Research Articles

Development Diploid Cells from Gill Tissue of Koi *(Cyprinus carpio)* and Using to Isolate Koi Herpesvirus

Nam-Aoy Taowan[1] Natthaphat Ketchim[1] Somchit Chaeiwattanarungruaegprisan[1] Parut Suksai[1] Preawporn Thaijongruk[2] Kridsada Chaichoun[1,3 *]

[1]The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals,
[2]Departments of Clinical Science and Public Health, [3]Department of Preclinical and Applied Animal Science,
Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakorn Pathom, Thailand.
[*]Corresponding author, E-mail address: kridsada.cha@mahidol.ac.th

Abstract

Koi herpesvirus (KHV) is a cause of morbidity and mortality in fancy carp (koi; *Cyprinus carpio koi*) and common carp *(Cyprinus carpio)*. The development of diploid cells for viral isolation is important for laboratory diagnosis and research. In this study, KHV was cultured consecutively in koi gill (KG) cells of passage 29 - 30 and 33 - 34. The fluid from each passage was tested for KHV by polymerase chain reaction technique and positive result was found in both passages. Thus, KG cells can provide a positive result to KHV isolation at 25°C and this can be confirmed by PCR.

Keywords: Koi herpesvirus, virus isolation, Koi gill cells

การพัฒนา Diploid cells จากเซลล์เหงือกของปลาคาร์พ เพื่อใช้ในการแยกเชื้อไวรัสคอยเฮอร์ปีส์

น้ำอ้อย เฉาวัลย์[1] นัทธภัทร เกตุฉิม[1] สมจิตร ใช้วัฒนรุ่งเรืองไพศาล[1] ปรุศก์ สุกใส[1]
แพรวพร ไทยจงรักษ์[2] กฤษฎา ใจชื้น[1,3*]

[1]ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ
[2]ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข [3]ภาควิชาปรีคลีนิคและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
[*]ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kridsada.cha@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสคอยเฮอร์ปีส์ (Koi herpesvirus; KHV) เป็นสาเหตุสำคัญของการป่วยและตายของปลาคาร์พ (fancy carp หรือ koi; *Cyprinus carpio koi*) และปลาไน (common carp; *Cyprinus carpio*) การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (cell-line) เพื่อใช้สำหรับแยกเชื้อจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและการศึกษาวิจัย งานวิจัยนี้ได้พัฒนา diploid cell-line จากเหงือกของปลาคาร์พ (Koi gill or KG cells) ขึ้นมาและทำการทดสอบใช้ KG cells ที่ passage 29 และ 33 สำหรับการแยกเชื้อไวรัส KHV และเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องจาก KG cells (passage 29-30) และจาก KG cells (passage 33-34) น้ำเลี้ยงเซลล์ของการเลี้ยงไวรัสในแต่ละรอบในเซลล์ ได้นำไปตรวจหาเชื้อเพื่อยืนยัน โดยวิธี polymerase chain reaction ผลการตรวจพบว่าการใช้ KG cells สามารถใช้สำหรับการแยกเชื้อ KHV ได้ โดยตรวจพบเชื้อ KHV ได้จากทั้ง 2 รอบของการแยกเชื้อ (passage) ต่อเนื่องกันใน KG cells ดังนั้น KG cells จึงเป็นเซลล์ที่เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยการแยกเชื้อและเพาะเลี้ยงไวรัส (viral isolation) ได้

คำสำคัญ : การแยกเชื้อไวรัสคอยเฮอร์ปีส์

บทนำ

เชื้อไวรัสคอยเฮอร์ปีส์ (Koi herpesvirus, KHV) เป็นเชื้อที่พบการติดเชื้อในปลาไน (common carp, *Cyprinus carpio carpio*) และปลาคาร์พสวยงาม (Koi or fancy carp, *Cyprinus carpio cormmunis*) ที่เลี้ยงไว้เพื่อการบริโภคและเพื่อความสวยงาม (Hedrick *et al.*, 1990) เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Herpesviridae* (Ronen *et al.*, 2003) มีเปลือกนอก (envelope) มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ (Waltzek *et al.*, 2005) เชื้อ KHV นับเป็นโรคที่มักเกิดช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิน้ำต่ำ ทำให้ปลาไนและปลาคาร์พที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก พบการระบาดรุนแรงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 ที่ประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกา จากนั้นก็พบการระบาดเกิดขึ้นอีกหลายแห่งทั่วโลก ในการแพร่กระจายของไวรัสไปทั่วโลกนี้เป็นผลมาจากการส่งออกปลาคาร์พ ซึ่งพบได้แพร่กระจายต่อไปทั้งในประเทศแถบยุโรป อินโดนีเซีย แอฟริกาใต้ ไทย ไต้หวัน ญี่ปุ่น จีน และมาเลเซีย (Pokorova *et al.*, 2007) อาการที่พบในปลาที่ป่วยจากการติดเชื้อ คือ ปลาว่ายน้ำผิดปกติ หายใจถี่ขึ้น อาจมีแผลตื้นๆบริเวณผิวหนัง (Pokorova *et al.*, 2005) ช่องเหงือกบวมและเกิดเนื้อตายบริเวณเหงือก (necrotic gill filaments) มีการผลิตเมือกมากเกินกว่าปกติหรือสีของเหงือกซีดลง เกิดเป็นรอยนูน (patches) บนผิวหนังและพบอาการตาโปน (exophthalmoses) และมีม้ามโต (Hedrick *et al.*, 2005)

