รายงานการแยกเชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea Virus ใน Vero Cell Cultures

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

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อ Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ใน Vero cell cultures โดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองหยอดเชื้อ PEDV ซึ่งระบาดที่จังหวัดตรัง เชื้อ PEDV ที่แยกได้ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์มีลักษณะ Cell-fusion และ syncytium formation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบขนาด 10 μg/ml ตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV โดยวิธี direct และ indirect immunofluorescence พบการเรืองแสงในส่วน cytoplasm ของกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส นำ infected cells ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน พบอนุภาคไวรัสในกลุ่ม coronaviridae รูปร่างกลมหรือ pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วย envelope ขนาดเฉลี่ย 70-100 nm จากการทำ cross neutralization test พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถถูก neutralize ได้ด้วย pig anti-PEDV serum สายเชื้อจากเบลเยี่ยม จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้พบว่า 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) ไม่สามารถยังยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และ Lipid solvents จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ : Porcine epidemic diarrhea virus, Vero cell cultures, trypsin, syncytium formation

---

[1] ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ สำนักงานปศุสัตว์ เขต 8 อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110
[2] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพมหานคร

คำนำ

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) และ Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในสุกร เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม Coronaviridae เนื่องจากมีรูปร่างคล้ายกันแต่มี antigenicity ต่างกัน (Pensaert and Debouck, 1978; Chasey and Cartwright, 1978) การแยกเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจากกัน ต้องอาศัยการย้อมด้วย แอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น ไม่สามารถบอกได้โดยดูจากอาการทางคลีนิค หรือจากจุลพยาธิวิทยา หรือโดยการดูรูปร่างของไวรัสจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (DeBouck and Pensaert, 1980) โรคนี้มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษและเบลเยี่ยมในระหว่างปี ค.ศ. 1976-1978 (Wood, 1977 ; Chasey and Cartwright, 1987 : Pensaert and DeBouck, 1978) ต่อมามีรายงานพบโรคนี้ในหลายประเทศในทวีปยุโรป รวม ทั้งประเทศจีนและญี่ปุ่นซึ่งยืนยันจากการตรวจแอนติบอดี โดยวิธี ELISA-blocking test และการแยกเชื้อ PEDV (Takahashi et al., 1983; Pensaert, 1992) ในประเทศไทย สนองและคณะ (2538) รายงานการเกิดโรค PED ที่จังหวัดตรัง ซึ่งยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect immunofluoescence ตรวจพบเชื้อ coronavirus 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, cell fusion และ syncytia ต่อมา Kusanagi et al. (1992) รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83 P-5 ใน Vero cells และกล่าวว่าเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 22 ครั้ง สามารถเติบโตและทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ใน MA-104 (rhesus macaque fetal kidney cells), CPK (cloned porcine kidney cells) และ ESK (embryonic swine kidney cells) โดยมี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

รายงานนี้กล่าวถึงการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells และคุณสมบัติบางประการของเชื้อไวรัสที่แยกได้ ซึ่งเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นแอนติเจน เพื่อทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ PED 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®) มี tryptose phosphate broth (TPB, Difco®), 0.3%, L-glutamine, 0.03%, fetal calf serum 5%, $NaHCO_3$ 0.7 mg/ml, เพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิต และ 100 μg/ml ตามลำดับ เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 5 ซม. ที่มี coverglass ขนาด 18 x 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®) ความเข้มข้น 10 μg/ml

ตัวอย่างเชื้อไวรัส :

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

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

Antisera และ conjugated immunoglobulin :

ที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิดคือ

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

2. ฟลูออเรสเซสต์แอนติบอดีคอนจูเกตต่อเชื้อ PEDV (FITC-conjugated PEDV antiserum) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยวิธี direct immunofluorescence (ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. M. Pensaert, Ghent, Belgium)

3. Rabbit anti-pig IgG FITC (Sigma®) เพื่อใช้ทดสอบโดยวิธี indirect immunofluorescence

การแยกเชื้อไวรัสและ 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 อบที่อุณหภูมิ 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 หลายครั้งและตรวจการเกิด CPE ทุกวัน เซลล์กลุ่มควบคุมจำนวน 2 plates ทำเช่นเดียวกันแต่ inoculate ด้วย TM แทนตัวอย่างเชื้อไวรัส

