รายงานการแยกเชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea Virus ใน Vero Cell Cultures

Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Vero Cell Cultures

ช้องมาศ อันตรเสน[1] ลัดดา ตรงวงศา[2] พรทิพย์ เจียรสุข[1] ไพรสน พรมเมือง[1] และ สมจิตร รุจิขวัญ[2]

Chongmas Antarasena[1], Ladda Trongwongsa[2], Porntip Jearasuk[1], Praison Prommuang[1], and Somjit Rujikwan[2]

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)ใน Vero cell culturesโดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองหยอดเชื้อ PEDV ซึ่งพบระบาดที่จังหวัดตรัง เชื้อ PEDV ที่แยกได้ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์มีลักษณะ cell fusion และ syncytium formation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsinเป็นส่วนประกอบ ขนาด 10 ug/ml ตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV โดยวิธีdirect และ indirect immunofluorescence พบการเรืองแสงในส่วน cytoplasm ของกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส นำinfected cells ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านพบอนุภาคไวรัสในกลุ่ม coronaviridae รูปร่างกลมหรือ pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วยenvelop ขนาดเฉลี่ย 70-100 nm จากการทำ cross neutralization test พบว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถถูก neutralize ได้ด้วย pig anti-PEDV serum สายเชื้อจากเบลเยี่ยม จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ พบว่า 5-iodo-2/-deoxyuridine(IUDR)ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และ lipid solvents จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์.

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was isolated in Vero cell cultures from the small intestine of piglet experimentally infected with PEDV,the fieldisolate which had been isolated during outbreaks of PED in Trang province,Thailand.The PEDV was succesfully isolated in Vero cells maintained in the maintenance medium containing of 10 ug/ml of trypsin.PEDV-infected cells exhibited cytopathic effect, which characterized by cell fusion and syncytium formation. A cytoplasmic fluorescence of PEDV-infected cells was shown when examined for virus replication by direct and indirect immunofluorescent test.Typical coronaviruswith enveloped round or pleomorphic morphology with diameter of 70-100 nm were seen in cytoplasmic vacuoles of the degenerated cells when observed by transmissionelectron microscopy. The isolate was neutralized by pig anti-PEDV serum, the Belgian strain by cross neutralization test.The physicochemical properties studies indicated that virus replication could not inhibited by 5-iodo-2/-deoxyuridine(IUDR) and the virus was completely inactivated by lipid solvents.

1 ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110
Southern Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Center,Tung-song, Nakhon-si-thammarat 80110

2 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพมหานคร
National Institute of Animal Health,Kaset-klang,Bangkhen,Bangkok.

คำนำ

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)และ Transmissible gastroenteritisvirus (TGEV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในสุกร เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม coronaviridae เนื่องจากมีรูปร่างคล้ายกัน แต่มี antigenicity ต่างกัน (Pensaert andDeBouck,1978;Chasey and Cartwright,1978)และไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อไวรัสโดยสังเกตจากอาการทางคลีนิค (DeBouck and Pensaert,1980)โรคนี้มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษและเบลเยี่ยมในระหว่างปี ค.ศ.1976-1978(Wood,1977;Chasey and Cartwright, 1978; Pensaertand DeBouck, 1978) ต่อมามีรายงานพบโรคนี้ในหลายประเทศในทวีปยุโรป รวมทั้งประเทศจีนและญี่ปุ่น ซึ่งยืนยันจากการตรวจแอนติบอดี โดยวิธี ELISA-blocking test และการแยกเชื้อ PEDV (Takahashi, 1983; Pensaert, 1992) ในประเทศไทย สนองและคณะ (2538) รายงานการเกิดโรค PED ที่จังหวัดตรัง ซึ่งยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect immunofluorescence,ตรวจพบเชื้อcoronavirus ใน enterocytes ของลำไส้เล็กลูกสุกรป่วยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่านและการแยกเชื้อไวรัสในลูกสุกรทดลอง

