ว.วิทย. มข. 40(4) 1177-1183 (2555) KKU Sci. J. 40(4) 1177-1183 (2012)

รายงานการศึกษาเบื้องต้น: การใช้ Vero Cell ในการเพาะแยกเชื้อ Newcastle disease virus (NDV)

Preliminary Report: Using Vero Cell Line for Newcastle Disease Virus (NDV) Isolation

วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[1] อรวรรณ์ บุตรดี[1] ภัทรา มูลจิตร[1] และ สุธี รัตนภิรมย์[1]*

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาเบื้องต้นในการเพาะแยกเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus or NDV isolation) จากตัวอย่างสัตว์ป่วยโดยการใช้เซลล์ Vero เพื่อวัตถุประสงค์ในการใช้พิสูจน์เชื้อไวรัส (viral identification) จากตัวอย่างที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัส NDV ซึ่งส่งมายังห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยเปรียบเทียบกับวิธี การฉีดไวรัสเข้าไข่ไก่ฟักที่ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อน และการใช้เซลล์ปฐมภูมิจากตัวอ่อนของไข่ฟัก (chicken embryo fibroblast; CEF) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytophathic effect) ทำการวัดความเข้มข้นของไวรัสทั้งสองวิธีซึ่งได้ไวรัสที่มีความเข้มข้นสูงเท่ากันคือ 128 HA unit ในขณะที่ Vero Cell ไวรัสทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เช่นกันโดยเซลล์มีลักษณะหดตัวกลม สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน แสดงว่าสามารถนำมาใช้ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสเพื่อใช้พิสูจน์การเป็นสาเหตุของโรคได้ และเมื่อนำมาตรวจความเข้มข้นของเชื้อได้ค่า $10^{3.5}$TCID50/ml และ 8 HA unit เมื่อนำเชื้อไวรัส กลับไปเพาะเลี้ยงในเซลล์ปฐมภูมิจากตัวอ่อนไข่ฟักอีกครั้ง พบว่ามีระดับความเข้มข้นของไวรัสเพิ่มขึ้นเป็น $10^{8.75}$TCID50/ml ซึ่งเป็นการแสดงถึงการเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมของเซลล์จากตัวอ่อนไข่ฟักเพื่อใช้ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสและเพื่อพิสูจน์เชื้อชนิดนี้ได้ ดังนั้น Vero cell เซลล์จึงเป็นเซลล์ทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้เซลล์ปฐมภูมิที่มีอายุใช้งานจำกัดและการเตรียมเซลล์ที่ยุ่งยากซับซ้อนกว่า เพื่อความสะดวกสำหรับงานพิสูจน์เชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

*Corresponding Author, E-mail: fvetwich@ku.ac.th

ABSTRACT

The preliminary study was isolation of Newcastle disease virus (NDV) using Vero Cell line from infected chickens. The aim of this study is for viral identification. The specimens of NDV were brought to Virus Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakornprathom, Thailand. The comparison of virus isolation was performed using Vero Cell line, primary cell culture as Chicken Embryo Fibroblast (CEF) and chicken embryonated egg which can cause embryonic death. Virus concentration was determined. Both of the inoculated CEF and inoculated embryonated egg yielded 128 HA unit while Vero Cell line as host for NDV isolation and CEF showed the cell differentiation and Cytophathic effect (CPE) of the obvious rounded up cells which indicated the virus isolation and identification for causative agent detection. The virus concentration from infected Vero Cell line was $10^{3.5}$TCID50/ml and 8 HA unit. The virus yield was then used to inoculate the primary cell culture CEF and the viral concentration was increasing to $10^{8.75}$TCID50 /ml. This is the evident of being host of choice of the primary cell culture as embryonated egg for NDV isolation. However Vero Cell line could be the alternate host of choice in substitution to using the primary cell culture which has the limit of life span and more complicated preparation for the advantage of viral identification purpose of routine application.

