The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 21
Issue 2 *June, 1991*

Article 4

6-1-1991

การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่ายโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์

กัญญา สุวินทรากร

อนุทิน หาญวีระพล

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

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

สุวินทรากร, กัญญา and หาญวีระพล, อนุทิน (1991) "การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่ายโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 21: Iss. 2, Article 4.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1571
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol21/iss2/4

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.

เวชชสารสัตวแพทย์ ปีที่ 21 ฉบับที่ 2 มิถุนายน 2534

การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกร ไซน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่ายโดยใช้ การเพาะเลี้ยงเซลล์

กัญญา สุวินทรากร[1]
อนุทิน หาญวีระพล[1]

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบหาเชื้อและไตเตอร์ของ Lapinized swine fever virus, China strain โดยวิธี Fluorescent antibody cell culture techniqne (FACCT) - 2 Steps และ Exaltation of Newcastle Disease virus (END) - 2 Step

FACCT - 2 Steps : เพาะเลี้ยง seed lapinized swine fever virus, China strain ใน Swine testicle (ST) cell line ทำการ harvest หลังจากเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37° c. นาน 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เป็นไวรัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

นำไวรัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เพาะเลี้ยงใน PK-15 cell line บน cover slip ในหลอดไลตั้น ย้อมด้วย swine fever direct FA conjugate เมื่อ incubate ครบ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าไวรัสในกลุ่มที่ 1 ให้ไตเตอร์ต่ำ ขณะที่กลุ่มที่ 2 และ 3 ให้ไตเตอร์สูงกว่า และไม่แตกต่างกัน

END - 2 Steps : เพาะเลี้ยง seed lapinized swine fever virus, China strain ใน cell line PK - 15 ทำการ harvest หลังเพาะเลี้ยงที่ 37° c. นาน 72 และ 96 ชั่วโมง

นำไวรัสอายุเพาะเลี้ยง 72 และ 96 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงใน primary ST cell เพื่อหาไตเตอร์โดยวิธี END พบว่า lapinized swine fever virus, China strain ไม่ทำให้เกิด cytopathic effect (CPE) โดยวิธี END - 2 Steps.

คำสำคัญ : การตรวจหา, ไซน่า สเตรน, การเพาะเลี้ยงเซลล์

---

1 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทนำ

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย China strain ซึ่งนำมาใช้เป็นซีด (Seed) สำหรับผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร เป็นไวรัสที่ได้จากการผ่าน (passage) ไวรัสอหิวาต์สุกรที่ทำให้เกิดโรคเข้าในกระต่ายหลายร้อยครั้ง จนคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคหมดไป รวมทั้งไม่สามารถตรวจหาไวรัส China strain โดยวิธี Exaltation of Newcastle Disease virus(END) (Kumagai และคณะ, 1961) และ Interference method (Shimizu และคณะ, 1970) ได้เหมือนกับไวรัสโรคอหิวาต์สุกร ทั้งสองวิธีดังกล่าวทำในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำได้สะดวกในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการตรวจหาไวรัสและปริมาณไวรัส China strain จึงต้องใช้วิธีฉีดเข้าสุกรปลอดภูมิคุ้ม (Swine Inoculation Test = SIT) ซึ่งสิ้นเปลืองมาก ไม่สามารถตรวจสอบวัคซีนได้ทุกชุด ถ้าสามารถทำการทดสอบหาปริมาณไวรัสทางห้องปฏิบัติการได้ จะเป็นการสะดวก ประหยัด และสามารถตรวจสอบวัคซีนได้ทุกชุด

การตรวจหาไวรัสและปริมาณไวรัส China strain โดยวิธี FACCT สามารถทำได้โดยพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของเซลล์ PK 15 ที่ติดเชื้อไวรัสนาน 24-72 ชั่วโมง แต่ตรวจพบได้ยาก (Mengeling, 1967)

ได้มีการทดลองหาไวรัสและปริมาณของไวรัสอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย แอล พี ซี เสตรน (LPC strain) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไซน่าเสตรน พบว่าสามารถตรวจสอบไวรัสและปริมาณไวรัสโดยวิธี FACCT - 2 Step และให้ไตเตอร์มีค่าเท่ากับวิธี SIT (Lin and Lee, 1981)

FACCT - 2 Steps เป็นวิธีการนำไวรัสมาเพาะในเซลล์อัณฑะสุกรก่อนแล้วจึงมาเช็คโดย FACCT ส่วน END - 2 Steps เป็นวิธีนำไวรัสมาเพาะในเซลล์ PK 15 ก่อนแล้วจึงนำมาเช็คโดยวิธี END - 2 Steps

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบการใช้วิธี FACCT-2 Steps และ END-2 Steps ตรวจหาไวรัสและปริมาณไวรัส ไซน่า เสตรน ว่าได้ผลเพียงใดหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. Virus

Lapinized swine fever virus, China strain : เป็น seed virus

vaccine ไตเตอร์ $10^{5.5}$ PID_{50}/มล. ผลิตโดยงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร กรมปศุสัตว์ ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นำส่วนใสมาใช้

ALD strain : เป็น virulent swine fever virus ชุดที่ 1/29 ของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

Miyadera strain : เป็น Newcastle disease virus ชุดที่ 2/29 ของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

2. Cell Culture

PK - 15 cell line : passage ที่ 105 จาก National Animal Disease Center, U.S.A.