จากการเกิดโรคระบาดของเชื้อไวรัสคอยเฮอร์ปีส์ในปลาไนและปลาคาร์พ ในประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกานั้น ได้มีการพัฒนา cell-line ขึ้นมาจากครีบปลา (Koi fin cell-line, KF-1) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ ซึ่งพบว่าไวรัสที่แยกเชื้อได้มีลักษณะคล้ายเชื้อไวรัสเริม (herpes simplex virus) ในมนุษย์ จึงกำหนดชื่อเป็น ไวรัสคอยเฮอร์ปีส์ (KHV) ซึ่งในประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกาประสบความสำเร็จสามารถพัฒนาวิธีการแยกเชื้อได้โดยใช้ Koi fin cell-line หรือ KF-1 (Hedrick *et al.*, 2005)

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรค KHV ทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีเพาะแยกเชื้อ (virus isolation) โดยใช้ cell-line ที่มีความไวต่อเชื้อ เช่น Koi fin cell-line เซลล์จะสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 15-25°C (Hartman *et al.*, 2004; Gilad O. *et al.*, 2003) เซลล์อื่นๆ ที่ได้รับการพัฒนาต่อมาสำหรับการแยกเชื้อ KHV ได้แก่ FHM cell-line (Oh *et al.*, 2001) Common carp brain (CCB) cell-line, Common carp gill (CCG) cell-line (Neukirch *et al.*, 2001) ซึ่งอุณหภูมิที่ไวรัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีในเซลล์ที่กล่าวมาจะอยู่ในช่วง 17-28°C (St-Hilaire *et al.*, 2005)การแยกเชื้อ KHV สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อของเหงือก ไต ตับและม้ามของปลาที่ติดเชื้อใกล้ตายหรือเพิ่งตายใหม่ๆ แต่ไม่เหมาะสำหรับการแยกเชื้อจากชิ้นเนื้อของปลาที่แช่แข็งไว้ และวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจหาเชื้อในปลาที่เป็นพาหะระยะ latent infection (Crane *et al.* (2004) 2) วิธีปฏิกริยาลูกโซ่ของ เอนไซม์โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นวิธีการตรวจที่ถูกพัฒนาขึ้นทำให้สามารถตรวจหา ดีเอ็นเอ ของเชื้อ KHV ในปลาที่ติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง (Gray *et al.*, 2002) 3) วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ (anti-KHV carp antibody) เพื่อใช้ในการคัดกรองการติดเชื้อของปลา (Ronen *et al.*, 2003)

ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ทำการเตรียม primary cells จากเหงือกของปลาคาร์พ (Koi) และเลี้ยงต่อเนื่องเพื่อพัฒนาเป็น diploid cell-line ขึ้นมาเรียกว่า Koi gill (KG) cells เนื่องจากในการติดเชื้อ KHV นั้น เหงือกเป็นบริเวณที่พบการติดเชื้อที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดและมักจะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ KHV ทั้งวิธีการเพาะแยกเชื้อและวิธีตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอเรส จากนั้นจึงนำ KG cells ที่เตรียมได้ในการศึกษานี้มาทดสอบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ KHV ในเซลล์ที่เตรียมได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกปลาคาร์พ (Koi gill, KG cells)

การเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือกปลาคาร์พ คัดเลือกปลา fancy crap *(Cyprinus carpio cormmunis)* อายุประมาณ 1 ปี ที่มีสุขภาพดี น้ำหนักประมาณ 200 กรัม ทำการสลบปลาด้วยสารละลายกานพลูในเอทานอลความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและเจาะเลือดปลาออกทันที (สุรชัย พิกุลแก้ว และคณะ, 2550) ตัดส่วนเหงือกของปลาออกมาแช่และล้างจำนวน 3 ครั้งด้วย 1x Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin เข้มข้น 8,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมี Penicillin G เข้มข้น 40,000 unit/ml ผสมอยู่ จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Media (MEM, Gibco®, USA))และตัดย่อยเหงือกปลาคาร์พ ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ในขั้นตอนนี้ทำภายในตู้ปลอด

