วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 3 เล่มที่ 1 มีนาคม 2535

The Journal of Veterinary Biologics Vol.3 No.1 March 1992

* การตรวจหาระยะของความคุ้มโรค ของกาฬโรคเป็ด (ในท้องที่).....1
* Preliminary survey of antibodies to artropod - borne viruses in cattle in the central part of Thailand.....4
* ความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกริยาสังเคราะห์ ของสารในกลุ่ม Aziridine (Binary ethylenimine) ในระยะเวลา และอุณหภูมิต่างๆกัน.....11
* ผลผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการทดลองใช้ไวรัสชนิดบริสุทธิ์ และเข้มข้นเป็น inoculum.....17
* การผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่น โดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์.....21
* ศึกษาการผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีส ชนิดลดได้ส.....24
* การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนไข้ขา ในแกะ และ สัตว์ทดลองขนาดเล็ก.....27
* การวัดหาปริมาณ 140 - S อนุภาคสมบูรณ์ ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 31
* การปรับปรุงวิธีหาปริมาณ 140 - เอส พาร์ทิเคิ้ล ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ซูโครสเดนซีตี้เกรเดี้ยน.....42

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

๑ เมษายน ๒๕๓๕

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
บรรณาธิการผู้ช่วย	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	เชิงชาย จันทรัศมี
	บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์
	โสภณ ท้วมแสง
	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	เดิมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ
วัตถุประสงค์	1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์
	2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับใช้วัคซีนป้องกันโรคสัตว์
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน ,มีนาคม และเดือน กันยายน

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS

Editor in chif	Ab Kongthon
Assistance Editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial Board	Cherngchai Chuntarasmi
	Banchon Likitdecharoj
	Sophon Tuamsang
	Somjai Kamolsiripichaiporn
	Dermpol Ratanawonk
Business Office	Division of Veterinary Biologics Phyathai Bangkok Thailand

The Journal of Veterinary Biologics is a publication of the Division of Veterinary Biologics, Department of Livestock Developement intended to make available the results of technical work in the veterinary biological science. The Journal of Veterinary Biologics edition is issued 2 times per year in March and September

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับคือเดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

1. **ต้นฉบับ** ควรพิมพ์ลงบนกระดาษขนาด 8.5 x 11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ความยาวประมาณ 25 บรรทัดต่อหน้า มีความยาวทั้งหมด 8 หน้าพิมพ์ โดยประมาณ

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ให้เขียนนำหน้าต้นเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของต้นเรื่อง ควรเขียนทั้งภาษาไทยและอังกฤษ

5. **เนื้อหา** (Text) สำหรับงานวิจัย ควรประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้

5.1 *คำนำ (Introduction)* เพื่ออธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ และอาจรวมการตรวจเอกสาร (literature review) เข้าไว้ด้วยกัน

5.2 *อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)* ควรประกอบด้วย

5.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการที่ใช้ทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 *ผล (Results)* เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็น ถ้ามีตาราง กราฟหรือรูปภาพก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 *วิจารณ์ (Discussion)* เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านหลักฐานที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 *เอกสารอ้างอิง (Literature cited)*

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a,b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อต้นนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินโดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น.หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิตให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขและแสดงจำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอักษรตัวหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือควรให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. **ภาพประกอบ (Illustration)**

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจริงใช้และผู้เขียนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 x 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียนเขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเต็ม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อหาความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การตรวจหาระยะของความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด (ในท้องที่)

DURATION OF IMMUNITY OF DUCK PLAGUE VACCINE (FIELD SURVERY)

โสภณ ท้วมแสง[1] สุวรรณี ท้วมแสง[1] วิมล ปริยกนก[1]

Sopon Tuamsang Suwonee Tuamsang Wimon Pariyakanok

ABSTRACT

The potency of duck plague vaccine was studied in field trial (Chonburi province). Ducks at 3 months of age were injected with field dose of vaccine intramuscularly and then challenged with virulent duck plaque virus for 8 monthly intervals. The result showed that the immunity of vaccinated ducks against duck plague virus last for six months.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดในท้องที่ (จังหวัดชลบุรี) พบว่าเป็ดที่ได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดเพียงครั้งเดียว แล้วนำมาฉีดเชื้อพิษทับหลังจากฉีดวัคซีนทุก ๆ เดือน พบว่าเป็ดมีอัตราการให้ความคุ้มโรคได้ถึงเดือนที่ 6

คำนำ

ในปัจจุบันเกษตรกรมีการเลี้ยงเป็ดมากขึ้น ทำให้อัตราการใช้วัคซีนป้องกันโรคระบาดมีมากขึ้น วัคซีนกาฬโรคเป็ดเป็นวัคซีนชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ป้องกันโรคระบาดในท้องที่ ตามปกติการใช้วัคซีนชนิดนี้จะทำการกระตุ้นซ้ำทุก ๆ 6 เดือน แต่ในบางครั้งการใช้วัคซีนยังไม่ถูกต้องตามหลักวิชาเมื่อยังไม่ครบกำหนดการฉีดในครั้งต่อไป ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย เพิ่มต้นทุนการผลิตในสัตว์ปีก สุวรรณี และคณะ (2533) ได้ศึกษาพบว่าจากการทดลองตรวจหาระยะความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ดในห้องปฏิบัติการที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ เป็ดที่ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวสามารถมีอัตราการให้ความคุ้มโรคถึงเดือนที่ 18 เมื่อนำมาฉีดเชื้อพิษทับ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนี้ขึ้นมา เพื่อศึกษาอัตราการให้ความคุ้มโรคในเป็ดท้องที่ที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากห้องปฏิบัติการ ว่าสามารถสร้างภูมิคุ้มโรคได้กี่เดือน เมื่อฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัคซีนกาฬโรคเป็ด ชนิดเชื้อเป็นที่ผลิตขึ้นจากศูนย์ผลิตวัคซีน มี Virus titer $10^{5.5}$ $TCID_{50}$ ต่อมิลลิลิตร เป็นวัคซีนที่ผ่านการทดสอบคุณภาพและผลิตออกใช้ในท้องที่

2. ไวรัสเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดชนิดท้องที่ (Local strain) ซึ่งเก็บมาจากจังหวัดชลบุรี และนำมาหาค่า Virus titer ในเป็ด

3. เป็ดไม่จำกัดเพศพันธุ์อายุประมาณ 3 เดือนจำนวน 130 ตัว เป็นเป็ดที่เลี้ยงที่ฟาร์ม ๆ หนึ่งในจังหวัดชลบุรีและไม่เคยฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดมาก่อน

4. เป็ดควบคุม (Control group) จำนวน 40 ตัว เป็นเป็ดที่ผลิตขึ้นจากฝูงเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อำเภอปากช่อง และไม่เคยฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดมาก่อน

5. เซลล์ตัวอ่อนลูกไก่ อายุ 11 วัน (Chick embryo fibroblast, CEF)

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

วิธีการศึกษา

1. สุ่มเจาะเลือดเป็ดก่อนฉีดวัคซีน เพื่อหาภูมิคุ้มโรคถ่ายทอด (Passive immunity)
2. ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดกับเป็ดจำนวน 130 ตัว ขนาดโด๊สในห้องที่เข้ากล้ามเนื้อขา และทำการเลี้ยงเป็ดเหล่านี้ไว้ในฟาร์ม ๆ หนึ่งในจังหวัดชลบุรี
3. หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว ทุก ๆ เดือนนำเป็ดที่ฉีดวัคซีนเหล่านี้มาฉีดเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดทับด้วยขนาด 10^4-10^5 DLD_{50} ต่อตัวเดือนละ 15 ตัว พร้อมกับเป็ดดาบคุม 5 ตัว โดยนำมาฉีดพิษทับที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
4. ก่อนฉีดเชื้อพิษทับทุกครั้ง เจาะเลือดเป็ดเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปหาระดับแอนติบอดี้
5. ตรวจหาระดับแอนติบอดี้โดยวิธี Neutralization test เพื่อหาค่า Neutralising Index (NI)(Constant serum,varying virus)
6. ดูอัตราการตายและรอดของกลุ่มเป็ดที่ฉีดวัคซีนหลังฉีดพิษทับเปรียบเทียบกับกลุ่มดาบคุมทุก ๆ เดือน

ผลการทดลอง

พบว่าเป็ดในห้องที่ก่อนฉีดวัคซีนจะมีค่า Neutralising Index (NI) อยู่ระหว่าง 0.1-0.3 ซึ่งแสดงถึงการไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด จากตารางที่ 2 เป็ดหลังการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดแล้วนำมาฉีดเชื้อพิษทับในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนที่ 1,2,3,4,5,6,7 และ 8 มีอัตราการให้ความคุ้มโรคดังนี้ 100,93.33,93.33,100,93.33,86.67,53.33 และ 53.33 เปอร์เซนต์ตามลำดับ และค่า Neutralising index ของซีรัมในเป็ดเหล่านี้ก่อนนำไปฉีดพิษทับอยู่ระหว่าง 1.5-2.8 ในขณะที่เป็ดดาบคุมแต่ละกลุ่มเมื่อนำไปฉีดเชื้อพิษอัตราการตายเป็น 100 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 1)

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองในห้องทดพบว่าวัคซีนกาฬโรคเป็ดเมื่อนำไปฉีดเป็ดเพียงครั้งเดียวสามารถให้ภูมิคุ้มกันโรคได้เพียง 6 เดือน(ตารางที่ 2) และหลังจากนั้นในเดือนที่ 7 อัตราการให้ความคุ้มโรคจะลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง ดังนั้นควรฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำอีกครั้งหนึ่งเมื่อครบ 6 เดือนเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกัน ซึ่งตรงกับคำแนะนำการใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ดของกรมปศุสัตว์ที่ให้ทำการกระตุ้นทุก ๆ 6 เดือน

สาธรณี และคณะ (2533) ได้ศึกษาพบว่าจากการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ เป็ดที่ได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดเพียงครั้งเดียวสามารถให้ภูมิคุ้มโรคได้ถึงเดือนที่ 18 เมื่อนำมาฉีดพิษทับ แต่จากการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองในห้องที่ ซึ่งสภาพแวดล้อมต่างแตกต่างจากห้องปฏิบัติการโดยสภาพของเป็ดที่ถูกเลี้ยงในห้องที่เสี่ยงต่อการติดโรคสูง และขึ้นอยู่กับการจัดการฟาร์มของเกษตรกร ถ้าการจัดการไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการเป็นโอกาสที่เป็ดในห้องที่จะมีภาวะความคุ้มโรคไม่ดีเท่ากับในห้องปฏิบัติการ ภาวะความคุ้มโรคในเป็ดหลังที่จะลดลงเร็วขึ้น ดังนั้นการกระตุ้นวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่ใช้ในห้องทดควรจะกระตุ้นทุก ๆ 6 เดือน

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการตายของเป็ดหลังฉีดวัคซีนแต่ละเดือน โดยการฉีดเชื้อพิษทับ

จำนวนเดือนหลังการฉีดวัคซีน	อัตราการตายของเป็ดหลังการฉีดพิษทับ (จำนวนตาย/จำนวนฉีดพิษทับ)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
กลุ่มฉีดวัคซีน	0/15	1/15	1/15	0/15	1/15	2/15	7/15	7/15
กลุ่มดาบคุม	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

ตารางที่ 2 แสดงค่า Neutralizing index (NI) และ Protection rate ของกลุ่มเป็ดหลังฉีดวัคซีน ตั้งแต่เดือนที่ 1-8

เดือนหลังฉีด	NI ก่อน challenge (X)	Protection rate (%)
1	2.8	100
2	2.7	93.33
3	1.5	93.33
4	1.7	100
5	1.84	93.33
6	1.5	86.67
7	1.5	53.33
8	1.5	53.33

เอกสารอ้างอิง

สาธารณ์ ห้ามแสง และสายชล จันทร์สว่างกุ, 2533 : การตรวจหาระยะของความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด วารสารชำผลิตภัณฑ์ 1 (1) : 1-4

Dardiri, A.H., and W.R. Hess. The incidence of neutralizing antibodies to duck plaque virus in serums from domestic ducks and wild water fowl in the United States of America Proc. 71 st Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Assoc. 1967. pp. 225-237.

R.E. Gough. 1984. Laboratory confrimed outbreaks of duck virus enteritis (duck plague) in the United Kingdom from 1977 to 1982., Vet. Reccord. 114 : p 262-265.n

PRELIMINARY SURVEY OF ANTIBODIES TO ARTHROPOD-BORNE VIRUSES IN CATTLE IN THE CENTRAL PART OF THAILAND

Aree Supcharoen[1] Prateep Pemayothin[1] Urasri Tantaswasdi[1]
Tomiaki Morimoto[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาอัตราการติดโรคไวรัสที่มีแมลงเป็นตัวนำโรค โดยการตรวจหา antibody titer ด้วยวิธี serum neutralization test และ haemagglutination test พบผลบวกของ SN titer ของ BEF 95.5% ค่าเฉลี่ย titer 11.3, HI titer ของโรค Akabane 95.5% ค่าเฉลี่ย titer 32.5, HI titer ของโรค Ibaraki 98.3% ค่าเฉลี่ย titer = 20 และ HI titer ของโรค JE พบผลบวก 21.9% และ 70% ในวัวนำเข้าและวัวพื้นเมืองตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงว่ามี การระบาดของโรคไวรัสที่มีแมลงเป็นตัวนำ ในภาคกลางของประเทศไทย

ABSTRACT

The distribution of antibodies against arthropod-borne viruses such as bovine ephemeral fever(BEF),Akabane, Ibaraki, and Japanese encephalitis (JE) viruses in cattle in the central part of Thailand was examined using the serum neutralization (SN) test or the hemagglutination-inhibition (HI) test.

A positive SN antibody rate of 95.5% and geometric mean (GM) titer of 11.3 were found to BEF virus. Paired sera were obtained on August 31st and September 17th, 1990. During this period, the GM of SN titer to BEF virus increased from 8.6 to 29.9, indicating that the virus was epizootic at that time.

HI antibody against Akabane virus was detected at a positive rate of 95.5% and 32.5 GM titer. Paired sera were obtained from bovine herds affected by abortion and stillbirth, at shortly after delivery and 17 days after the first bleeding. The HI antibody titers to Akabane virus increased in 3 out of 4 of the cows that had aborted.

Distribution of HI antibody to Ibaraki virus was 98.3% and GM titer was 20, suggesting that Ibaraki virus was already present in Thailand.

Prevalence of HI antibody against JE virus was examined in cattle imported from countries where JE virus was nonenzootic. The cattle in Thailand for less than 3 weeks had scarcely any antibody to JE virus, but increased their possessive the rate of antibody to JE virus with progress of their residing in Thailand. But incidence was lower in comparison with indigenous cattle of the same province.

These results indicated the prevalence of several bovine arthropod-borne viruses in the central part of Thailand.

INTRODUTION

The tropical climate and natural environments of Thailand are suitable for the insects inhabitation,especially mosquitoes and midges.They breed all the year round in rice fields,puddles,ponds,canals and rivers in tropics. Some species of these insects are known to transmit several viral diseases of cattle by biting as a vector.

This paper deals with a preliminary survey of antibodies against.such arthropod-borne viruses in cattle in the central part of Thailand.

---

[1]National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development, Bangkhen, Bangkok, 10900, Thailand

MATERIALS AND METHODS

Viruses : The viruses examined in these experiments are listed in Table 1. In this table, classification and nomenclature, diseases in cattle, and vectors of these viruses are also included for reference.