ในการแยกเชื้อ PEDV ในเซลล์เพาะเลี้ยง Hofmann and Wyler (1988) รายงานการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cell line (African green monkey kidney cells) โดยเติม trypsin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect) ประกอบด้วย vacuolation,cellfusion และ syncytia ต่อมา Kusanagi et al.(1992) รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83P-5 ใน Vero cells และกล่าวว่าเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 22 ครั้ง สามารถเติบโตและทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ใน MA104 (rhesus macaque fetal kidneys cells),CPK (cloned porcine kidney cells) และ ESK (embryonic swine kidney cells) โดยมี trypsinเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

บทความนี้กล่าวถึงการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells และคุณสมบัติบางประการของเชื้อไวรัสที่แยกได้ซึ่งเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นแอนติเจน เพื่อทดสอบแอนติบอดีของโรคPED ในสุกร โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์:

ใช้ Vero cell line (African green monkey kidney cells) ในการแยกเชื้อ PEDV เพาะเลี้ยง Vero cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium, GM) ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (EMEM, Seromed^R) มี tryptose phosphate broth (TPB,Difco^R) 0.3%, L-glutamine 0.03%, fetal calf serum 5%, $NaHCO_3$ 0.7 mg/ml, เพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิต และ100 ug/ml ตามลำดับ เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 5 ซม.ที่มี coverglass ขนาด 18×18 มม.ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำมาใช้แยกเชื้อ PEDV เมื่อเซลล์มีอายุ 2-3 วันและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (maintenance medium, TM) ที่ประกอบด้วย EMEM มี TPB 3%, yeast extract 0.02% และ trypsin (1:250, Difco^R) ความเข้มข้น 10 ug/ml

ตัวอย่างเชื้อไวรัส:

ตัวอย่างลำไส้เล็กและของเหลวภายในของลูกสุกรทดลองแยกเชื้อ PEDV จากการระบาดของโรคนี้ที่จังหวัดตรัง (สนองและคณะ,2538) โดยเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กและของเหลวภายในหลังหยอดเชื้อ 7 วัน นำมาบดทำเป็น 20% organ suspension ใน PBS ปั่นแยกน้ำใสออก กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 um และเจือจาง 5 เท่าใน TM ก่อนนำมาใช้แยกเชื้อใน Vero cells เพื่อหลีกเลี่ยง cytotoxic reaction

เชื้อท้องที่ Aujeszky's disease virus (ADV) เพื่อใช้ในการทดสอบชนิดของ nucleic acid นำมาเพาะเลี้ยงใน Vero cells 2 ครั้งก่อนใช้

Antiserum และ conjugated globulin :

ที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิดคือ

1. ซีรั่มสุกรที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ PEDV (hyperimmune porcine antiserum against PEDV) เพื่อใช้ทดสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี cross neutralization test และ indirect immunofluorescence (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.M.Pensaert, Ghent, Belgium)

2. ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีคอนจูเกตต่อเชื้อ PEDV (FITC conjugated PEDV antiserum)เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ PEDV ใน Vero cellsโดยวิธี direct immunofluorescence (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.M.Pensaert, Ghent, Belgium)

3. Rabbit anti-pig IgG FITC (Sigma^{R}) เพื่อใช้ทดสอบโดยวิธี indirect immunofluorescence

การแยกเชื้อไวรัส และ serial propagation ใน Vero cells

นำ Vero cells อายุ 2 วัน ดูด GM ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย TM 2 ครั้ง นำตัวอย่างลำไส้เล็กสุกรทดลองเพาะเชื้อลงในจานเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 0.5 ml/plate จำนวน 6 plates adsorb ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม TM ปริมาณ 5 ml/plate อบที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้อบที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวัน ในวันที่ 7 หลังหยอดเชื้อ นำเซลล์ไป freeze and thaw 2 ครั้งแล้วนำ culture fluid ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่ ทำ serial passage ใน Vero cells หลายครั้ง และตรวจการเกิด CPE ทุกวัน เซลล์กลุ่มควบคุมจำนวน 2 plates ทำเช่นเดียวกัน แต่ inoculate ด้วย TM แทนตัวอย่างเชื้อไวรัส

