

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (Classical Swine Fever) เป็นโรคระบาดของสุกรที่รุนแรง พบว่าเกิดในยุโรปและอเมริกาตั้งแต่ปี 1810 (Hanson, 1957) โรคนี้เป็นโรคที่มีความสำคัญในระดับโลกโดยพบว่าเป็นโรคประจำถิ่น(endemic) ในประเทศแถบยุโรปตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อเมริกาใต้และอเมริกากลาง เป็นต้น ซึ่งประเทศเหล่านี้ใช้มาตรการการทำวัคซีนเชื้อเป็นในการป้องกันโรค ในทางตรงกันข้ามหลายๆ ประเทศเช่น ในยุโรปตะวันตกซึ่งมีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นเช่น เยอรมันนี, เนเธอร์แลนด์, เบลเยียม และ สเปน นั้นใช้มาตรการงดการใช้วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ แต่ก็ยังคงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคค่อนข้างสูงและพบกับการระบาดของโรคเป็นระลอก วิธีการควบคุมโรคที่ใช้กันในประเทศกลุ่มยุโรปในปัจจุบันก็คือการคัดสุกรที่ติดเชื้อหรือถูกสงสัยว่าติดเชื้อทั้งทั้งฝูง และใช้มาตรการการเฝ้าระวังอย่างเข้มงวดต่อไปในฟาร์มเหล่านั้น ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก สำหรับโปรแกรมการควบคุมโรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น pseudorabies และ infectious bovine rhinotracheitis นั้นใช้ marker vaccine เป็นตัวช่วยในกระบวนการกำจัดโรคได้อย่างประสบผลสำเร็จ ดังนั้นแนวทางการผลิต marker vaccine สำหรับโรคอหิวาต์สุกรเพื่อใช้ในการทำ ring vaccination พร้อมกับการใช้ชุดวินิจฉัยที่สามารถแยกแยะสุกรที่ติดเชื้อออกจากสุกรที่ได้รับวัคซีนในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคนั้นน่าจะเป็นวิธีการที่ได้ผลดีในการควบคุมการระบาดของโรคและที่สำคัญทำให้ไม่ต้องทำลายสุกรทุกตัวที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงทำให้ลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจได้และยังมีผลดีในแง่ของ Animal Welfare อีกด้วย

ส่วนในประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2493 (สมใจ และคณะ 2524) และตระหนักว่ามีการระบาดอย่างรุนแรงขึ้นนับตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2527 โดยพบว่าปัญหาโรคระบาดของอหิวาต์สุกรได้ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างใหญ่หลวงในฟาร์มสุกรโดยทั่วไปทั้งฟาร์มเลี้ยงสุกรพันธุ์และฟาร์มสุกรขุน (สุพล 2543) สมใจและนิยมนศักดิ์ (2535) รายงานว่า จากการติดตามการระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วง เมษายน 2525 – กรกฎาคม 2534 รวมเป็นเวลา 9 ปี 4 เดือน พบการระบาด 55 ครั้ง มีสุกรป่วยตายและถูกทำลายทั้งสิ้นประมาณ 1,989 ตัว คิดเป็นความสูญเสียกว่า 5,000,000 บาท สำหรับสถานการณ์ของโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นยังพบว่าการระบาดของโรคเป็นประจำทุกปี ถึงแม้ว่าจะมีการทำวัคซีนกันเป็นประจำแล้วก็ตาม ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกิดจากการหลายสาเหตุเช่น มีโรคแฝงชนิดที่ก่อกำเนิดกันในสุกร เช่น โรคพิษสุนัขบ้าเทียม โรคพื่ออาร์อาร์เอส การได้รับสารพิษจากเชื้อราเช่น Aflatoxin เป็นต้น หรืออาจจะเป็นวิธีการทำวัคซีนไม่ถูกต้อง การวางโปรแกรมการทำวัคซีนไม่ดีพอ และที่สำคัญ biosecurity ไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากความสูญเสียโดยตรงดังกล่าวแล้ว ยังมีความสูญเสียในแง่เศรษฐกิจอื่นๆ ที่สำคัญคือ อหิวาต์สุกรเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประเทศไทยไม่สามารถผลิตสุกรส่งออกขายยังต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น และ สหภาพยุโรป เป็นต้น เนื่องจากประเทศเหล่านี้ได้ประกาศตัวว่าเป็นประเทศที่ปลอดจากโรคอหิวาต์สุกร และประกาศงดใช้วัคซีนอหิวาต์สุกร ทำให้ประเทศไทยซึ่งยังคงใช้วัคซีนอหิวาต์สุกรอยู่ในปัจจุบันไม่สามารถส่งสุกรเป็นสินค้าออกได้ เพราะการให้วัคซีนกับการติดเชื้ออหิวาต์สุกรตามธรรมชาตินั้นทำให้ระดับของภูมิคุ้มกันต่ออหิวาต์สุกรสูงขึ้น เช่นเดียวกันทำให้ผู้ซื้อไม่มั่นใจว่าสุกรที่ซื้อไปนั้นเป็นสุกรที่ติดเชื้ออหิวาต์สุกรหรือได้รับวัคซีนกันแน่

ขณะนี้กลุ่มวิจัยทั่วโลกกำลังวิจัยเกี่ยวกับ marker vaccine หรือ DIVA vaccine (ย่อมาจาก differentiating infected from vaccinated vaccine) ซึ่งสามารถใช้แยกสุกรซึ่งติดเชื้ออหิวาต์