Serum samples : Serum samples were obtained from the central part of Thailand during 1989 and 1990, from herds in which unidentified diseases occurred. They were brought to the National Animal Health and Production institute (NAHPI) for examination and diagnosis. All serum samples were kept at -20°C. until examination.

Serum neutralization (SN) test : The SN test of bovine ephemeral fever (BEF) virus was carried out using the serum dilution and constant virus amount method. All sera were inactivated at 56°C. for 30 minutes and serial two-fold serum dilutions were mixed with equal volumes of virus suspension containing about 200 $TCID_{50}$ of YHL strain of BEF virus (Inaba et al. 1968). The mixtures were incubated at 37°C. for 60 minutes and inoculated in cell cultures of HmLu-1, an established baby hamster lung cell line. After incubation at 37°C. for 7 days in a CO_2 incubator, the inhibition of cytopathic effect was observed and 50% SN titer was calculated.

Hemagglutination-inhibition (HI) test : The HI test of Akabane virus was carried out using a commercialdiagnostic kit by the method of Goto et al. (1978). The principle of this method is the same as that of Clark and Casals (1958) but some modifications were made by using a diluent with 0.4 M NaCl, and 0.2 M phosphate at pH 6.0 to 6.2.

The HI test of Ibaraki virus was performed with a commercial diagnostic kit according to the method of Tokuhisa et al. (1983) using cattle erythrocytes and a diluent with 0.6 M NaCl, and 0.2 M phosphate at pH 7.5.

Table 1 Classification and nomenclature of arthropod borne viruses examined in this experiments.

Virus			Diseases in cattle	Vector
Family	Genus	Species		
Rhabdoviridae	Ungrouped	Ephemeral fever virus	Fever, anorexia, depression, nasal discharge, Stiffness, lameness, drop in milk production	Midges, mosquitoes
Bunyaviridae	Simbuvirus	Akabane virus	Abortion, stillbirth, congenital deformities, newborn arthrogryposis and hydranencephaly	Mosquitoes, midges
Reoviridae	Orbivirus	Ibaraki virus	Fever, lachrymation, congestion, edema, erosion, ulcer of mucous membrane, difficulty in swallowing	Midges
Flaviviridae	Flavivirus	Japanese encephalitis virus	Inapparent infection, rarely encephalitis	Mosquitoes

Antibodies for Japanese encephalitis (JE) virus were measured by the HI test according to the method of Clark and Casals (1958). The antigen was prepared from infected suckling mouse brains by the sucrose-acetone extraction method, and goose erythrocytes were used.

HI antibody titer was calculated by the reciprocal of the highest serum dilution which inhibited hemagglutination, and 10 or above was regarded as positive.

RESULTS

A positive SN antibody rate of 95.5% and geometric mean (GM) titer of $2^{3.5}$ (11.3) was found in 155 bovine sera to BEF virus (Fig 1). Paired sera were obtained in Phetchaburi province on August 31st and September 17th, 1990. During this period, the GM of SN titer to BEF virus increase from $2^{3.1}$ (8.6) to $2^{4.9}$ (29.9), indicating that the virus was epizootic in this period (Fig 2).

A high HI antibody incidence of 95.5% and GM Titer of 32.5 was found for Akabane virus (Fig 3). Paired sera were obtained from herds affected by bovine abortion and stillbirth, at shortly after delivery and 17 days after the first bleeding. The HI antibody titer to Akabane virus increased in 3 out of 4 of the cows aborting (Fig 4).

Distribution of HI antibody to Ibaraki virus among 59 cattles in Saraburi province was 98.3% and GM titer was 20 suggesting that Ibaraki virus was already present in Thailand (Fig 5).

Prevalence of HI antibody against JE virus was examined in the sera of cattle imported from countries where JE virus was non-enzootic. Fifty nine sera were obtained from cattle 17 days after their arrival in Thailand from Costa Rica while being reared in Lopburi province for quarantine. Only 2 sera had antibody to JE virus in low titer; the positive rate was 3.4%. By contrast, sera collected from cattle imported from Australia and residing for 2 years in Phetchabun province,had antibody to JE virus at a positive rate of 21.9% with relatively higher HI titer, but a lower incidence than that of indigenous cattle of the same Phetchabun provine, whose positive rate being 70% (Table 2).

DISCUSSION

There is little information of the existence and prevalence of arthropod-borne viruses infection in cattle in Thailand, except for BEF virus. Wongwatcharadumrong et al. (1984) reported the results of preliminary antibody survey against BEF virus in cattles and buffaloes in the southern part of Thailand. Virakul et al. (1987) investigated an outbreak of bovine epizootic disease among imported dairy cattle raised at Muag-lek, Saraburi province and confirmed this outbreak was BEF virus infection by clinical and serological examination, but did not succeed in isolating the causal agent.The present serological survey reaffirmed these results of prevalence and epizoosis of BEF virus in Thailand.

The occurrence of abortion, stillbirth and infertility in dairy cattle imported from foreign countries has been noticed by field veterinarians but the details of incidence and causal agents were unclear. Akabane virus is one of the viruses causing bovine abortion,stillbirth, and congenital deformities (Inaba & Matumoto, 1981). There were no reports of infections of Akabane virus in cattle in Thailand, but the present results indicate the existence and a prevalence of the virus infection in cattle.

Ibaraki virus, closely related to bluetongue virus, causes a febrile disease, produces lesions in mucous membranes and developes difficulty in swallowing in the cattle. The virus and antibody have been found in Japan,

FIG 1 DISTRIBUTION OF NEUTRALIZATION ANTIBODY AGAINST BOVINE EPHEMERAL FEVER VIRUS AMONG CATTLE IN THAILAND.

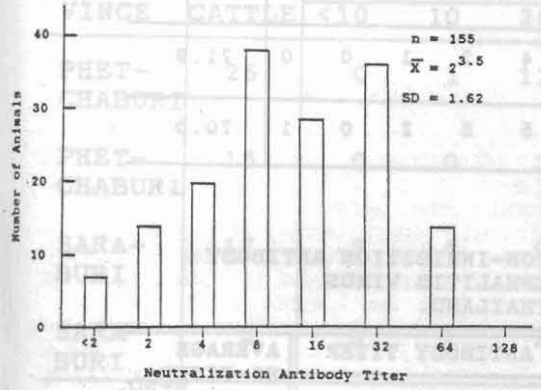


FIG 2 DETECTION OF NEUTRALIZATION ANTIBODY AGAINST BOVINE EPHEMERAL FEVER VIRUS IN SERA OF DAIRY CATTLE RESIDING PHETCHABURI PROVINCE OCCURED ABORTION, STILLBIRTH AND STIFF GAIT.

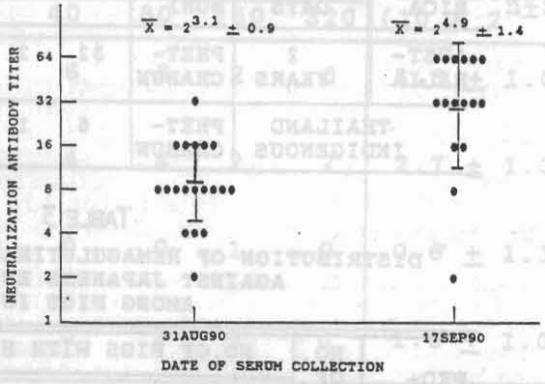


FIG 3 DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGAINST AKABANE VIRUS AMONG CATTLE IN THAILAND.

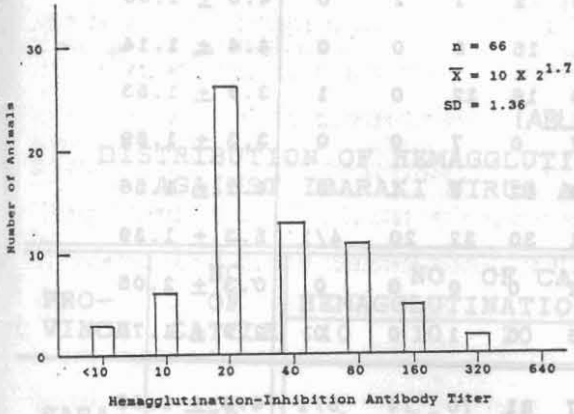


FIG 4 DETECTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGINST AKABANE VIRUS AMONG CATTLE OCCURED ABORTION, STILLBIRTH, STIFF GAIT, RESIDING PHETCHABURI PROVINCE.

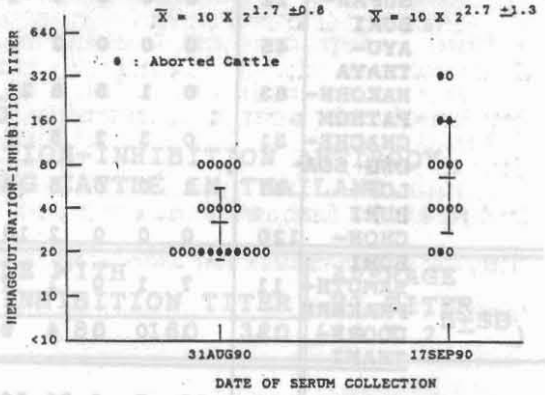


FIG 5 DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY TITERS AGAINST IBARAKI VIRUS AMONG CATTLE RESIDING IN CENTRAL REGION OF THAILAND.

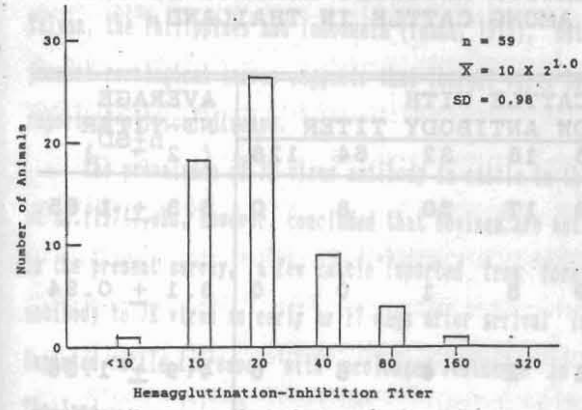
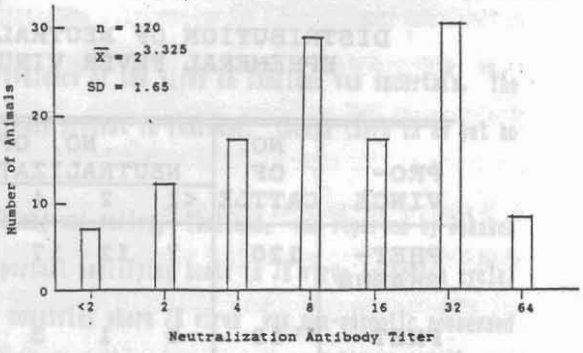


FIG 6 DISTRIBUTION OF NEUTRALIZATION ANTIBODY TITERS AGAINST BOVINE EPHEMERAL FEVER VIRUS AMONG CATTLE RESIDING PETCHABOON PROVINCE



Neutralization test : Constant virus amount (100 $TCID_{50}$) and variety serum dilution method was employed. YHL strain of BEF virus and HmLu-1 cell culture system was used. The neutralization titer was determined as reciprocal of the highest serum dilution which inhibited completely of viral cytopathic effects.

TABLE 2

DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGAINST JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AMONG IMPORTED CATTLE IN THAILAND.

IMPORTED FROM	DURATION IN THAILAND	RESIDE PROVINCE	NO. OF CATTLE WITH HI-ANTIBODY <20	20	40	80	160	320	640	POSITIVE RATE (%)
COSTA RICA	17 DAYS	LOP-BURI	57	0	2	0	0	0	0	3.4
AUSTRALIA	2 YEARS	PHET-CHABUN	32	2	4	2	1	0	0	21.9
THAILAND INDIGENOUS		PHET-CHABUN	6	1	5	5	2	0	1	70.0

TABLE 3

DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGAINST JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AMONG PIGS IN THAILAND.

PROVINCE	NO. OF PIGS	NO.OF PIGS WITH HI ANTIBODY TITER <10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	AVERAGE HI-TITER ($10 \times 2^{\bar{n}\pm SD}$)
SARABURI	28	1	0	0	3	6	7	6	4	1	0	4.0 ± 1.66
SUPANBURI	12	0	0	0	1	1	5	2	1	2	0	4.6 ± 1.50
AYUTHAYA	45	0	0	0	2	9	11	15	8	0	0	4.4 ± 1.14
NAKORNPATHOM	83	0	1	5	8	21	19	16	12	0	1	3.9 ± 1.53
CHACHEONG SOA	31	0	3	2	5	7	7	0	7	0	0	3.3 ± 1.89
LOPBURI	37	1	0	0	5	3	10	12	5	1	0	4.2 ± 1.56
CHONBURI	120	0	0	0	2	10	21	30	32	20	4/1	5.3 ± 1.39
SAMUTHPRAKARN	11	7	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0.3 ± 2.05
UDORNTHANI	14	1	0	1	4	2	5	0	1	0	0	2.9 ± 1.70
TOTAL	381	10	5	8	31	59	87	81	70	24	5/1	4.3 ± 1.80

TABLE 4

DISTRIBUTION OF NEUTRALIZATION ANTIBODY AGAINST BOVINE EPHEMERAL FEVER VIRUS AMONG CATTLE IN THAILAND.

PROVINCE	NO. OF CATTLE	NO. OF CATTLE WITH NEUTRALIZATION ANTIBODY TITER <2	2	4	8	16	32	64	128	AVERAGE NT-TITER ($2^{\bar{n}\pm SD}$)
PHET-CHABUN	120	7	12	17	29	17	30	8	0	3.3 ± 1.65
PHET-CHABURI	19	0	1	3	9	5	1	0	0	3.1 ± 0.94
PHET-CHABURI	16	0	1	0	1	2	6	6	0	4.9 ± 1.36
TOTAL	155	7	14	20	39	24	37	14	0	3.5 ± 1.62

TABLE 5

DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGAINST AKABANE VIRUS AMONG CATTLE IN THAILAND.

PROVINCE	NO. OF CATTLE	NO. OF CATTLE WITH HEMAGGLUTINATION-INHIBITION TITER							AVERAGE HI-TITER ($10 \times 2^{n \pm SD}$)
		<10	10	20	40	80	160	320	
PHET-CHABURI	26	0	1	12	6	5	2	0	1.8 ± 1.06
PHET-CHABURI	15	0	0	3	4	4	2	2	2.7 ± 1.33
SARA-BURI	17	3	4	9	0	0	1	0	0.6 ± 1.18
SARA-BURI	8	0	1	2	3	2	0	0	1.8 ± 1.04
TOTAL	66	3	6	26	13	11	5	2	1.7 ± 1.36

TABLE 6

DISTRIBUTION OF HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODY AGAINST IBARAKI VIRUS AMONG CATTLE IN THAILAND.

PROVINCE	NO. OF CATTLE	NO. OF CATTLE WITH HEMAGGLUTINATION-INHIBITION TITER							AVERAGE HI-TITER ($10 \times 2^{n \pm SD}$)
		<10	10	20	40	80	160	320	
SARA-BURI	59	1	18	26	9	4	1	0	1.0 ± 0.98

Taiwan, the Philippines and Indonesia (Inaba, 1975), but prevalence of the virus in Thailand was uncertain. The present serological survey suggests that Ibaraki virus is already present in Thailand, though there is as yet no report of clinical disease.

The prevalence of JE virus antibody in cattle in the Chiang-mai valley, Thailand, was reported by Johnsen et al.(1974),who, however, concluded that bovines are not important amplifying hosts in JE virus infection cycle. In the present survey, a few cattle imported from foreign countries where JE virus was non-enzootic possessed antibody to JE virus as early as 17 days after arrival in Thailand. The incidence of antibody to JE virus in imported cattle increased with prolonged residence in this country, indicating that JE virus is enzootic in Thailand.