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ (Immunofluorescent test)

นำ Vero cells ที่เลี้ยงบน coverglass มาตรวจหาเชื้อ PEDV โดยวิธี direct และ indirect immunofluorescent test ในวันที่ 5 หลังหยอดเชื้อ นำ coverglass ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วแช่ใน acetone นาน 10 นาที จากนั้นนำ coverglass จำนวน 1 แผ่นมาย้อมด้วยฟลูออเรสเซนท์คอนจูเกตของโรค PED เพื่อตรวจโดยวิธี direct immunofluorescent test อีก 1 แผ่น ตรวจโดยวิธี indirect immunofluorescent test ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจหาเชื้อ PEDV ใน Vero cells ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนท์ เซลล์กลุ่มควบคุมทำเช่นเดียวกัน

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นำ infected Vero cells และเซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงบน coverglass มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วย้อมด้วยสี crystal violet ความเข้มข้น 0.13% ใน 5% formalin นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง ทำให้แห้งแล้ว mount ด้วย Canada balsam ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัส เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ PEDV passage ที่ 21 และเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เกิด CPE ประมาณ 80% ล้างด้วยphosphate buffer pH 7.4 ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการ dehydration ด้วยalcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อก ตัด section ให้ได้ขนาด 700°A ย้อมด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate จากนั้นนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200)

การทำ infectivity assay

การทำ virus titration เพื่อหาค่า infectivity titer โดยนำเชื้อ PEDV passage ที่ 21 ใน Vero cells และเก็บ culture fluid ในวันที่ 3 หลังจากหยอดเชื้อนำมาทำ ten-folddilution ใน TM เจือจางเชื้อ PEDV ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้ว inoculate เชื้อ PEDV แต่ละ dilution ลงบน Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate

(Costar^R) ปริมาณ 0.1 ml/หลุม dilution ละ 4 หลุมก่อน inoculate ล้าง Vero cells ด้วย TM 2 ครั้งอบที่อุณหภูมิ 37° C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ปริมาณ 0.5 ml/หลุม ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน นำมาคำนวณค่า $TCID^{50}$ โดยวิธีของ Behrens-Karber (1931)

การทำ cross neutralization test

นำซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อPEDVอุ่นที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ทำการเจือจางซีรั่มเป็น two-fold dilutionตั้งแต่ระดับ 1:2 ถึง 1:1024 แล้วผสมซีรั่มแต่ละ dilution กับเชื้อ PEDV passage ที่ 21 มีความเข้มข้น 200 $TCID_{50}$/0.1ml อบส่วนผสมซีรั่ม-ไวรัส ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้ว inoculate ส่วนผสมแต่ละ dilution ปริมาณ 0.1 ml/หลุม บน Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate (Costar^R)ส่วนผสมละ 2 wells หลัง adsorption เติม TM 0.5 ml ต่อหลุม อบที่อุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน อ่านผล neutralizing antibody titer โดยวัดจากซีรั่มเจือจางสูงสุดที่ยับยั้งการเกิด CPE

การทดสอบชนิดของ Nucleic acid

ทำการทดสอบชนิดของ nucleic acid โดยเติม 5-iodo-2/-deoxyuridine (IUDR, Sigma^R) ปริมาณ 50 ug/ml หรือ 200 ug/ml ใน TM นำ Vero cells อายุ 2 วันที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์หยอดเชื้อ PEDV passage ที่ 34 ปริมาณ 0.5 ml/ขวด และเชื้อท้องที่ ADV ปริมาณ 0.2 ml/ขวด ชนิดละ 3 ขวด หลังจากอบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ที่ไม่มี IUDR, มี IUDR 50 ug/ml และ 200 ug/ml ขวดละ 5 ml อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำ infected cells ไป freeze and thaw 2 ครั้ง และนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ นำ culture fluid แต่ละตัวอย่างมา titrate คำนวณค่า infectivity titers

