

6-1-1980

การแยกเชื้อ AUJESZKY'S DISEASE VIRUS โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ (ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS BY USING CELL CULTURE)

สละ กองสมัคร

บุญมี สันยสุจจารี

ไพโรธ ห้างทองคุณ

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjvm>



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

Recommended Citation

กองสมัคร, สละ; สันยสุจจารี, บุญมี; and ห้างทองคุณ, ไพโรธ (1980) "การแยกเชื้อ AUJESZKY'S DISEASE VIRUS โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ (ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS BY USING CELL CULTURE)," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 10: Iss. 2, Article 2.

DOI: <https://doi.org/10.56808/2985-1130.1159>

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol10/iss2/2>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การแยกเชื้อ AUJESZKY'S DISEASE VIRUS โดยใช้เซลล์กัลเจอร์
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS
BY USING CELL CULTURE

สละ กองสมัค *

S. Kongsamak *

บุญมี สัญญสุจจารี **

B. Sunyasootcharee **

พิเคราะห์ อาทรงคุณ *

P. Arjsongkoon **

บทย่อ

Aujeszky's Disease virus แยกได้จากสมองของสุกรที่ตายด้วยโรคที่สงสัยว่าเป็น Aujeszky's Disease โดยใช้ PK-15 cell line. ซึ่งต่อมาได้ทำการพิสูจน์โดยใช้วิธีฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีเทสต์และไวรัสเนอทรไลเซชันเทสต์ และยืนยันได้ว่ามีโรค Aujeszky's Disease ระบาดอยู่ในสุกรในประเทศไทย

Summary

Aujeszky's Disease virus was isolated from brain of a dead pig suspected of Aujeszky's Disease by using PK-15 cell line. The virus was identified by using fluorescent antibody technique (FAT) and virus neutralization test (VNT).

* กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* Division of Veterinary Biologics, Department of Livestock Development. Phayathai Rd. Bangkok

** Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Bangkok 5.

บทนำ

Aujesky's Disease หรือ Pseudorabies เป็นโรคติดต่อของสุกร และสัตว์อื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น โค ม้า ลู่น้ำ และแมว ในสุกรสามารถติดต่อได้รวดเร็วและทำให้ลูกสุกรตาย แต่ในสุกรมีอายุมักไม่แสดงอาการป่วยหรือแสดงอาการป่วยเพียงเล็กน้อย

โรคนี้เป็นโรคสำคัญของสุกรในหลายประเทศ เช่น ในยุโรปตะวันออก สหรัฐอเมริกา ที่ใกล้ประเทศไทยก็มีในไต้หวันและสิงคโปร์

สำหรับในประเทศไทย บุญมี สัตวแพทย์ และคณะได้รายงานการระบาดของโรคนี้ครั้งแรกในท้องที่จังหวัดนครปฐมในปี 2521 โดยทำการวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาและโดยการแยกเชื้อไวรัสและทดสอบเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง ตลอดจนศึกษาลักษณะของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

อุปกรณ์และวิธีการ

I. Isolation of the virus

1. สมองลูกสุกรซึ่งตายด้วยโรคซึ่งสงสัยว่าเป็นโรค Aujesky's Disease (P863 B) ซึ่งส่งมาโดยหน่วยวิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. PK-15 cell line

วิธีการแยกเชื้อ

บดเนื้อสมองประมาณ 1 กรัม แล้วทำ 20% suspension กับ Maintenance medium สำหรับเพาะเซลล์ นำไป centrifuge ที่ประมาณ 3000 รอบ/นาที ประมาณ 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไป inoculate PK-15 cell อายุ 2 วัน ในขนาด 1 มล. ต่อ PK-15 cell monolayer ประมาณ 20 ซม.² ใส่ในตู้อบ 37°C 1 ชม. (virus absorption) ดูดเอา inoculum ออกแล้วล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ใส่ maintenance medium แล้วนำเซลล์ไปเพาะในตู้อบ 37°C นำมาตรวจหา CPE (Cytopathogenic effect) ทุกวัน

Growth medium สำหรับเพาะ PK-15 cell line

Eagle MEM medium	80 %
Tryptose Phosphate broth (TPB)	10 %
Calf serum	10 %
L-glutamine (0.3%)	1 %
Sodium Bicarbonate (NaHCO_3)	7 %
Penicillin 100 units, Streptomycin 100 μg & Fungizone 3-5 $\mu\text{g}/1 \text{ ml. of medium}$	1 %
pH 7.2	

Maintenance medium สำหรับเลี้ยงเซลล์หลังจาก inoculate virus แล้วส่วนประกอบเหมือน Growth medium นอกจากเพิ่ม Eagle MEM medium เป็น 85% และลด calf serum ลงเหลือ 5%