สุกรออกจากสุกรซึ่งได้รับวัคซีนได้ ปัจจุบันมีการวิจัยทั้ง subunit vaccine, การใช้ไวรัสชนิดอื่นเป็น vector เพื่อให้เซลล์สร้างโปรตีน E2 หรือ E0, การสร้าง chimeric ไวรัส หรือ การตัดยีน E2 หรือ E0 ออกจากไวรัสอหิวาต์สุกร ซึ่งปัจจุบันจะเห็นได้ว่ามีเพียงวัคซีน subunit เท่านั้นที่ได้รับอนุญาตให้ออกสู่ตลาดขณะที่วัคซีนชนิดอื่นๆ ยังต้องผ่านกระบวนการพิสูจน์ว่ามีความปลอดภัยและจะไม่สร้างปัญหาต่อไปเนื่องใช้ไวรัสที่มีชีวิตและผ่านกระบวนการตัดต่อยีนมา ซึ่งคาดว่ากว่าจะได้รับอนุญาตให้นำมาใช้ได้คงไม่ต่ำกว่า 5-10 ปี ในส่วนของ subunit vaccine นั้นในเรื่องของคุณภาพของวัคซีนยังไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากประสิทธิภาพของวัคซีนยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจหากเทียบกับวัคซีนเชื้อเป็นที่ใช้กันอยู่ (De Wulf *et al.*, 2002; Widjojoatmodjo *et al.*, 2000)

ในแง่ของการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรในประเทศไทยนั้นมีหน่วยงานที่ทำการผลิตเพียงหน่วยเดียวคือกรมปศุสัตว์ โดยพบว่าในปี 2547 มีการผลิต 7-15 ล้านโดสซึ่งเพิ่มขึ้นกับปริมาณของสุกรที่ผลิตในแต่ละปี ซึ่งจำนวนนี้ยังไม่นับรวมวัคซีนที่มีการส่งนำเข้ามาจากต่างประเทศ (กรมปศุสัตว์ยังไม่สามารถผลิตวัคซีนได้เพียงพอต่อการใช้) ซึ่งหากนับเป็นจำนวนเงินรายได้แล้วประมาณ 21-45 ล้านบาทต่อปี สำหรับชนิดของวัคซีนที่กรมปศุสัตว์ผลิตนั้นเป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ได้จากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ Lapinized C-Strain ซึ่งต้องเพิ่มจำนวนในกระต่ายแล้วสกัดไวรัสจากม้ามากระต่ายมาใช้ทำเป็นวัคซีนซึ่งมีปัญหาในเรื่องของการที่ต้องฆ่ากระต่ายเป็นจำนวนมากในแต่ละปี นอกจากนี้การควบคุมคุณภาพทำได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถที่จะทราบปริมาณของเชื้อที่แน่ชัดได้เหมือนกับการเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยง และเมื่อนำมาใช้แล้วมักจะเกิดปัญหาในเรื่องของการแพ้วัคซีนทำให้สุกรที่ได้รับวัคซีนช็อคและตาย

จากการที่ผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยจากงบอุดหนุนผ่านมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการพัฒนา subunit vaccine E2 ขึ้นในปีงบประมาณ 2550 นี้ในชื่อเรื่อง “การพัฒนา subunit vaccine ชนิดของโปรตีน E2 ร่วมกับ โปรตีน Npro สำหรับโรคอหิวาต์สุกรพร้อมการตรวจหาโปรตีน E0 เพื่อใช้แยกระหว่างสุกรที่ติดเชื้อออกจากสุกรที่ได้รับวัคซีน” ประกอบกับมีข้อมูลที่กล่าวถึงไปแล้วว่า ประสิทธิภาพของ subunit vaccine E2 เดียวๆ นั้นยังไม่เป็นที่น่าพอใจนัก ดังนั้น การศึกษาโดยใช้ระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งที่น่าจะทำการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนดังกล่าว

เนื้อเรื่อง

ไวรัสอหิวาต์สุกรเป็น RNA ไวรัสซึ่งมีขนาดประมาณ 12 กิโลเบส พบว่ามีเพียงหนึ่ง ORF ดังนั้นไวรัสจะสร้าง polyprotein ขึ้นมา ต่อมาภายหลังการถอดรหัส (translation) polyprotein จะถูกตัดออกเป็นโปรตีนสำหรับเชื้อไวรัส 12 ชนิด โดยแบ่งเป็นโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิดคือ โปรตีน C, E₀, E₁ และ E₂ และโปรตีนซึ่งไม่เป็นโครงสร้าง 8 ชนิด ประกอบไปด้วย N^{pro}, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B โปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่แตกต่างกันออกไป (Meyers and Thiel, 1996) สุกรจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรเพียง 3 ชนิดภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเข้าไปคือ แอนติบอดีต่อโปรตีน E₀, E₂ และ NS2.3 (van Oirschot, 2003) อย่างไรก็ตามมีเพียงแอนติบอดีต่อโปรตีน E₀ และ E₂ เท่านั้นที่พบว่าเป็น neutralizing แอนติบอดี ส่วนโปรตีน NS2.3 นั้นไม่พบว่าเป็น neutralizing แอนติบอดี อีกทั้งยังพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้ยังไม่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรอีกด้วย