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

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

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ 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 ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัส เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ PEDV passage ที่ 21 และเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เกิด CPE ประมาณ 80% ล้างด้วย phosphate buffer pH 7.4 ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการ dehydration ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อค 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-fold dilution 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®) ปริมาณ 0.1 ml/หลุม dilution ละ 4 หลุม ก่อน inoculate ล้าง Vero cells ด้วย TM 2 ครั้ง อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ปริมาณ 0.5 ml/หลุม ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน นำมาคำนวณค่า $TCID_{50}$ โดยวิธีของ Karber (1931)

การทำ cross neutralization test

อุ่นซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที ทำการเจือจางซีรั่มเป็น two-fold dilution ตั้งแต่ระดับ 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 ส่วนผสมละ 2 wells หลังอบ เติม TM 0.5 ml ต่อหลุม อบที่อุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจการเกิด CPE นาน 7 วัน อ่านผล neutralizing antibody titer โดยวัดจากซีรั่มเจือจางสูงสุดที่ยับยั้งการเกิด CPE โดยสมบูรณ์

การทดสอบชนิดของ Nucleic acid

ทำการทดสอบชนิดของ nucleic acid โดยเติม 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR, Sigma®) ปริมาณ 50 μg/ml หรือ 200 μg/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 หลัง จากอบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เติม TM ที่ไม่มี IUDR, หรือ มี IUDR 50 μg/ml และ 200 μg/ml ขวดละ 5 ml อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ 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 ลงไป เขย่าอย่างแรงให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ปั่นที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำ culture fluid มา titrate คำนวณค่า infectivity titers

ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อไวรัสและทำ serial propagation ของเชื้อ PEDV ใน Vero cells

จากการตรวจพยาธิสภาพของ Vero cells ที่ inoculate ด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรทดลองแยกเชื้อ PEDV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบพบว่าในระยะแรกสังเกตการเกิด CPE ได้ยากและเซลล์กลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาต่อ trypsin โดยเซลล์จะหดตัว ในวันที่ 5 หลังหยอดเชื้อตรวจพบ CPE เป็นแบบ syncytium formation โดยผนังเซลล์จะหายไป เกิด cell fusion โดย syncytial cells ประกอบด้วย 2-3 nuclei ต่อมา syncytial cells จะหดตัวและหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ Vero cells 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 (รูปที่ 1) การตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะสังเกตง่ายเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet ในระยะแรกของการเกิด CPE ผนังเซลล์จะหายไปเกิด cell-fusion ตรวจพบ nuclei สะสมอยู่ตรงกลางของ polykarions ที่มีลักษณะกลม ต่อมา nuclei จะเคลื่อนไปอยู่ตรงขอบของ syncytia ทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ ตรงกลางของ syncytia และ muclei จะฝ่อ (pyknotic) หลังจากนั้น syncytia จะลอกจากผิวแก้วหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 2)

ผลการตรวจเชื้อ PEDV โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

จากการนำ coverglass ไปตรวจหาเชื้อ PEDV ทั้งวิธี direct และ indirect immunofluorescence พบว่า Vero cells ที่ inoculate ด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กสุกรในการแยกเชื้อครั้งแรกและนำมาตรวจในวันที่ 5 จะตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytial cells ที่ประกอบด้วย 2-3 nuclei ส่วนเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells passage ที่ 15 เมื่อนำ coverglass มาตรวจจะตรวจพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ syncytial cells ที่มีขนาดใหญ่ (รูปที่ 3) ภายใน 20 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อ ส่วนในเซลล์กลุ่มควบคุมตรวจไม่พบการเรืองแสงของเซลล์

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่านตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสอยู่ใน cytoplasmic vacuoles ของเซลล์ที่เกิดการเสื่อม เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ coronaviridae รูปร่างกลม บางอนุภาครูปร่าง pleomorphic มี core อยู่ตรงกลางลักษณะเป็น electron dense หรือ opaque ล้อมรอบด้วย envelope มีขนาดประมาณ 70-100 nm และตรวจพบกลุ่มอนุภาคของไวรัสติดบนผิวนอกของเซลล์ด้วย (รูปที่ 4)

ผลของ PEDV infectivity และการทำ cross neutralization test

จากการนำ culture fluid ของเชื้อ PEDV ใน passage ที่ 21 มา titrate หา infectivity titer ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อพบว่าเชื้อ PEDV มี virus titer เท่ากับ $10^{5.2}$ $TCID_{50}$/ml เมื่อนำ PEDV มาทำ cross neutralization test กับซีรั่มสุกรที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PEDV พบว่าเชื้อ PEDV ที่แยกได้ neutralize ซีรั่มสุกรที่ระดับเจือจางสูงสุดเท่ากับ 256

