การเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6

กังวาน จึงธีรพานิช[1] ดิถี ประเสริฐสุวรรณ[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์ชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมไวรัสสำหรับใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ SK6 เก็บไวรัสทุกวันหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน ตรวจหาปริมาณไวรัสทุกวัน พบว่า วันที่ 10 หลังการเพาะไวรัสมีปริมาณไวรัสสูงสุดเท่ากับ $10^{6.08}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร และปริมาณไวรัสในสุกรทดลองเท่ากับ 10^{6} PID_{50}/มิลลิลิตร เมื่อนำไวรัสมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 3, 9 และ 15 เดือน พบปริมาณไวรัสในสุกรทดลองเท่ากับ 10^{6}, 10^{6} และ $10^{5.54}$ PID_{50}/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสามารถเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์ SK6 ซึ่งให้ปริมาณไวรัสเพียงพอกับการใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร คือ ไม่น้อยกว่า 10^{5} PID_{50}/มิลลิลิตร และสามารถเก็บรักษาเพื่อใช้งานได้ อย่างน้อย 1 ปี ซึ่งเป็นการทดแทนการเตรียมไวรัสจากสุกรและสอดคล้องตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการสากล 3Rs

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง เซลล์เพาะเลี้ยง SK6 ปริมาณไวรัส ความคุ้มโรค

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกรทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เกิดจากเชื้อไวรัส Classical swine fever ซึ่งอยู่ใน Family Flaviviridae Genus Pestivirus การติดต่อของโรคติดได้โดยการสัมผัสกับสัตว์ป่วย สิ่งขับถ่าย น้ำเชื้อ หรือสารคัดหลั่งจากสัตว์ที่ป่วยหรือตาย การป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรคให้กับสุกร ซึ่งคุณภาพของวัคซีนที่ใช้ต้องเป็นไปตามมาตรฐานสากล เช่น องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health; OIE) หรือประชาคมอาเซียน (Association of South East Asian Nations; ASEAN) การทดสอบความคุ้มโรควัคซีนอหิวาต์สุกรที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำได้โดยการฉีดวัคซีนที่เจือจางจากขนาดที่แนะนำให้ใช้ในพื้นที่เป็นขนาด 1/40 และ 1/160 จากนั้น 14 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่มีปริมาณไวรัส 10^5 PID_{50}/มิลลิลิตร (50% Pig Infectious Dose) ตัวละ 1 มิลลิลิตร ให้สุกรกลุ่มได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุมสังเกตอาการและบันทึกอุณหภูมิร่างกายสุกรทุกวันเป็นเวลา 14 วัน นำข้อมูลสุกรที่แสดงอาการป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรมาคำนวณความคุ้มโรค ซึ่งวัคซีนต้องมีความคุ้มโรค (50% Protective Dose) ไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์เตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สายพันธุ์บางเขน (Classical swine fever, Bangkhen strain) สำหรับใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรด้วยการเพิ่มปริมาณไวรัสในสุกรทดลอง โดยการฉีดเชื้อไวรัสที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 PID_{50}/มิลลิลิตร ลงในสุกรและทำการเจาะเก็บเลือดหลังจากสุกรแสดงอาการป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร ซึ่งการเตรียมเชื้อไวรัสด้วยวิธีการนี้ ต้องใช้สุกรที่มีสุขภาพดี ไม่เคยได้รับวัคซีนและไม่เคยเป็นโรคอหิวาต์สุกรมาก่อนเป็นจำนวนมากทั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไวรัสและขั้นตอนการหาความรุนแรงของเชื้อไวรัส ในปัจจุบันสัตว์ทดลองที่มีคุณภาพตามข้อกำหนดนั้นหาได้ยากและมีมูลค่าต่อตัวที่สูง รวมถึงปริมาณเลือดที่เก็บได้จากสัตว์ทดลองมีปริมาณไม่แน่นอนในแต่ละครั้งและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการเก็บเลือดค่อนข้างสูง ซึ่งต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญในการเก็บเลือดด้วยวิธี sterile technique