REFERENCES

1. Clarke, D.H. and Casals, J. (1958). Techniques for hemaglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7:561-573.

2. Goto, Y., Inaba, Y., Miura, Y., Kurogi, H., Takahashi, E., Sato, K. Omori,T., Hanaki, T., Sazawa, H., and Matumoto, M. (1978). Hemagglutination-inhibition test applied to the study of Akabane virus infection in domestic animals. Vet. Microbiol. 3:89-99.

3. Inaba, Y. (1975). Ibaraki disease and its relationship to bluetonge. Aust. Vet. J. 51:178-185.

4. Inaba, Y. and Matumoto, M. (1981). Congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome. Virus diseases of food animals. Vol. II. pp. 653-671. Edited by Gibbs, E.P.J. Academic Press, London.

5. Inaba, Y., Tanaka, Y., Sato, K., Ito, H., Omori, T. and Matumoto, M (1968). Propagation in laboratory animals and cell cultures of a virus from cattle with bovine epizootic fever. Jpn. J. Microbiol. 12:253-255.

6. Johnsen, D.O., Edelman, R., Grossman, R.A., Muangman, D., Pomsdhit, J. and Gould, D.J. (1974). Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmai valley, Thailand. Am. J. Epidemiol. 100:57-68.

7. Tokuhisa, S., Inaba, Y., Miura, Y., Sato, K. and Matumoto, M. (1983). Salt-dependent hemagglutination with Ibaraki virus and its inhibition by specific antisera. Jpn. J. Vet. Sci. 45:15-21

8. Virakul, P., Wongwatcharadumrong, R. and Nittichai, K. (1987). Prevalence of bovine ephemeral fever disease in dairy cattle at Muag-lek district. Thai. J. Vet. Med. 17:253-260.

9. Wongwathcharadumrong, R. Chaipoca, C. and Kishi, S. (1984). Preliminary report of neutralizing antibody examination in bovine ephemeral fever in the southern part of Thailand. Thai. J. Vet. Med. 14:23-30.

ความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกริยาสังเคราะห์ของสารในกลุ่ม AZIRIDINE (BINARY ELHYLENIMINE) ในระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

A RELATION OF AZIRIDINE GROUP CYCLIZATION (BINARY ELHYLENIMINE) IN THE VARIOUS TIME AND TEMPERATURE

มนตรี มนต์มธุรพจน์[1] นริศ ว่องวัฒนากูล[1] พิจิตร มกรเสน[1]

Montri Montmaturapoj Naris Wongwattanakul, Pichit Makarasen

ABSTRACT

At present, foot and mouth disease viruses (FMDV) were inactivated with Binary ethylenimine (BEI) from the cyclization reaction of 2-Bromo ethylamine (BEA) under alkaline solution. (1,3,6)

Preparation of BEI by reaction of 0.14 N. soda solution at 37°C., 3 hours, provides suitable pH 7.5-7.7 to inactivate FMDV. To extend the time of reaction pH will be slowly decreased.Another preparation of BEI with 0.2N. soda solution gave high pH and quite stable between pH 9-10. The experiments has done by storage both of BEI-preparation at 5°C. for 1 week, this temperature keep pH more stable, properties of inactivation with FMDV still be efficient.

บทคัดย่อ

การ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบัน ใช้สาร Binary ethylenimine (BEI) ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกริยาสังเคราะห์ของสาร 2-Bromo ethylamine (BEA) กับสารละลายโซดา (NaOH) (1,3,6)

BEI ที่เตรียมจากสารละลายโซดาความเข้มข้น 0.14 N ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 3 ชั่วโมง จะมี pH ประมาณ 7.5-7.7 ซึ่งพบว่าเหมาะสมในการใช้ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เมื่อปล่อยให้ปฏิกริยาเกิดต่อไปพบว่า pH ของ BEI จะค่อย ๆ ลดต่ำลง ส่วนสารละลาย BEI ที่เตรียมจากสารละลายโซดา ความเข้มข้น 0.2 N จะให้ pH สูงและค่อนข้างคงที่ระหว่าง 9-10 ในการทดลองโดยเก็บ BEI ที่เตรียมจากสารละลายโซดาทั้งสองความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 5°C. นาน 1 สัปดาห์ พบว่าที่อุณหภูมินี้ pH ของสารละลายคงที่มากขึ้น คุณสมบัติในด้าน inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยยังมีประสิทธิภาพเช่นเดิม

คำนำ

การ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) โดย aziridines หรือ ethylenimine (EI) derivatives ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 (1) N-acetyl Ethylenimine (AEI) เป็น aziridine ตัวแรกที่มีรายงานถึงการใช้ inactivate FMDV ในการผลิตวัคซีน (4) แต่ AEI ยังมีคุณสมบัติที่ไม่ดีเนื่องจากไม่คงทนในอุณหภูมิปกติ ต่อมาพบว่า EI มีคุณสมบัติดีในการ inactivate FMDV และยังคงทนได้ในอุณหภูมิปกติแต่ความเป็นพิษสูง ใช้ไม่สะดวกและอันตรายหากนำมาใช้ปริมาณมาก ๆ เช่นในขบวนการผลิตวัคซีน (3)

ต่อมาได้พบว่า formation ของ EI ที่ได้มาจากปฏิกริยาของ 2-Haloalkylamines (2-bromethylamine) ภายใต้สภาพความเป็นด่าง EI ที่ได้มีคุณสมบัติที่ดีความเป็นพิษน้อยลง มีความคงทนในอุณหภูมิปกติพอสมควร จึงได้เรียกสารตัวใหม่นี้ว่า Binary Ethylenimine เพื่อให้แยกออกจาก pure EI (1) การใช้ BEI ในการผลิตวัคซีน FMD จึงเป็นอย่างกว้างขวาง การเตรียม BEI โดยทั่ว ๆ ไปมักจะพบว่าเป็นการเตรียมเพื่อจะนำมาใช้ทันที (1) มีรายงานว่าสามารถ เตรียม BEI เป็นสต๊อกเก็บไว้และสต๊อกนี้สามารถนำมาใช้ได้ดี (9)

การทดลองนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นว่าจะสามารถเตรียม BEI เก็บเป็นสต๊อกไว้ได้หรือไม่และเก็บได้นานเพียงใด โดยยังมีคุณสมบัติเหมือน ๆ กับ BEI ที่เตรียมใหม่ เพื่อเป็นประโยชน์ในการประหยัดเวลา ลดความยุ่งยากในขบวนการผลิตวัคซีน ลดค่าใช้จ่ายในการผลิต ซึ่งแต่เดิมต้องใช้ BEI ในลักษณะที่ต้องเตรียมใหม่เสมอ

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมไวรัส

ไวรัสไรคยากและเท้าเปื่อยไทป์โอเตรียมจาก IFFA-3 Cell suspension ในถังขนาด 3,200 ลิตรทำการแยกกากเซลล์โดยการ Centrifuge และการกรองด้วยไส้กรองขนาด 3 นม จากนั้นทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Ultrafiltration และทำให้บริสุทธิ์โดยสารเคมีจนได้ไวรัสที่บริสุทธิ์และเข้มข้นสุดท้าย (Total virus) ความเข้มข้น 275 เท่า นำไวรัสนี้มาทำการทดสอบ inactivation ด้วย BEI ที่เตรียมในความเข้มข้นต่างกันและเก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

2. การเตรียมสาร Inactivant BEI

2.1 เตรียม BEA 0.1 M ทำปฏิกริยากับ 0.14 N NaOH solution ที่ 37°C. ใน waterbath เก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มทำปฏิกริยาชั่วโมงที่ 0 (T0) ชั่วโมงที่ 1 (T1) ชั่วโมงที่ 3 (T3) ชั่วโมงที่ 5 (T5) ชั่วโมงที่ 10 (T10) ชั่วโมงที่ 15 (T15) และชั่วโมงที่ 24 (T24) ขณะทำการเก็บทำการตรวจวัด pH ทุกครั้ง ตัวอย่างทั้งหมดนำไปเก็บไว้ใน -20°C. และนำมาตรวจหาค่า Ethyleniimine (EI) ที่เกิดขึ้น BEI ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 5 แบ่งส่วนหนึ่งมาทำการ inactivate ไวรัส ส่วนที่เหลือเก็บใน 5°C. นาน 1 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจวัด pH และหาปริมาณ EI ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำมาทดลอง inactivate ไวรัสโดยวิธีการเดียวกัน

2.2 เตรียม BEA 0.1 M ทำปฏิกริยากับ 0.2 N NaOH solution ที่ 37°C. เช่นเดียวกับ 2.1 เก็บตัวอย่างทำการตรวจหาค่า pH หาปริมาณ EI ที่เกิดขึ้น BEI ชั่วโมงที่ 3 และ 5 แบ่งส่วนหนึ่งมาทำการ inactivate ไวรัส ที่เหลือเก็บใน 5°C. นาน 1 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจวัดค่า pH และหาปริมาณ EI ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำมาทดลอง inactivate ไวรัส เช่นเดียวกัน

3. การ Inactivate ไวรัส

ทำการ inactivate ไวรัสที่เตรียมจากข้อ 1 ด้วยปริมาณ BEI 10% V/V (0.01% final concentration) ทำการ inactivate ที่อุณหภูมิ 25°C. เป็นเวลา 17 ชั่วโมง

4. Inactivation Test

ทำการตรวจตัวอย่างไวรัสที่ inactivate แล้ว ด้วยวิธี inactivation test โดยวิธีการดังนี้

4.1 เตรียม Primary Lamb Kidney cells ในขวดหมุนให้ได้เซลล์เต็มขวด

4.2 ใส่ไวรัสที่ inactivate แล้ว ลงไปในเซลล์ที่เตรียมใน 4.1 ทำการ incubate ที่ 37°C. นาน 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิด CPE ใน 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

4.3 หากตรวจพบว่ามีการเกิด CPE นำ fluid จากข้อ 4.2 นี้ไป passage ลงใน Lamb Kidney cell ต่อไปอีก 2 passage

4.4 หากพบว่าเกิด CPE ทำการตรวจหาไวรัส โดยวิธี Virus infectivity test หรือ 100% hemolysis complement fixation

4.5 หากตรวจตามข้างต้นแล้วไม่พบ CPE แสดงว่าการ inactivate ไวรัสสมบูรณ์ แต่ถ้าเกิด CPE แล้วตรวจตามข้อ 4.4 เป็นไทป์เดียวกับที่ทดลองแสดงว่าการ inactivate ไวรัสไม่สมบูรณ์

ผล

ในตารางที่ 1 จะพบว่าค่า pH ของ BEI ที่เกิดจากความเข้มข้นของด่าง 0.14 N NaOH จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกริยาต่อไป แต่ค่า pH ของ BEI ที่เกิดจากด่าง 0.2 N และลดลงเพียงเล็กน้อย และค่อนข้างจะคงที่เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกริยาต่อไป จากตารางที่ 2 เมื่อเลือก pH ที่เหมาะสมที่สุด (ชั่วโมงที่ 3-5) นำมาเก็บในอุณหภูมิ 5°C. เพื่อให้ปฏิกริยาสิ้นสุดลงเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ พบว่า pH ของ BEI ที่เตรียมจากด่างทั้งสองความเข้มข้นในวันแรกตลอดจนถึงวันสุดท้าย pH ค่อนข้างคงที่ซึ่งหมายความว่า ในกรณีที่เตรียม BEI แล้วไม่สามารถจะนำ BEI นี้มา inactivate ไวรัสได้ทันทีก็สามารถเก็บ BEI นี้ในอุณหภูมิ 5°C. ได้นานถึง 1 สัปดาห์ โดยที่ pH ของ BEI จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปมากนัก

พบว่า pH ของ BEI ขณะเกิดปฏิกริยาที่ 37°C. (ตารางที่ 4) หากนำมาเก็บใน -20°C. pH ในส่วนที่เกิดจากปฏิกริยาของด่าง 0.14 N NaOH จะกลับลดลง แต่ pH ของ BEI ที่เกิดจากปฏิกริยาของด่าง 0.2 N NaOH จะค่อนข้างคงที่

ในส่วนของปริมาณ EI ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 5) พบว่า EI ที่เกิดจากด่าง 0.14 N NaOH ปริมาณ EI จะค่อย ๆ ลดลงและจะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป แต่ในส่วนของ EI ที่เกิดจากปฏิกริยาของด่าง 0.2 N NaOH ปริมาณ EI ที่เกิดขึ้นจะมีมากเป็น 2 เท่าของ EI ที่เกิดจากด่าง 0.14 N NaOH และปริมาณ EI จะค่อนข้างคงที่ แม้จะปล่อยให้เกิดปฏิกริยาต่อไปและจะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10

จากตารางที่ 6 เมื่อทำการ inactivate ไวรัสด้วย BEI ที่เตรียมใหม่ ๆ (3 ชั่วโมง) และแบ่งส่วนหนึ่งนำไปเก็บในอุณหภูมิ 5°C. นาน 1 สัปดาห์ พบว่า Residual EI ที่เกิดเมื่อเริ่ม inactivate (T0) และเมื่อครบเวลา inactivate แล้ว (T17) Residual EI ในส่วนของ BEI ที่เก็บใน 5°C. จะมีปริมาณน้อยกว่า Residual EI ที่เตรียมและใช้ทันที ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณ EI ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกริยาของ BEA และด่าง NaOH เมื่อปล่อยไว้เป็นเวลานาน ๆ ปริมาณ EI จะลดน้อยลงบ้าง แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 1 แสดงค่า pH ของ BEI ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเริ่มทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37°C. จนครบ 24 ชั่วโมง โดยเตรียม BEI 0.1 M ในความเข้มข้นของด่าง (NaOH) ที่ 0.14 N และ 0.2 N

Time (hrs)	BEA 0.1 M in 0.14 N NaOH			BEA 0.1M in 0.2 N NaOH		
	Sample No. 1	Sample No. 2	Sample No. 3	Sample No. 1	Sample No. 2	Sample No. 3
T0	11.53	11.54	11.52	11.56	11.57	11.58
T1	7.79	7.78	7.86	9.75	9.74	9.58
T3	7.60	7.62	7.68	9.78	9.81	9.66
T4	7.52	7.58	7.60	9.84	9.85	9.72
T5	7.43	7.54	7.53	9.89	9.87	9.76
T10	7.23	7.36	7.38	10.00	10.03	9.92
T15	7.10	7.19	7.20	10.02	10.08	9.97
T24	6.95	6.89	7.02	10.07	11.06	10.05

ตารางที่ 2 แสดงค่า pH ของ BEI ที่เก็บตัวอย่างจากชั่วโมงที่ 3 (T3) และชั่วโมงที่ 5 (T5) เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกริยาดำเนินต่อไปในอุณหภูมิ 5°C. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (T = time in hour)

Day	BEA 0.1 M in 0.14 N NaOH		BEA 0.1M in 0.2 N NaOH	
	T3	T5	T3	T5
0	7.63	7.52	9.80	9.87
1	7.97	7.84	10.14	10.26
2	7.97	7.84	10.18	10.27
3	7.96	7.82	10.19	10.27
4	7.89	7.79	10.18	10.26
5	7.83	7.75	10.18	10.25
6	7.76	7.69	10.17	10.24
7	7.65	7.63	10.16	10.24

ตารางที่ 3 สรุปค่า pH ของ BEI จากตารางที่ 2 ที่ชั่วโมงที่ 3 (T3) และชั่วโมงที่ 5 (T5) ของวันแรกและวันที่ 7 เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกริยาต่อไปในอุณหภูมิ 5°C. (T = time in hour)