วัคซีนที่ใช้ป้องกันโรคอหิวาต์สุกรซึ่งเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันนั้นเป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่มีการ

พัฒนาขึ้นจากไวรัสฮิวมาโนไวรัสหลายสายพันธุ์ดังนี้ 1) Chinese (C) strain, 2) Japanese guinea-pig exaltation-negative (GPE⁻) strain และ 3) Thiverval strain (van-Oirschot 2003) วัคซีนเชื่อเป็นเหล่านี้มีข้อดีในแง่ของการที่สามารถป้องกันการเกิดอาการของโรคในสุกรได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Aynaud, 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนเชื่อเป็นโดยเฉพาะ C-strain ก่อนได้รับเชื้อฮิวมาโนไวรัสเพียง 1 อาทิตย์ไม่แสดงอาการของโรคอีกทั้งยังไม่เกิดภาวะ viremia และไม่มีการขับเชื้อออกจากร่างกายสุกร (De Wulf *et al.*, 2002) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวัคซีนเชื่อเป็นได้อย่างไม่มีข้อสงสัย อย่างไรก็ตามสุกรซึ่งได้รับวัคซีนเหล่านี้จะสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสฮิวมาโนไวรัสขึ้นและไม่สามารถแยกออกจากการติดเชื้อไวรัสโดยเฉพาะสุกรที่ติดเชื้อไวรัสแบบแฝงซึ่งจะสามารถขับเชื้อไวรัสออกมาได้ตลอดเวลาได้ซึ่งเป็นข้อด้อยที่สำคัญ ซึ่งทำให้เมื่อประเทศในทวีปยุโรปกำหนดนโยบายการกำจัดโรคคอฮิวมาโนไวรัสขึ้นเมื่อปี 1986 เป็นต้นมาทำให้ต้องงดการใช้วัคซีนฮิวมาโนไวรัส เพื่อให้การกำจัดโรคคอฮิวมาโนไวรัสจากทวีปยุโรปทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยการตรวจหาแอนติบอดีและคัดทิ้งสุกรที่มีแอนติบอดีและตัวที่อยู่ใกล้ชิด ออกไปอย่างรวดเร็ว (Stegeman *et al.*, 2000) ในระยะแรก นโยบายการกำจัดโรคคอฮิวมาโนไวรัสดังกล่าวสามารถใช้ควบคุมการระบาดของโรคได้เป็นอย่างดี แต่พอถึงช่วงปี 1997-1998 การควบคุมการระบาดของโรคดังกล่าวกลับได้ผลไม่ดีขึ้นทำให้ต้องมีการทำลายทิ้งสุกรเป็นจำนวนกว่าล้านตัวในการระบาดครั้งนั้นครั้งเดียว จึงเป็นที่มาของแนวคิดในการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมและ/ป้องกันโรคในกรณีที่มีการระบาดของโรคขึ้นมาก (emergency vaccination) อย่างไรก็ตามวัคซีนที่จะนำมาใช้จะต้องเป็นวัคซีนที่เรียกว่า marker หรือ DIVA (differentiating infected from vaccinated) vaccine เพื่อให้สามารถแยกได้ว่าสุกรตัวใดติดเชื้อและสมควรที่จะคัดทิ้งออกไปหรือไม่ซึ่งจะมีผลดีทำให้ไม่จำเป็นต้องคัดทิ้งสุกรเป็นจำนวนมากเหมือนในอดีต (van Oirschot, 2003)

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของ subunit vaccine E2 ยังไม่สามารถแสดงประสิทธิภาพได้เทียบเท่าวัคซีนเชื่อเป็นที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างภูมิคุ้มกันจนสามารถป้องกันโรคได้โดยที่พบว่าต้องใช้เวลาน้อย 7-10 วัน ขณะที่วัคซีนเชื่อเป็น C-strain ต้องการเวลาเพียง 3-5 วันก็สามารถป้องกันการแสดงอาการของสุกรได้ (De Wulf *et al.*, 2002) นอกจากนี้ความสามารถในการป้องกันการเกิด Vertical transmission ก็ยังเป็นที่ยังสงสัยเนื่องจากในการทดลองพบว่ายังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อจากแม่สู่ลูกผ่านทางสายรกได้ (De Smit *et al.*, 2000)

โดยสรุปแล้ว marker vaccine ที่มีอยู่ในปัจจุบันนั้นยังไม่พร้อมที่จะออกสู่ตลาดหรือที่ออกมาแล้วก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับ van Oirschot (2003) คาดว่าต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 5-10 ปีในการที่ marker vaccine เหล่านี้ต้องใช้ในการพิสูจน์ว่าไม่มีผลเสียต่อสุกรและสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะวัคซีนเชื่อเป็นเช่น chimeric วัคซีนต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากเชื่อสามารถเพิ่มจำนวนในสิ่งมีชีวิตได้ซึ่งเกรงกันว่าอาจจะก่อให้เกิดผลเสียตามมาเช่น การเกิดการกลายพันธุ์ของเชื่อทำให้รุนแรงขึ้น เป็นต้น