ST cell line : passage ที่ 65 จาก National Animal Disease Center, U.S.A.

ST Primary Cell : เตรียมจาก Swine testicle cell โดยงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

3. Conjugate : Swine fever direct fluorescent antibody (FA) conjugate ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ (สละ และกำลัง, 2529)

แยกการทดลองเป็น

1. FACCT - 2 Steps

เพาะเลี้ยง ST cell line ในขวดเพาะเซลล์ขนาด 500 ซีซี. 3 ขวด เลี้ยงเชื้อ ที่ 37° c. 24 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ใส่ seed lapinized swine fever virus, China strain เจือจางด้วย maintenace medium 1/10 ขวดละ 5 มล. เลี้ยงเชื้อที่ 37° c. นาน 1ชั่งโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 25 มล. เลี้ยงเชื้อที่ 37° c. นาน 72 ชั่งโมง 1 ขวด 96 ชั่วโมง 1 ขวด และ 120 ชั่วโมง 1 ขวด ทำการ harvest เชื้อที่เพาะครบ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20° c. เป็นไวรัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

เตรียม Cell line PK - 15 บน cover slip ในหลอดไลตั้น จำนวน 70 หลอด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง นำ Seed virus กลุ่ม 1,2 และ 3 แต่ละกลุ่มที่เตรียมตามข้างต้น มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 1/10, 1/100, 1/1,000 และ 1/10,000 ใส่เชื้อไวรัสที่เจือจางลงในหลอดลตั้น หลอดละ 0.2 มล. dilution ละ 5 หลอด รวมกลุ่มละ 20 หลอด สำหรับ positive control ใส่

ALD 100 $TCID_{50}$/มล. หลอดละ 0.2 มล. 5 หลอด และ negative control ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ หลอดละ 0.2 มล. จำนวน 5 หลอด นำหลอดทั้งหมดอบที่ 37° c. นาน 1 ชั่วโมง นำมาใส่อาหารเลี้ยงเซลล์หลอดละ 1.8 มล. นำกลับเข้าเลี้ยง ที่ 37°c.

นำ cover slip จากทุก dilution dilution ละ 1 cover slip จากไวรัสทั้ง 3 กลุ่ม ALD 100 $TCID_{50}$/มล. 1 แผ่น และ negative control 1 แผ่น มาย้อมด้วย Swine fever direct FA conjugate เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24, 48,72, 96 และ 120 ชั่วโมง

หากผลเป็นบวก จะเกิดการเรืองแสงใน cytoplasm

2. END - 2 Steps

เตรียม PK - 15 cell line ในขวดเพาะเซลล์ขนาด 500 มล. 2 ขวด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ใส่ seed lapinized swine fever virus, China strain เจือจาง 1/10 ลงไปขวดละ 5 มล. อบที่ 37°c. นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปขวดละ 25 มล. อบที่ 37°c. เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้น harvest เชื้อ แล้วเก็บที่ -20°c.

เตรียม primary ST Cell โดยใช้ primary ST Cell 0.5 % ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ primary ST Cell ในหลอดเพาะเซลล์จำนวน 108 หลอด ๆ ละ 0.5 มล. โดยแบ่งหลอดทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 54 หลอด กลุ่มที่ 1 สำหรับ seed virus อายุเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 2 สำหรับ seed virus อายุเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง ในแต่ละกลุ่มจะแบ่งหลอดการทดลองออกเป็น 9 ชุด ชุดละ 6 หลอด ดังนี้

ชุด 1 เป็น negative control

ชุด 2 เป็น NDV control

ชุด 3 เป็น ALD control ใส่ ALD 100 $TCID_{50}$/มล.หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 4 เป็น positive control ใส่ ALD 100 $TCID_{50}$/มล. หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 5 เป็น seed virus control ใส่ undiluted seed virus หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 6 เป็น seed virus dilution 1/10 ใส่หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 7 เป็น seed virus dilution 1/100 ใส่หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 8 เป็น seed virus dilution 1/1000 ใส่หลอดละ 0.1 มล.