Day	BEA 0.1 M in 0.14 N NaOH		BEA 0.1M in 0.2 N NaOH	
	T3	T5	T3	T5
0	7.63	7.52	9.80	9.87
7	7.65	7.63	10.16	10.24

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า pH ของ BEI ภายหลังเก็บในอุณหภูมิ -20°C.เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ กับค่า pH ของ BEI ที่เตรียมใหม่ ขณะทำปฏิกริยาที่ 37°C. ก่อนเก็บใน -20°C. (T = time in hour)

Time (hrs)	BEA 0.1 M in 0.14 N NaOH		BEA 0.1M in 0.2 N NaOH	
	37°C.	-20°C.	37°C.	-20°C.
T0	11.54	8.64	11.57	11.59
T1	7.78	7.18	9.74	10.20
T3	7.62	6.98	9.81	10.19
T5	7.54	6.92	9.87	9.76
T10	7.36	6.88	10.03	9.87
T15	7.19	6.90	10.08	10.09
T24	6.89	6.98	10.06	10.30

ตารางที่ 5 การตรวจหาปริมาณของ Ethyleneimine (EI) ในระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่เริ่มทำปฏิกริยา (T0) จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 (T24) จากปฏิกริยาของสาร BEA กับความเข้มข้นต่างสองชนิด 0.14 และ 0.2 N. (NaOH) (T = time in hour) (μ mol = microMol)

Time (hrs)	EI (μ mol/ml)	
	BEA 0.1 M in 0.14 N NaOH	BEA 0.1M in 0.2 N NaOH
T0	38.4	70.5
T1	15.2	71.0
T3	8.3	71.4
T5	8.2	78.5
T10	9.3	65.7
T15	9.4	58.8
T24	9.0	59.6

ตารางที่ 6 ปริมาณ Residual Ethylenimine (EI) (μ mol/ml) ที่เกิดขณะ inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ชั่วโมงเริ่มต้น (T0) และชั่วโมงที่ 17 (T17) หลัง inactivation เปรียบเทียบจากการเตรียม BEI ชั่วโมงที่ 3 ใช้ทันทีหลังเตรียมที่ 37°C. กับหลังจากเก็บใน 5°C. นาน 1 สัปดาห์

Inactivation Time (Hrs)	EI at T 37°C. (μm/ml)		EI at T3 5°C. 1 wk (μm/ml)	
	0.14 N NaOH	0.2 N NaOH	0.14N NaOH	0.2 N NaOH
T0 (Time of contact)	3.97	5.20	2.06	4.80
T17 (Time after inactivation)	2.88	4.56	2.01	4.19

ตารางที่ 7 ผลการทดลอง inactivation test ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ BEI ที่เตรียมหลังเกิดปฏิกริยา 3 และ 5 ชั่วโมง (T3, T5) ในความเข้มข้นต่าง 2 ความเข้มข้น ใช้ทันทีหลังการเตรียมและใช้หลังจากเก็บใน 5°C. นาน 1 สัปดาห์

TEMP.	T3		T5	
	0.14 N NaOH	0.2 N NaOH	0.14N NaOH	0.2 N NaOH
37°C.	complete	complete	complete	complete
5°C. 1 wk	complete	complete	complete	complete

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณ Ethylenimine (EI) ที่เกิดขึ้นในความเข้มข้นของด่าง 0.2 N มีปริมาณสูงมากเมื่อเทียบกับปริมาณ EI ที่เกิดขึ้นในความเข้มข้นต่าง 0.14 N (ตารางที่ 5) และเมื่อนำ BEI ที่เตรียมได้นี้ไปทำการ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ปริมาณ Residual EI ที่เหลือจากการ inactivate ไวรัสในส่วนที่เตรียมจากด่าง 0.2 N ก็ยังมีปริมาณมากกว่า BEI ที่เตรียมจากด่าง 0.14 N (ตารางที่ 6) ซึ่งปริมาณ EI ที่ค้างเหลืออยู่นี้หากมีปริมาณมากเกินไปมักจะพบเสมอว่า ในการทำ inactivation test เซลล์จะตายเพราะเกิด toxic เสมอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ primary cell ในการทดสอบ ซึ่งตรงกับที่ สมใจ กมลศิริพิชัยพร และคณะรายงานไว้ (9) ดังนั้นในการเตรียม inactivant BEI จึงแนะนำว่าควรเตรียมในความเข้มข้นต่าง 0.14 N จะดีกว่าการเตรียมในด่าง 0.2 N ซึ่งการเตรียมในด่าง 0.2 N นี้จะต้องมาเติมสารเคมี ที่จะหยุดปฏิกริยาของ BEI เพื่อไม่ให้เกิด toxic ภายหลัง (9)

จากการเก็บ BEI ที่อุณหภูมิ 5°C. นาน 1 สัปดาห์ พบว่า BEI ที่เตรียมยังคงมีคุณสมบัติในการ inactivate ไวรัสได้ดีพอ ๆ กับ BEI ที่เตรียมใหม่ คุณสมบัตินี้นับว่าเป็นประโยชน์และสามารถนำมาใช้กับงานด้านการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขออบคุณ นายสัตวแพทย์พิจิตร นครเสน และเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีน สนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ได้สนับสนุนการทดลองครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขออบคุณ นายสัตวแพทย์พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ที่กรุณาช่วยตรวจทานและแก้ไข รวมทั้งได้จัดนำพิมพ์เผยแพร่ทางวิชาการเพื่อเป็นประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Bahnemann,H.G. 1975. Binary Ethylenimine as an Inactivant for Foot and Mouth Disease Virus and Its Application for Vaccine Production. Arch Virol 47:47-56.
2. Bahnemann,H.G.1976. Inactivation of Viruses in Serum with Binary Ethyleimine.Journal of Clinical Microbiology, Feb. Vol.3, No.2:209-210.
3. Bahnemann, H.G., Auge de Mello, P., Abaracon, D., Gomes, I. 1974. Immunogenicity in Cattle of Foot and Mouth Disease vaccines inactivated with Binary-Ethylenimine. Bull of int. Epiz. 81 (11-12):1335-1343.
4. Brown, F., Hyslop, N. St G., Joan Crick., Morrow, A.W. 1963. The use of acetylethylenimine in the production of inactivate foot and mouth disease vaccines. J. Hyg., Camb. 61:337-344.
5. Cunliffe, H.R. 1973. Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus with Ethylenimine. Applied Microbiology, Nov. Vol.26, No.5:747-750.
6. Daniel Abaracon., Homero Giacometti., Julio A. Mesquita. 1979. The use of binary ethylenimine (BEI) for the inactivation of foot-and-mouth disease virus produced by different semi-industrial techniques. 8lth Centro Panamericano Fiebre Aftosa 33-34:7-11.
7. Larghi, O.P., Savy, V.L., Nebel, A.E. and Rodriguez, A1976. Ethylenimine-Inactivated Rabies Vaccine of Tissue culture Origin. Journal of clinical Microbiology, Jan. Vol.3 No.1:26-33.
8. Oscar P. Larghi and Ana E. Nebel 1980. Rabies Virus Inactivation by Binary Ethylenimine : New Method for Inactivated Vaccine Production. Journal of Clinical Microbiology, Feb. Vol.11, No.2:120-122.
9. สมใจ กมลศิริพัชยพร และคณะ 2533 อิทธิพลของการเก็บและการเตรียมการ Binary Ethyleneimine (BEI) ต่อการเป็นพิษ และคุณสมบัติในการ Inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 1 เล่มที่ 1 น.47-52

ผลผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการทดลองใช้ไวรัสชนิดบริสุทธิ์และเข้มข้นเป็น INOCULUM

THE VIRUS YIELD OF FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE USING PURIFIED CONCENTRATED VIRUSES AS INOCULUM

มนตรี มนต์มธุรพจน์[1] สินสมุทร นิลฉวี[1]

Montri Montmaturapoj Sinsamoot Nilchavee

ABSTRACT

In the small scale vaccine production of Foot and Mouth Disease virus (FMDV) type O using the purified concentrated viruses as inoculum show that there is no significal difference between the experimental viruses and the routine production viruses using raw virus as inoculum.

บทคัดย่อ

ในการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โดยการใช้ไวรัสชนิดบริสุทธิ์และเข้มข้นเป็น inoculum พบว่าผลผลิตของไวรัสที่ได้จากการเพาะโดยใช้ inoculum แบบนี้ ให้ผลไม่แตกต่างกับผลผลิตที่ได้จากการผลิตไวรัสเพื่อการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีปกติ ซึ่งใช้ raw virus เป็น inoculum

คำนำ

การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีปัจจุบัน มีความยุ่งยากและลำบากในการเตรียม Seed virus ในแต่ละขั้นตอน เพื่อนำไปขยายการผลิตระดับอุตสาหกรรม ปัญหาส่วนใหญ่พบว่าการเตรียม Seed virus ขึ้นมาใหม่ในแต่ละชุด ไม่สามารถจะเก็บรักษาไว้ได้นาน เนื่องจากพบว่าคุณสมบัติด้าน infectivity จะลดต่ำลงอย่างมาก ดังนั้นหากเตรียม Seed virus ขึ้นมาแล้ว และไม่ได้ใช้ในระยะเวลาที่ไวรัสยังคงมีคุณสมบัติที่ดีอยู่ ก็จะต้องทิ้งไปและเตรียมขึ้นมาใหม่ ซึ่งเป็นการยุ่งยาก สิ้นเปลือง และเสียเวลา อีกทั้งปัญหาที่พบบ่อยครั้งก็คือการเตรียม Seed virus แบบ Raw virus นี้จะต้องให้มีความสัมพันธ์กับการผลิตเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการ infect ไวรัส เพื่อการผลิตวัคซีน หากการเตรียม Seed virus และการผลิตเซลล์ไม่สัมพันธ์กัน ผลผลิตไวรัสที่ได้ก็จะไม่ดีเท่าที่ควร

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนำไวรัสที่บริสุทธิ์และเข้มข้นมาใช้เป็น inoculum หากผลผลิต (yield) ที่ได้จากการทดลองนี้ดีเท่ากับผลผลิตเดิมที่ดำเนินการผลิตอยู่ในปัจจุบันหรือดีกว่า ก็จะเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียม Seed virus โดยการเตรียม Seed virus แล้วทำให้เข้มข้นไว้เป็นสต็อกจำนวน ๆ มาก และเก็บไว้ใน Liquid nitrogen โดยแบ่งเป็นชุด ๆ ตามปริมาตรที่จะใช้ในแต่ละครั้ง ไวรัสที่เป็น inoculum นั้น ก็สามารถนำมาใช้ได้ทันที อีกทั้งผลผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละชุดก็จะมีคุณภาพใกล้เคียงกัน ซึ่งจะได้รับทั้งความสะดวกและลดค่าใช้จ่ายในการผลิต เมื่อนำผลจากการทดลองนี้มาใช้กับการผลิตระดับอุตสาหกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ ประกอบด้วย

1. Seed virus (from -70°C.) Type O1s9 (Oudornthani/87)
2. IFFA-3 cell suspension
3. Basal Medium Eagle (BME) with 2% Calf Serum
4. Van Bekkum Medium (VBM)
5. Ethylene Oxide polymer

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

วิธีการ

1. การเตรียม inoculum purified-concentrated virus

ขั้นตอนที่ 1 เตรียม Refreshment virus ในขวด wolff โดยใช้ IFFA-3 Cell suspension ความเข้มข้น 3 x 10^6 cell/ml หลังจากนั้นใช้ Initial virus strain (IVS) ที่เก็บใน -70°C. โดยใช้ปริมาณ 10 ml/10^9 cell เป็น inoculum ทำการเพาะที่ 37°C. pH 7.5 ~ 7.6 ใน water bath โดยใช้ O_2 เป็น aeration ทำการเก็บไวรัส เมื่อเกิด Cytopathic effect ต่อเซลล์ 80-90% ใส่ Chloroform 0.5% V/V ปั่นอย่างแรง 1 ชั่วโมง แล้วเก็บในอุณหภูมิ 5°C.

ขั้นตอนที่ 2 เตรียม Seed batch ในขวดเพาะเหมือนขั้นตอนที่ 1 โดยใช้ refreshment virus ที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 1 เป็น inoculum เมื่อเซลล์เกิด CPE ประมาณ 90% ทำการหยุดเพาะ ใส่ chloroform 0.5% V/V ปั่นอย่างแรง 1 ชั่วโมง เก็บในอุณหภูมิ 5°C.

ขั้นตอนที่ 3 เตรียม production virus ในขวดเพาะ โดยรับเซลล์จากขวดเพาะซึ่งได้เพาะเซลล์เตรียมไว้แล้วมาทำการเพาะให้ได้เซลล์จำนวน >2 x 10^6 เซลล์/ซีซี. แล้วทำการตกตะกอนเซลล์ 1 วัน ถ่ายน้ำยาส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาเพาะไวรัส (VBM) ปรับจำนวนเซลล์ให้มีความเข้มข้น 2 x 10^6 เซลล์/ซีซี. แล้ว infect ด้วยไวรัสที่เตรียมในขั้นที่ 2 (seed batch) จำนวน 10 ซีซี./10^9 เซลล์ เหมือนขั้นตอนที่ 1 เมื่อเกิด CPE ประมาณ 80-90% หยุดทำการเพาะ ใส่ chloroform 0.5% V/V ปั่นอย่างแรงที่ 25°C.นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงที่ 5°C. แล้วตกตะกอนกากเซลล์ไว้อย่างน้อย 20 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 ทำการ clarify ไวรัสด้วยเครื่อง centrifuge ไวรัสส่วนที่ clarify แล้วผ่านเข้ามาเก็บในภาชนะที่ใช้เป็น buffer และขณะเดียวกันก็กรองไวรัสส่วนนี้ด้วยเครื่องกรองขนาด 3 μm ลงเก็บในภาชนะที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและเก็บตัวอย่างไวรัสไว้เป็น inoculum ในการทดลองเพื่อใช้เป็นตัว control ต่อไป

ขั้นตอนที่ 5 ทำไวรัสให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Ultra-filtration ให้มีความเข้มข้น 45 เท่า เก็บไวรัสส่วนเข้มข้นในภาชนะที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ขั้นตอนที่ 6 ทำไวรัสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วยสาร ethylene oxide polymer 3-4% W/V ปั่นอย่างแรง 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 7 ทำการปั่นแยกไวรัสที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ (concentrated purified virus) ด้วยเครื่อง Centrifuge 2800 rpm. นาน 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 8 ถ่ายส่วนใสทิ้งทำการ harvest virus-polyox paste ด้วยอุปกรณ์เฉพาะ ปรับความเข้มข้นของไวรัสให้ได้ 275 เท่า ด้วย Elution medium

ขั้นตอนที่ 9 ทำการปั่นแยกไวรัสที่ 8000 รอบ/นาที นาน 35 นาที เก็บไวรัสส่วนใสใน -70°C. สำหรับใช้เป็น inoculum

ขั้นตอนที่ 10 ไวรัสทุกขั้นตอน ทำการส่งทดสอบหาปริมาณ 140-S และ infectivity titer ($TCID_{50}$)

2. การทดลองเพาะไวรัสโดยใช้ purified-concentrated rivusเป็น inoculum

ทำการเตรียม IFFA-3 cells suspension ในขวดขนาด 5 ลิตร wolff ให้มีความเข้มข้น 2 x 10^6 เซลล์/ซีซี. inoculate ด้วย purified-concentrated virus (ไวรัสที่ได้ทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์) ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 9 ปริมาณ 20 μg/10^9 เซลล์ (ปริมาณ 140-S เป็น μg) ปรับ pH ของน้ำยาเพาะ 7.5-7.6 เพาะที่อุณหภูมิ 37°C. ทำการเก็บไวรัสเมื่อเซลล์เกิด CPE 80-90% หลังจากนั้นเติม chloroform 0.5% V/V ปั่นที่ 25°C. นาน 1 ชั่วโมง ทำการส่งตัวอย่างไวรัสหาปริมาณ 140-S และ infectivity titer ($TCID_{50}$/ml)