ดังนั้น marker vaccine ที่เหมาะสมสำหรับเมืองไทยในขณะนี้ น่าจะเป็น subunit vaccine ซึ่งอย่างน้อยมีการพิสูจน์แล้วว่าปลอดภัยจึงได้รับใบอนุญาตให้ผลิตขายได้แม้ว่าจะยังมีคุณภาพไม่ดีนักก็ตาม แนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของ subunit vaccine E2 แนวทางหนึ่งนั้นได้แก่การพัฒนากระบวนการนำส่งที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถนำส่งแอนติเจนของเชื่อให้แก่เซลล์ที่สร้างภูมิคุ้มกันได้อย่างรวดเร็วและคงอยู่ในร่างกายได้เป็นระยะเวลานานๆ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell mediated immunity) ใกล้เคียงกับวัคซีน C-strain ซึ่งมีรายงานว่าเซลล์ที่

ติดเชื้อไวรัส C-strain สามารถสร้าง interferon-gamma (Suradhat *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นตัวบ่งว่าการทำงานของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์เป็นไปอย่างดี นอกจากนี้ทางที่ใช้ในการให้วัคซีนนั้นก็ควรจะใกล้เคียงกับทางที่ได้รับเชื้อ นั่นก็คือทางเยื่อเมือกที่บริเวณปากและจมูก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

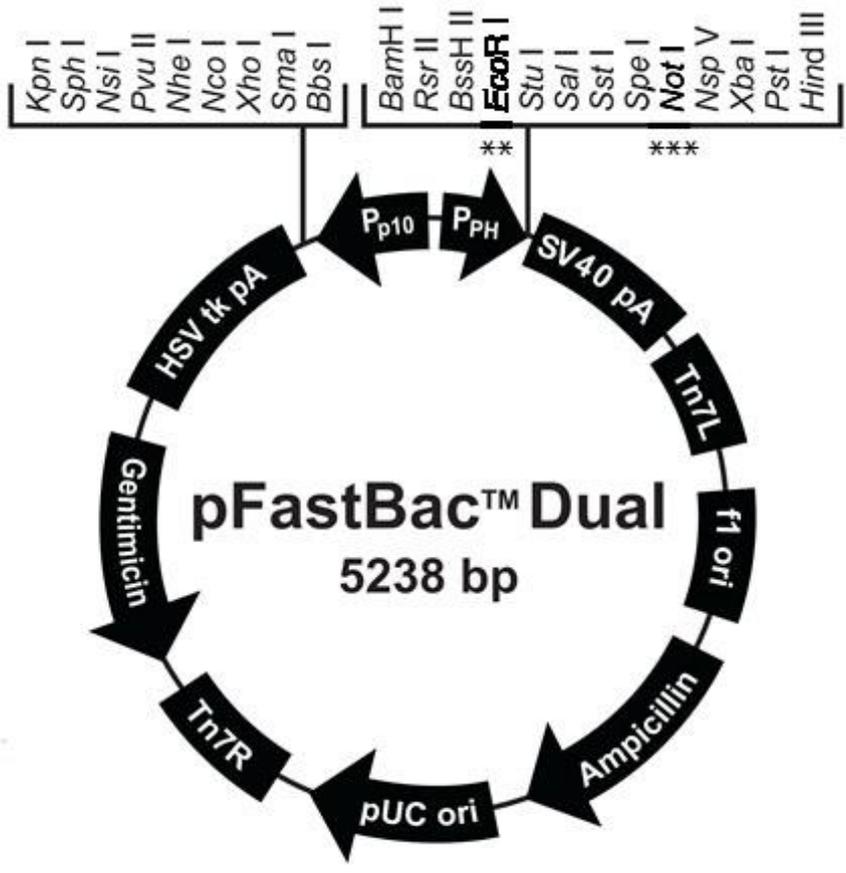
1. เพื่อผลิตโปรตีน E2 โดยผ่านระบบการผลิตของ Baculovirus และ เซลล์แมลง
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ subunit vaccine E2 ที่ใช้อุณหภูมิห้อง/ไมโครในการนำส่งทางจมูกเพื่อป้องกันโรคคหิวหวัดสุกร

วิธีการทดลอง

1. การแทรกยีน E2 เข้า pFastbac Dual plasmid

เพิ่มจำนวนของยีน E2 จาก cDNA ของ CSFV สายพันธุ์ Alfort/187 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก I. Reimann จาก Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Centre for Virus Disease of Animals, Insel Riems, Germany ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะครอบคลุมส่วนของ signal sequence ของยีน E2 และไม่มี transmembrane domain (Yu *et al.*, 2001) ลำดับเบสของ primer ได้แก่ 5'TTGGGAATTCATCATGGTGTGAACAGCGCCAGCAC (sense) และ 5'TTGGGCGGCCGCTTAGAACTCGGCGAAGTAGTCGCT (anti-sense) โดยแต่ละ primer จะมีตำแหน่งสำหรับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI (sense) และ NotI (anti-sense) ตามลำดับ (ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้) ซึ่งขึ้นดิเอ็นเอที่จะเพิ่มจำนวนจะมีขนาด 1,116 base pairs คือตั้งแต่นิวคลีโอไทป์ที่ 2,330-3,466 ของ CSFV สายพันธุ์ Alfort/187

ยีน E2 ที่ได้จะถูกนำไปแทรกเข้าสู่พลาสมิด pFastBac Dual Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression system ที่ตำแหน่งระหว่างเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ NotI และถูกตั้งชื่อว่า pFastBac Dual-E2