คำสำคัญ: โรคนิวคาสเซิล การเพาะแยกเชื้อไวรัส Vero cell

Keywords: Newcastle disease virus, Virus isolation, Vero cell

บทนำ

โรคนิวคลาสเซิล (Newcastle disease) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสในสกุลพารามิกโซไวรัสซีโรไทป์ 1 (Newcastle disease virus; NDV) เป็นโรคที่แพร่ระบาดไปทั่วโลก ก่อความเสียหายต่อสัตว์ปีกและนกหลายชนิด (Alexander, 2003) การวินิจฉัยเป็นไปตามวิธีการขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE Manual) คือวิธีการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง chicken embryo fibroblasts (CEF) และการฉีดตัวอย่างที่สงสัยการติดเชื้อเข้าไปในไข่ฟัก (inoculation embryonated chicken eggs) (Alexander, 1989; Krzysztof et al., 2006) ซึ่งในทางปฏิบัตินั้นการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง CEF เป็นวิธีการเตรียมที่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและต้องอาศัยความชำนาญสูง เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ง่าย รวมทั้งการฉีดเชื้อไวรัสเข้าสู่ไข่ฟักโดยตรงก็เป็นวิธีที่ต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานการนำเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) มาใช้เลี้ยง NDV สายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรง คือ Texus GB และในการทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ยังใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น swine testicular (ST), human rectal tumor (HRT 18), fetal

rhesus monkey kidney (MA104), bovine turbinate (BT), quail tracheal (QT35) (Reynolds et al., 1999) ยังมีรายงานการใช้เซลล์ baby hamster kidney cell line (BHK)(Slosar et al., 1989) และการใช้ Bovine kidney cell (MDBK) (นรินทร์ และคณะ, 2000) ยังมีรายงานการนำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด African green monkey kidney cell line (VERO) มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อ NDV จำนวน 5 passage และได้ไวรัสที่มีความเข้มข้นที่ $10^{3.9}$TCID50 /ml และทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้อย่างชัดเจน แต่ได้เชื้อไวรัสที่มีความเข้มข้นต่ำ (Ahamed et al., 2004) การใช้ Vero cell เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อผลิตวัคซีนที่สำคัญ เช่น influenza A, B (Govorkova et al.,1996; Kistner et al., 1998)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงความเหมาะสมในการใช้ Vero cell เป็นเซลล์ทางเลือกในการเพาะแยกเชื้อไวรัส และพิสูจน์เชื้อไวรัส (viral Identification) จากตัวอย่าง ไวรัสโรคนิวคาสเซิลจากสัตว์ป่วยโดยตรง (clinical case) สำหรับการปฏิบัติงานพิสูจน์เชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง ปอด ต่อมน้ำเหลือง ของไก่ป่วยที่มีการระบาดในฟาร์มเขตจังหวัดนครปฐม ส่งมาเพาะแยกเชื้อภายในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยการตัดชิ้นส่วนตัวอย่างรวมกันในโกร่งบดที่เย็นจัด (แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาปั่นที่ 10,000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสไปกรองด้วย syringe filter 0.45 μm นำส่วนที่ได้จากการกรองมาเป็น inoculums

การเลี้ยงเซลล์ Vero

เลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Hyclone®) ที่มี 4 mM L-glutamine และ 25 mM herpes เติม 2 mM $NaHCO_3$ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 μm แล้วเติม 500 μg /ml ของเพนนิซิลิน G, 500 μg/ml สเตรปโตมัยซิน, 2.5 μg/ml ของ amphotericin B และ 10% FBS (Hyclone®) เลี้ยงใน flask ขนาด 25 cm^2 ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% CO_2 จนเซลล์เจริญได้เต็มพื้นผิว ล้างและ subculture โดยวิธีดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง และย่อยเซลล์ด้วย trypsin 0.5% เป็นเวลา 3 นาที นำเซลล์ไปปั่นล้างที่ 1500 rpm นาน 5 นาที นับเซลล์โดยใช้ hemacytometer ปรับจำนวนให้ได้ 5×10^5 cells/ml นำไปเลี้ยงต่ออีก 2 วัน สังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope พบว่าเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวและเรียงตัวเป็นรูปกระสวย

การเลี้ยงเซลล์จากตัวอ่อนไข่ฟัก (chicken embryo Fibroblast; CEF)

การเตรียมเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) จากไข่ฟักอายุ 9-10 วัน โดยวิธีการปลอดเชื้อโดยใช้ alcohol 75 % หรือ povidone scrub solution เช็ดเปลือกไข่ ให้กะเทาะเปลือกไข่ บริเวณ air space ใช้ forceps คีบตัวอ่อน (embryo) วางลงใน petridish ตัด หัว ขา และแยกอวัยวะภายในออกจากตัว embryo ด้วย forceps และกรรไกร ล้างส่วนที่เหลือด้วย PBS 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัด embryo ทั้งหมดให้

ละเอียด ย่อยเซลล์ด้วย 0.1% Trypsin-versine solution ให้ท่วมเซลล์ ปั่นกวนด้วย magnetic stirring bar เป็นเวลา 5-10 นาที กรองเซลล์ผ่านผ้าก๊อซ 4 ชั้น เติม growth medium ให้ท่วม เตรียม 1% cell suspension ใน growth medium แล้วตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Tryphan blue exclusion method โดยใช้ hemacytometer ปรับปริมาตรให้ได้ 2×10^4 cells/ml นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในภาชนะ (flask) นำไปใส่ใน CO_2 incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 วันเซลล์โตเต็มพื้นผิว นำไปเพาะแยกเชื้อไวรัสได้

การเพาะแยกเชื้อไวรัสใน Vero cell

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกจาก flask เลี้ยงเซลล์ Vero และ CEF ขนาด 25 cm^2 และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติมเชื้อจากตัวอย่าง 100 µl เอียง flask ไปมาให้ทั่วพื้นผิว และเก็บในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม IMDM ที่มี 1% FBS (Hyclone®) และ เลี้ยงต่อไปในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 5% CO_2 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทำการเก็บเซลล์เมื่อเกิด CPE 80% ไปตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี HA-HI

การเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ตัวอ่อนของไข่ฟัก (chicken Embryo Fibroblast)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกจาก flask เลี้ยงเซลล์ ตัวอ่อนของไข่ฟักขนาด 25 cm^2 และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติมเชื้อจากตัวอย่าง 100 µl เอียง flask ไปมาให้ทั่วพื้นผิว และเก็บในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม IMDM ที่มี 1% FBS (Hyclone®) และ เลี้ยงต่อไปในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 5% CO_2 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ทำการเก็บเซลล์เมื่อเกิด CPE 80% ไปตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี HA-HI

การฉีดเชื้อไวรัสในไข่ฟัก

ใช้ไข่ฟักที่ปลอดเชื้ออายุ 9-11 วัน ส่องตรวจไข่ไก่ฟัก ทำเครื่องหมายเหนือขอบเขต air cell เล็กน้อยเช็ดฆ่าเชื้อเปลือกไข่ด้วยสารละลายทิงเจอร์ไอโอดีน หรือ แอลกอฮอล์ เจาะเปลือกไข่ และแทงเข็ม tuberculin syringe ที่มีเชื้อจากตัวอย่างเชื้อไวรัสจานวน 0.2 มิลลิลิตร แทงจนมิดปลายเข็ม ดึงกระบอกฉีดยากลับเพื่อยืนยันการเข้าตำแหน่ง allantoic sac ค่อย ๆ ปล่อยเชื้อเข้าไปในฟองไข่ แล้วเช็ดเปลือกไข่ตรงรูเปิดด้วยสารละลายทิงเจอร์ไอโอดีน หรือ แอลกอฮอล์อีกครั้งหนึ่ง ปิดช่องด้วยขี้ผึ้งที่อุ่นให้ละลาย นำเข้าตู้ฟักไข่ 3-5 วัน จึงนำไข่มาเจาะน้ำไข่ในช่องเปิดเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำไปตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี HA-HI