3. การทดลองเพาะไวรัสโดยใช้ raw virusเป็น inoculum เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 2 และทำพร้อมกับข้อ 2 แต่ใช้ raw virus จากขั้นตอนที่ 4 เป็น inoculum

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไทป์โอ โดยใช้ purified-concentrated virus เป็น inoculum ในขนาด small scale เบื้องต้นปรากฏว่า antigen ที่ได้มีปริมาณ titer ($TCID_{50}$) และ yield (140-S) ใกล้เคียงกับไวรัสที่เพาะได้โดยใช้ raw virus ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และใกล้เคียงกับ production virus ที่ผลิตได้โดยวิธีปกติ (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ใช้ Oudornthani/87 เป็น initial virus strain(IVS) แสดงผลของการเตรียม Refreshment virus,Oudornthani/87 seed batch และ Industrial batch เพื่อใช้เตรียมเป็น purified-concentrated virus inoculum ในการทดลอง

ตารางที่ 2 แสดงผลของ titer และ yield ของ purified-concentrated virus inoculum ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3 แสดงผลของไวรัสที่ได้จากการทดลอง โดยใช้ inoculum จาก purified-concentrated virus และ raw virus ที่เตรียม

TABLE 1 Stock control O189 (Oudornthani/87) 6th Pass. as IVS

Passage No.	Results			
	Culture Duration	% CPE	$TCID_{50}$	140-S (μg)
O189 7th P Refreshment	18 Hrs.	80	6.3	1.52
O189 8th P Seed bath	18 Hrs.	93	7.3	1.97
O189 9th P Industrial batch	18 Hrs.	90	6.7	1.46

TABLE 2 Results of Inoculum (x 275) (C & F = Clarification & Filtration)

Virus Titer	Raw virus	C & F	Ultrafiltration (x 45)	Final virus (x 275)
$TCID_{50}$/ml	6.7	7.3	8.1	8.9
140-S (μg)	1.46	1.40	45	180

TABLE 3 Results from experimental virus

Using Concentrated-purified virus as inoculum						Using raw virus as inoculum (Control)				
Exp. No.	Cell Counting	Culture Duration	% CPE	$TCID_{50}$/ml	140-S (μg)	Cell Counting	Culture Duration	% CPE	$TCID_{50}$/ml	140-S (μg)
1	2.1×10^6	18 Hrs.	85	7.7	0.95	2.0×10^6	18 Hrs.	90	6.7	1.30
2	2.0×10^6	18 Hrs.	87	7.1	1.00	2.1×10^6	17 Hrs.	92	7.5	1.75
3	2.0×10^6	18 Hrs.	90	7.3	1.32	1.9×10^6	17 Hrs.	88	6.9	1.00
4	2.1×10^6	18 Hrs.	92	6.7	1.20	2.0×10^6	18 Hrs.	90	7.1	1.37
5	2.2×10^6	18 Hrs.	90	7.5	1.60	2.1×10^6	17.5 Hrs.	89	7.3	1.21

TABLE 4 Comparison yields of type O, experimental virus and routine production virus

Experimental virus			Routine production virus		
Exp. No.	$TCID_{50}$/ml	140-S (µg)	Batch No.	$TCID_{50}$/ml	140-S (µg)
1	7.7	0.95	9103	6.7	1.30
2	7.1	1.00	9104	7.5	1.75
3	7.3	1.32	9106	6.9	1.00
4	6.7	1.20	9107	7.1	1.37
5	7.5	1.60	9108	7.3	1.21

นำมาจากตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลของการผลิตไวรัสในขบวนการผลิตตามปกติโดยการใช้ raw virus เป็น inoculum กับการทดลองใช้ purified concentreted virus เป็น inoculum

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โดยการใช้ purified-concentrated virus (x 275) นี้ เป็น inoculum แทนการเตรียม inoculum โดยวิธีปกติ ปรากฏว่าปริมาณ yield ที่ได้ใกล้เคียงกับวิธีการที่ผลิตในปัจจุบันมาก(ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4) ซึ่งตรงกับการทดลองของ Duchesne และคณะ แต่การทดลองนี้เป็นการเริ่มต้นที่ยังไม่สมบูรณ์เพียงพอ เพราะจำนวนการทดลองยังน้อยและควรจะมีการทดลองต่อไปว่า

1. อุณหภูมิที่ใช้เก็บ purified-concentrated virus นี้ ในอุณหภูมิ -70°C. หรือ -196°C.อย่างไหนไวรัสจะยังคงสภาพและนำไปใช้ได้ดีกว่ากัน

2. หากเก็บไวรัสนี้ใน -196°C. จะสามารถเก็บได้นานเท่าใด จึงจะยังคงคุณสมบัติเป็น inoculum ที่ดีได้ ซึ่งในข้อนี้จะเป็นประโยชน์มาก ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในอนาคต เพราะสามารถผลิตได้ทันทีถ้ามีความต้องการวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์เชาวฤทธิ์ บุญมาศิต และเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ได้ช่วยตรวจวัดหาปริมาณ 140-S แอนติเจน และตรวจสอบหาค่า infectivity titer จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Duchesne, M., Gurerche, J., Legrand, B., Proteau, M., and Colson., x. 1981. The use of highly concentrated purified (By a large scale method) and long term liquid nitrogen stored foot-and-mouth disease viruses for the preparation of vaccines/physico-chemical quality controls and potency tests after storage. Joint ESACT/IABS Meeting on the use of Heteroploid and other Cell Substrates for the Production of Biologicals, Heidelberg, F.R. Germany. Biol. Standard. 50 : 249-259 (S. Darger, Basel 1982).

การผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่นโดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์

PRODUCTION OF BRUCELLA ANTIGEN BY FERMENTOR

อนุทิน หาญวีระพล[1] ชลลดา กำเนิดมงคล[1] วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1]

Anootin Hanveeraphon Chollada Kamnerdmongkhol

Vuthiporn Rungvetvuthivitaya

ABSTRACT

The production of Brucella antigen was developed to be cultured in the 14 litres sized fermentor (Newbrunswick) under centrolled condition for 48 hours. The PCV was equal to 40% from 3 cultures. The yield from this antigen was found to be satisfied compared with the conventional method in solid media.

บทคัดย่อ

ทดลองผลิตวัคซีนบรูเซลล่าแอนติเย่นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 14 ลิตร ของ Newbrunswick ปรับอุณหภูมิ รอบปั่นและปริมาตรอากาศให้เหมาะสม หลังจากเพาะเชื้อนาน 48 ชั่วโมงนำมาหาความเข้มข้นของเชื้อ พบว่าจากการเพาะ 3 ครั้งได้ความเข้มข้นของเชื้อ (PCV) 4% เท่ากัน เมื่อนำไปผลิตแอนติเย่นชนิดโรสเบงกอล และเพลทแอกกลูติเนชั่น พบว่าปริมาณแอนติเย่นสำเร็จรูปต่อการผลิต 1 ครั้ง ได้ผลใกล้เคียงกับการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 1 ครั้ง เช่นเดียวกัน

คำนำ

บรูเซลล่าแอนติเย่นที่กรมปศุสัตว์ผลิตในปัจจุบัน ทำโดยเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่บรรจุในขวดรูกซ์ ซึ่งจะใช้ประมาณ 400-500 ขวด ต่อการผลิตแต่ละครั้ง การผลิตโดยวิธีนี้ใช้เวลาและแรงงานค่อนข้างมาก ในการเตรียมอาหาร การเพาะเชื้อ และการเก็บล้างเชื้อ ซึ่งถ้าสามารถเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวก็จะลดปัญหาดังกล่าวได้ (Alton และคณะ, 1975) จึงทำการทดลองผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ รอบปั่น และปริมาตรอากาศได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ : ใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 14 ลิตร ของ Newbrunswick ซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิ, อากาศเข้า และรอบปั่นให้ได้ตามความต้องการ

2. เชื้อที่ใช้เพาะ : ใช้ Seed บรูเซลล่า อบอร์ตัส สเตรน 1119-3 ที่เพาะไว้เป็น Seed

3. Antifoam : ใช้ 3% antifoam ปริมาตร 100 ซีซี. เพื่อลดการเกิดฟองขณะปั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave พร้อมกับ chamber ของเครื่องเฟอร์เมนเตอร์

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ : ประกอบด้วย

Tryptose (Lab.M)	300 กรัม
Dextrose	300 กรัม
Yeast Extract (oxoid)	100 กรัม
NaH_2PO_4 (anhydrous)	90 กรัม
Na_2HPO_4 (anhydrous)	33 กรัม
น้ำกลั่น	10 ลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 1 การเพาะเชื้อในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลิตร)	จำนวนเชื้อที่ใช้เพาะ (ขวดรูกซ์)	เวลาที่ใช้ในการเพาะ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่ใช้เพาะ (°C.)
10	1	48	37

ตารางที่ 2

Incubation Time (ชั่วโมง)	Air Flow rate (ลิตร/นาที)	Agitator Rate (รอบ/นาที)
0-8	4	200
8-24	6	200
24-32	8	250
32-48	10	300

วิธีการ

เพาะเชื้อลงในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ ปรับให้อุณหภูมิเท่ากับ 37°C. ตามตารางที่ 1 แล้วปรับปริมาตรอากาศ และรอบปั่นตามตารางที่ 2

เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของเชื้อ (PCV) นำเชื้อที่ได้มาปั่นล้างด้วย 0.5% Phenol saline solution solution ที่ 2500 G.นาน 90 นาที ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง จากนั้นจึงฆ่าเชื้อด้วยวิธี water bath ที่อุณหภูมิ 80°C.นาน 90 นาที แล้วจึงเตรียมเป็นแอนติเซ่นชนิดโรสเบงกอลและเพลทแอกกลูติเนชั่น ตามวิธีของ USDA เปรียบเทียบ Sensitivity กับแอนติเซ่นที่ผลิตโดยวิธีเดิม (1,2,3)

ผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเชื้อในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ 3 ครั้ง พบว่าความเข้มข้นของเชื้อ (PVC) ที่ได้จากการเพาะแต่ละครั้งเท่ากันคือ 4% เมื่อนำไปเตรียมเป็นแอนติเซ่นสำเร็จรูป โดยเตรียมเป็นแอนติเซ่นชนิดโรสเบงกอล 2 ชุดและแอนติเซ่นชนิดเพลทแอกกลูติเนชั่น 1 ชุด ได้ปริมาตรแอนติเซ่นตามลำดับดังนี้ 2,490 ซีซี., 2,200 ซีซี. และ 1,900 ซีซี. (ตารางที่ 3) แอนติเซ่นแต่ละชุดเมื่อนำไปทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับแอนติเซ่นโดยวิธีเดิมพบว่าให้ผลตรงกันตามตารางที่ 4

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าปริมาณของแอนติเซ่นสำเร็จรูปที่ได้จากการเพาะในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ 1 ครั้ง ใกล้เคียงกับการเพาะในขวดรูกซ์ จำนวน 400-500 ขวด 1 ครั้งเช่นเดียวกัน โดยที่การผลิตด้วยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์สะดวกกว่า ใช้เวลาและแรงงานน้อยกว่า นอกจากนี้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ก็แตกต่างกันมาก การเพาะเชื้อในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์จะใช้อาหารเพียง 10ลิตรต่อครั้ง ขณะที่การเพาะในขวดรูกซ์ต้องเตรียมอาหารแต่ละครั้งประมาณ 80-100 ลิตร ต่อ 400-500 ขวด ซึ่งทำให้มีผลต่อเนื่องไปถึงต้นทุนการผลิตด้วย แต่การเพาะเชื้อโดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์จะมีความเสี่ยงสูง นั่นคือถ้าเกิดการปนเปื้อนก็จะเสียหมดทั้งชุด แต่กรณีที่เพาะในขวดรูกซ์จะสูญเสียเพียงบางส่วน ดังนั้นจึงต้องใช้ความระมัดระวังอย่างยิ่ง คุณลักษณะของแอนติเซ่นที่ได้จากการเพาะโดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ทั้งชนิดโรสเบงกอล และเพลทแอกกลูติเนชั่นก็ไม่แตกต่างจากแอนติเซ่นที่ผลิตโดยวิธีเดิม แม้ว่าจะยังไม่ได้ทดลองผลิตเชื้อเตรียมเป็นแอนติเซ่นชนิดท้าแอกกลูติเนชั่นแต่ก็คาดได้ว่าจะให้ผลเช่นเดียวกัน การผลิตแอนติเซ่นโดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์จึงมีประโยชน์มาก เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณการผลิต โดยสามารถลดปัญหาแรงงานและต้นทุนการผลิตลงได้ส่วนหนึ่ง

ตารางที่ 3 ผลจากการผลิตแอนติเซ่นโดยใช้เครื่องเฟอร์เมนเตอร์ (Pack cell volume = PCV)

	PCV (%)	ปริมาตร (ลิตร)	แอนติเซ่นที่ผลิตได้ (ซีซี)	sensitivity Test
โรสเบงกอล				
ครั้งที่ 1	4	10	2,400	เป็นไปตามมาตรฐาน
ครั้งที่ 2	4	10	2,200	เป็นไปตามมาตรฐาน
เพลทแอกกลูติเนชั่น	4	10	1,900	เป็นไปตามมาตรฐาน

ตารางที่ 4 ผลจากการทำ Sensitivity Test เปรียบเทียบแอนติเซ่นที่ผลิตโดยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์และผลิตโดยวิธีเดิม (- = Negative, + = Complete Agglutination, i = Incomplete Agglutination)

แอนติเซ่น	ซีรั่มตัวอย่าง (โค)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
โรสเบงกอล										
ผลิตโดยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์										
ครั้งที่ 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ครั้งที่ 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ผลิตโดยวิธีเดิม	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
เพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์										
ผลิตโดยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์	-	-	+	+	++i	++i	+++	+++	++++	++++
ผลิตโดยวิธีเดิม	-	-	+	+	++i	++i	+++	+++	++++	++++

เอกสารอ้างอิง

1. Alton, G.G., Jones, L.M.., Pietz, D.E. (1975) : Laboratory Tecniques in Brucellosis. World Health Organization. Monograph series No.55 P 65-70.
2. Pietz. D.E., Angus. R.D., (1976) : Method for the preparation of Brucella Abortus strain 1119-3 cultures original seed : VSL Diagnostic. Reagents Production Guide No. R-16.
3. Pietz. D.E., Angus. R.D., (1976) : Method for the preparation of Brucella Abortus strain 1119-3 for the production of Antigens. VSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-00.
4. Porner, L.A., and Alton, G.G. : The persistence of Brucella abortus Strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. (Personal Communication).

ศึกษาการผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีสชนิดลดโด๊ส

STUDY OF REDUCED DOSE BRUCELLOSIS VACCINE PRODUCTION

อนุทิน หาญวีระพล[1] วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1] จันทร์ทิพย์ แสงทอง[1]

Anootin Hanveeraphon Vuthiporn Rungvetvuthivitaya Chantip Saengtong

ABSTRACT

The experimental vaccine productioon of Brucellosis strain 19 for non vaccinated heifer and non vaccinated cow was studied by reducing the amount of antigen to 1-3 x 10^8 organisms/2 cc./dose. The vaccine was qualified through viability test, dissociation test, purity test and safety test.