เชื้อแบบ Class II Biosafety cabinet เนื้อเยื่อส่วนหนึ่งนำไปตรวจหาเชื้อ KHV และ *Mycoplasma* sp. ด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันว่าปลาที่ใช้เตรียมเซลล์นั้นปลอดโรค นำเนื้อเยื่อไปย่อยต่อให้ได้เซลล์เดี่ยว ด้วย 0.25% Trypsin (Gibco®, USA) ใน MEM ปั่นเบาๆใน Erlenmeyer flask เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเพื่อล้างกำจัด trypsin ออกด้วย 1xPBS จำนวน 2 ครั้งโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลานาน 10 นาที นำเซลล์ที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 10% Fetal bovine serum (Gibco®, USA) ใน MEM ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25 cell culture flask, Nunc™, USA) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 20, 23, 25 และ 28°C ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

2. การทดสอบการเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง (continuous sub-cultivation)

นำเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) ที่เตรียมจากเหงือกปลาคาร์พ แผ่ขยายประมาณร้อยละ 90 บนพื้นที่ผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ (T-25 tissue culture flask, Nunc™, USA) แล้วนำไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นเพื่อแยกเซลล์และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous sub-cultivation) เป็นจำนวน 35 รอบ (passages) นำไปบ่ม 25°C ใน incubator ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 โดยนำเซลล์แต่ละรอบมาทำการ sub-passage ด้วยการย่อยให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.125% trypsin-EDTA ไว้นานประมาณ 3-5 นาที หลังจากนั้นเติม growth media ปริมาณ 5 ml เป่าขึ้นลงให้เป็น single cell suspension ใส่ลงใน หลอดสำหรับปั่นเซลล์ (centrifuge tube) ขนาด 15 ml แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แบ่ง cell suspension ให้มีจำนวนเซลล์เป็น $2x10^5$ cell/ml ใน growth media (10% FBS-MEM) ปริมาณ 5 ml แล้วเติมลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

3. การทดสอบแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) โดยใช้ KG cells

เตรียม KG cells เพาะเลี้ยงเซลล์ลง tissue culture plate แบบ 24 หลุม (24-well tissue culture plate, Nunc®, USA) เพื่อใช้แยกเชื้อไวรัส โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ดังวิธีการที่กล่าวข้างต้น และแบ่ง cell suspension ที่ได้ลง tissue culture plate แบบ 24 หลุม จากนั้นทำการนับเซลล์แล้วปรับให้ได้จำนวน $2x10^5$ cells/0.5ml/well นำเซลล์ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C ในตู้บ่มที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์ร้อยละ 3 จนเซลล์ใน plate เพิ่มจำนวนจนเกือบเต็มหลุมเลี้ยงเซลล์ จึงนำไปใช้เป็นเซลล์โฮสต์สำหรับการแยกเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส KHV ต่อไป การเตรียมตัวอย่างที่มีเชื้อสำหรับการทดสอบแยกเชื้อไวรัส ทำโดยใช้ตัวอย่างเหงือกปลาคาร์พที่ตรวจพบเชื้อ KHV ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจเชื้อ KHV โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งได้รับจากห้องปฏิบัติการของศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ โดยตัดย่อยชิ้นเนื้อเหงือกปลาด้วยกรรไกรให้มีขนาดเล็กลงและบดด้วยโกร่งแก้วแล้วเติม viral transport media (VTM) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมแบบเขย่า (vertex mixer) จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใสด้านบนมากรองด้วย Millipore® membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน นำส่วนที่ถูกกรอง (filtrate) ไปใช้แยกเชื้อ

4. การตรวจหาเชื้อไวรัส KHV โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่หยอดตัวอย่างติดเชื้อ KHV ลงไปสามารถตรวจหาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์โดยการตรวจดูการเกิด cytopathic effect (CPE) ของ KG cells โดยการส่องตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope ที่กำลังขยาย 40-100 เท่า จากนั้นพิสูจน์ยืนยันเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในเซลล์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAGEN DNA extraction kit (QIAGEN®, Germany)

ในการตรวจด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction ใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ thymidine kinase (Tk) gene ของเชื้อไวรัส โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ KHV-Tk gene จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi. nlm.nih.gov.) จำนวน 22 sequences (GenBank accession number: DQ657948, HM347096-HM347113, JN180630, JQ247182, JQ247183 และ NC_009127) โดยคัดเลือกบริเวณลำดับเบสที่มีความคงตัว (conserved sequence) และคัดเลือก forward primer คือ KHV-TK-F189

(5'-GGGTTACCTGTACGAG-3') และ reward primer คือ KHV-TK-R598 (5'- CACCCAGTAGATTATGC-3') ซึ่งจะได้ PCR product มีขนาดความยาว 409 คู่เบส (base-pairs) ซึ่ง PCR product ที่ได้ถูกนำไปหาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยวิธี Di-deoxy dye terminator เพื่อตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส

การเตรียมปฏิกิริยา PCR เตรียมปฏิกิริยาเป็น Master Mix สำหรับทำปฏิกิริยาในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เตรียมปฏิกริยาในรูปแบบ Master mix โดยให้ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาณ nuclease free water ปริมาณ 40.1 µl เติม 10X reaction buffer ปริมาณ 5 µl เติม 25 mM each dNTPs ปริมาณ 0.4 µl เติม 25 mM MgCl2 ปริมาณ 3 µl เติมไพร์เมอร์ KHV-TK-F189 และ KHV-TK-R598 (ความเข้มข้น 50 pmol) ปริมาณชนิดละ 0.25 µl และเติมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (New England Biolab™, USA) ปริมาณ 0.5 µl (5 unit) จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นตกเป็นเวลาสั้นๆ จากนั้นจึงเติมน้ำยา Master mix ที่เตรียมไว้แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองแบบ thin-wall tube ขนาด 0.2 ml นำไปเติมลงในหลอดทดลองปริมาณ 45 µl จากนั้นเติมดีเอ็นเอจากตัวอย่างส่งตรวจที่เตรียมได้ปริมาณ 5 µl ลงในหลอดที่ใส่น้ำยาไว้ ปิดฝาหลอดทดลองและนำไปใส่ลงในเครื่อง DNA thermal cycler (BioRad®, USA) การกำหนดค่าพารามิเตอร์และจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ ในขั้น First Denature 94°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นขั้น Denature ที่ 94°C นาน 45 วินาที Annealing 54°C เป็นเวลา 45 วินาที Extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นมีขั้นตอน Final Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที เมื่อทำปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำ PCR product ที่ได้จากข้างต้น ปริมาณ 5-10 µl มาแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (2.5% Agarose gel electrophoresis) โดยเทียบกับ 100 base-pair DNA Ladder (New England Biolab™, USA) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสี GelRed™ (Biotium, Inc., U.S.A) และส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

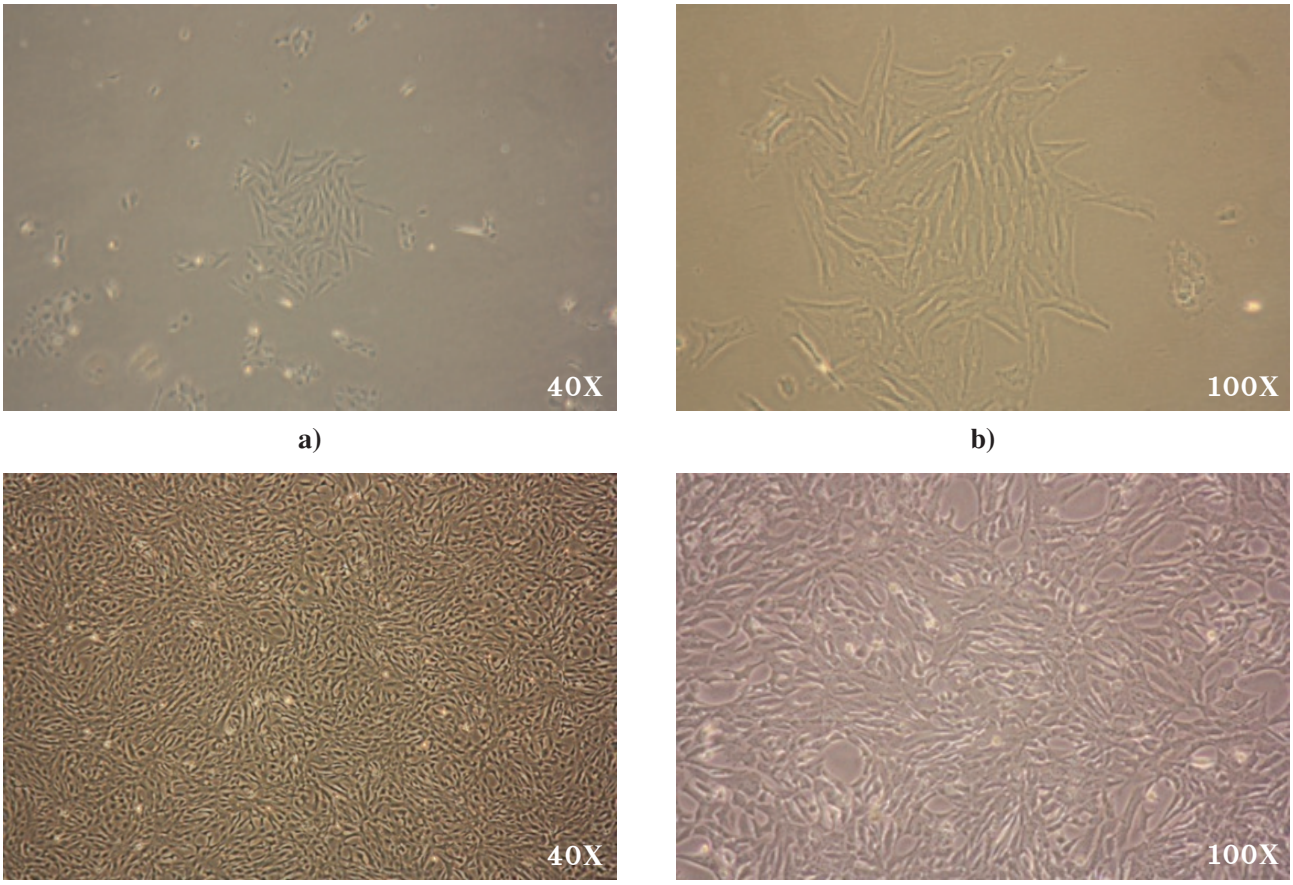
5. การตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma* sp. โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส

KG cells ปกติ (passage 1, 29 และ 33) นำมาทดสอบการปลอดเชื้อ (sterility) โดยการส่องตรวจเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (light microscope) และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์นำไปตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma* sp. โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อเชื้อใน Genus *Mycoplasma* โดยใช้ Myco-5'primer (5'-CGCCTGAGTAGTACGTWCGC-3'; W แทน เบส T ผสมกับเบส A) และ Myco-3'primer (5'-GCGGTGTGTACAARACCCGA -3'; R แทน เบส G ผสมกับ เบส A) ค่าพารามิเตอร์ของปฏิกิริยา PCR ทำตามการทดลองตามรายงานของ Freshney (2005) เมื่อทำปฏิกิริยา PCR เสร็จแล้ว นำดีเอ็นเอผลผลิต (amplicon) ไปแยกขนาดด้วยไฟฟ้ากระแสตรงใน 1.3% Agarose gel เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิต ขนาดความยาว 510 คู่เบส (bps)

ผลการทดลอง

1. การเตรียมและพัฒนา diploid cells จากเนื้อเยื่อเหงือกของปลาคาร์พ (Koi gill tissue)

การเตรียม diploid cells จากเหงือกของปลาคาร์พ ใช้ปลาคาร์พที่มีสุขภาพดีที่ผ่านการตรวจหาเชื้อ KHV ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงให้เป็น cell-line ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ได้ทดลองใช้อุณหภูมิสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 20, 23, 25 และ 28°C จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าอุณหภูมิที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ 25°C ในสภาวะที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 (3% CO_2) และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-85 ในช่วงแรก (passage 1-20) การเจริญเติบโตของ KG cells จะค่อนข้างช้า (duplication time ประมาณ 7 วัน) ซึ่งสามารถแบ่งแยกเซลล์ไปเลี้ยงใหม่ (sub-passage)โดยเฉลี่ย 2 อาทิตย์ต่อครั้ง แต่การเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ passage 20 เป็นต้น ไปเซลล์จะมีการเจริญเติบโตที่เร็วขึ้นจนถึง passage 36 (duplication time เท่ากับ 3 วัน) การ sub-passage ของเซลล์โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 1-2 ครั้งต่ออาทิตย์ ซึ่งจาก passage 36 เป็นต้นไปเซลล์จะเริ่มเติบโตช้าลง ลักษณะของ KG cells ที่เตรียมได้เป็น fibroblast cells รูปร่างเซลล์เรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle cell) เป็นเซลล์ที่ยึดเกาะกับพื้นผิวพลาสติกของขวดเลี้ยงเซลล์ (adhesive cell) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ KG cells ใน passage 0 และ passage 20 แสดงลักษณะของเซลล์เป็น fibroblast cells a) Primary KG cells; passage 0 ที่อายุ 16 วัน (กำลังขยาย 40 เท่า) b) Primary KG cells; passage 0 อายุ 16 วัน (กำลังขยาย 100 เท่า) c) KG cells; passage 20 (กำลังขยาย 40 เท่า) d) KG cells; passage 20 (กำลังขยาย 100 เท่า)

2. การทดสอบการเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง (continuous sub-cultivation) และการทดสอบความปลอดเชื้อ (sterility test)