การพิสูจน์เชื้อไวรัส โดยวิธี HA/HI

การพิสูจน์เชื้อไวรัส โดยวิธี hemagglutination test นำไวรัส 50 µl หยดลงบน pertridish เปรียบเทียบกับ PBS ที่ใช้เป็น negative control 50 µl เติม 5 % RBC 50 µl ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยใช้ปลาย tip เกลี่ยผสมให้ทั่วทีละตัวอย่าง เปลี่ยน tip ทุกครั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีจึงสังเกตการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง เมื่อได้ตัวอย่างสงสัยติดเชื้อไวรัสแล้ว จึงนำไปทดสอบกับแอนติบอดีต่อ Newcastle disease virus, Avian influenza virus, adenovirus, infecttious bronchitis virus และ mycoplasma โดยวิธี hemagglutination inhibition test (HI) วิธีการ ผสมตัวอย่างที่สงสัยติดเชื้อ NDV 50 µl กับ anti-serum ตัวอย่างละ 50 µl เปรียบเทียบกับ PBS ที่ใช้เป็น negative control 50 µl ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเติม 5% RBC 50 µl ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยใช้ปลาย tip เกลี่ยผสมให้ทั่วทีละตัวอย่าง เปลี่ยน tip ทุกครั้งทิ้ง

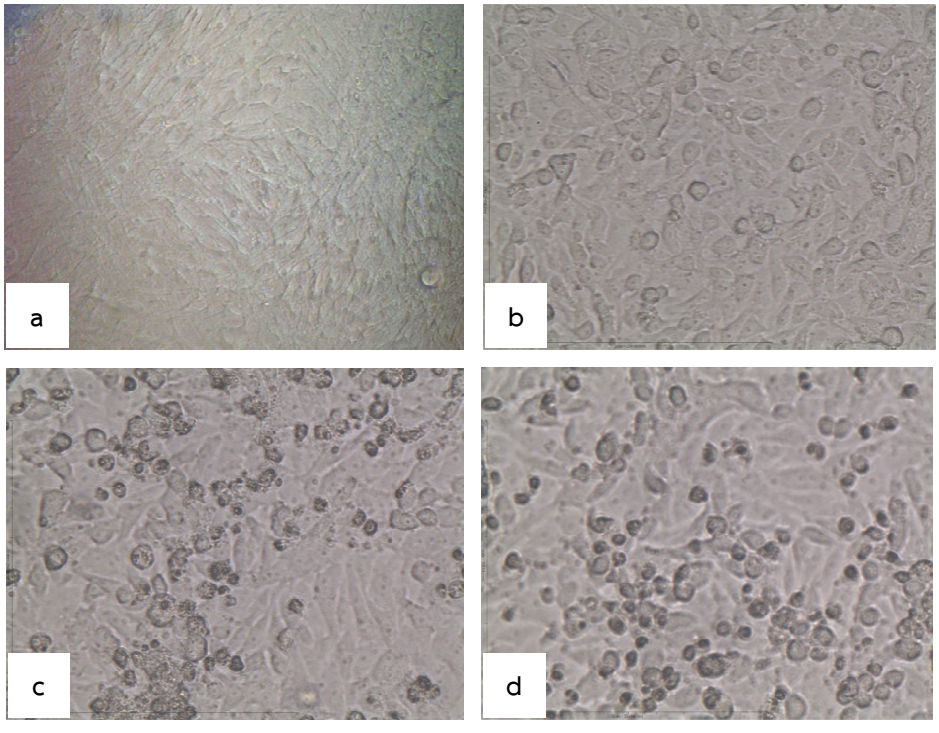
ไว้ประมาณ 15 นาที สังเกตการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง

การตรวจหาความเข้มข้นของไวรัส

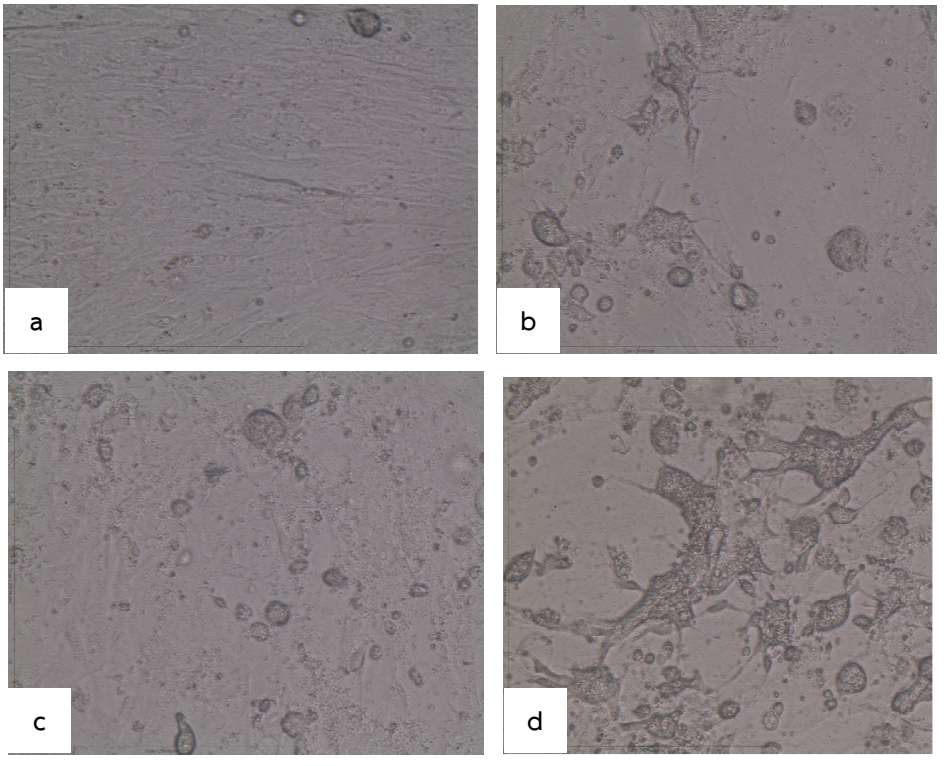
การตรวจหาความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธีตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของไก่ โดยวิธี HA-test โดยวิธีการทำ serial 2-fold dilution ครั้งละ 50 μl ของสารละลายไวรัส จำนวน 12 dilution เติมสารละลาย 1% RBC 50 μl ทุก dilution ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตการตกตะกอน และอ่านผล

การหาความเข้มข้นของไวรัสทำโดยวิธี TCID50 โดยใช้สารละลายไวรัส 100 μl ผสมกับสารเจือจาง (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Hyclone®) ที่มี 4mM L-glutamine และ 25 mM herpes เติม 2 mM $NaHCO_3$ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 μm แล้วเติม 100 μg/ml ของเพนนิซิลิน G, 500 μg/ml สเตรปโตมัยซิน, 2.5 μg/ml ของ amphotericin B และ 1% FBS (Hyclone®)) จำนวน 900 μl ผสมให้เข้ากันดี โดยใช้ vortex mixer ถ่ายส่วนผสมต่อโดยนำสารละลายไวรัสมาทำ serial 10-fold dilution จำนวน 12 dilution นำแต่ละ dilution ถ่ายลงในเซลล์ Vero ที่เลี้ยงไว้ใน 96 well plate หลุมละ 100 μl dilution ละ 8 หลุม จนครบ 12 dilution จึงนำเข้า ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 5% CO_2 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ อ่านผลในแต่ละ dilution และคำนวณ โดยวิธี Reed and Meunh

ผลการทดลองและวิจารณ์



รูปที่ 1 เซลล์ Vero (a) ปกติ (b) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 24 ชั่วโมง (c) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 48 ชั่วโมง (c) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 2 เซลล์ CEF (a) ปกติ (b) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 24 ชั่วโมง (c) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 48 ชั่วโมง (c) หลังได้รับเชื้อไวรัส NDV ที่เวลา 72 ชั่วโมง