บทคัดย่อ

ทดลองผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีสสเตรน 19 สำหรับใช้ในโคสาวและแม่โคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน โดยลดจำนวนเชื้อต่อโด๊สลงก่อนที่จะทำเป็นวัคซีนแห้ง นั่นคือจะมีเชื้อที่มีชีวิตอยู่ระหว่าง 1-3 x 10^8 ตัว/โด๊ส โดยที่ปริมาณวัคซีนต่อโด๊ส 2 ซีซี.เท่าเดิม หลังจากที่ได้วัคซีนสำเร็จรูป ได้ทำการทดสอบวัคซีนดังนี้ : Viability test, Dissociation test, Purity test และ Safety test พบว่าวัคซีนผ่านการทดสอบ

คำนำ

วัคซีนบรูเซลโลซีสสเตรน 19 ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์มีข้อกำหนดให้ใช้เฉพาะลูกโคเพศเมียที่มีอายุระหว่าง 3-8 เดือน เนื่องจากระดับแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ที่เกิดขึ้นจะลดลงหลังจากฉีดวัคซีนภายใน 30 เดือน (WHO) ทำให้ง่ายต่อการวินิจฉัยโรคภายหลัง สำหรับโคสาวหรือแม่โคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน จะไม่แนะนำให้ใช้วัคซีนชนิดนี้ เพราะแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ ที่เกิดจากวัคซีนจะคงอยู่ตลอดไป ทำให้สับสนในการวินิจฉัยโรค ได้มีการทดลองฉีดวัคซีนที่เจือจางจนมีจำนวนเชื้อ 1-3 x 10^8 ตัว/โด๊ส นั่นคือประมาณ 400 เท่าจากวัคซีนปกติให้แก่โคสาวและแม่โค พบว่าสามารถให้ความคุ้มโรคได้ และระดับแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ ที่เกิดจากวัคซีนลดลงภายหลังการฉีดไม่ทำให้สับสนในการวินิจฉัยโรค (1),(2),(3),(4) นับได้ว่าเป็นวิธีการป้องกันโรคบรูเซลโลซีสอีกวิธีหนึ่ง ดังนั้นจึงได้มีการทดลองผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีสชนิดลดโด๊สสำหรับฉีดให้แก่โคสาวและแม่โคที่ไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อน โดยทำให้มีปริมาตรต่อโด๊สและวิธีใช้เช่นเดียวกับวัคซีนปกติเพื่อสะดวกในการใช้ในฟองที่

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

Seed : บรูเซลล่า อบอร์ตัส สเตรน 19 จาก USDA

อาหารเลี้ยงเชื้อ : Tryptose agar บรรจุในขวดรูกซ์ (Roux Bottle)

Stabilizer : ประกอบด้วย Enzymatic digest ซุโครส 5% และโซเดียมกลูตาเมท 1% ละลายในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

สัตว์ทดลอง : หนุ่มสาวเพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 300-400 กรัม จำนวน 4 ตัว

วิธีการ

เพาะเชื้อบรูเซลล่า อบอร์ตัส สเตรน 19 บน Tryptose agar ที่บรรจุในขวดรูกซ์อบที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 48 ชั่วโมง ล้างเชื้อที่เพาะได้ด้วย Stabilizer แล้วเก็บรวมกันเพื่อรอตรวจสอบการปนเปื้อน จากนั้นจะนำส่วนที่ผ่านการตรวจสอบมาหาความเข้มข้นของเชื้อโดยหาค่า Pack Cell Volume (PCV) นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนเชื้อต่อซีซี. แล้วเจือจางด้วย Stabilizer เพื่อให้จำนวนเชื้ออยู่ระหว่าง 1-3 x 10^8 ตัว/โด๊ส นั่นคือประมาณ 400 เท่าจากวัคซีนปกติ(40-120 x 10^9 ตัว/โด๊ส) บรรจุขวดๆ ละ 2 ซีซี.นำไปทำเป็นวัคซีนแห้ง แล้วทดสอบคุณภาพและลักษณะของวัคซีนดังนี้ Viability, Purity Test, Dissociation Test และ Safety Test

---

[1]สุนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ผลการทดลอง

วัคซีนชนิดลด โด๊สที่ผลิตได้เมื่อละลายด้วยน้ำยาละลาย 10 ซีซี. แล้วนำวัคซีน 1 โด๊ส (2 ซีซี.) ไปหา Viability พบว่าจำนวนเชื้อ 2×10^8 ตัว/โด๊ส ซึ่งอยู่ในมาตรฐาน (ตารางที่ 1) จากการตรวจสอบอื่น ๆ ไม่พบว่ามีเชื้อปนเปื้อนและไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี จากการทำ Safety Test โดยฉีดวัคซีนชนิดลดโด๊สให้แก่หนูตะเภาในขนาดเดียวกับที่ฉีดให้แก่โคสาวหรือแม่โค พบว่าระดับแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ และจำนวนเชื้อที่ตรวจพบในม้ามอยู่ในมาตรฐานที่กำหนด (ตารางที่ 2) และเมื่อทำเป็นวัคซีนสำเร็จรูปสามารถนำไปใช้ได้สะดวกเช่นเดียวกับวัคซีนเด็มโด๊ส (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อวัคซีนลดโด๊ส

จำนวนเชื้อก่อนเจือจาง (ตัว/โด๊ส)	จำนวนเชื้อหลังเจือจาง (ตัว/โด๊ส)	จำนวนเชื้อหลังทำการดูดแห้ง (ตัว/โด๊ส)	ปริมาตรเนื้อวัคซีน (ซีซี.)
120×10^9	3×10^8	2×10^8	2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบวัคซีนลดโด๊ส

Viable Count (ตัว/โด๊ส)	Dissociation Test	Agglutinating Antibody จากหนูตะเภา (1 /ml)	ปริมาตรเนื้อวัคซีน (ตัว/กรัม)
2×10^8	Smooth Colony	$\geq$ 1,000	$\geq 5 \times 10^5$

ตารางที่ 3 การใช้วัคซีนลดโด๊ส

บรรจุขวดละ	น้ำยาละลาย	ฉีดโดเพสเม็ยตัวละ	วิธีใช้
5 โด๊ส	10 ซีซี.	2 ซีซี.	ฉีดเข้าใต้หนัง

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษากรรมวิธีวิธีในการผลิต เพื่อให้ได้วัคซีนบรูเซลโลซีส ในขนาดลดโด๊สที่จำนวนเชื้อตามที่กำหนดโดยที่วัคซีนที่ผลิตได้เมื่อทำการทดสอบและทำการดูดแห้งแล้วยังคงอยู่ในมาตรฐาน การผลิตเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อตามมาตรฐานวัคซีนบรูเซลโลซีสชนิดลดโด๊สในปริมาตรที่กำหนดและทำการละลายด้วยน้ำยาละลายจำนวนไม่มาก เป็นการผลิตเพื่อให้ได้วัคซีนชนิดลดโด๊สสำเร็จรูปที่ผู้ใช้สามารถนำไปใช้ได้โดยสะดวก ซึ่งสามารถฉีดให้แก่โคสาวและแม่โคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีสมาก่อน อันเป็นวิธีป้องกันโรคบรูเซลโลซีสอีกวิธีหนึ่ง ทำให้การฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีสและการป้องกันโรคบรูเซลโลซีสจะสามารถทำได้กว้างขวางขึ้น แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้มิได้มีการนำไปฉีดในโคเพื่อดูระดับแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ แต่จากการทดลองของวาสิพร และคณะ (2528) ซึ่งได้ทดลองฉีดวัคซีนขนาดเจือจาง 400 เท่าให้กับโคสาว จำนวน 14 ตัว พบว่าแอกกลูติเนติ้ง แอนติบอดี้ ที่เกิดจากวัคซีนจะลดลงจนไม่ทำให้สับสนในการวินิจฉัยโรคภายใน 4 เดือน ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของ Deyoe et. al (Personal Communication), Alton et. al (1980) ที่ทำการทดลองฉีดวัคซีนลดโด๊สที่มีจำนวนเชื้อระหว่าง 1-3 $\times 10^8$ ตัว/โด๊ส หรือเจือจางประมาณ 400 เท่าให้กับโคสาวและโคตั้งท้อง ทำให้สามารถลดปัญหาในการวินิจฉัยโรคบรูเซลโลซีสลงได้ ในขณะที่ยังคงให้ภูมิคุ้มกันโรคได้ดีไม่ต่างไปจากการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีสชนิดเด็มโด๊สใน

ลูกโค อย่างไรก็ตามวัคซีนบรูเซลโลซีสชนิดลดโดสในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพของความคุ้มโรค, ระยะยาวนานของความคุ้มโรค ยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจและน่าศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Alton, G.G., Corner, L.A., and Plackett, P. (1980) : Vaccination of pregnant cows with low doses of Brucella abortus strain 19 vaccine Australian Veterinary Journal, Vol 56 P. 369-372.
2. Alton, G.G., and Corner, L.A. ; Vaccination of heifer before first mating with a reduced dose of Brucella abortus Strain 19 vaccine (Personal Communication).
3. Corner, L.A., and Alton, G.G. : The persistence of Brucella abortus Strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. (Personal Communication).
4. Deyoe, B.L., Dorsey, T.A., and Meredith, K.B. : Effect of reduced dosage of Brucella abortus strain 19 in cattle vaccinated as yearlings (Personal Communication)
5. วสันพร รังเวชาสิวิทยา, ชลดา มหาวัจน์ (2528) การฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีส สเตรน 19 ชนิดเจือจางในโคสาวก่อนผสมพันธุ์ เอกสารเผยแพร่วิชาการเรื่องที่ 3 งานบรูเซลโลซีส กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนไข้ขาในแกะและสัตว์ทดลองขนาดเล็ก

COMPARATIVE POTENCY TEST OF BLACKLEG VACCINE IN SHEEP AND SMALL LABORATORY ANIMAL

โสภณ ท้วมแสง[1] นิเทศ เลิศลิมชลาลัย[1] วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1]

Sopon Tuamsang Niteth Lertlimchalalai Vuthiporn Rungvetvuthivitaya

ABSTRACT

The potency test of Blackleg vaccine was conduted in mice compared with sheep.The vaccine was given to mice (0.25 ml) intraperitonially 4 times on 2 consecutive days. Mice were then challenged with virulent Clostridium chauvoei 10 days after the last injection. The sheep was injected with field dose of vaccine subcutaneously and challenged 14 days after vaccination. The result showed the protective correlation between mice and sheep.

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลก (วัคซีนโรคไข้ขา) โดยฉีดวัคซีนแบล็คเลกของกรมปศุสัตว์เข้าช่องท้อง (Intraperitonium) หนูขาว 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันครั้งละ 2 วัน แล้วฉีดเชื้อพิษหับหลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 10 วัน เปรียบเทียบกับการฉีดวัคซีนแบล็คเลกในแกะด้วยขนาดโด๊สในท้องที่เข้าได้หนังแล้วฉีดพิษหับหลังจากฉีดวัคซีน 14 วัน พบว่าหนูและแกะที่ฉีดวัคซีนสามารถคุ้มโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

คำนำ

วัคซีนแบล็คเลก (วัคซีนโรคไข้ขา) ของกรมปศุสัตว์ที่ผลิตจากเชื้อคลอสตริเดียมไหว้อาย(Clostridium chauvoei) ชนิดท้องที่ (local strain) เพื่อป้องกันโรคแบล็คเลกนั้นมีมาตรฐานการผลิตโดยใช้ค่า PCV (Packed cell volume) ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อที่เจริญเติบโตของวัคซีนต้องไม่น้อยกว่า 0.26% การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในสัตว์เป้าหมายอันได้แก่ วัว ควาย แพะ แกะ ทำให้ต้นทุนการผลิตวัคซีนสูงขึ้นตามราคาของสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงได้นำสัตว์ทดลองขนาดเล็ก เช่น หนู Mice มาทำการทดลองประสิทธิภาพของวัคซีน โดยวิธี Mouse protection test (Y. TAMURA และคณะ, 1986)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีน วัคซีนที่ใช้เป็นวัคซีนแบล็คเลก ผลิตที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อำเภอปากช่อง เป็นวัคซีนเชื้อตาย โดยใช้ Clostridium chauvoei (local strain) เป็นเชื้อที่เพาะตามมาตรฐาน PCV (Packed cell volume)

2. เชื้อพิษ เชื้อพิษแบล็คเลกทำแห้ง เตรียมโดยเพาะเชื้อ Clostridium chauvoei (local strain) เพาะเชื้อลงใน cooked meat medium ที่เตรียมจากเนื้อสดตามสูตรที่ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ อบในตู้อบ 37°C. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ขึ้นมาเติม Booster media พร้อมทั้งปรับ pH ให้ได้ 7.2 และอบในตู้อบอีก 24-48 ชั่วโมง และนำมาอุ่นใน Water bath อุณหภูมิ 70°C. เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นและล้างด้วย PBS (phosphate buffer saline) ขนาด 3,100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง เก็บเชื้อครั้งสุดท้ายมาใส่ 10% Skim milk แล้วนำไปแจกลงขวดขนาด 2 มิลลิลิตร เข้าเครื่องทำแห้ง เก็บเป็นเชื้อพิษ นำไปนับจำนวนเชื้อได้ 648,000 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีดังนี้

2.1 ใส่ Suspension ของเชื้อซึ่งทำเป็น dilution ไว้บนฝา petri-dish 1 มิลลิลิตร

2.2 เติม CLA (cystein liver agar) ตามสูตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง (5 นาที)

2.3 ใส่ CLA อีก 5 มิลลิลิตร แล้ววางส่วน body ของ petri-dish ทับลงไปโดยหงายฝาขึ้น

2.4 เติม CLA 5 มิลลิลิตร ลงในช่องระหว่าง body กับ cover ของ petri-dish นั้น

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

2.5 นำฝา plate ขนาดใหญ่มาปิดกันการปนเปื้อนของเชื้อตัวอื่น นำเข้าอบที่ 37°C. ในตู้อบธรรมดา 24 ชั่วโมง อ่านผล

สูตรการเตรียม CLA (Cystein liver agar)

Liver infusion broth	100 %
Peptone	3 %
Dextrose	0.5 %
NaCl	0.5 %
l-Cystein Monohydrochloride	0.5 %

*เชื้อพิษเมื่อฉีดในสัตว์ทดลองต้องใช้ 3% $CaCl_2$ เป็นตัวทำละลาย

3. สัตว์ทดลอง

หนู Mice น้ำหนัก 16-20 กรัม จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง จำนวน 370 ตัว

แกะ ใช้แกะรุ่นอายุประมาณ 4-6 เดือน จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ซึ่งยังไม่เคยฉีดวัคซีนแบล็คเลก จำนวน 42 ตัว

วิธีการ

1. ศึกษาหา Minimum lethal dose ของเชื้อพิษแบล็คเลกทำให้แห้งในหนู Mice โดยฉีดในหนู Mice แต่ละกลุ่ม ด้วยขนาด 1; 13; 137; 1,370 และ 13,700 CFU ต่อโด๊สตามลำดับ

2. ศึกษาหา Minimum lethal dose ของเชื้อพิษแบล็คเลกทำให้แห้งในแกะ โดยฉีดในแกะแต่ละกลุ่มด้วยขนาด 12,960 ; 129,600 และ 1,296,000 CFU ต่อโด๊สตามลำดับ

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในหนู ฉีดหนู Mice ด้วยวัคซีนแบล็คเลกชุดที่ 6/33, 7/33, 1/34, 2/34, 3/34, 4/34, 5/34, และ 6/34 รวม 8 ชุด ๆ ละ 20 ตัว โดยการฉีดเข้าช่องท้องด้วยขนาด 0.25 มิลลิลิตร 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 วัน หลังการฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 10 วัน นำหนู Mice เหล่านี้มาฉีดเชื้อพิษทับด้วยขนาด 100 LD โดยมีหนู Mice 20 ตัวต่อชุดเป็นกลุ่มดาบคุม (ไม่ได้ฉีดวัคซีน) ดูผลหลังจากฉีดเชื้อพิษทับภายใน 7 วัน

4. ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในแกะ ฉีดแกะด้วยวัคซีนแบล็คเลกชุดที่ 6/33, 7/33, 1/34, 2/34, 3/34, 4/34, 5/34 และ 6/34 รวม 8 ชุด ๆ ละ 3 ตัว โดยการฉีดเข้าใต้หนังด้วยขนาดโด๊สหลังที่ (2.5 มิลลิลิตร) หลังจากนั้น 14 วัน นำมาฉีดแบล็คเลกทับด้วยขนาด 100 LD โดยมีแกะจำนวน 3 ตัวเป็นกลุ่มดาบคุม (ไม่ได้ฉีดวัคซีน) ดูผลหลังจากฉีดเชื้อพิษทับภายใน 7 วัน

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดง Minimum lethal dose ของเชื้อพิษแบล็คเลกในหนูขาว

จำนวนหนู (ตัว)	Challenged dose (CFU/dose)	Mortality rate (%)
10	13,700	100
10	1,370	100
10	137	100
10	13	100
10	1	0

ตารางที่ 2 แสดง Minimum lethal dose ของเชื้อพิษแบล็กเลกในแกะ

จำนวนแกะ (ตัว)	Challenged dose (CFU/dose)	Mortality rate (%)
5	1,296,000	100
5	129,600	100
5	12,600	0

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในกลุ่มหนูขาวที่ฉีดวัคซีน และกลุ่มควบคุม (Control) ต่อเชื้อพิษแบล็คเลก

วัคซีนชุดที่	อัตราการรอดของกลุ่มที่ฉีดวัคซีน (%)	อัตราการรอดของกลุ่มควบคุม (Control) (%)
6/33	100	20
7/33	80	20
1/34	90	10
2/34	80	10
3/34	100	10
4/34	80	0
5/34	100	10
6/34	80	0

ตารางที่ 4 แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในกลุ่มแกะที่ฉีดวัคซีน และกลุ่มควบคุม (Control) ต่อเชื้อพิษแบล็คเลก

วัคซีนชุดที่	อัตราการรอดของกลุ่มที่ฉีดวัคซีน (%)	อัตราการรอดของกลุ่มควบคุม (Control) (%)
6/33	100	0
7/33	100	0
1/34	100	0
2/34	100	0
3/34	100	0
4/34	100	0
5/34	100	0
6/34	100	0

จากตารางที่ 1 พบว่า Minimum lithal dose ของเชื้อพิษแบล็คเลกที่ทำให้หนู Mice ตาย มีขนาด 13 CFU ต่อโด๊ส และ Minimum lethal dose ในเชื้อพิษชุดเดียวกันที่ทำให้แกะตาย มีขนาด 129,000 CFU ต่อโด๊ส (ตารางที่ 2)

จากตารางที่ 3 ในกลุ่มหนู Mice ที่ฉีดวัคซีนแบล็คเลกในแต่ละชุด แล้วนำไปฉีดพิษทับด้วยขนาด 100 LD มีอัตราการรอดอยู่ระหว่าง 80-100 เปอร์เซนต์ ในขณะที่กลุ่มไม่ได้ฉีดวัคซีน (กลุ่ม Control) มีอัตราการรอดอยู่ระหว่าง 0-20 เปอร์เซนต์ และมีอัตราการตาย 80-100 เปอร์เซนต์

ในแกะหลังฉีดวัคซีนแบล็คเลกในแต่ละชุดแล้วนำไปใช้ฉีดพิษทับ มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีอัตราตาย 100 เปอร์เซนต์ เนื่องจากไม่ได้ฉีดวัคซีน (ตารางที่ 4)

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองสามารถหาขนาดปริมาณของเชื้อพิษแบล็คเลกที่ทำให้หนู Mice และแกะตาย (ตารางที่ 1 และ 2) และได้นำมาใช้ในการทดลองประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลก โดยการฉีดพิษทับในหนู Mice และแกะที่ฉีดวัคซีนด้วยขนาด 100 เท่าของ Lethal dose ในสัตว์แต่ละกลุ่ม พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในหนู Mice ได้ผลดี (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกันกับ Y. TAMURA (1986) ที่พบว่าประสิทธิภาพของวัคซีนแบล็คเลกในญี่ปุ่นที่ทดลองในหนูมีอัตราการรอด 60 เปอร์เซนต์ หลังได้รับเชื้อพิษ

การทดสอบวัคซีนแบล็คเลกในสัตว์ทดลองขนาดเล็ก เช่น หนู Mice จะให้ผลดีเช่นเดียวกับการทดลองในแกะซึ่งเป็นสัตว์ขนาดใหญ่ (ตารางที่ 3 และ 4) ดังนั้นสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายได้โดยนำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในสัตว์ทดลองขนาดเล็ก เช่น หนู Mice มาใช้แทนสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Report of Department of Ministry of Agriculture, Forestry and Fischeries. 1972. pp 99-100. In : Minimum Requirements for Biological Products for Animal Use, Tokyo (in Japanese).

2. Tamura, Y. : Makie, G., and Tanaka, M. 1986. Correlation between the in direct hemagglutinating antibody and protection of mice against Clostridium chauvoei : pp 1249-1251.

การวัดหาปริมาณ 140-S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

MEASURING THE QUANTITY OF 140-S THE COMPLETE PARTICLES OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUSES

มนตรี มนต์มธุรพจน์[1] เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต[1]

Montri Montmaturapoj Chawarit Bunmatid

ABSTRACT

In the production of Foot and Mouth Disease virus type O, A,As-1 in the biogenerator level industrial scale the amount of 140-S particle were measured by sucrose gradient ultracentrifuge method. This method was satisfied and was used as a standard method in the vaccine quality control of RMD center.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไทป์ โอ เอ เอเชีย๑ แบบขังเป็นชั้นโดยใช้ถังเพาะขนาดอุตสาหกรรมนั้น การตรวจคุณภาพวัคซีนในขั้นตอนการผลิตโดยการตรวจหาปริมาณอนุภาคสมบูรณ์ 140-S โดยวิธี sucrose gradient ultracentrifuge นั้น ได้ผลเป็นที่น่าพอใจและใช้เป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจสอบขั้นตอนการผลิตวัคซีนของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย

คำนำ

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจำแนกอยู่ในตระกูล Picornavirideae และเป็น acid sensitive members ของ Apthovirus genus ลักษณะของอนุภาค (virion) เป็นแบบ Icosahedron ที่ไม่มี envelope อนุภาคมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27-28 นาโนมิเตอร์ (nm), มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 8 x 10^6 dalton เปลือกหุ้มโปรตีน (capsid protein) หรือ capsomer มี 60 copies แต่ละ copies ประกอบด้วย polyppetides ที่สำคัญ 4 ชนิด คือชนิด VP1, VP2, VP3 และ VP4 กรดนิวคลีอิค (Nucleic acid) ของไวรัสปากและเท้าเปื่อยเป็นชนิด RNA เส้นเดี่ยว (Single-strand RNA) มีน้ำหนักโมเลกุล 2-3 x 10^6 dalton

อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีค่า Sedimentation coefficient = 140 (1) และเป็นที่ยอมรับกันว่าอนุภาค 140-S เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความคุ้มต่อโรค (Immunogenic component) (7) ด้วยเหตุผลนี้การตรวจวัดหาปริมาณ 140-S ใน virus suspension จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ที่จะเป็นตัวกำหนดปริมาณ 140-S ต่อทุก ๆ โด๊สทุก ๆ โด๊สของวัคซีน เนื่องจากคุณสมบัติของ 140-S ดังได้กล่าวแล้ว

การวัดหาปริมาณ 140-S ใน Virus suspension กระทำโดยวิธี ultracentrifugation sucrose density gradients เทคนิค ซึ่ง Barteling, Meloen (2) และ Doel และคณะ (3, 4) ได้รายงานไว้ โดยหลักการที่ว่า virus preparation เมื่อถูกเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ใน sucrose gradient ด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) ขนาดของ UV-adsorption peak จะสัมพันธ์กับปริมาณของ 140-S เสมอ พื้นที่ของ peak จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณของ 140-S ในตัวอย่างที่วัด

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมไวรัส (Virus preparation) และ gradients

ไวรัส 3 ไทป์ คือ O-189, A-132, As-1, ผลิตได้จาก IFFA-3 cell โดยวิธี suspension cell culture ในถังเพาะขนาด 3,200 ลิตร ไวรัสที่ได้ (Raw virus) นำมาแยกตะกอนเซลล์ออกโดยการปั่นแยก (Centrifuge) ที่ 3,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C.

Gradients เตรียมโดยใช้ 15% และ45% sucrose ใน Tris-buffer โดยใช้ sucrose gradient former เป็นอุปกรณ์ในการเตรียม, gradient ถูกเตรียมใน tube ของ Beckman รุ่น SW-41 (ultraclean),gradients ที่เตรียม สามารถเก็บใน -20°C. เพื่อเตรียมไว้ใช้ในโอกาสต่อไปได้

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

Centrifugation Conditions

ตัวอย่างไวรัสที่จะทำการวัดหาปริมาณ ใช้ปริมาณ 2 ซีซี. ใส่ลงบน gradient ต่อ tube ปริมาณที่ถูกต้องแน่นอนสามารถกระทำได้โดยการชั่งอย่างละเอียด หลังจากนั้นปั่นที่ 16,000 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 17 ชั่วโมง หรือ 41,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2.30 ชั่วโมง ที่ 4°C. (Beckman L7-55 Ultracentrifuge) โดยใช้ Beckman rotor swing type

Gradient Photometry

gradients จะถูกดันในอัตรา 50 ซีซี./ชั่วโมง โดย peristaltic pump ผ่าน flow cell ของ LKB-spectrometer model 2138 Uvicords ซึ่งมี Path-length flow cell3 มม.,ที่ wave length 254 nm.,recorder 0.2 มม./second, U.V. spectrometor sensitivity 0.1 (ABS-range), recording amplification 100 mv.

การคำนวณหาค่า

ขนาดของ peak ใน chart recorder จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไวรัสเสมอ การคำนวณหาค่าโดยการลอก peak ที่ได้ในกระดาษ ตัดหาการชั่งน้ำหนัก เทียบหาปริมาณไวรัสกับ standard ที่มีอยู่

จากรูปที่ 1 เป็น absorbance peak ที่ wave length 254 nm.ของไวรัสไข่ เอเชียน ซึ่งได้ทำการทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ 275 เท่า และนำมา inactivate ด้วย BEI 10% V/V เป็นความเข้มข้นสุดท้าย 250 เท่า นำไวรัสมาทำ dilution 1:40 ก่อนทำการวัด peak

รูปที่ 2 ทำการตีเส้น peak ทั้ง 3 ด้าน ให้เป็นรูปสามเหลี่ยม

รูปที่ 3 นำกระดาษมาทาบกับสามเหลี่ยม แล้วทำการลอกพื้นที่ของ peak (พื้นที่สีดำ) แล้วทำการตัดกระดาษพื้นที่สีดำไปทำการชั่งหาน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาพื้นที่ โดยที่เราทราบว่าตัวอย่างเช่น

กระดาษที่ใช้ชั่งน้ำหนัก 1 ตารางเซนติเมตร หนัก	=	20	mg.
ถ้าน้ำหนักกระดาษที่ลอกจาก peak	=	120	mg.
ดังนั้น area ของ peak	=	6	ตารางเซนติเมตร

จาก standard curve, area ที่ 6 ตารางเซนติเมตร เท่ากับน้ำหนัก 140-S 7.5 µg/ml ดังนั้นน้ำหนัก 140-S ของ peak นี้คือ 7.5 x 40 เท่ากับ 300 µg/ml

การหา standard curve

Crude viral suspension

↓

Centrifuge 20 min. at 2,600 rpm., 4°C.

↓

PEG 8,000 7.5% W/V agitation 2 hours

↓

Centrifuge 1.5 hrs., at 2,600 rpm., 4°C.

↓

Remove supernatant

↓

Add TNE buffer in sediment Vol 1/100 of initial viral suspension

↓

Homogenize and agitation 60 min., 4°C.

↓

Supernatant virus treat by fluorocarbon

↓

Ultra-centrifugation supernatant

|

Fractionation

|

Collect the fraction

Purity evaluation

ทำการหาความบริสุทธิ์ของไวรัสโดยเปรียบเทียบค่า UV จาก 2 wavelength

$$\frac{\text{OD 259 nm}}{\text{OD 280 nm}} \simeq 1.6 \text{ to } 1.8 \quad \text{หรือ} \quad \frac{\text{OD 259 nm}}{\text{OD 239 nm}} \simeq 1.4$$

ค่าของ OD ของไวรัสจะต้องใกล้เคียงกับค่า average หรือต้องมากกว่าค่า 1.1 ขึ้นไป จึงจะใช้ได้

จากการที่เราพบว่า 140-S particles ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่บริสุทธิ์ 100 µg/ml จะมีค่า OD (d) เท่ากับ 0.76 ที่ 259 nm

เพราะฉะนั้นปริมาณไวรัส (µg)/ml) = $\frac{100\,d}{0.76}$

ตัวอย่าง OD ที่ 259 nm ของไวรัสที่ทำการ collect dil$_{1/4}$ คือ 0.34 และที่ 280 nm เท่ากับ 0.23

เพราะฉะนั้น purity = $\frac{0.34}{0.23} = 1.48$

เพราะฉะนั้นปริมาณไวรัส = $\frac{100 \times 0.34}{0.76} = 44.7$

$= 44.7 \times 4$ (dil)

$= 179$ µg/ml

นำ purified ไวรัสนี้ไปทำ standard curve ต่อไป โดยทำ dilution ให้อยู่ระหว่าง 1-10 µg/ml

ผล

ผลการตรวจวัดแสดงให้เห็นในตารางที่ 1-3 และรูปที่ 1

1. แสดงปริมาณ 140-S ใน raw virus ที่วัดค่าได้ของไวรัสไทป์ O, A, As-1

ไทป์ O มีค่าเฉลี่ย 1.85 (range 1.00-2.42)

ไทป์ A มีค่าเฉลี่ย 1.26 (range 0.61-2.40)

ไทป์ As-1 มีค่าเฉลี่ย 2.10 (range 1.10-2.60)

ตามตารางที่ 1 และค่า CF, $TCID_{50}$ ของไวรัส ไทป์ O, A, As-1 ตามตารางที่ 2 โดยที่

ไทป์ O มีค่า CF เฉลี่ย 370 (range 275-481)

ไทป์ A มีค่า CF เฉลี่ย 548 (range 372-724)

ไทป์ As-1 มีค่า CF เฉลี่ย 560 (range 407-724)

ไทป์ O มีค่า $TCID_{50}$ เฉลี่ย 6.9 (range 6.1-7.9)

ไทป์ A มีค่า $TCID_{50}$ เฉลี่ย 7.3 (range 6.7-7.9)

ไทป์ As-1 มีค่า $TCID_{50}$ เฉลี่ย 7.2 (range 6.5-7.7)

2. ในตารางที่ 3 ปริมาณ 140-S ใน concentrated purified virus ของไทป์ A มีค่าเฉลี่ย 263 (range 225-324) ซึ่งให้ความเข้มข้นประมาณ 188 เท่าของ raw virus คิดเป็นเปอร์เซนต์ yield ราว 75% ของ raw virus ส่วนค่า CF มีค่าเฉลี่ย 84,745 (range 46,800 ถึง 127, 400) และค่า $TCID_{50}$ มีค่าเฉลี่ย 8.99 (range 8.1-9.9)