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น SK6 (Hulst *et al*., 2000; Terpstra *et al*., 1990) และ FS-L3 (Sakoda and Fukusho, 1996; วาสนาและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร พบว่าเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชนีส สามารถตรวจพบในเซลล์ทั้ง SK6 และ FS-L3 ได้ใน passage แรก ในวันที่ 7 และ 12 หลังเพาะเชื้อตามลำดับ นอกจากนี้ไวรัสอหิวาต์สุกรยังเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์สุกร (Sasahara and Kumagai, 1966) ได้แก่ BEK (เซลล์ไตโค), MARC-145 (เซลล์ไตลิง), Vero (เซลล์ไตลิง), และ HL (เซลล์ปอดแฮมสเตอร์) วาสนาและคณะ, 2544 ได้วิจัยการพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยเปลี่ยนจากการเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรผ่านกระต่าย ซึ่งต้องใช้กระต่ายเป็นจำนวนมากและมีกรรมวิธีที่ยุ่งยาก มาเป็นการเตรียมเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงแทนการใช้สัตว์ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตและกรรมวิธีการผลิต

ในปัจจุบันการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย อยู่ภายใต้พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ.2558 โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ประเทศไทยมีการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ให้สอดคล้องตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ตามหลักการสากล 3Rs ได้แก่การใช้วิธีอื่นทดแทนสัตว์ทดลอง (Replacement) เช่น เนื้อเยื่อสังเคราะห์แทนการใช้สัตว์หรือเลือกการทดลองที่ไม่ใช้สัตว์หากผลที่ได้ไม่ต่างกัน แต่หากจำเป็นต้องใช้สัตว์ก็ต้องคำนึงถึงสวัสดิภาพสัตว์ (Refinement) โดยสถานที่ต้องไม่คับแคบ ปลอดเชื้อ มีอาหารและน้ำเพียงพอ และข้อสุดท้ายคือพยายามลดจำนวนสัตว์ทดลองที่ต้องใช้ให้มากที่สุด (Reduction) (ศูนย์สัตว์ทดลอง, 2018) ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองตามหลักสากล 3Rs จึงมีแนวคิดในการพัฒนาการเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 แทนการเตรียมเชื้อพิษทับจากสุกรทดลอง เพื่อลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองในการเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่ใช้สำหรับทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large white, Landrace, Duroc) คละเพศ อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวน 127 ตัว ซึ่งเป็นสุกรจากฟาร์มเอกชนที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร ทำการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยมีระบบการเลี้ยงแบบ Conventional หลังสิ้นสุดการทดลองทำการุณยฆาตด้วยวิธี frontal shock (Gunshot) (American Association of Swine Practitioners and National Pork Board, 2008) ปลดสัตว์ทดลองด้วยวิธีการเผาซาก

2. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ SK6 (Growth medium, GM) ประกอบด้วย minimal essential medium, Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 5%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium, MM) ประกอบด้วย minimal essential medium, Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 1%

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ SK6

ใช้เซลล์ SK6 ที่เก็บในถังลิควิดไนโตรเจน passage ที่ 27 เพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดพลาสติกแบนขนาด 75 ตารางเซนติเมตร จำนวน 40 ขวด จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $2x10^6$ เซลล์ต่อขวด เติม 5% GM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ขวด บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 5 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นที่ผิวขวดจึงนำไปใช้เพาะเลี้ยงไวรัสต่อไป

4. การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกร

4.1 การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกร

นำเชื้อไวรัสอหิวาห์สุกรชนิดรุนแรงสายพันธุ์บางเขนที่มี ปริมาณไวรัส 10^5 PID_{50}/มิลลิลิตร ฉีดลงในสุกร 2 ตัวๆละ 1 มิลลิลิตร บันทึกอุณหภูมิร่างกายตัวสัตว์ สังเกตอาการป่วยทุกวัน เมื่อสุกรมีอุณหภูมิร่างกายสูงเกิน 40 องศาเซลเซียส และแสดงอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกร เจาะเก็บเลือดสุกรจากหัวใจหรือเส้นเลือด Anterior vena cava ปั่นและเก็บตัวอย่างซีรัมส่งตรวจความปนเปื้อน และนำไปตรวจหาปริมาณไวรัสในสุกรทดลอง