II. Identification of the virus

1. Fluorescent Antibody Technique (FAT)

อุปกรณ์

1. Isolated virus (from PK-15 cell).
2. Anti-Aujeszky's Disease conjugate A (Taiwan) and B (The Netherlands)
3. PK-15 cells grown on coverslip in Leighton tube

วิธีการ

เพาะ PK-15 cells บน coverslip ใน Leighton tubes เมื่อเซลล์ขึ้นเต็ม coverslip หรืออายุประมาณ 2 วัน ตูดเอา Growth medium ออกล้าง cell 1 ครั้งด้วย PBS แล้ว dilute ไวรัสด้วย maintenance medium ให้มีปริมาณของไวรัสประมาณ $10^5 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$. Inoculate ไวรัสลงไปใน PK-15 cell ประมาณ 1.5 มล. ต่อหลอด เพาะต่อที่ 37°C ประมาณ 20-24 ชม. แล้วนำ infected cells มาย้อมด้วย Anti-Aujeszky's Disease conjugates ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

2. Virus Neutralization Test (VNT)

อุปกรณ์

1. Isolated virus
2. Aujeszky's Disease antiserum A (USDA) and Aujeszky's Disease antiserum B (The Netherlands)
3. Convalescent serum from a 5-month-old pig inoculated I/M with about $10^{7.5}$ TCID₅₀ of the isolated virus one month before serum collection
4. Preserum collected from the same pig just before virus inoculation.
5. PK-15 cells grow in 13 x 100 mm. culture tubes

วิธีการ

ใช้ PK-15 cells อายุ 2 วัน ซึ่งเพาะในหลอดแก้วเพาะเซลล์ขนาด 13 x 100 มม. และใช้ทำ VNT 2 วิธีดังนี้

1. Constant serum-decreasing virus เลือจางซีรัมทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ Aujeszky's Disease antiserum A และ B, convalescent serum, Preserum 5 เท่าด้วย Maintenance medium เลือจาง Isolated virus โดยวิธีทำ 10-fold dilution จาก 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้วผสมไวรัสแต่ละความเจือจางกับซีรัมในปริมาตรที่เท่ากัน (1:1) อุณหภูมิใน waterbath 37°C 1 ชม. แล้วนำไป inoculate ลงเซลล์เพื่อหา virus titer ของซีรัมแต่ละตัวอย่าง

2. Constant virus-decreasing serum เลือจางซีรัมโดยวิธีทำ 2-fold dilution จาก 2 เท่าถึงประมาณ 256 เท่าแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปผสมกับ isolated virus ขนาดประมาณ 100-500 TCID₅₀/0.1 มล. ในปริมาตรที่เท่ากัน (1:1) อุณหภูมิใน waterbath 37°C 1 ชม. แล้วนำมาเพาะใน PK cell เพื่อหา serum titer ของซีรัมแต่ละตัวอย่าง

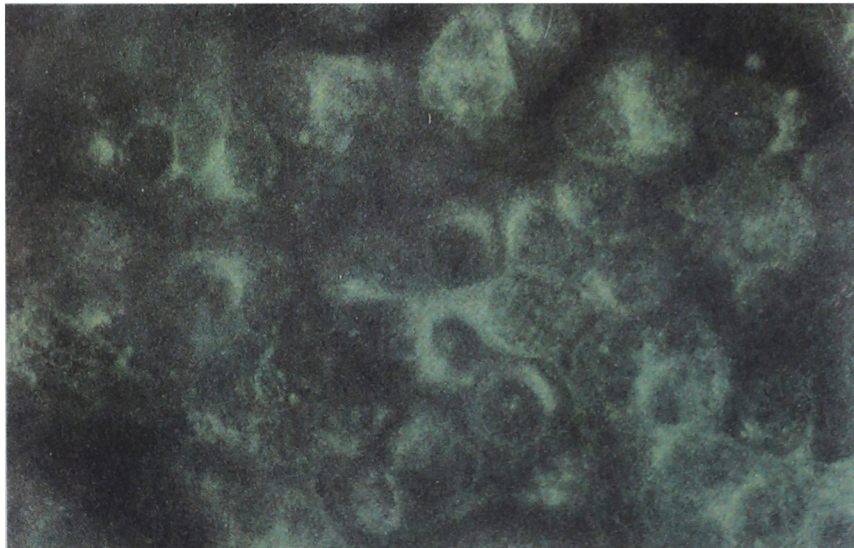
ผลการทดลอง

I. Virus isolation

suspected specimen ที่เพาะลงใน PK-15 cells เริ่มมี CPE (Cytopathogenic Effect) ให้เห็นได้ภายในประมาณ 20 ชม. และเห็นได้ชัดเจนภายใน 48 ชม. ได้เก็บไวรัสจาก culture fluid ไว้ทดสอบโดยวิธี Fluorescent Antibody Technique และ Virus Neutralization Test

II. Identification of the isolated virus

1. Fluorescent Antibody Technique เมื่อย้อม isolated virus ด้วย Aujeszky's Disease conjugate A และ B แล้วส่องดูด้วยกล้อง Fluorescent microscope ให้ผล Positive (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. PK-15 cell culture inoculated with a field strain (P863B) of Aujeszky's Disease virus and later on stained with direct F.A. test. Specific greenish fluorescence found both in nuclei and in cytoplasm of many cells. Excitation with light from mercury lamp. x 400.