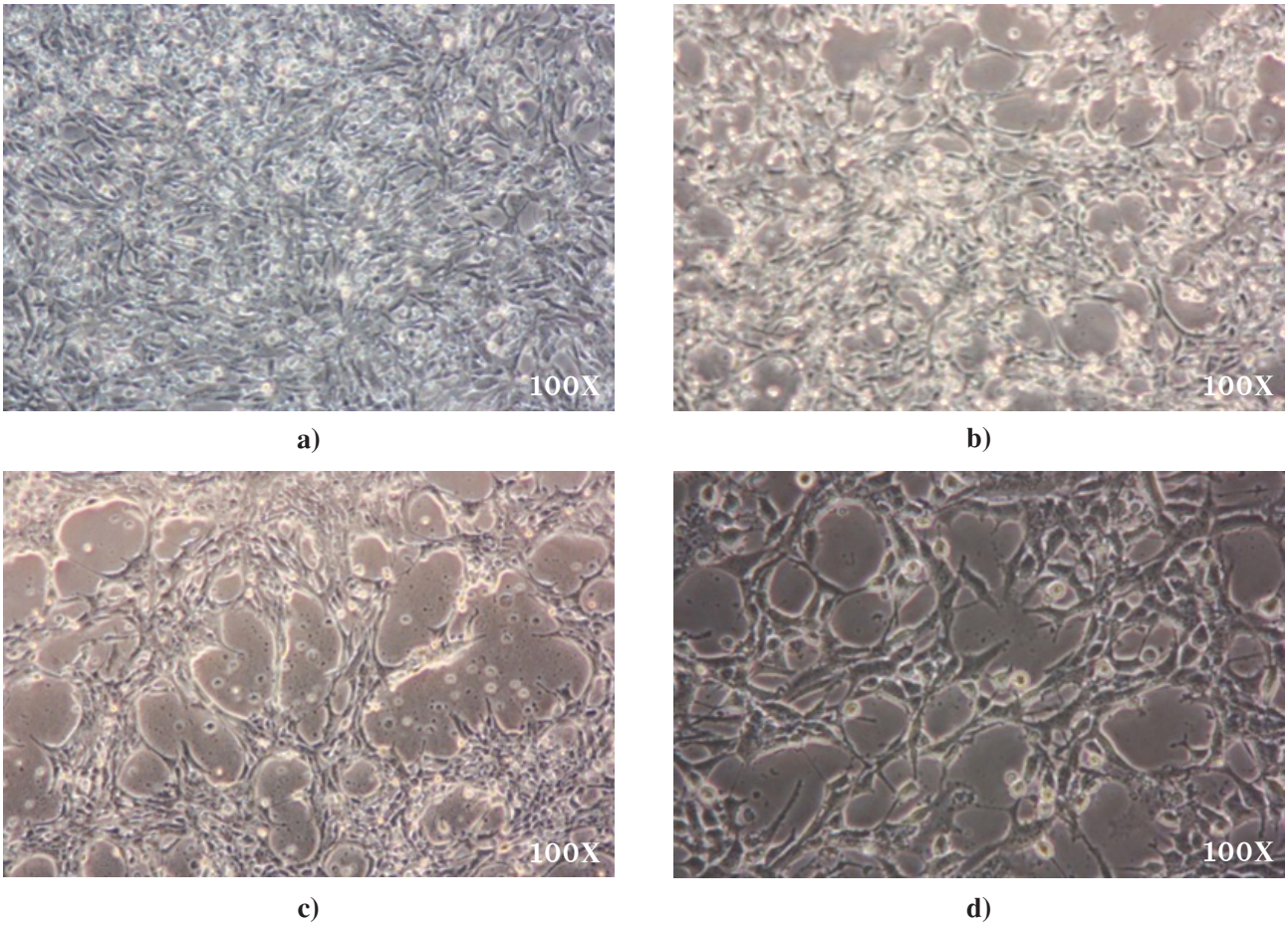
เมื่อได้ KG cells ที่เตรียมจาก primary cells ได้ทดสอบเลี้ยงต่อเนื่องจำนวน 36 passages พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงเกินกว่า 36 passages ยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และเมื่อทดสอบความปลอดเชื้อ พบว่า เมื่อเลี้ยงต่อเนื่องมา 36 passages ไม่พบการปนเปื้อนของทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา และตรวจไม่พบ เชื้อ *Mycoplasma* sp. โดยการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส

3. การแยกเชื้อ Koi herpesvirus และทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ Koi herpesvirus ใน KG cells ที่เตรียมได้

การทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมต่อหลุม (well) ของ tissue culture plate แบบ 24 หลุม ซึ่งมีพื้นที่ 1.9 ตารางเซนติเมตร ทำโดยใส่เซลล์และมีปริมาณ $2x10^5$ cells/well, $3x10^5$ cells/well และ $4x10^5$ cells/well เมื่อเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าหลุมที่ใส่เซลล์ปริมาณ $2x10^5$ cells/well เจริญเติบโตได้ประมาณร้อยละ 60 ของพื้นที่ในหลุม (60% confluence) หลุมที่ใส่เซลล์ปริมาณ $3x10^5$ cells/well เจริญเติบโตได้ประมาณร้อยละ 90 ของพื้นที่ในหลุม (90% confluence) และเซลล์ที่ $4x10^5$ cells/well แบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้จนเต็มพื้นที่ในหลุม (100% confluence) ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม คือ $3x10^5$ cells/well ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 1: 2 ในเวลา 24 ชั่วโมง

