การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ

ดิถี ประเสริฐสุวรรณ[1] กังวาน จึงธีรพานิช[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรง สำหรับใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ดจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ โดยการฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดในเป็ดทดลองพันธุ์กากีแคมป์เบล เก็บซีรัมในวันที่ 4 และ 5 มาเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ หาปริมาณไวรัสในเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 10 วันและนำไวรัสในวันที่ให้ปริมาณไวรัสสูงสุดมาเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 2 ครั้ง เช่นเดียวกับ passage แรก แล้วนำไวรัสแต่ละ passage ในวันที่ได้ปริมาณไวรัสสูงสุดไปหาความรุนแรงในเป็ดทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสที่ได้ พบว่าไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน passage ที่ 1 และ 2 จะมีปริมาณไวรัสสูงสุดที่ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. ขณะที่ passage ที่ 3 อยู่ที่ $10^{4.71}$ $TCID_{50}$/มล. ในวันที่ 5-6 และความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลองเท่ากับ $10^{5.17}$, $10^{5.80}$ และ $10^{4.50}$ LD_{50}/มล. ตามลำดับ สรุปได้ว่า ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เตรียมจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ passage ที่ 1-3 มีปริมาณไวรัสในเซลล์ ($TCID_{50}$) และมีความรุนแรง (LD_{50}) ในเป็ดทดลองใกล้เคียงกัน สามารถใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในการเตรียมเชื้อพิษทับได้

คำสำคัญ: ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรง เซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ ปริมาณไวรัส ความคุ้มโรค

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคกาฬโรคเป็ด (duck plague หรือ duck virus enteritis) เกิดจากเชื้อ Herpesvirus เป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันและสามารถติดต่อได้อย่างรวดเร็ว (Sandhu and Leibovitz, 1997) ทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกจำพวกเป็ด ห่าน และหงส์ เมื่อเกิดการระบาดของโรคแล้วจะทำให้สัตว์มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงได้ถึง 100% (อุราศรี, 2542) ในฝูงเป็ดไข่ที่ติดเชื้อพบอัตราการผลิตไข่ลดลง 20-100% และการฟักไข่เป็นตัวอ่อนลดลง (Burgess and Yuill, 1981; Jansen, 1964) ดังนั้นการฉีดวัคซีนให้สัตว์จึงเป็นวิธีการสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Zander *et al*., 1997)

ปัจจุบันการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนตามมาตรฐาน ASEAN (1998) โดยฉีดวัคซีนในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบล และหลังจากนั้น 14 วัน ทำการฉีดเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ด ปริมาณไวรัส 10^2 fifty percent lethal dose (LD_{50})/มล. ตัวละ 1 มล. โดยเป็ดทดลองที่ได้รับวัคซีนอย่างน้อย 90% ต้องไม่แสดงอาการป่วยหรือความผิดปกติที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดและเป็ดในกลุ่มควบคุมต้องตายภายใน 7 วัน จึงจะถือว่าวัคซีนผ่านการทดสอบ

การเตรียมเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เตรียมได้จากเป็ดทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนท้องถิ่น ที่มีปริมาณไวรัส $10^3 LD_{50}$/มล. หลังจากการฉีดเชื้อ 4-5 วัน เก็บตับจากเป็ดที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน ซึ่งไวรัสที่เตรียมได้ต้องปลอดจากการปนเปื้อนของเชื้ออื่นจึงจะเก็บไว้ใช้งานได้ การเตรียมเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดด้วยวิธีนี้ต้องมีการคัดเลือกเป็ดที่มีสุขภาพดี ปลอดจากโรค เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในเชื้อพิษทับที่เตรียมได้ รวมถึงขั้นตอนในการเก็บตับเป็ดทดลองต้องมีความชำนาญและปฏิบัติด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากเตรียมเชื้อพิษทับที่ได้จากเป็ดทดลองมีความจำเป็นต้องหาปริมาณเชื้อไวรัสและความรุนแรงในเป็ดทดลอง ซึ่งต้องทำอย่างน้อย 2 ครั้งต่อการเตรียมเชื้อพิษทับ 1 ครั้ง โดยใช้เป็ดทดลองอย่างน้อย 60 ตัวต่อการเตรียม 1 ครั้ง