การทดสอบความไวต่อ lipid solvents

ทำการทดสอบความไวของเชื้อ PEDV ต่อ diethyl ether และ chloroform โดยนำเชื้อ PEDV passage ที่ 34 ปริมาณ 5 ml เติม diethyl ether หรือ chloroform ปริมาณ 0.5 ml ลงไปเขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำ culture fluid มา titrate คำนวณค่า infectivity titers

ผล

ผลการแยกเชื้อไวรัสและทำ serial propagation ของเชื้อ PEDV ใน Vero cells

จากการตรวจพยาธิสภาพของ Vero cells ที่ inoculate ด้วย ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองแยกเชื้อ PEDV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบ พบว่าในระยะแรก สังเกตการเกิด CPE ยากและเซลล์กลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาต่อ trypsin โดยเซลล์จะหดตัว ในวันที่ 5 หลังหยอดเชื้อตรวจพบ CPE เป็นแบบ syncytium formationโดยผนังเซลล์จะหายไป เกิด cell fusion โดย syncytial cells ประกอบด้วย 2-3 nucleiต่อมา syncytial cells จะหดตัวและหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ Vero cell ไป freeze and thaw และนำ culture fluid ไปทำ serial propagation ใน Vero cells โดยยังคงมี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPE จะเกิดอย่างรวดเร็วตามจำนวน passage ที่เพิ่มขึ้น เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีลักษณะของ cell fusion และเกิด syncytium formation (ภาพที่ 1) การตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จะสังเกตง่ายเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet ในระยะแรกของการเกิด CPE ผนังเซลล์จะหายไป เกิด cell fusion ตรวจพบ nuclei สะสมอยู่ตรงกลางของ polykarions ที่มีลักษณะกลม ต่อมา nuclei จะเคลื่อนไปอยู่ตรงขอบของ syncytia ทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ ตรงกลางของ syncytia และ nuclei จะฝ่อ (pyknotic) หลังจากนั้น syncytia จะลอกจากผิวแก้วหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 2)

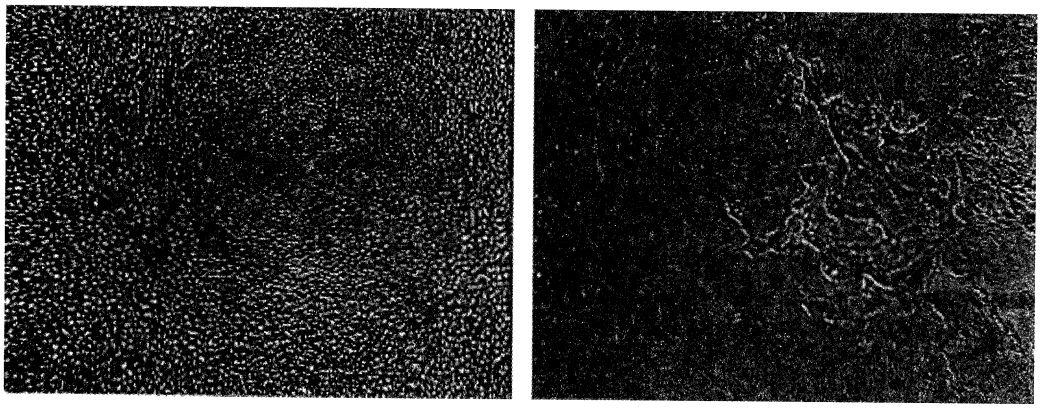

Figure 1 Cell fusion and syncytium formation in PEDV-infected Vero cells with trypsin in the medium. Uninfected culture (a) and infected culture (b) × 40