ตารางที่ 1.

PK-15 cells	Stained with	Results
Inoculated with isolated virus	Anti-Aujeszky's Disease conjugate A*	Positive
Inoculated with isolated virus	Anti-Aujeszky's Disease conjugate B**	Positive
Control cell	Anti-Aujeszky's Disease conjugate A	Negative
Control cell	Anti-Aujeszky's Disease conjugate B	Negative

2. Virus Neutralization Test

2.1 วิธี constant serum-decreasing virus ผลปรากฏว่า Aujeszky's Disease antiserum A และ B และ convalescent serum มี Neutralizing Index มากกว่า $10^{5.5}$ TCID₅₀ ส่วน Preserum ไม่ neutralize ไวรัสและมี virus titer ใกล้เคียงกับ control virus (ตารางที่ 2)

2.2 วิธี constant virus-decreasing serum ผลปรากฏว่า Aujeszky's Disease antiserum C, Aujeszky's Disease antiserum D, และ convalescent serum มี serum titer (antibodies against isolated virus) เท่ากับ 64 เท่ากันทั้ง 3 ตัวอย่าง ส่วน Preserum ซึ่งเจาะก่อนฉีด isolated virus มี serum titer ต่ำกว่า 2 (ตารางที่ 3)

* Anti-Aujeszky's Disease conjugate A ได้รับจาก Central Veterinary Institute, Rotterdam, The Netherlands.

** Anti-Aujeszky's Disease conjugate B ได้รับจาก Pig Research Institute, Taiwan.

ตารางที่ 2 VNT Constant serum (serum 1/5)

serum	virus titer Log ₁₀ TCID ₅₀ 0.1 ml.	Neutralizing Index
Diluent only (control)	6.5	-
Preserum	6.4	-
Convalescent serum	1	5.5
Aujeszky's Disease antiserum C*	1	5.5
Aujeszky's Disease antiserum D**	1	5.5

ตารางที่ 3 VNT constant virus (isolated virus 200 TCID₅₀/0.1 ml.)

serum	serum titer
Preserum	2
Convalescent serum	64
Aujeszky's Disease antiserum C*	64
Aujeszky's Disease antiserum D**	64

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการแยกเชื้อไวรัสจากสมองของลูกสุกรซึ่งตายด้วยโรคซึ่งสงสัยว่าเป็น Aujeszky's Disease จากการทดสอบไวรัสโดยใช้ Fluorescent Antibody Technique และ virus Neutralization Test ยืนยันได้ว่าเชื้อที่พบในสมองของลูกสุกรเป็นเชื้อ Aujeszky's Disease Virus

* Aujeszky's Disease antiserum C ได้รับจาก U.S.D.A., U.S.A.

** Aujeszky's Disease antiserum D ได้รับจาก The Netherlands

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr.K.R.Hood, Director ของ National Veterinary Services Lab, U.S.D.A., Ames, Iowa, U.S.A. ที่ supply Aujeszky's Disease Antiserum. และขอขอบคุณ Dr.P.R.Ronhuis ณ Centraal Diegeneeskundig Institute, Rotterdam, The Netherlands ที่ supply Aujeszky's Disease antiserum และ Anti-Aujeszky's Disease conjugate และขอขอบคุณ Pig Research Institute, Taiwan ที่ supply Anti-Aujeszky's Disease conjugate

เอกสารอ้างอิง

- บุญมี สัตยกุลจุลจารี, พิเคราะห์ อัจทรงคุณ และมานิช เฟื่องฟูพงศ์ 1978 (2521) รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการพบโรค ซึ่งมีลักษณะของ Aujeszky's Disease ในสุกร สัตวแพทย์สาร 29 (3): 1:11.
- Bitsch, V. and Eskildsen, M. 1976. A Comparative Examination of Swine Sera for Antibody to Aujeszky's Virus with The Conventional and A modified Virus-Serum Neutralization Test and A modified Direct Complement Fixation Test. Acta vet. scand. 17 : 142-152.
- Wirahadiredja, R.M.S. and Rondhuis, P.R. 1976. A Comparative study of The Neutralization Test The and Indirect Fluorescent Antibody Technique for The Detection of Antibodies to The Virus of Aujeszky in Pig Sera. Tijdschr. Diergeneesk. 101 : 1125-1128.