ไวรัสกาฬโรคเป็ดสามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์หลายชนิด เช่น เพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ (chicken embryo fibroblast; CEF) (จารุภา, 2559; ทวีศักดิ์, 2546; Kalaimathi, 1989; OIE, 2014; Sinthia *et al*., 2017) เพาะเลี้ยงในเซลล์ตับของคัพภะเป็ด (Duck embryo liver cell; DEL) (Kalaimathi, 1989) หรือจากเซลล์คัพภะเป็ด (Duck embryo fibroblast; DEF) (ทวีศักดิ์, 2546) หรือในเซลล์ชนิดเลี้ยงต่อเนื่อง (Baby Hamster kidney cell line; BHK-21) (Sinthia *et al*., 2017) ซึ่งใช้ในการตรวจหรือวินิจฉัยโรคกาฬโรคเป็ด แต่ยังไม่มีการใช้เพื่อเตรียมเป็นเชื้อพิษทับ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อและการใช้สัตว์จำนวนมากให้เป็นไปตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง จึงมีแนวคิดในการพัฒนาการเตรียมเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดสำหรับเป็นเชื้อพิษทับโดยการเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast; 1°CEF) ซึ่งเป็นผลผลิตจากไข่ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และใช้ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด เพื่อใช้ทดแทนการเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากสัตว์ทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

1.1 เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบล คละเพศอายุ 3 สัปดาห์ ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี จำนวน 100 ตัว ทำการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยมีระบบการเลี้ยงแบบ Conventional และปลดสัตว์ทดลองด้วยวิธีการดึงคอ (Cervical dislocation) (ศูนย์สัตว์ทดลอง, 2018) และทำลายด้วยวิธีเผาซาก

1.2 ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 11 วัน พันธุ์เล็กฮอร์นขาว (white leg-horn) จากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ (SPF) ที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยมีระบบการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อก่อโรคจำเพาะ (Specified Pathogen Free System) จำนวน 150 ฟอง และหลังเสร็จสิ้นการทดลองทำลายด้วยวิธีการเผา

2. อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ CEF หรือ growth medium (GM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 9% Medium 199 Eagle solution, 3.6% calf serum, 2.6% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM Vitamin solution และ 0.1% amphotericin B solution และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (maintenance medium; MM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 4.7% Medium 199 Eagle solution, 3.6% calf serum, 2.5% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM Vitamin solution และ 0.1% amphotericin B solution, 4% Ham F10 solution และ 4% tryptose phosphate broth solution ตามขั้นตอนและคู่มือการปฏิบัติงาน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2547)

3. การเตรียมเซลล์ 1°CEF

ใช้ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free, SPF) อายุ 11 วัน จำนวน 50 ฟอง/ครั้ง (ทำการเพาะเลี้ยงไวรัส 3 passage จะใช้ไข่ไก่ฟัก จำนวน 150 ฟอง) เก็บตัวอ่อนใส่จานแก้วที่สะอาด ตัดส่วนหัวทิ้ง บดผ่านไซริงค์แก้วขนาด 20 มล. ล้างเนื้อเยื่อโดยเติม phosphate buffered saline (PBS) pH 6.8-7.2 และกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กนาน 5 นาที ตั้งให้เนื้อเยื่อตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยการเติมสารละลาย 0.25% trypsin นาน 30 นาที (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2553ก) เก็บส่วนที่เป็นของเหลวหรือเซลล์แขวนลอยโดยกรองผ่านตะแกรงลวดสแตนเลส ขนาดรู 0.25 มม. ผสมสารละลาย lactalbumin hydrolysate 50% โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์[1] นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยซีรัมลูกโค 1.5 เท่าโดยปริมาตร ปั่นอีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนตะกอนมาเติม GM และเก็บเซลล์แขวนลอย

[1] Beckman model J-6B centrifuge, USA

บางส่วนนำมาย้อมด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์ แล้วปรับจำนวนเซลล์ด้วย GM ให้มีปริมาณเซลล์ 1.0×10^6 เซลล์/มล.

เพาะเซลล์ 1°CEF ในขวดพลาสติกเพาะเซลล์ ขนาด 75 ซม.^{2} โดยใส่เซลล์เริ่มต้นที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเติม GM จำนวน 20 มล. (เซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 1.0×10^6 เซลล์/ขวด หรือ 5.0×10^4 เซลล์/มล.) จำนวน 22 ขวด นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37°C, 5% CO_2 นาน 48-72 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ 1°CEF ที่เหลือเก็บใส่ตู้เย็น 4°C สำหรับการหาปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด

4. การเพิ่มปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด

4.1 การเพิ่มปริมาณไวรัสในเป็ดทดลอง

นำเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ไวรัสที่มีความรุนแรง 10^3LD_{50}/มล. ฉีดในเป็ดทดลองจำนวน 10 ตัว ตัวละ 1 มล. หลังฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด 4-5 วัน เจาะเลือดเป็ด ตัวละ 3 มล. เพื่อเก็บซีรัมนำมารวมกัน และแบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสและเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ 1°CEF ต่อไป