รูปที่ แสดงโครงสร้างของ pFastBac Dual vector ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ EcoR I คือ ** และ ตำแหน่งตัวของเอนไซม์ Not I คือ ***

2. วิธีการเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (completent cell) (Dagert and Ehrlich, 1979)
 - 2.1. เพาะเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ XL1-Blue โดยใช้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) จาก LB agar นำไปเลี้ยงใน LB broth 10 มิลลิลิตรที่เครื่องบ่มเพาะแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน
 - 2.2. นำ *E.coli* ที่ได้จากข้อ 2.1 มา 5 มิลลิลิตรเติมลงไป ใน Erlenmeyer flask ที่มี LB broth อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่เครื่องบ่มเพาะแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ mid-log phase (O.D.₆₀₀ = 0.5-0.6)
 - 2.3. นำ mid-log phase *E.coli* ที่ได้จากข้อ 2.2 มาแช่เย็นที่อ่างน้ำแข็งจนเย็น แล้วใช้ aseptic techniques ถ่ายเชื้อลงไปในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตรและแช่เย็นไว้ แล้วนำไปปั่นเก็บเซลล์ที่ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งไป
 - 2.4. นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.3 มากระจายให้ทั่วในสารละลาย 0.1 M MgCl₂ ปลอดเชื้อและแช่เย็น 25 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที แล้วใช้ aseptic technique ถ่ายเชื้อลงไปในหลอดปั่น

- เหยียงที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิตรและแช่เย็นไว้ก่อนแล้วนำไปปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป
- 2.5. นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.4 มากระจายให้ทั่วอย่างไม่รุนแรงนักโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงในสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ปลอดเชื้อและแช่เย็น 25 มิลลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที แล้วนำไปปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนใสทิ้งไป
 - 2.6. นำเซลล์ที่ได้มากระจายให้ทั่วอย่างไม่รุนแรงนักโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงในสารละลาย 0.1M CaCl₂ ที่มี 15% glycerol ปลอดเชื้อและแช่เย็น 2.5 มิลลิตร
 - 2.7. แบ่งเก็บสารละลาย Competent cell ลงในหลอด microtube ปลอดเชื้อหลอดละ 200 ไมโครลิตร ในตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส เก็บได้นานไม่เกิน 6 เดือน
3. นำ plasmid DNA เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ด้วยวิธี chemical transformation (Hanahan and Meselson, 1983)
- ใช้ DNA sequence ของเชื้อไวรัส CSFV ที่ตำแหน่งของยีน E2 โคลนเข้าสู่ pFastBac Dual ที่ตำแหน่ง restriction enzyme EcoRI และ Not I ได้เป็นพลาสมิด pFastBac Dual-E2 แล้วนำเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี chemical transformation ดังนี้
- 3.1. ละลาย competent cells (จาก -80 องศาเซลเซียส) ในน้ำแข็ง
 - 3.2. ใช้ปิเปตดูด competent cells 200 µl ใส่ลงใน 15 ml polypropylene tube
 - 3.3. เติมพลาสมิด pFastBac Dual-E2 1 µl แล้วผสมเบาๆ ให้เข้ากันเป็นอย่างดี
 - 3.4. Incubate cell ในอ่างน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง
 - 3.5. นำ cell มาใส่ลงใน water bath ซึ่งมีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ไม่ต้องเขย่า
 - 3.6. นำหลอดมาแช่เย็นในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที
 - 3.7. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายปริมาตร 200 µl จากข้อ 6 ถ่ายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 mm ที่ บรรจุอาหาร LB broth ในปริมาตร 2 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-90 นาที เพื่อให้พลาสมิดมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านและเตรียมพร้อมที่จะแสดงออกของลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะ Gentamycin ตาม genetic marker ของพลาสมิด pFastBac Dual
 - 3.8. เตรียม LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin (30 mg/ml)
 - 3.9. หลังจากบ่มเซลล์แล้วดูเซลล์ที่ได้มา 100 µl หยดลงบน LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamycin (30 mg/ml) ที่เตรียมไว้แล้วใช้ที่เกลี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวน้ำของจานอาหาร
 - 3.10. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วคัดเลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นไปเพิ่มจำนวน และทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979) เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป
4. การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pFastBac Dual และยีน E2 ด้วยปฏิกิริยาการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้คือ EcoRI และ Not I โดยเตรียม reaction mixture ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 reaction mixture ในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
พลาสมิด pDE2swot	2
EcoRI buffer	2
BSA	0.2
EcoR I	1
Not I	1
DEPC water	13.8
TV	20

เมื่อดูดส่วนประกอบทั้งหมดลงในหลอดครบแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลายของ pipette tip กวนเบาๆ และต้องให้แน่ใจว่าส่วนประกอบต่างๆนั้นรวมกันอยู่ที่ก้นหลอด ทั้งนี้โดยปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 วินาทีในเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วสูงสุดของเครื่อง จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแบบเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนครบสมบูรณ์ เมื่อทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอจนครบสมบูรณ์ทำการวิเคราะห์ด้วยการนำมาทำ agarose gel electrophoresis

5. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979)

