การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ CMI พบว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IFN-γ และ IL-4 ได้ในระดับสูง จากผลการศึกษาทั้งหมดบ่งชี้ว่าวัคซีน pseudotyped baculovirus (BV-CMV-5m6) เป็นระบบที่เหมาะสำหรับการพัฒนาวัคซีนต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในอนาคต (Wu *et al.*, 2013)

References

Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E. and Davison, A. 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. 161: 2921-2949.

Beura, L.K., Sarkar,S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K. and Osoriol,F.A. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1β modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. J. Virol. 84: 1574-1584.

Charerntantanakul, W. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. World J. Virol. 1(1): 23-30.

Chen, Z., Zhou, X., Lunney, J.K., Lawson, S., Sun, Z., Brown, E., Christopher-Hennings, J., Knudsen, D., Nelson, E.A. and Fang, Y. 2010. Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. J. Gen. Virol. 91: 1047-1057.

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., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCCVR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126.

Cui, J., O'Connell, C.M., Smith, J.D., Pan, Y., Smyth, J.A., Verardi, P.H. and Garmendia, A.E. 2016. A GP5 Mosaic T-cell vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome virus is immunogenic and

confers partial protection to pigs. Vaccine Rep. 6: 77-85.

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.

Fang, Y., Christopher-Hennings, J., Brown, E., Liu, H., Chen, Z., Lawson, S.R., Breen, R., Clement, T., Gao, X., Bao, J., Knudsen, D., Daly, R. and Nelson, E. 2008. Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. J. Gen. Virol. 89: 3086-3096.

Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E.J., Zimmerman, J.J., Rotto, H.F., Yoder, T.K., Wang, C., Yeske, P.E., Mowrer, C.L. and Haley, C.A. 2013 Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. J. Swine Health Prod. 21: 72-84.

Jantafong, T., Sangtong, P., Saenglub, W., Mungkundar, C., Romlamduan, N., Lekchareonsuk, C. and Lekcharoensuk, P. 2015. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. Vet Microbiol. 176(3–4): 229-238.

Jiang, P., Jiang, W., Li, Y., Wu, S. and Xu, J. 2004. Humoral immune response induced by oral administration of S. typhimurium containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 321-328.

Jiang, Y.B., Fang, L.R., Xiao, S.B., Zhang, H., Pan, Y.F., Luo, R., Li. B. and Chen, H. 2007. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vaccine. 25: 547-560.

Jiang, Y., Xiao, S., Fang, L., Yu, X., Song, Y., Niu, C. and Chen, H. 2006. DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. Vaccine. 24: 2869-2879.

Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Li, B., Pan, Y., Luo, R. and Chen, H. 2009. A suicidal DNA vaccine co-expressing two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigens induce

protective responses. Biotechnol. Lett. 31: 509-518.

Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y. and Du, Y. 2008. Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. Virus Res. 136: 50-57.

Kappes, M.A. and Faaberg, K. S. 2015. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. Virology 479–480: 475-486.

Kost, T.A., Condreay, J.P. and Jarvis, D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nat. Biotechnol. 23: 567-575.

Li, J., Jiang, P., Li, Y., Wang, X., Cao, J., Wang, X. and Zeshan, B. 2009. HSP70 fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhanced the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge in pigs. Vaccine. 27: 825-832.

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

Meng, X.J., Paul, P.S., Morozov, I. and Halbur, P.G. 1996. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 77: 1265-1270.

Mengeling, W.L. 2005. The porcine reproductive and respiratory syndrome quandary. Part II. Vaccines and vaccination strategy. J. Swine Health Prod. 13: 152-156.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. and Clouser, D.F. 2003. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet. Microbiol. 93: 25-38.

Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y.J. and Zhou, E.M. 2017. Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. Front Microbiol. 28 (8): 1-17.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A. and Lopez, O.J. 2002. Identification of neutralizing and non-neutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. J. Virol. 76: 4241-4250.

Rowland, R.R. 2007. The stealthy nature of PRRSV infection: the dangers posed by that ever-changing mystery swine disease. Vet. J. 174: 451.

Ruenphet, S. Punyadarsaniya, D., and Jantafong, T. 2017. Longitudinal study on antibodies detection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in vaccinated fattening pigs by various Enzymelinked Immunosorbent Assay test kits. J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 91-102.

Schommer, S.K. and Kleiboeker, S.B. 2006. Use of a PRRSV infectious clone to evaluate in vitro quasispecies. Adv. Exp. Med. Biol. 581: 435-438.

Shen, G., Jin, N., Ma, M., Jin, K., Zheng, M., Zhuang, T., Lu, H., Zhu, G., Jin, H., Jin, M., Huo, X., Qin, X., Yin, R., Li, C., Li, H., Li, Y., Han, Z. and Chen, Y. 2007. Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. Vaccine. 25: 4193-4202.

Sirisereewan, C., Nedumpun, T., Kesdangsakonwut, S., Woonwong, Y., Kedkovid, R., Arunorat, J.,Thanawongnuwech, R. and Suradhat, S. 2017. Positive immunomodulatory effects of heterologous DNA vaccine-modified live vaccine, prime-boost immunization, against the highly-pathogenic PRRSV infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 183: 7-15.

Snijder, E.J. and Meulenberg, J.J. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol. 79: 961-979.

Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E. and Dokland, T. 2009. Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. J. Gen. Virol. 90: 527-535.

Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J. and Gao, G.F. 2007.Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS One. 2: e526.

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.

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.

Vanhee, M., Delputte, P.L., Delrue, I., Geldhof, M.F. and Nauwynck, H.J. 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus neutralizing antibodies. Vet. Res. 40: 63.

Wang, X., Li, J., Jiang, P., Li, Y., Zeshan, B., Cao, J. and Wang, X. 2009. GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge. Virus Res. 143: 24-32.

Wu, Q., Xu, F., Fang, L., Xu, J., Li, B., Jiang, Y., Chen, H. and Xiao, S. 2013. Enhanced immunogenicity induced by an alphavirus replicon-based pseudotyped baculovirus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Virol. Methods. 187: 251-258.

Zheng, H., Liu, C., Zhuang, J. and Yuan, S. 2010. Baculovirus expression of cloned porcine arterivirus generates infectious particles in both insect and mammalian cells. J. Biotechnol. 150: 251-258.

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.

Zimmerman, J., Sanderson, T., Eernisse, K.A., Hill, H.T. and Frey, M.L. 1992. Transmission of SIRS virus from convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. Am. Assoc. Swine Practitioners Newslett. 4(4): 25.