4.2 การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดในเซลล์ 1°CEF

นำเซลล์ 1°CEF จากข้อ 3. เทมีเดียมเก่าทิ้งล้างด้วย PBS pH 6.8-7.2 2 ครั้ง นำไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เก็บจากซีรัมซึ่งทราบปริมาณไวรัสในเซลล์ ($TCID_{50}$) แล้วมาเจือจางด้วย MM ให้มีปริมาณไวรัส 10^4 $TCID_{50}$/มล. ใส่เชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดลงเซลล์ 1°CEF ที่เตรียมไว้ จำนวน 22 ขวดๆ ละ 5 มล. (อีก 2 ขวด ไม่มีการเติมไวรัส เป็นกลุ่มเซลล์ควบคุม) โดยค่า MOI เท่ากับ 0.05 จากนั้นเติม MM ปริมาตร 15 มล. นำไปบ่มที่ 37°C 5% CO_2 แล้วทำการเก็บขวดไวรัสทุกวัน วันละ 2 ขวด นาน 10 วัน นำมาแช่แข็งที่ตู้ -20°C ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายน้ำไวรัส (thaw) มารวมกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสแบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80°C และนำไปหาปริมาณไวรัสโดยใช้เซลล์ 1°CEF

4.3 การเพาะเลี้ยงไวรัสต่อ (Passage)

นำไวรัสที่มีปริมาณสูงสุดใน passage ที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ 1°CEF เป็น passage ที่ 2 และนำไวรัสที่มีปริมาณสูงสุดใน passage ที่ 2 มาเพาะเลี้ยงต่อใน passage ที่ 3 โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.2

5. การหาปริมาณไวรัสในเซลล์ 1° CEF

การทดสอบหาปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด ทำโดยเตรียมเซลล์ 1°CEF เพาะเซลล์ลงใน 96 well-plate จำนวนเซลล์ประมาณ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไวรัสกาฬโรคเป็ดที่ต้องการหาปริมาณเจือจางไวรัสแบบ 10-fold dilution เลือกความเจือจาง ที่ 10^{-1}–10^{-10} ด้วย PBS pH 6.8-7.2 ถ่ายมีเดียมเก่าทิ้ง แล้วเติมน้ำไวรัสลงใน well-plate ความเจือจางละ 10 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตรและเติมมีเดียมใหม่อีก 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยอ่านผลการเกิด cytopathic effect (CPE) เป็นเวลา 5 วัน และคำนวณหาปริมาณไวรัส (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2553ข)

6. การหาความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลอง

นำไวรัสที่ได้ใน passage ที่ 1, 2 และ 3 มาหาปริมาณไวรัสโดยใช้สัตว์ทดลอง (LD_{50}/มล.) เพื่อยืนยันความรุนแรงของเชื้อ โดยเจือจางไวรัสแบบ 10-fold dilution ด้วย PBS แล้วเลือกความเจือจางที่ 10^{-2}-10^{-7} ฉีดในเป็ดทดลองความเจือจางละ 5 ตัวๆ ละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อขา บันทึกอาการป่วยหรือตาย 7 วัน และคำนวณหาปริมาณไวรัส (Reed and Muench, 1938)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ 1°CEF กับความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลอง ระหว่าง passage ที่ 1, 2 และ 3