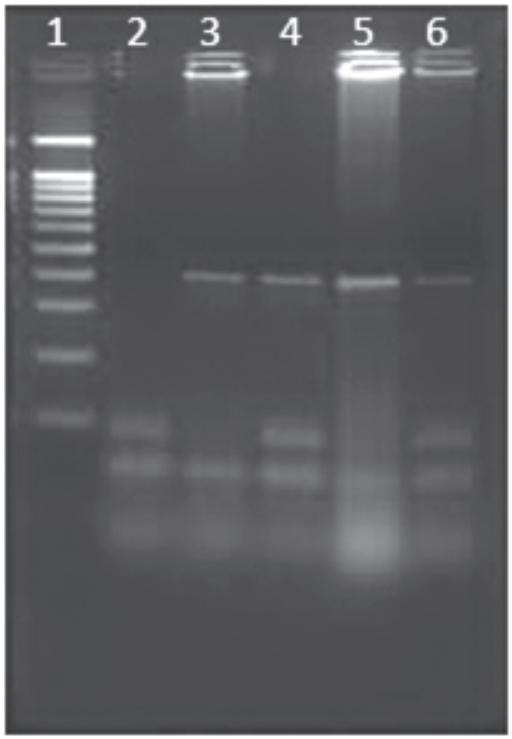
การทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ Koi herpesvirus ใน KG cells ทำโดยใช้เพลทเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในแต่ละหลุมใช้เซลล์จำนวน $3x10^5$ cells/well โดยใช้ KG cells ใน passage เริ่มต้นที่ 29 และ 33 จากนั้น sub-passage ของเซลล์แต่ละ passage ที่เริ่มต้นไปอีก 3 passages เมื่อลงตัวอย่างในเซลล์แล้วต้องตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และถ่ายภาพบันทึกไว้ทุกวัน

จากการสังเกตลักษณะของเซลล์ภายหลังจากนำตัวอย่างส่งตรวจมาแยกเชื้อในเซลล์ที่เตรียมไว้ เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect; CPE) ได้แก่ เซลล์เปลี่ยนรูปร่างจาก spindle เป็นรูปร่างกลมขึ้น พบการตายของเซลล์และมีการลอกหลุดของเซลล์ประมาณร้อยละ 50 ออกจากพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ KG cells และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสจากการแยกเชื้อไวรัส a) mock control cells ที่ 72 ชั่วโมง b) KG cells (passage 29) ที่ใช้แยกเชื้อไวรัส KHV ที่ 72 ชั่วโมง c) KG cells (passage 30) ที่ใช้แยกเชื้อไวรัส KHV ที่ 48 ชั่วโมง d) KG cells (passage 33) ที่ใช้แยกเชื้อไวรัส KHV ที่ 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสใน KG cells จบแต่ละ passage จะเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ส่งตรวจหาเชื้อโดยวิธีทาง PCR จากผลการตรวจทาง PCR พบว่าการใช้ KG cells สามารถให้ผลบวกต่อการแยกเชื้อ KHV ได้ โดยตรวจพบเชื้อ KHV ได้จากทั้ง 2 passages จาก KG cells ใน passage เริ่มต้นที่ passage 29 (passage 29-30) และ passage 33 (passage 33-34) ผลการตรวจโดยวิธี PCR แสดงในรูปที่ 3



Lane 1 100-base pairs DNA ladder (marker)
Lane 2 PCR product จาก negative mock control
Lane 3 PCR product ของการแยกเชื้อ KHV ใน KG cells (passage 29)
Lane 4 PCR product ของการแยกเชื้อ KHV ใน KG cells (passage 30)
Lane 5 PCR product ของการแยกเชื้อ KHV ใน KG cells (passage 31)
Lane 6 PCR product ของการแยกเชื้อ KHV ใน KG cells (passage 33)

รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อไวรัส KHV ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์เลส และแยกขนาด ดีเอ็นเอโดยใช้ 2.5% Agarose gel electrophoresis

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การศึกษานี้เป็นการเตรียม diploid cells จากเหงือกของปลาคาร์พโดยเรียกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมได้นี้ว่า Koi gill (KG) cells เพื่อนำมาใช้ในการแยกเชื้อ KHV จากตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเมื่อนำ KG cells ที่พัฒนามาใช้แยกเชื้อ และการตรวจยืนยันผลโดยวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อ KHV ในน้ำเลี้ยงเซลล์อย่างน้อย 2 passage ที่ทำต่อเนื่องกัน แสดงว่า KG cells เป็นเซลล์ที่ยอมให้เชื้อ KHV เพิ่มจำนวน (permissive cells) และมีความไว (sensitive) ต่อการติดเชื้อ KHV แต่ทั้งนี้ การประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อได้นอกจากมีเซลล์โฮสต์ ที่ดีแล้วยังต้องมีองค์ประกอบที่สำคัญอื่นๆ อีก เช่น ผู้เลี้ยงเซลล์ต้องมีความรู้และทักษะที่ดี มีอุปกรณ์ที่เหมาะสมในการควบคุมสภาวะการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดด่าง เป็นต้น จากการศึกษาในช่วงเวลาที่ผ่านมา พบว่าการแยกเชื้อ KHV โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงนั้นควรใช้เนื้อเยื่อเหงือก ไต และม้ามของปลาที่ติดเชื้อรุนแรงซึ่งกำลังจะตายหรือเพิ่งตายใหม่ๆ จะให้ผลที่ดีกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากใช้อวัยวะที่อยู่ภายในอย่างไตจะดีกว่าการใช้ส่วนเหงือก เนื่องจากเนื้อเยื่อเหงือกของปลาที่ติดเชื้อนั้นอาจกลายเป็นเนื้อตาย (necrotic tissue) และอาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ที่บริเวณเหงือกและในระหว่างการแยกเชื้ออาจมีการปนเปื้อนขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้จะมีการเติมยาปฏิชีวนะไปแล้วก็ตาม (Crane *et al.*, 2004)