4.1.1 วิธีการหาปริมาณไวรัสในสุกรทดลอง

นำซีรัมที่ได้จากข้อ 4.1 มาเจือจางที่ 10^{-2}- 10^{-7} ด้วยวิธี 10-fold dilution ไปฉีดในสุกรทดลอง dilution ละ 1 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว โดยมีสุกรกลุ่มควบคุมจำนวน 1 ตัว บันทึกอุณหภูมิร่างกายตัวสัตว์และจำนวนสัตว์ตาย/รอด ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน ทำการผ่าซากสุกรทดลองทุกตัว เพื่อดูวิการของโรคอหิวาต์สุกรได้แก่ เกิดวิการเลือดออกที่กล่องเสียง ทอนซิลอักเสบ การอุดตายที่เนื้อเยื่อทอนซิล การเกิดจุดเลือดออกและจ้ำเลือดออกที่ไตรวมถึงกระเพาะปัสสาวะ การอุดตายของเนื้อเยื่อม้าม และการอักเสบของลำไส้ใหญ่ (กิจจา, 2535) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

4.2 การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ SK6

นำไวรัสอหิวาต์สุกรที่ได้จากข้อ 4.1 ซึ่งทราบปริมาณไวรัสแล้วและเจือจางให้มีปริมาณไวรัสตั้งต้น 10^5 PID_{50}/มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จำนวน 36 ขวดๆ ละ 1 มิลลิลิตร เติม MM ปริมาตร 19 มิลลิลิตร อีก 4 ขวดไม่ใส่ไวรัส (เป็นกลุ่มควบคุม) นำไปบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เก็บไวรัสทุกวัน (day post inoculation, dpi) วันละ 2 ขวด นาน 16 วัน นำมาแช่แข็งที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายน้ำไวรัส (thaw) มารวมกันในแต่ละวัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์[1] เก็บส่วนน้ำใสแบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสจากตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละวัน

5. การหาปริมาณไวรัส

5.1 การหาปริมาณไวรัสในเซลล์ SK6

เพาะเลี้ยงเซลล์ SK6 ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ $5x10^4$ ต่อหลุม บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 3 วัน นำมาใช้งานเมื่อเซลล์เจริญเต็มก้นเพลท เตรียมตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากข้อ 4.2 จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยการเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วย PBS pH 6.8-7.2 ที่ความเจือจาง 10^{-2}–10^{-7} เติมตัวอย่างไวรัสลงในไมโครเพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง หลุมละ 50 ไมโครลิตร พร้อมเซลล์ควบคุม บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 7 วัน ย้อมสีไมโครเพลทด้วยวิธี Immunoperoxidase สังเกตการย้อมติดสีของเซลล์จากไมโครเพลทที่ใส่เชื้อไวรัสเปรียบเทียบ

---

[1] Sigma model 2K15 centrifuge, Germany

กับหลุมที่มีเซลล์ควบคุม บันทึกจำนวนหลุมที่มีการย้อมติดสีและไม่มี คำนวณปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (tissue culture infective dose, $TCID_{50}$) ด้วยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938)

5.2 การหาปริมาณไวรัสในสุกร

นำไวรัสที่มีปริมาณสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงในข้อ 4.2 มาหาปริมาณไวรัสในสุกรตามข้อ 4.1.1 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

6. การหาความคงตัวของไวรัส

นำไวรัสจากข้อ 4.2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –80°C ระยะเวลา 3, 9 และ 15 เดือน มาหาปริมาณไวรัสในสุกรตามข้อ 4.1.1 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench

ผล

ไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน ที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จะมีปริมาณไวรัสสูงสุด เท่ากับ $10^{6.08}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ในวันที่ 10 และ 11 หลังเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1) และเมื่อนำมาทดสอบหาปริมาณไวรัสในตัวสัตว์ทดลอง พบว่ามีปริมาณไวรัสเท่ากับ 10^{6} PID_{50}/มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน เมื่อนำไวรัสที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาตรวจหาปริมาณไวรัสในเดือนที่ 3, 9 และ 15 พบว่ามีปริมาณไวรัสเท่ากับ 10^{6}, 10^{6} และ $10^{5.54}$ PID_{50}/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน ในเซลล์ SK6 พบว่าจากตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสที่ตรวจพบในวันที่ 1-2 มีปริมาณไวรัสเท่ากับไวรัสเริ่มต้น เนื่องมาจากไวรัสที่ตรวจพบเป็นไวรัสที่ยังไม่มีการสูญเสียหรือเพิ่มจำนวน ในวันที่ 3-5 ปริมาณไวรัสที่พบมีปริมาณลดลงอาจเนื่องมาจากการสูญเสียไวรัสบางส่วนจากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและอยู่ในสภาวะปรับตัวของไวรัส ในวันที่ 6-11 ปริมาณไวรัสที่พบเริ่มมีปริมาณสูงขึ้น เนื่องจากไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ และในวันที่ 12-16 ปริมาณไวรัสที่พบมีแนวโน้มลดลงอีกครั้งเนื่องจากสภาวะอาหารเลี้ยงรวมถึงคุณภาพของเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวาสนาและคณะ (2544) จากผลการทดลองปริมาณไวรัสสูงสุดคือ $10^{6.08}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) ซึ่งมีปริมาณไวรัสที่ได้เพียงพอต่อการใช้เป็นเชื้อพิษทับ (10^{5} PID_{50}/มิลลิลิตร) และเมื่อทดสอบความคงตัว (keeping quality) ของไวรัสที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 9 และ 15 เดือน พบว่าปริมาณไวรัสที่ได้ในเดือนที่ 3 และ 9 ของอายุการเก็บยังคงให้ปริมาณไวรัสใกล้เคียงกับปริมาณไวรัสเริ่มต้น ถึงแม้ว่าในเดือนที่ 15 ของการเก็บจะมีปริมาณไวรัสที่น้อยลงกว่าในอายุการเก็บที่ 3 และ 9 เดือน แต่ยังคงเพียงพอต่อการใช้เป็นเชื้อพิษทับสำหรับการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกร

จากผลการทดลอง พบว่าการพัฒนาวิธีการเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน ด้วยเซลล์ SK6 สามารถลดการใช้สัตว์ทดลองโดยใช้วิธีอื่นเพื่อทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง (Replacement) และลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในขั้นตอนการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ (Reduction) ตามหลักสากล 3Rs และเพื่อให้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวน passage สูงสุดที่ยังคงความรุนแรงในการเป็นเชื้อพิษทับได้ รวมไปถึงการศึกษาความแตกต่างของการใช้ไวรัสที่เตรียมจากสัตว์และจากเซลล์เพาะเลี้ยงในกระบวนการฉีดพิษทับ เพื่อยืนยันและปรับปรุงกระบวนการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรต่อไป

สรุป

การพัฒนาวิธีการเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 พบว่า ไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน สามารถเตรียมไวรัสได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 ทดแทนการเตรียมไวรัสจากสุกรทดลอง และเป็นการลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองสอดคล้องตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการสากล 3Rs โดยไวรัสที่ได้มีความรุนแรงตามมาตรฐานสำหรับทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร คือไม่น้อยกว่า 10^5 PID_{50}/มิลลิลิตร และเมื่อเก็บรักษาไวรัสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 ปี ไวรัสยังคงมีความรุนแรงเพียงพอต่อการใช้ในงานทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์ 2535 แนวทางการวินิจฉัย รักษา และการควบคุม โรคอหิวาต์สุกร หน้า 20-25

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 14 ก หน้า 22-40.

วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากร สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโภคิน และฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2544 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ไลน์ สัตวแพทยสาร ปีที่ 52 เล่มที่ 3 หน้า 21-30

ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2018 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สัตว์ทดลอง) http://www.culac.chula.ac.th/news/154572690768 30 ตุลาคม 2562

สุพล เลื่องยศลือชากุล 2543 โรคติดเชื้อของสุกร คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม ISBN 974-333-383-5 หน้า 1-17

American Association of Swine Practitioners and National Pork Board. 2008. On-farm euthanasia of swine: Recommendations for the producer. https://www.aasv.org/aasv/documents/SwineEuthanasia.pdf [Accessed 30 October 2019].