ผล

จากการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ดในเซลล์ 1°CEF พบว่าปริมาณไวรัส passage ที่ 1 ในวันที่ 5-6 และ passage ที่ 2 ในวันที่ 6 จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุด คือ $10^{5.50}$ $TCID_{50}$/มล. แต่ passageที่ 3 จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุดในวันที่ 5 คือ $10^{4.71}$ $TCID_{50}$/มล. (ตารางที่ 1) และเมื่อหาความรุนแรงของไวรัส passage ที่ 1, 2 และ 3 ในเป็ดทดลอง (LD_{50}/มล.) มีค่า $10^{5.17}$, $10^{5.80}$ และ$10^{4.50}$ LD_{50}/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ ขั้นตอนการเตรียมไวรัสตั้งต้นได้ใช้ไวรัสที่มีอยู่ในซีรัมเป็ดในช่วงที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดแทนการใช้ไวรัสที่ได้จากวิการ (lesion) นั้น เนื่องมาจากวิการโรคกาฬโรคเป็ดส่วนใหญ่ที่พบเกิดขึ้นที่หลอดอาหารและลำไส้ ซึ่งการเก็บวิการจากตำแหน่งดังกล่าว พบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (ทวีศักดิ์, 2546) จากการทดลองปริมาณไวรัสที่ได้จาก passage ที่ 1 และ 2 ที่มีปริมาณเท่ากัน คือ $10^{5.5}$$TCID_{50}$/ มล. แต่ให้ค่า LD_{50} ที่ต่างกันเมื่อฉีดในเป็ดทดลองอาจเนื่องมาจากคุณภาพของสัตว์ทดลองที่ทดสอบในช่วงเวลานั้นๆ สำหรับปริมาณไวรัสที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (สำหรับการฉีดพิษทับ) ใช้เพียง $10^{2}$$LD_{50}$/มล. ซึ่งไวรัสที่เตรียมได้มีปริมาณ $10^{5.5}$$TCID_{50}$/มล. ซึ่งเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็นเชื้อพิษทับ โดยให้ผลเช่นเดียวกับไวรัสที่เตรียมได้จากเป็ดโดยเป็ดทดลองจะเสียชีวิตภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ (ตารางที่ 2) สำหรับไวรัสที่เตรียมจาก passage ที่ 3 จะมีปริมาณน้อยกว่า passage ที่ 1 และ 2 แต่ความรุนแรงของไวรัสกาฬโรคเป็ด เมื่อนำมาเตรียมเป็นเชื้อพิษทับยังคงมีความรุนแรงเช่นเดียวกับ passage ที่ 1 และ 2 ซึ่งแม้ว่าการเลี้ยงใน 1°CEF เป็นระบบหนึ่งในการลดความรุนแรง (attenuate) เพื่อเป็นวัคซีนเชื้อเป็นเช่นเดียวกับวัคซีนในปัจจุบันแต่ต้องมีการ passage ต่อเนื่องหลายครั้ง เช่น 25-80 passage (Yang *et al*., 2015) อาจเป็นไปได้ว่าพันธุกรรมหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของไวรัสกาฬโรคเป็ดในการศึกษาครั้งนี้ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง และเพื่อให้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวน passage สูงสุดที่สามารถให้ความรุนแรงในการเป็นเชื้อพิษทับได้ และศึกษาอายุการเก็บรักษาไวรัส (Keeping Quality) รวม

ไปถึงการศึกษาความแตกต่างของการใช้ไวรัสที่เตรียมจากสัตว์และจากเซลล์ในกระบวนการฉีดพิษทับ เพื่อยืนยันและปรับปรุงกระบวนการทดสอบวัคซีนกาฬโรคเป็ดต่อไป

สรุป

ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เตรียมจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ passage ที่ 1-3 มีปริมาณไวรัสในเซลล์ ($TCID_{50}$) และมีความรุนแรงในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบล (LD_{50}) ใกล้เคียงกัน สามารถใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในการเตรียมเชื้อพิษทับได้

เอกสารอ้างอิง

จารุภา เถาวัลย์ 2559 คู่มือการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก งานไวรัสวิทยาและการเพาะเลี้ยงเซลล์ ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและ สัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 8, 42-52

ธวัชชัย ปัจฉานุกูลและฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2555 ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 20-21(1-2): 31-39

ทวีศักดิ์ ส่งเสริม 2546 โรคเป็ดและห่านในประเทศไทย พยาธิวิทยาและการวินิจฉัย หน้า 15

ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2018 การการุณยฆาตสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Euthanasia) แหล่งที่มา http://www.culac.chula.ac.th/news/154573358575 30 ตุลาคม 2562

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2547 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน การเตรียม Growth medium, SOP-DP-006 ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2553ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน การเตรียม Chicken embryo fibroblast, SOP-QCSD-005 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2553ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน การหาปริมาณไวรัส, SOP-QCSD-006 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-5

อุราศรี ตันตสวัสดิ์ 2542 แนวทางการป้องกันโรคสำคัญในเป็ดและห่าน กรมปศุสัตว์ หน้า 29

ASEAN 1998. ASEAN standard requirements for duck plague vaccine, live In: ASEAN standard for animal vaccines. 2nd edition. Livestock publication Series No. 2A. p 8-9

Burgess, E. C. and Yuill T. M.. 1981. Increased cell culture incubation temperatures for duck plague virus isolation. Avian Dis. 25: 222–224.

Jansen, J. 1964. The interference phenomenon in the development of resistance against Duck plague. J. Comp Pathol. Ther. 74: 3-7.

Kalaimathi, R. 1989. Adaptation of a Virulent strain of Duck Plague virus to chicken embryo fibroblast cell culture. INDIAN VET. J. 66(11): 1001-1004.

Office international des Epi Zooties (OIE) 2014 . Manual of diagnostic tests and vaccine for tersestrial Animals. CHAPTER 2.3.7: 507-513.