- 5.1. นำเอาเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนใน LB-broth ขำมคั้นมาใส่ลงใน microtube 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที
- 5.2. เทเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออกให้หมดเหลือแต่ตะกอนเซลล์ที่ตกลงรวมกันอยู่ที่ก้นหลอด
- 5.3. นำเซลล์ที่ได้มาเติม 100 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG I (lysozyme solution) เขย่าและผสมให้เซลล์และ lysozyme solution เข้ากันให้ดีด้วย vortex mixer
- 5.4. เติมผง lysozyme ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 5.5. เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG II (lysis solution) เขย่าแบบแผ่วเบาด้วยนิ้วมือและข้างๆหลอดแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 5.6. เติม 150 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG II (neutralization solution) เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (ขณะนี้ควรเห็นตะกอนสีขาวๆเกิดขึ้นแล้ว) แช่น้ำแข็งอีกเป็นเวลา 10 นาที
- 5.7. นำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

- 5.8. ถ่ายแยกเอาแต่ส่วนใสข้างบนหลอดลงไปหลอด microtube หลอดใหม่ส่วนตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดเดิมนั้นทิ้งไป
- 5.9. ประมาณปริมาตรส่วนใสที่ได้ แล้วเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นเอาไว้ก่อนแล้วที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนใส
- 5.10. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสประมาณ 1 ชั่วโมง-ข้ามคืนเพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอตกตะกอนลงมา
- 5.11. นำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-20 นาที
- 5.12. นำเอาตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ที่เย็นแล้วปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที
- 5.13. เทเอา 70% ethanol ทิ้งไปแล้วนำเอาตะกอนมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศหรืออบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
- 5.14. นำเอาตะกอนที่ทำให้แห้งมาทำให้ละลายใหม่โดยใช้สารละลาย TE buffer pH 8 ในปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร

6. การเลี้ยงเซลล์แมลง

เซลล์แมลงที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ประกอบด้วย High 5 และ Sf9 เซลล์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health 17493 Greifswald, Island Riems, Germany และ Pilot Plant Development and Training Institute (PDTI), King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkuntien), Bangkok 10150, Thailand ตามลำดับ สูตรอาหารสำหรับเลี้ยง High 5 ได้แก่ Grace's Antheraea Medium, 3,3 g/l LAH ; 3,3 g/l Yeast-Extract, 10 % FCS, pH 6,5 – 6,7 ส่วนสูตรอาหารเลี้ยง Sf9: Grace's insect medium containing 2% (50x) lactalbumin, 2% yeastolate, 10% FBS และ 8% L-glutamine (200mM, 100x) เซลล์ทั้งสองชนิดจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสในขวดระบบปิด

7. การทำ Chemical Transfection

ในการทดลองนี้เลือกใช้ Cellfectin II (Life technology) และ FuGENE HD Transfection Reagent (Roche, Cat.No. 04 709 691 001) ในการทดลองโดยดำเนินการดังต่อไปนี้คือ

Cellfectin II

- 7.1. เติมน้ำเซลล์ 8×10^5 ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 2 ซีซี ลงเพลตขนาด 6 หลุม ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เซลล์เกาะกับผิวเพลต จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเดิมออก เติมน้ำเลี้ยงตาม ข้อ 2 ปริมาตร 2.5 ml ลงไปแทน

- 7.2. เตรียม plating medium โดยการผสม Grace's Insect Medium (supplemented) 1.5 ml ซึ่งมี FBS 10% แต่ไม่มียาปฏิชีวนะ เข้ากับ Grace's Insect Medium (unsupplemented) ซึ่งไม่มีทั้ง FBS และ ยาปฏิชีวนะ ปริมาตร 8.5 ml เข้าด้วยกัน
- 7.3. ผสม cellfectin 8 μ l กับ Grace's Insect Medium (unsupplemented) 100 μ l เข้าด้วยกัน
- 7.4. ผสม pFastBac Dual-E2 1-3 μ g เข้ากับ 100 μ l ของ Grace's Insect Medium (unsupplemented)
- 7.5. ผสมสารใน สารในข้อ 3 และ 4 เข้าด้วยกัน เข้าเบาๆ ทิ้งไว้ประมาณ 15 ถึง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 7.6. เมื่อครบเวลาหยุดสารจากข้อ 5 ลงบนเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ที่ละหยด แล้วบ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง

FuGENE HD Transfection Reagent

- 7.7. ปรับ FuGENE HD Transfection Reagent ให้มีอุณหภูมิ 15 ถึง 25 องศาเซลเซียส เย่เบาๆ
- 7.8. ผสม pFastBac Dual-E2 ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 0.02 μ g/ μ l
- 7.9. ดูดสารในข้อ 7.8 ปริมาตร 100 μ l ลงในเพลท 96 หลุม และเขียนที่หลุมว่า 3:2, 4:2, 5:2, 6:2, 7:2 และ 8:2
- 7.10. ทำ transfection complex โดยการเติม FuGENE HD Transfection Reagent ลงในเพลทในข้อ 7.9 โดยดูในขนาด 3, 4, 5, 6, 7, หรือ 8 μ l
- 7.11. ผสมสารโดยการวางเพลทลงบน rotating shaker นาน 5-10 วินาที และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
- 7.12. เมื่อครบเวลาให้ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติม สารในข้อ 7.11 โดยหยดทีละหยด แล้วเขย่าเพลทเป็นวงกลมโดยใช้ rotating platform shaker นาน 30 วินาทีโดยใช้ความเร็วต่ำ
- 7.13. บ่มเซลล์ที่ 27 องศาเซลเซียส นาน 17 ถึง 72 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจหาการสแดงออกของโปรตีน