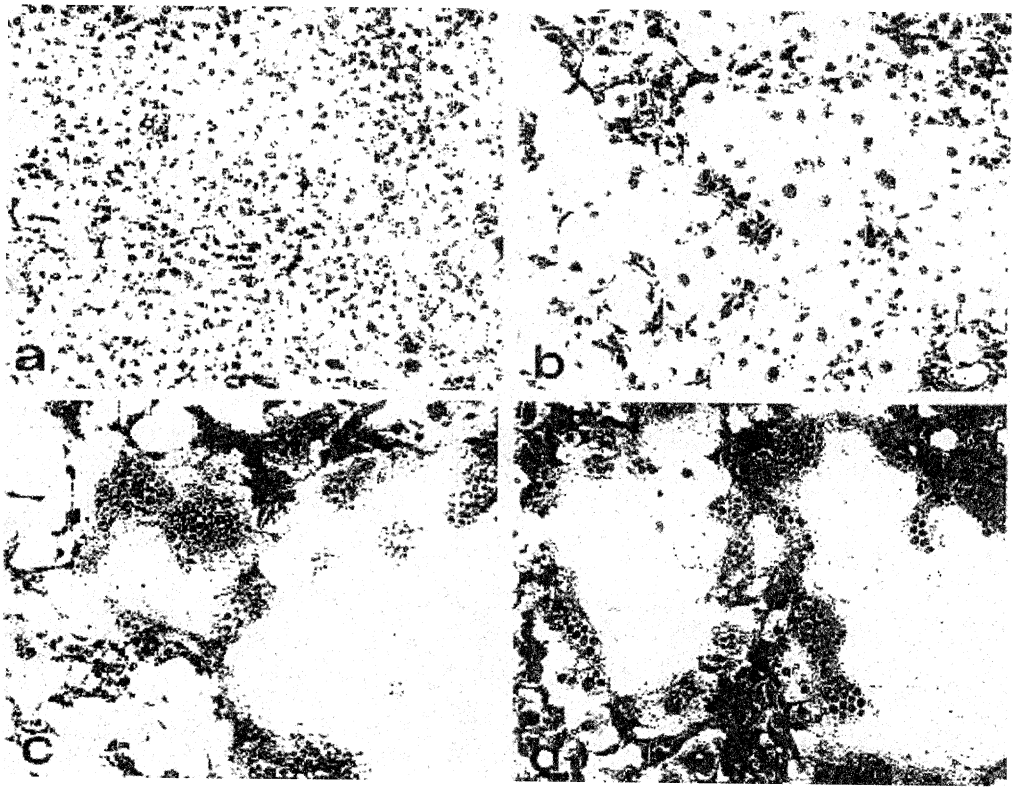

Figure 2 Cytopathic changes and cell fusion in PEDV-infected Vero cells. Uninfected culture (a), early stage of cytopathic change, single cells lose their individual demarcation (b), numerous nuclei are accumulated in the center of polycarions (c) and late stage of cytopathic change, pyknotic nuclei are accumulated at the periphery of polycarions (d). Crystal violet staining. × 100

ผลการตรวจเชื้อ PEDV โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

จากการนำ coverglass ไปตรวจหาเชื้อ PEDV ทั้งวิธี direct และ indirect immunofluorescence พบว่า Vero cells ที่ inoculate ด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กสุกร ในการแยกเชื้อครั้งแรก และนำมาตรวจในวันที่ 5 จะตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytialcells ที่ประกอบด้วย 2-3 nuclei ส่วนเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells passage ที่ 15 เมื่อนำ coverglass มาตรวจ จะตรวจพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ syncytial cells ที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 3) ภายใน 20 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อ ส่วนในเซลล์กลุ่มควบคุมตรวจไม่พบการเรืองแสงของเซลล์

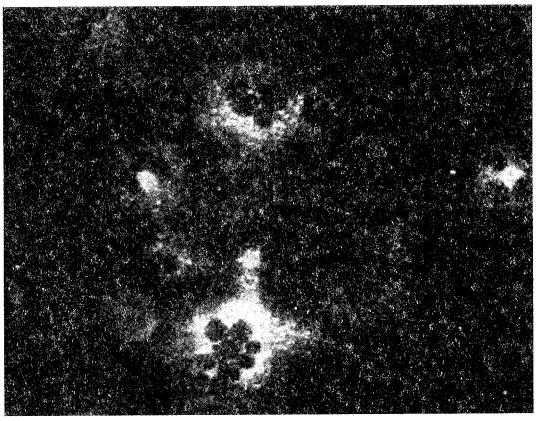

Figure 3 Cytoplasmic immunofluorescence of syncytium in Vero cells inoculatedwith cell culture-adapted PEDV. × 100