ชุด 9 เป็น seed virus dilution 1/10,000 ใส่หลอดละ 0.1 มล. เลี้ยงที่ 37°c. นาน 4 วัน

เมื่อ Incubate ครบ 4 วัน นำหลอดเพาะเซลล์มาดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก หลอดที่เป็น negative control, ALD control และ seed virus control ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ หลอดละ 0.5 มล. ส่วน NDV control, positive control และ seed virus dilution ที่ 1/10, 1/100, 1/1000 และ 1/10000 ใส่ NDV 100 $TCID_{50}$/ml. ใน Maintenance medium ลงในหลอด ๆ ละ 0.5 มล. เลี้ยงทั้งหมดที่ 37°c. อ่านผลวันที่ 2 และ 3

หากผลเป็นบวกจะเกิด CPE

ผล

ผลของ FACCT - 2 Steps

พบว่าไวรัสกลุ่มที่ 1 ให้ผลบวก ที่ dilution 1/10 (ตารางที่ 1) ส่วนกลุ่มที่ 2 และ 3 ให้ผลบวก ที่ dilution 1/10 และ 1/1000 หลังใส่ไวรัส China strain ใน PK - 15 นาน 24 ชั่วโมง และให้ผลบวก ที่ dilution 1/10, 1/100 และ 1/100 หลังใส่เชื้อใน PK - 15 นาน 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)

ผลของ END - 2 Steps

ไม่เกิด CPE เมื่ออ่านผลหลังใส่ NDV 100 $TCID_{50}$/มล. นาน 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุปผล

วัคซีนอหิวาต์สุกร China strain ชนิดผ่านกระต่าย สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี FACCT - 2 Steps และพบว่าถ้าเพาะเลี้ยงไวรัสใน Step ที่ 1 คือใน ST cell นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใน Step ที่ 2 คือใน PK 15 นาน 24 - 120 ชั่วโมง จะให้ไตเตอร์ต่ำ คือที่ 10^{-1} แต่เมื่อเลี้ยงไวรัสใน Step ที่ 1 นาน 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงใน Step ที่ 2 ไตเตอร์จะสูงขึ้นคือที่ 10^{-2} ที่ 24 ชั่วโมง และ 10^{-3} ที่ 48-120 ชั่วโมง ซึ่งแสดงว่าไวรัส China strain ต้องการเวลา ตั้งแต่ 96 ชั่วโมงขึ้นไป เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้มากที่สุดใน step แรก และเมื่อนำมาทำ FACCT ต้องใช้เวลา 48 - 120 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสใน PK 15 ได้สมบูรณ์ที่สุด

ตารางที่ 1 : Detection of seed lapinized swine fever virus, China strain by FACCT - 2 Steps method.

Step 1		Step 2		FA - Technique					
ชื่อเซลล์	เวลาเพาะเลี้ยงไวรัส ชั่วโมง	ชื่อเซลล์	เวลาเพาะเลี้ยงไวรัส ชั่วโมง	control		virus dilution			
				ALD	M.M.	1:10	1:100	1:1000	1:10000
ST-cell	72	PK - 15	24	+	-	+	-	-	-
			48	+	-	+	-	-	-
			72	+	-	+	-	-	-
			96	+	-	+	-	-	-
			120	+	-	+	-	-	-
ST-cell	96	PK - 15	24	+	-	+	+	-	-
			48	+	-	+	+	+	-
			72	+	-	+	+	+	-
			96	+	-	+	+	+	-
			120	+	-	+	+	+	-
ST-cell	120	PK - 15	24	+	-	+	+	-	-
			48	+	-	+	+	+	-
			72	+	-	+	+	+	-
			96	+	-	+	+	+	-
			120	+	-	+	+	+	-

ตารางที่ 2 : Detection of seed lapinized swine fever virus, China strain by END - 2 Steps method.

Step 1		Step 2		อ่านผลจาก cytopathic effect ภายหลังฉีดเชื้อ NDV 48 และ 72 ชม								
ชื่อเซลล์	เวลาเพาะเลี้ยงไวรัส ชั่วโมง	ชื่อเซลล์	วิธีทดสอบ	control					Seed virus dllution			
				Postitive	Negative	NDV	ALD	Seed virus	1:10	1:100	1:1000	1:10000
PK-15	72	Primary ST cell	END	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PK-15	96	Primary ST cell	END	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Lin and Lee (1981)ได้ใช้วิธี FACCT -2 Steps ตรวจสอบไวรัส แอล พี ซี เสตรน ได้พบว่าการเพาะเลี้ยงใน ST cell นาน 4-5 วัน ก่อนจะช่วยให้ไวต่อการตรวจเช็คโดยวิธี FACCT มากขึ้น โดยมีค่าไตเตอร์เท่ากับที่ทดสอบได้ในสุกร (SIT)

จากการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับ SIT โดยตรง แต่จาก lapinized China strain ที่นำมาใช้มีไตเตอร์ $10^{5.5}$ /มล. ซึ่งทดสอบโดย SIT มีค่าสูงกว่าไตเตอร์จาก FACCT - 2 Steps (10^3/0.1 มล. หรือ 10^4/มล.) อาจเนื่องจากเพราะ ST cell line มิใช่ primary ST cell เหมือนกับที่ Lin และ Lee ทำไว้ หรืออาจจะเป็นเพราะค่าไตเตอร์ของไวรัส China strain จากวิธี FACCT - 2 Steps ไม่เท่ากับวิธี END - 2 Steps ก็ได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรจะต้องศึกษาต่อไป

สำหรับผลจากการทำ END - 2 Steps พบว่าไม่เกิด CPE ไวรัสโรคอหิวาต์สุกรจะไม่ทำให้เกิด CPE ในเซลล์เพาะเลี้ยงใด ๆ นอกจากจะมีไวรัสนิวคาสเซิล Miyadera strain เข้าไปร่วมด้วย หลังจากเซลล์นั้นติดเชื้อไวรัสโรคอหิวาต์สุกรได้ 3 - 4 วัน (Kumagai และคณะ, 1961) ซึ่งเรียกว่า END method แต่ถ้าเป็นไวรัส China strain จะไม่ทำให้เกิด END method (Lin และ Lee 1981) ดังนั้น ใน Step แรกเป็นการเพิ่มปริมาณไวรัสใน PK 15 ปริมาณไวรัสที่เพิ่มยังคงเป็นไวรัส China strain เมื่อนำมาทำ END Method จึงไม่เกิด CPE ซึ่งต่างกับ FACCT - 2 Steps ที่ใช้ตรวจสอบหาไวรัส China strain FACCT สามารถตรวจไวรัสนี้ได้ โดยไวรัสเข้าจับคอนจูเกต เมื่อเพิ่มปริมาณไวรัสใน Step แรกแล้ว นำมาทำ FACCT ใน Step 2 ปริมาณไวรัสที่สูงขึ้นจะเพิ่มการจับกับคอนจูเกต ทำให้เห็นผลเด่นชัดขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ ผลที่พบว่า FACCT -2 Steps สามารถตรวจหาไวรัสและปริมาณไวรัส China strainได้ จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบมาตรฐานของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย China strain หรือนำไปเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อการค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อนี้ได้

เอกสารอ้างอิง

สละ กองสมัคร และ กำลัง ชุมพลบัญชร 2529 การเตรียมคอนจูเกตสำหรับการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรด้วยวิธีฟลูโอเรสเซนต์ แอนตี้บอดี้เทคนิค วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย โดยสละ กองสมัคร 49 - 58 พิมพ์ที่ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda and Mastumoto, M., 1961. A new vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in tissue culture. I. Establishment of standard jeroceduse. J. Immunol., 87 : 245 - 256.

Lin, T.C. and Lee, C.T. 1981. An overall report on the development of a highly safe and potent lapinized hog cholera control in Taiwan : NSC Special Publication 5 : 26 - 28.

Mengeling, W.L. 1967. Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for hog cholera diagnosis. Amer. J. Vet. Res, 28 : 1653 - 1659.

Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T.S., Sasahara, J. 1970. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell culture. Amer. J. Vet. Res. 41 : 1787 - 1794.

Thai J. Vet. Med. Vol.21 No.2 June 1991

Detection of lapinized swine fever virus China Strain : using cell culture

Kunya Suvintarakorn[1]
Anootin Hanveeraphon[1]

Abstract

The titer of lapinized swine fever virus, China strain was tested by Fluorescent antibody cell culture techniqne (FACCT) - 2 Steps and Exaltation of Newcastle Disease Virus (END) - 2 Steps.

FACCT - 2 Steps : The Swine testicle (ST) cell line was infected with lapinized swine fever virus, China strain and incubated at 37°C. 72, 96 and 120 hr. The virus was harvested and designated as group 1, 2 and 3 respectively.

Each group of virus was titrated by infecting the PK - 15 cell line on a cover slip in a leighton tube and was incubated for 24, 48, 72, 96 and 120 hr. The infected cells were stained with fluorescent conjugated swine fever directed antibodies. The result revealed that group 1 virus had low titer whereas group 2 and 3 had higher titers. There was no significant difference between group 2 and group 3.

END - 2 Steps : The PK - 15 cell line was infected with lapinized swine fever virus, China strain and incubated at 37°C then harvested after 72 and 96 hr. If was found that there was no CPE observed in the primary ST cells which was infected with PK - 15 cell line infected virus as demonstrated by END - 2 Steps.

Keyword(s) : Detection, swine fever (China strain), cell culture.

---

1 Veterinary Biologic Center, Pakchong, Nakornrachasima, 30130