8. การทำ Transfection ด้วย Electroporator

ทำการสอดพลาสติกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Electroporation

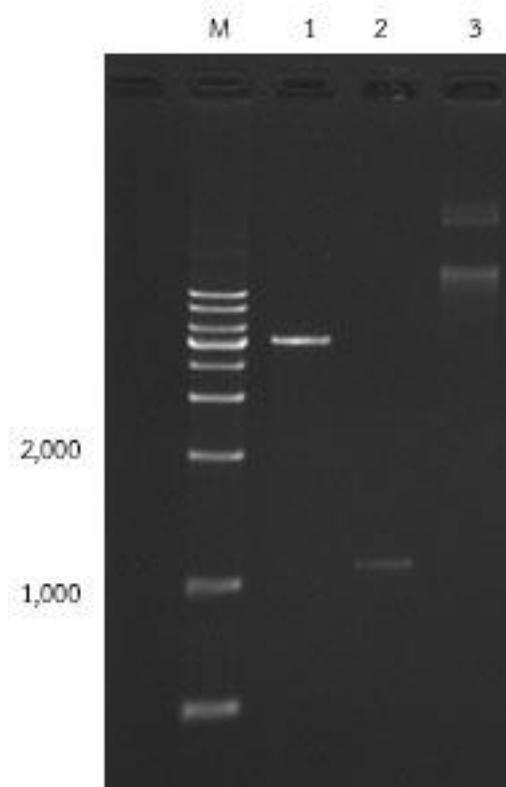
- 8.1. เตรียมเซลล์เจ้าบ้าน 2×10^6 cell/ml ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ log-phase มา centrifuge ที่ความเร็ว 500g นาน 5 min และละลายกลับใน HBS buffer (HEPES buffered saline): 20 mM HEPES, pH 7.05, 1 mM NaH_2PO_4 , 5 mM KCL, 140 mM NaCl and 10 mM glucose ปริมาตร 1 ml แช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อรอการทำ electroporation
- 8.2. Set เครื่อง Electroporation (BioRad) ที่ parameter : 200V, 1000 μ F
- 8.3. นำเซลล์ SF9 ที่เตรียมไว้ 800 μ l ผสมกับ DNA vector 20 μ g ใส่ลงใน cuvette sterile ขนาด 0.4 cm พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

8.4. หลังจากผ่านการ electroporation แล้วนำเซลล์วางไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที ย้ายไปใส่ใน medium 40 μ l บ่มไว้ที่ 28 °C 48 ชั่วโมง นำไปส่องด้วยกล้อง Fluorescent

ผลการทดลอง

การโคลนยีน E2 เข้า pFastBac Dual

ยีน E2 ซึ่งโคลนมาจากไวรัสสายพันธุ์ Alfort/187 (รูปที่ เลข 2) ถูกนำมาแทรกเข้ากับพลาสมิด pFastBac Dual (รูปที่ เลข1) ได้เป็น pFastBac Dual-E2 (รูปที่ เลข 3) จากนั้นจึง transform เข้า DH10bac และเลือก colony ที่ผลิต pFastBac Dual-E2 มากที่สุดมาเพิ่มจำนวน เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการ transfection



รูปที่ แสดงแถบของ pFastBac Dual (เลข 1) ยีน E2 (เลข 2) และ pFastBac Dual-E2 (เลข 3)

การทำ Chemical Transfection

พลาสมิด pFastBac Dual-E2 ที่ได้ถูกเพิ่มจำนวน และสกัดมาจากเซลล์แบคทีเรีย แล้วถูกนำมาทำการ Transfection เพื่อให้เข้าสู่ Cytoplasm ของเซลล์แมลงทั้ง Sf9 และ High 5 พบว่าไม่สามารถนำเซลล์เข้าสู่เซลล์แมลงเจ้าบ้านได้ทั้งสอง ชนิด แม้ว่าจะมีการปรับเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมสารเคมีที่ใช้ รวมไปถึงความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้แล้วก็ตาม

การทำ Electroporation

เนื่องจากการทำ Chemical Transfection ไม่สามารถนำ pFastBac Dual-E2 เข้าสู่เซลล์แมลงได้ ทำให้ต้องเปลี่ยนวิธีการมาเป็นการใช้ Electroporator ซึ่งพบว่าไม่สามารถนำ pFastBac Dual-E2 เข้าสู่เซลล์แมลงทั้งสองชนิดได้เช่นเดียวกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

ระบบการผลิตโปรตีนในห้องทดลองเพื่อนำมาศึกษานั้นมีหลายระบบ ได้แก่ ระบบที่ใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น แบคทีเรีย (Baneyx, 1999) ยีสต์ (Cregg *et al.*, 2000) เซลล์แมลง (Kost *et al.*, 2005) และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Rosser *et al.*, 2005) ในแต่ละระบบมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ซึ่งการจะนำมาใช้นั้นต้องศึกษาข้อดี ข้อเสีย ให้รอบคอบเสียก่อนจึงจะนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสม สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้ ระบบการผลิตโปรตีนจากเซลล์แมลง เนื่องจากมีกระบวนการ glycosylation ซึ่งไม่สามารถพบได้ในระบบของแบคทีเรีย และ ยีสต์ และระบบนี้สามารถสร้างโปรตีนได้ในปริมาณมาก กระบวนการ glycosylation นั้นเป็นกระบวนการเติมกลุ่มของ carbohydrate เข้าไปกับโปรตีนที่สร้างขึ้น เพื่อให้โปรตีนที่สร้างขึ้นนั้นมีโครงสร้างสามมิติที่ถูกต้อง ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ถูกต้องเช่นเดียวกับที่สร้างโดยเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