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสอยู่ใน cytoplasmic vacuoles ของเซลล์ที่เกิดการเสื่อม เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ coronaviridae รูปร่างกลม บางอนุภาครูปร่าง pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางลักษณะเป็นelectron dense หรือ opaque ล้อมรอบด้วย envelop มีขนาด ประมาณ 70-100 nm และตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสติดบนผิวนอกของเซลล์ด้วย (ภาพที่ 4)

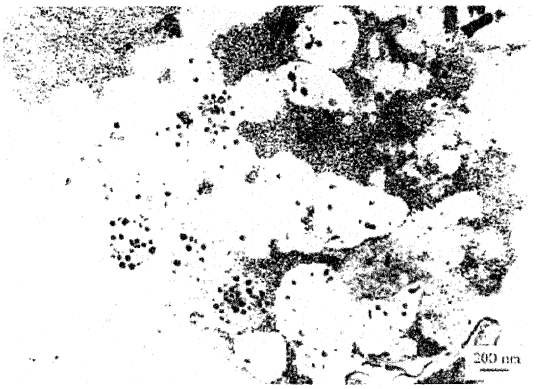

Figure 4 Electron micrograph of typical coronavirus particles obtained from PEDV-infected Vero cells (passage 21 of PEDV in Vero cells.) × 20K.

ผลของPEDV infectivity และการทำ cross neutralization test

จากการนำ culture fluid ของเชื้อ PEDV ใน passage ที่ 21 มา titrate หา infectivity titer ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อ พบว่าเชื้อ PEDV มี virus titer เท่ากับ 105.2 $TCID_{50}$ ต่อ ml เมื่อนำ PEDV มาทำ cross neutralization test กับซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV พบว่า เชื้อ PEDV ที่แยกได้ neutralize ซีรั่มสุกรที่ระดับเจือจางสูงสุดเท่ากับ 256

ผลการทดสอบชนิดของ nucleic acid และความไวต่อ lipid solvent

จากตารางที่ 1 จะพบว่า IUDR ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ที่มีมี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน diethyl etherและ chloroform จะทำลายเชื้อ PEDV อย่างสมบูรณ์

วิจารณ์

จากการศึกษาการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรที่หยอดเชื้อไวรัสที่ระบาดใน

Table 1 Nucleic acid determination of PEDV by the addition of IUDR

Virus	Infectivity titer1			Change	
	no IUDR (a)	IUDR 50ug/ml (b)	IUDR 200ug/ml (c)	a-b	a-c
PEDV	5.75	5.5	5	0.25	0.75
ADV	7	2.5	1.0	4.5	6.0

1 virus titer expressed as log $TCID_{50}$/ml

ท้องที่จังหวัดตรัง(สนองและคณะ,2538) สามารถแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cellsโดยพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ PEDV มีลักษณะ cell fusion และเกิด syncytium formation ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Hofmann and Wyler (1988) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV 2 สายเชื้อที่ระบาดในยุโรปและ Kusanagi et al.(1992) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83P-5 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้นี้ต้องการ trypsin ความเข้มข้น 10 ug/ml เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแยกเชื้อไวรัสหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในสุกรและโคโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในตัวอย่าง (inoculum) จะมีผลต่อการเพิ่มจำนวน (replication) ของเชื้อไวรัส ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และทำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพ (CPE) ซึ่งจะสังเกตได้ ในการแยกเชื้อ Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ใน CPK cells และเชื้อ Porcine rotavirus ใน MA-104 cells trypsin ที่เติมใน inoculum และอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเพิ่มขนาดของ plaque และมีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์(Komaniwa et al.,1986,Fukusho et al.,1981;Honda et al.,1990) ในการแยกเชื้อ bovine coronavirus ใน bovine fetal thyroid cells (BFTy cells) trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการเกิด plaque และ cell fusion (Storz et al.,1981) ส่วนการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells จำเป็นต้องเติม trypsin ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิด cell fusion (Hofmann and Wyler,1988) จากการทดสอบ physicochemical properties ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ พบว่าIUDR ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และether และ chloroform จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้เป็น enveloped RNA virus (Siddell et al.,1983 ; Hofmann and Wyler,1989) จากการพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี cross neutralization test พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ neutralize pig anti-PEDV serum สายเชื้อที่พบในเบลเยี่ยม จึงแสดงว่า เชื้อนี้มี antigenic relationship กับสายเชื้อที่แยกได้ในยุโรป จากการทำอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์เทสต์ ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytial cells เหมือนกับรายงานของ Hofmann and Wyler (1988) และ Kusanagi et al.(1992)