ผลการทดสอบชนิดของ nuclei acid และความไวต่อ lipid solvent

จากตารางที่ 1 จะพบว่า IUDR ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ PEDV ใน Vero cells ที่มี trypsin เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน diethyl ether และ chloroform จะทำลายเชื้อ PEDV อย่างสมบูรณ์

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

Virus	Infectivity titer[1]			Titer difference	
	no IUDR (a)	IUDR 50 μg/ml (b)	IUDR 200 μg/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

วิจารณ์

จากการศึกษาการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยใช้ตัวอย่างลำไส้เล็กลูกสุกรที่หยอดเชื้อไวรัสที่ระบาดในท้องที่จังหวัดตรัง (สนองและคณะ, 2538) สามารถแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells โดยพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ PEDV มีลักษณะ cell-fusion และเกิด syncytium formation ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Hofmann and Wyler (1988) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV 2 สายเชื้อที่ระบาดในยุโรป และ Kusanagi et al. (1992) ที่รายงานการแยกเชื้อ PEDV สายเชื้อ 83P-5 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้นี้ต้องการ trypsin ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแยกเชื้อไวรัสหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในสุกรและโคโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในตัวอย่าง (inoculum) จะมีผลต่อการเพิ่มจำนวน (replication) ของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และทำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพ (CPE) ซึ่งจะสังเกตได้ในการแยกเชื้อ Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ใน CPK cells และเชื้อ Porcine rotavirus ใน MA-104 cells trypsin ที่เติมใน inoculum และอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเพิ่มขนาดของ plaque และมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (Komaniwa et al., 1986, Fukusho et al., 1981; Honda et al., 1990) ในการแยกเชื้อ bovine coronavirus ใน bovine fetal thyroid cells (BFTy cells) trypsin ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเกิด plaque และ cell-fusion (Storz et al., 1981) ส่วนการแยกเชื้อ PEDV ใน Vero cells จำเป็นต้องเติม trypsin ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการเกิด cell-fusion (Hofmann and Wyler, 1988)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้พบว่า IUDR ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ether และ chloroform จะทำลายเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์ ดังนั้น จึงยืนยันได้ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้เป็น enveloped RNA virus (Siddell et al., 1983; Hofmann and Wyler, 1989) จากการพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี cross neutralization test พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ neutralize pig anti-PEDV serum สายเชื้อที่พบในเบลเยี่ยม จึงแสดงว่าเชื้อนี้มี antigenic relationship กับสายเชื้อที่แยกได้ในยุโรป จากการทำอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์เทสต์ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของ syncytial cells เหมือนกับรายงานของ Hofmann and Wyler (1988) และ Kusanagi et al., (1992)

จากการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เชื้อไวรัสที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ coronaviridae และมีขนาด 70-100 nm (Doane and Anderson, 1987; Palmer

and Martin, 1988) แต่ตรวจไม่พบ projection ซึ่งอาจเนื่องจาก projection มักหลุดออกจากอนุภาคไวรัสได้ง่ายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันการเกิดโรค Porcine epidemic diarrhea ในประเทศไทยและเชื้อ PEDV ที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาเตรียมเป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจโรค PED ในสุกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ Prof. Dr. M.B. Paensaert, University of Ghent, Belgium ที่ให้ความอนุเคราะห์ hyperimmune serum against PEDV และ FITC-conjugated PEDV antiserum และ น.สพ.นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ที่สนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

สนอง ศรีนันทพันธ์, ลัดดา ตรงวงศา, ช้องมาศ อันตรเสน, วาสนา แสงสุวรรณ์ และไพรสน 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 diarrhaea. 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 physiochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). Vet. Microbiol. 20 : 131-132.

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 their application. 2nd edition. 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. 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. 7th edition, 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. Immunol. 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.