จากผลการทดลองพบว่ายังไม่สามารถผลิตโปรตีนจากระบบของเซลล์แมลงได้ ถึงแม้ว่าจะใช้ระบบ Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression system ก็ตาม สำหรับสาเหตุของความล้มเหลวในการผลิตโปรตีนจากระบบเซลล์แมลงนั้นได้แก่ ความยากในการ transfect พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แมลง แม้จะได้ใช้ความพยายามในการดำเนินการหลากหลายวิธีเช่น การเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้าน 2 ชนิด ได้แก่ sf9 และ High 5 การใช้ chemical transfection และ electroporation แต่ก็ยังไม่สามารถทำการ transfection ได้สำเร็จ นอกจากความไม่ชำนาญในการทดลองกับเซลล์แมลงของผู้ทดลองแล้วสาเหตุอื่นๆ ที่อาจทำให้การนำยีน E2 เข้าสู่เซลล์แมลงได้แก่ อายุของเซลล์ที่อาจจะค่อนข้างมาก

เนื่องจากผู้ทดลองไม่ประสบความสำเร็จจากการใช้ระบบเซลล์แมลงในการผลิตโปรตีน และผู้ทดลองประเมินแล้วว่า มีประสบการณ์ในการทำงานกับระบบดังกล่าวนี้เพียงเล็กน้อย ถึงแม้จะได้มีการปรึกษาและ ดูงานจากหน่วยงานอื่นที่ทำการศึกษาระบบของเซลล์แมลงเช่น ที่ Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Centre for Virus Disease of Animals, Insel Riems, Germany หรือที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) แล้วก็ตาม แต่ทางผู้ทดลองมีประสบการณ์ในการทำงานกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากกว่า ดังนั้น ในการทดลองปีที่ 2 ทางผู้ทดลองจึงขอเปลี่ยนระบบการผลิตโปรตีนจากที่ผลิตในเซลล์แมลง มาเป็นระบบการผลิตโปรตีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งได้แก่ การใช้ CHO cells

เอกสารอ้างอิง

- สมใจ ศรีหาคิม, นิยมศักดิ์ อุปทุม, นิमित ลีสิริกุล และ วิมล จิระชนะวัฒน์ (2524): การระบาดของโรคอหิวาต์สุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย *สัตวแพทย์สาร* 32 (3), 163-170
- สมใจ ศรีหาคิม และ นิยมศักดิ์ อุปทุม (2535): อหิวาต์สุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.* 2 (1), 21-32
- สุพล เลื่องยศสื่อชากุล (2534): อหิวาต์สุกรของลูกสุกรหย่านมและแนวทางต่อสู้ที่ได้ผล *สุกรสาร* 10 (69), 9-14
- Aynaud, J.M., 1988, Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Martinus Nijhoff, Boston.
- Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in Escherichia coli. Current opinion in biotechnology 10, 411-421.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids research 7, 1513-1523.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000, Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Molecular biotechnology 16, 23-52.
- Dagert, M., Ehrlich, S.D., 1979, Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6, 23-28.
- De Smit, A.J., Bouma, A., De Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J.M., 2000, Prevention of transplacental transmission of moderately virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine. Vet. Quart. 22, 150-153.
- De Wulf, J., Laevens, H., Koenen, F., Mintiens, K., De Kruif, A., 2002. A comparative study for Emergency vaccination against classical swine fever with an E2 sub-unit marker-vaccine and a C-strain vaccine. In: Proceedings of the International Pigs Veterinary Society, Ames, p. 325.
- Hanahan, D., Meselson, M., 1983, Plasmid screening at high colony density. Methods in enzymology 100, 333-342.
- Hanson, R.P., 1957, Origin of hog cholera. J Am Vet Med Assoc 131, 211-218.
- Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L., 2005, Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature biotechnology 23, 567-575.
- Meyers, G., Thiel, H.J., 1996, Molecular characterization of pestiviruses. Advances in virus research 47, 53-118.
- Rosser, M.P., Xia, W., Hartsell, S., McCaman, M., Zhu, Y., Wang, S., Harvey, S., Bringmann, P., Cobb, R.R., 2005, Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. Protein expression and purification 40, 237-243.
- Stegeman, A., Elbers, A., de Smit, H., Moser, H., Smak, J., Pluimers, F., 2000, The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. Veterinary microbiology 73, 183-196.

- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M., Damrongwatanapokin, S., 2001, The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 83, 177-189.
- van Oirschot, J.T., 2003, Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Veterinary microbiology* 96, 367-384.
- Widjoatmodjo, M.N., van Gennip, H.G., Bouma, A., van Rijn, P.A., Moormann, R.J., 2000, Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J Virol* 74, 2973-2980.
- Yu, X., Tu, C., Li, H., Hu, R., Chen, C., Li, Z., Zhang, M., Yin, Z., 2001, DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine* 19, 1520-1525.