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน เชื้อไวรัสที่แยกได้ อยู่ในกลุ่มของ coronaviridae และมีขนาด 70-100 nm (Doane and Anderson,1987; Palmer and Martin,1988) แต่ไม่พบ projection เนื่องจาก projection จะหลุดออกจากอนุภาคไวรัสได้ง่าย ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้จึงยืนยันการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ในประเทศไทยและเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาเตรียมเป็น diagnostic reagent เพื่อตรวจโรค PED ในสุกรต่อไป

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณ Prof.Dr.M.B.Pensaert, University of Ghent, Belgium ที่ให้ความอนุเคราะห์ porcine hyperimmuneserum ต่อเชื้อ PEDV และ FITC conjugated PEDV antiserum และน.สพ. นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ที่สนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

สนอง ศรีนันทพันธ์,ลัดดา ตรงวงศา,ช้องมาศ อันตรเสน,วาสนา แสงสุวรรณ์และไพรสน พรมเมือง. 2538. รายงานการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ที่จังหวัดตรัง.สัตวแพทยสาร. 46(3):11-19.

Chasey, D. and Cartwright, S.F. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. Res. Vet. Sci.25:255-256.

DeBouck, P. and Pensaert,M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. Am. J. Vet. Res.41(2):219-223.

Doane, F.W. and Anderson,N. 1987.Coronaviridae In: Electron microscopy in Diagnostic Virology. 1st ed.Cambridge University Press, New York. p.138-141.

Fukusho, A., Shimizu, Y. and Ito, Y. 1981. Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. Arch. Virol. 69:49-60.

Hofmann, M. and Wyler, R., 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea (PED) in cell culture. J. Clin. Microbiol. 26:2235-2239.

Hofmann, M. and Wyler, R. 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). Vet. Microbiol.20:131-142.

Honda, E.,Takahashi, H., Okazaki, K., Minetoma, T. and Kumagai, T. 1990. The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. Jpn. J. Vet. Sci. 52(2)217-224.

Karber, G. 1931.Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162:480-483.

Kawamura, A. 1977. Fluorescent antibody techniques and thier application.2ndedition. University Tokyo Press.Tokyo. p 13-76.

Komaniwa, H., Makabe, T., Fukusho, A., and Shimizu, Y. 1986. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from feces of diarrheic pigs in roller culture of CPK cells in the presence of trypsin. Jpn. J. Vet. Sci. 48:1245-1248.

Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T. and Tajima, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. J. Vet. Med. Sci. 54(2):313-318.

Palmer, E.L. and Martin, M.L. 1988. Coronaviridae. in : Electron Microscopy in Viral Diagnosis.CRC Press, Florida. p. 121-123.

Pensaert, M.B. and Debouck, P. 1978. A New coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch. Virol. 58:243-247.

Pensaert, M.B. 1992. Porcine epidemic diarrhea in : Disease of swine. 7thedition. Eds.Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., Allaire S.D., Taylor D.J. Ames Iowa State University Press. p.293-298.

Siddell, S. G., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H.D., Macnaughton, M.R., Pensaert, M., Stohlman, S.A., Sturman, L. and Van der Zeijst, B.A.M. 1983. Coronaviridae.Third report.Intervirology,20:181-189.

Storz, J., Rott, R. and Kaluza, G. 1981. Enhancement of plaque formation and cell-fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. Infect. Immune. 31(3):1214-1222.

Takahashi, K., Okada, K. and Ohslima, K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 45:829-832.

Wood, E.N. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. Vet. Rec. 100:243-244.