จากการเพาะแยกเชื้อไวรัส NDV จากสัตว์ป่วยด้วยเซลล์ Vero และเซลล์ตัวอ่อนของไข่ฟัก พบว่าเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect) ได้ตั้งแต่ passage ที่ 1 (รูปที่ 1b-d และ 2b-d) ที่เห็นได้ชัดเจนคือมี ลักษณะการหดตัวกลม (round up and slough off) และหลุดจากพื้นผิวภาชนะ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 1d และ 2d) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสที่ยังคงมีลักษณะเจริญแน่น ยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะ(รูปที่ 1a และ 2a) และผลจากการพิสูจน์ด้วยการนำไวรัสมาตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ (HA/HI) พบว่า ให้ผลบวก และเมื่อนำไปทดสอบกับ anti-serum Newcastle disease virus, Avian influenza virus, Adenovirus, infectious bronchitis virus และ mycoplasma พบว่า anti-serum ต่อ Newcastle disease virus ไม่ตกตะกอน ส่วน anti-serum ต่อ avian influenza virus, adenovirus, infectious bronchitis virus และ Mycoplasma เกิดการตกตะกอน ต่อมานำไวรัสที่ได้จากการเพาะแยกในเซลล์ Vero ไป ตรวจวัดความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี hemagglutination test ได้ 8 HA unit และ$10^{-3.6}$TCID50/ml ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีการของ Ahamed et al. (2004) ซึ่งนำ Vero cell มาปรับใช้กับ NDV ให้ปริมาณเชื้อไวรัสความเข้มข้น $10^{3.6}$TCID50/ml และเมื่อนำเชื้อไวรัสกลับไป inoculate เซลล์ปฐมภูมิจากตัวอ่อนของไข่ฟักอีกครั้ง (CEF) ยังสามารถให้ปริมาณไวรัสที่สูงขึ้น $10^{8.75}$TCID50/ml อย่างไรก็ตาม Vero cell มีประโยชน์สำหรับการใช้เพื่อเพาะแยกไวรัส NDV จากสัตว์ป่วยได้ เนื่องจากเป็น

เซลล์พื้นฐานที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีไว้ใช้งานประจำ สะดวกในการปฏิบัติงาน ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากในการเตรียมเซลล์ปฐมภูมิจากตัวอ่อนของไข่ฟักที่มีอายุการใช้งานน้อย ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นนี้ Vero cell จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเลือกใช้เพื่อประโยชน์ในการเพาะแยกเชื้อไวรัส NDV แต่ไม่เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัส ถึงแม้ว่า จะให้ความเข้มข้นของไวรัสในปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับ CEF หรือการฉีดเชื้อเข้าไข่ฟักก็ตาม เนื่องจากตลอดปี 2554 มีตัวอย่างที่ส่งตรวจหาไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคนิวคาสเซิลเพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น และ 3 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อนิวคาสเซิล อีก 2 ตัวอย่างให้ผลลบ ในระยะยาวควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและใช้ตัวอย่างที่มากกว่านี้ในการวิเคราะห์ข้อมูลถึงความเหมาะสมในการเลือกใช้เซลล์ดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ อุประกรินทร์ นำดี แซ่เฮง นันทวัน ญาติบรรทุง วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ และวรวิทย์ วัชชวัลคุ. (2544). การพัฒนาการตรวจ Virus neutralization ต่อไวรัสนิวคาสเซิลโดยใช้ Bovine kidney cell line.การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์และสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่39. กรุงเทพฯ. หน้า 412-419.

Ahamed, T., Hossain, K.M., Billah, M.M., Islam, K.M.D., Ahasan, M.M. and Islam, M.E. (2004). Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) on Vero Cell Line. J. Poultry Science 3(2): 153-156.

Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease, other avian paramyxovirus, and pneumovirus infections. In: Diseases of Poultry 11th edition. Iowa State Press. 63-69.

Alexander, D.J. (2004). Newcastle disease. In: A laboratory Manual for the isolation and identification of avian pathogens 3rd edition chapter 27. 114-120.

Govorkova, E.A., Murti, G., Meigner, B., Taisne, C.DE. and Webster, G. (1996). African Green Monkey Kidney (Vero) Cells Provide and Alternative Host Cell System for Influenza A and B Viruses. J. Virology. 70(8): 5519-5524.

Kistner, 0., Barrett, P.N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S. and Doner, F. (1998). Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate Influenza virus vaccine. J.Vaccine 16(9-10): 960-968.

Kouvenhoven, B. (1993). Newcastle disease. In: Virus Infection of Birds, Elsevier Science Publishers B.V. 341-361.

Reynolds, D.L. and Mueach, A.D. (1999). A rapid virus neutralization assay for Newcastle disease Virus with the swine testicular continuous cell line. J. Avian Dis. 43(3): 564-571.

❑❑❑❑❑