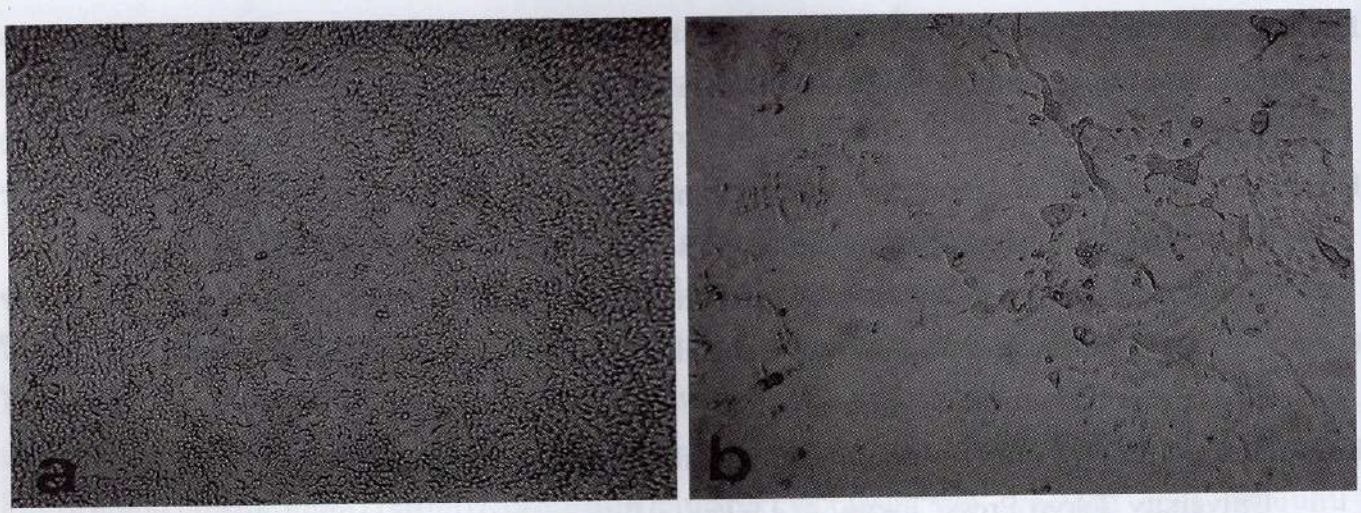


Figure 1 Cell fusion and syncytium formation in PEDV-infected Vero cells Uninfected culture (a) and infected culture (b) X40