ในการศึกษาวิจัยนี้มีข้อจำกัดอยู่ที่ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อ KHV เนื่องจากไม่สามารถหาตัวอย่างของปลาคาร์พที่ติดเชื้อที่กำลังใกล้ตายหรือเพิ่งตายใหม่ๆ ได้ ตัวอย่าง

ที่ใช้เป็นตัวอย่างจากเหงือกปลาที่ตรวจพบเชื้อ KHV โดยวิธีทาง PCR และถูกแช่แข็งไว้แล้วเป็นเวลานาน ผู้วิจัยได้ป้องกันการเกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียในตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างที่เตรียมได้มากรองผ่าน syringe filter ขนาดรูเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอนเพื่อกำจัดแบคทีเรียออก แต่การที่ตัวอย่างถูกเก็บแบบแช่แข็งไว้เป็นเวลานานอาจทำให้ปริมาณเชื้อไวรัสที่มีชีวิตมีปริมาณน้อย แต่อย่างไรก็ตาม KG cells ยังมีความไวพอที่ใช้สำหรับการแยกเชื้อ KHV ในเนื้อเยื่อที่เก็บแช่แข็งที่ -80°C เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ.สพ.ญ. วรรณา ศิริมานะพงษ์ และ สพ.ญ. กัญช์ เกล็ดมณี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำ และขอขอบคุณ น.สพ. วิมล จิระธนะวัฒน์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างเหงือกปลาคาร์พติดเชื้อ KHV แก่ผู้วิจัย โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และได้รับการสนับสนุนการใช้วัสดุและอุปกรณ์บางส่วน จากศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่าสัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

สุรชัย พิกุลแก้ว ทองกร มีแย้ม วรรณา ศิริมานะพงษ์ และ ศรุดา ติวะนันทกร (2550). การตรวจหาเชื้อเคเอชวีในปลาคาร์พ *(Cyprinus carpio koi)* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อไทมิดีนไคเนสยีนส์ (thymidine kinase gene). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 1(1) : 42-9.

Crane, M., Sano, M. and Komar, C. (2004) Infection with koi herpesvirus - disease card. Developed to support the NACA/FAO/OIE regional quarterly aquatic animal disease (QAAD) reporting system in the Asia-Pacific. NACA, Bangkok, Thailand. 11 pp.

Freshney, R.I. (2005) Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., USA. 580 pp.

Gilad, O., Yun, S., Adkison, M.A., Way, K., Willits, N.H., Bercovier, H. and Hedrick, R.P. (2003) Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol*. 84 (Pt 10): 2661-7.

Gray, W.L., Mullis, L., La Patra, S.E., Groff, J.M. and Goodwin, A. (2002) Detection of Koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis*. 25: 171-8.

Hartman, K.H., Yanong, R.P.E., Petty, B.D., Francis-Floyd, R. and Riggs, A.C. (2004) Koi Herpes Virus (KHV) Disease, Univ. FL, IFAS Exten. Fact Sheet VM-149.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., Mcdowell, T.S., Waltzek,T.B., Kelley, G.O. and Adkison, M.A. (2005) Initial isolation and characterization of herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bull. Fish. Res. Agen.* Supplement (2): 1-7.

Hedrick, R.P., Groff, J.M., Okihiro, M.S. and Mc Dowell, T.S. (1990) Herpesviruses detected in papillomatous skin growths of koi carp *(Cyprinus carpio)*. *J Wildl Dis*. 26(4): 578-81.

Neukirch, M. and Kunz, U. (2001) Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi (Cyprinus carpio) suffering gill necrosis and mortality. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 21: 125-35.

Pokorova, D., Piackova, V., Cizek, A., Reschova, S., Hulova, J., Vicenova, M., and Vesely, T. (2007) Tests for the presence of koi herpesvirus (KHV) in common carp *(Cyprinus carpio carpio)* and koi carp *(Cyprinus carpio koi)* in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina,* 52(12): 562-8.

Pokorova, D., Vesely, T., Piackova, V., Reschova, S. and Hulova, J. (2005) Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med. - Czech*. 50(4): 139-47.

Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. and Kotler, M. (2003). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*. 21(32):4677-84.

St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R.M., Martin, P. and Joiner, C. (2005) Reactivation of koi herpesvirus infections incommon carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Organ*. 9;67(1-2):15-23.

Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A.J., and Hedrick, R.P. (2005) Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J Gen Virol*. 86(Pt 6): 1659-67.