ASEAN. 1998. ASEAN standards requirement for swine fever vaccine (cell culture origins), live. In ASEAN standard for animal vaccines. Livestock publication series. No.2A. 2nd edition. P.60-61.

Hulst, M. M., Van Gennip, H. P. G. and Moormann, R. J. M. 2000. Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein E^{rns}. J. Virol. 74(20): 9553–9561.

Kasza, L., Shadduck, J. A., and Christofines, G. J. 1972. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of swine kidney cell line SK-6. Res. Vet. Sci. 13: 46-51

OIE Terrestrial Manual 2014 Chapter 2.8.3 Classical Swine Fever (Hog Cholera) (Infection with classical swine fever virus) p. 1-26.

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

Sakuda, Y. and Fukusho, A .1996. Establishment and characterization of a porcine kidney cell line, FS-L3, which forms unique multicellular domes in serum-free culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 34: 53-57.

Sasahara, J.and Kumagai,T.1966. Development of tissue culture live hog cholera vaccine. Jpn. Agr. Res.Q. (Tokyo) 1, pp.24-26.

Terpstra C, Woortmeyer R, Barteling SJ.1990. Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. 1990 Feb; 97(2): 77-9.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 หลังเพาะเชื้อวันที่ 1-16 โดย ตรวจในเซลล์เพาะเลี้ยง

วันที่เก็บ	ปริมาณไวรัส ($TCID_{50}$/มิลลิลิตร)
1	$10^{5.01}$
2	$10^{5.01}$
3	$10^{3.73}$
4	$10^{3.8}$
5	$10^{3.8}$
6	$10^{4.7}$
7	$10^{4.7}$
8	$10^{4.7}$
9	$10^{5.05}$
10	$10^{6.08}$
11	$10^{6.08}$
12	$10^{5.86}$
13	$10^{4.3}$
14	$10^{3.73}$
15	น้อยกว่า10^{2}
16	อ่านค่าไม่ได้

*คำนวณด้วยวิธี Reed and Muench

ตารางที่ 2 ความรุนแรงของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จากการทดสอบในสุกรทดลอง ในเดือนที่ 0, 3, 9 และ 15 หลังเก็บไวรัส

ความเจือจาง (Dilution)	จำนวนสุกร (ตาย/รอด)			
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 3	เดือนที่ 9	เดือนที่ 15
10^{-2}	4/0	4/0	4/0	4/0
10^{-3}	4/0	4/0	4/0	4/0
10^{-4}	4/0	4/0	4/0	4/0
10^{-5}	3/1	3/1	3/1	3/1
10^{-6}	2/2	2/2	2/2	1/3
10^{-7}	1/3	1/3	1/3	0/4
ปริมาณไวรัส (PID_{50}/มิลลิลิตร)	10^{6}	10^{6}	10^{6}	$10^{5.54}$

* คำนวณด้วยวิธี Reed and Muench

** เดือนที่ 0, 3, 9 และ 15 ใช้สุกรชุดควบคุม จำนวน 1 ตัว/เดือน รวมทั้งสิ้น 4 ตัว

The preparation of virulent classical swine fever virus from SK6 cells culture

Kungwan Jungtheerapanich[1] Ditee Prasertsuwan[1]

Abstract

Study on the preparation of Bang khen virulent swine fever virus using for vaccine potency test by inoculating in SK6 cells was conducted. The virus was harvested daily for 16 days to determine infectious titer in cultured cell and the virulent in an experimental pig. It was found that the harvested virus at day 10 obtained the maximum titer in cell culture equal to $10^{6.08}$ $TCID_{50}$/ml and 10^{6} PID_{50}/ml in an experimental pig. After keeping at -80^{o}C for 3, 9 and 15 months, the titer was 10^{6}, 10^{6} and $10^{5.54}$ PID_{50}/ml, respectively. Therefore, the virulent swine fever virus prepared from SK6 cells in this study, titer not less than $10^{5.0}$ PID_{50}/ml and shelf-life one year at least, could be use for vaccine potency test, which is an additional method for virus preparation from pigs and is following animal welfare and the three Rs principle.

Keywords: Virulent classical swine fever virus, SK6 cells culture, Virus content, Potency test

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