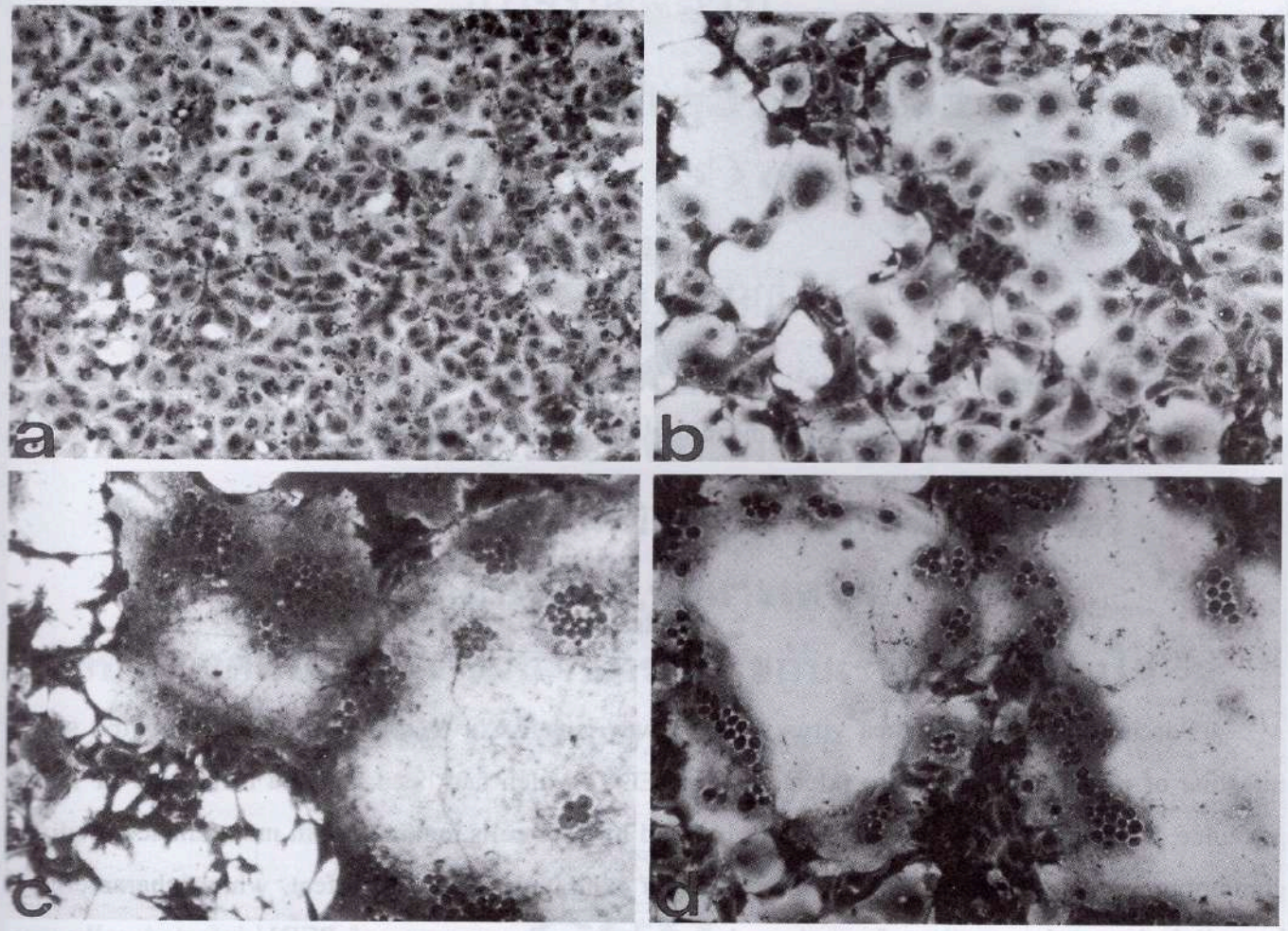


Figure 2 Cytopathic changes and cell fusion in PEDV-infected Vero cells. Uninfected culture (a), early stage of cytopathic change, single cell lost its individual demarcation (b), numerous nuclei are accumulated in the center of polycarions (c) and late stage of cytopathic change, pyknotic nuclei are accumulated at the periphery of polycarions (d). Crystal violet staining. X100



Figure 3 Cytoplasmic immunofluorescence of syncytium in Vero cells inoculated with cell culture-adapted PEDV X100

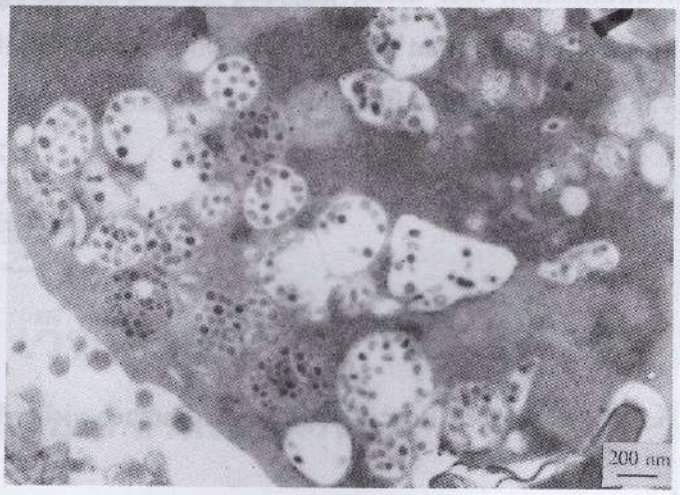


Figure 4 Electron micrograph of typical coronavirus particles obtained from PEDV-infected Vero cells (passage 21 of PEDV in Vero cells) X20K

Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Vero Cell Cultures

Chongmas Antarasena[1] Ladda Trongwongsa[2] Prontip Jearasuk[1]
Praison Prommuang[1] Somjit Rujikwan[2]

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was isolated in Vero cell cultures from the small intestine of piglet experimentally infected with PEDV, which had been isolated from pigs in Trang province, Thailand. PEDV was succesfully isolated in Vero cells maintained in maintenance medium containing trypsin 10 μg/ml. PEDV-infected cells exhibited cytopathic effect, which characterized by cell-fusion and syncytium formation. A cytoplasmic fluorescence of PEDV-infected cells was observed by direct and indirect immunofluorescent test. By trasmission electron microscopic study, typical coronavirus with enveloped round or pleomorphic morphology and diameter of 70-100 nm were observed in cytoplasmic vacuoles of degenerated cells. The isolate was neutralized by cross-neutralization test using pig anti-PEDV serum against Belgian strain. Physicochemical properties studies indicated that virus replication was not inhibited by 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR) and the virus was completely inactivated by lipid sovents.

Key words : Porcine epidemic diarrhea virus, Vero cell cultures, trypsin, syncytium formation

[1] Southern Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Center, Tung-song, Nakhon-si-thammarat 80110
[2] National Institute of Animal Health, Kaset-Klang, Bangkhen, Bangkok 10900