Reed, L. J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Public Hygiene. 27: 493–497.

Sandhu, T. S. and Leibovitz, L. 1997. Duck virus enteritis (Duck plague). In B.W. Calnek (Ed.), Diseases of Poultry 10th ed. Ames, IA: Iowa State University Press. pp. 675–683.

Sinthia, T., Khondoker, M., Hafizur, R., Anwer, H., Amal, K., Shaima, A. and Giasuddi, J. 2017. Adaptation of Duck plague Virus (DPV) In Baby Hamter Kidney cell line (BHK-21) Toward Vaccine Development. International Journal of Current Research. 9(5): 49733-49737.

Yang, C., Li, J., Li, Q., Li, L., Sun, M., Li, H., Xia, Y., Yang, H. and Yu, K. 2015. Biological properties of a duck enteritis virus attenuated via serial passaging in chick embryo fibroblasts. Arch. Virol. 160(1): 267–274.

Zander, D.V., Bermudez, A.J. and Mallison, E.T. 1997. Principle of disease prevention: diagnosis And Control. In: Disease of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press. pp. 21-25.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ (1°CEF) passage ที่ 1, 2 และ 3

วันที่ (เก็บ)	ปริมาณไวรัส ($TCID_{50}$ /มล.)		
	Passage 1	Passage 2	Passage 3
1	$10^{4.00}$	$10^{5.50}$	$10^{5.50}$
2	$10^{3.89}$	$10^{5.00}$	$10^{5.00}$
3	$10^{3.89}$	$10^{4.71}$	$10^{4.58}$
4	$10^{4.09}$	$10^{4.71}$	$10^{4.58}$
5	$10^{5.50}$	$10^{5.43}$	$10^{4.71}$
6	$10^{5.50}$	$10^{5.50}$	$10^{4.58}$
7	$10^{4.71}$	$10^{3.60}$	$10^{4.09}$
8	$10^{4.58}$	$10^{3.60}$	$10^{2.09}$
9	$10^{3.60}$	$10^{3.60}$	$10^{2.09}$
10	$10^{2.09}$	$10^{1.80}$	อ่านค่าไม่ได้

* อ่านค่าไม่ได้เนื่องจากปริมาณไวรัสน้อยกว่า 10^{1} $TCID_{50}$ /มล.

ตารางที่ 2 ปริมาณไวรัสหรือความรุนแรงของเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เพาะจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อทดสอบในเป็ดทดลอง

Dilution	จำนวนเป็ด (ตาย/ รอด)		
	Passage 1	Passage 2	Passage 3
10^{-2}	5/0	5/0	5/0
10^{-3}	4/1	5/0	4/1
10^{-4}	4/1	4/1	3/2
10^{-5}	3/2	4/1	2/3
10^{-6}	2/3	3/2	¼
10^{-7}	0/5	0/5	0/5
ปริมาณไวรัส (LD_{50}/มล.)	$10^{5.17}$	$10^{5.80}$	$10^{4.50}$

หมายเหตุ เป็ดทดลองตายภายใน 7 วัน

The preparation of virulent duck plaque virus from SPF chicken embryo fibroblast

Ditee Prasertsuwan[1] Kungwan Jungtheerapanich[1]

Abstract

Study on the preparation of virulent duck plague virus using for vaccine potency test by propagating in specific pathogen free chicken embryo fibroblast cell (SPF-CEF) was conducted. The virus was injected intramuscularly into Khaki Campbell duck. After 4-5 day, sera were collected and cultured in SPF-CEF. The virulent virus was harvested every day for 10 days in order to determine virus titer in SPF-CEF whereas the level of virulent virus was done in duck. The process of growing virus, serial passage was performed in SPF-CEF. Then the virus cultivation in the passage 2 and 3 were then compared in terms of virus titer. The study found that at day 5 and 6, the harvested virus obtained maximum titer about $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/ml in passage 1 and 2 while passage 3 was $10^{4.7}$ $TCID_{50}$/ml. The virulent level of virus in challenged duck from the first to the third passage were $10^{5.17}$ LD_{50}/ml, $10^{5.8}$ LD_{50} and $10^{4.5}$$LD_{50}$/ml, respectively. In summary, the virulent duck plague virus, prepared in SPF-CEF from passage 1, 2 and 3, still had nearly the same virus content and virulent in ducks which can be used for potency test of duck plaque vaccine. As a result, the number of experimental ducks can be reduced for the preparation of virulent virus.

Keywords: virulent duck plaque virus, specific pathogen free chicken embryo fibroblast, virus titer, potency test

[1] Bureau of Veterinary Biologic, Pakchong , Nakhonratchasima 30130