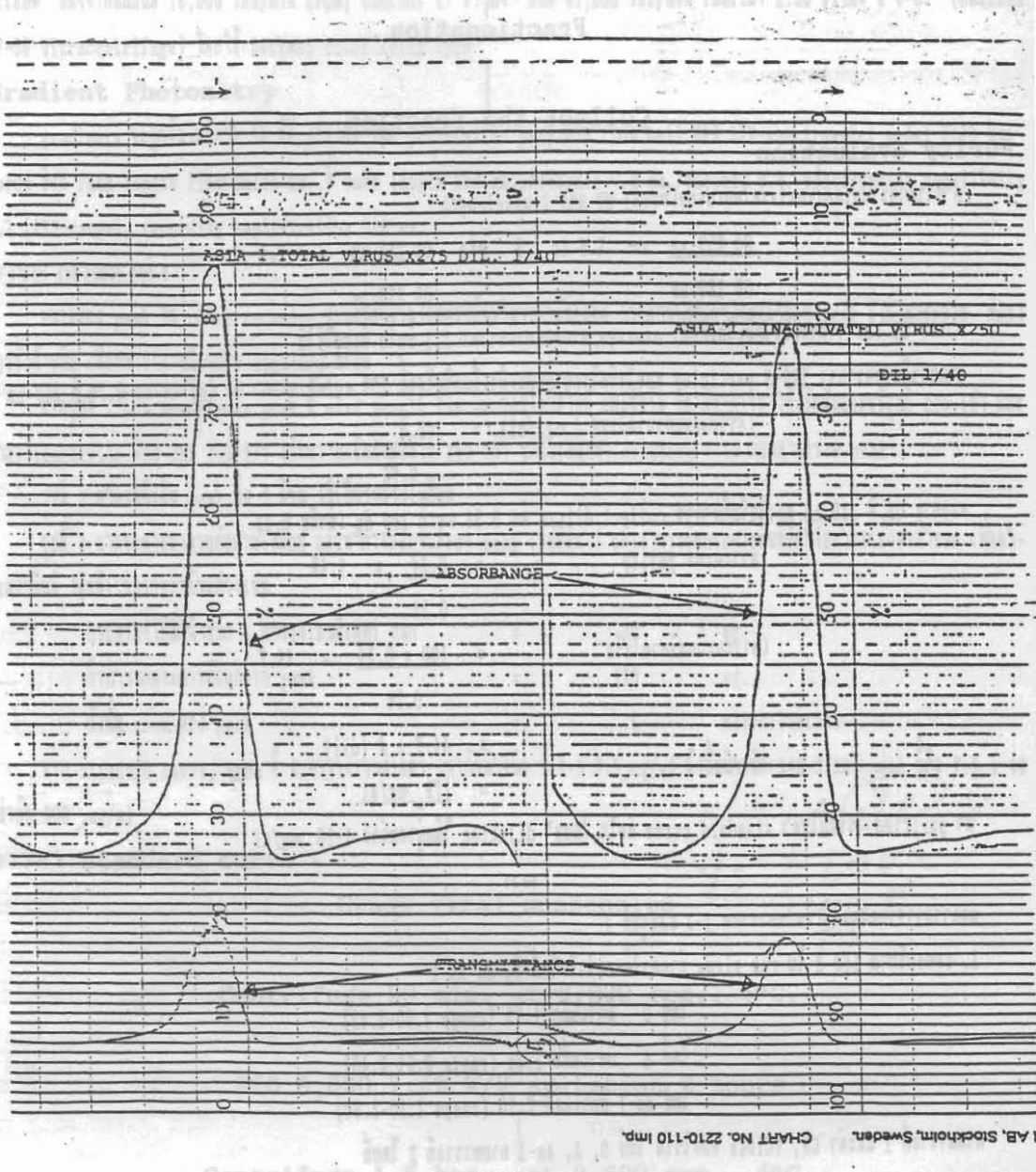


FIGURE 1, UV. ABSORBANCE PEAK OF 140-S TYPE ASIA1. X275 & X250

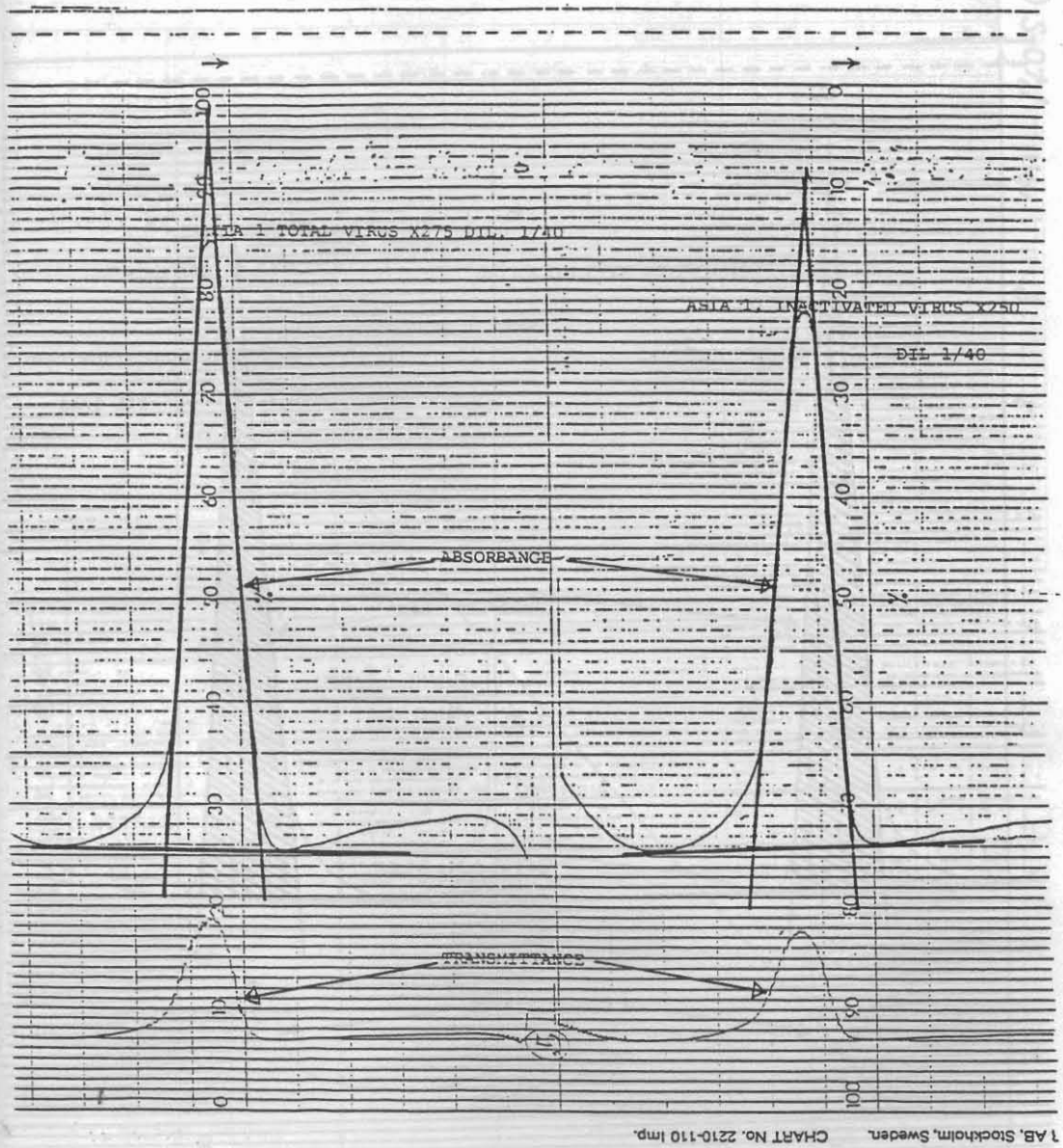
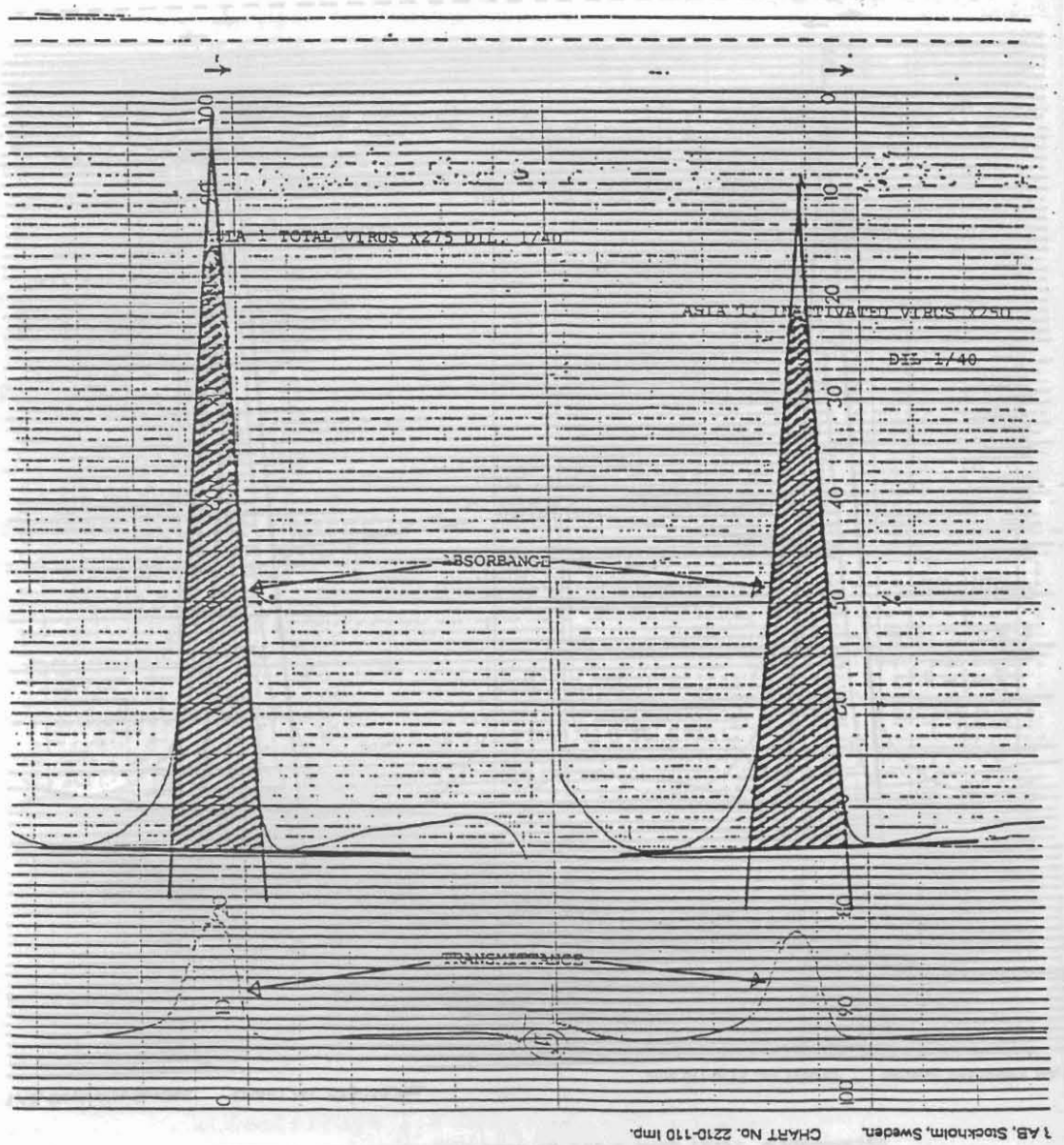
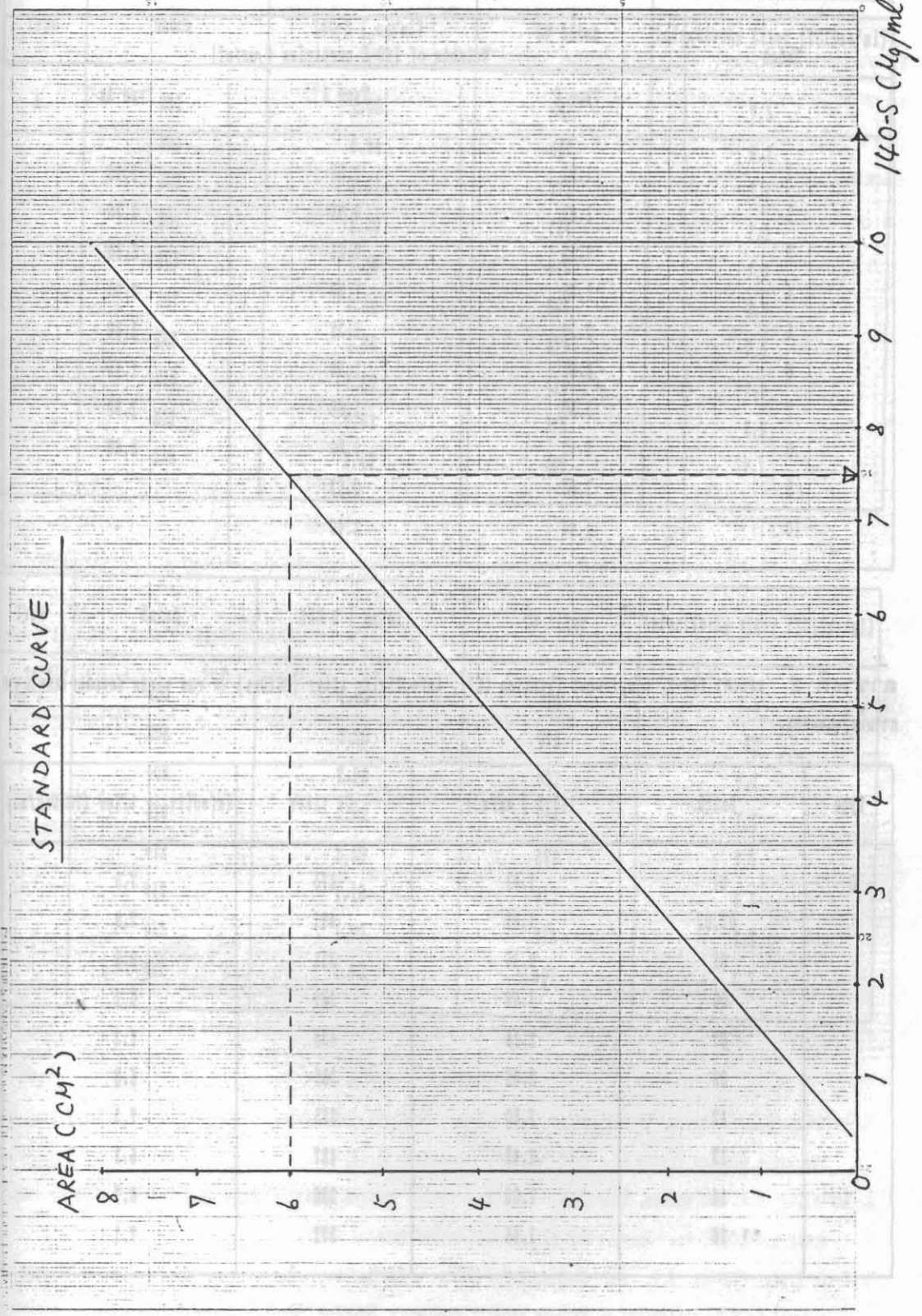

ASIA 1 TOTAL VIRUS X275 DIL. 1/40
ASIA 1. INACTIVATED VIRUS X250
DIL 1/40
ABSORBANCE
TRANSMITTANCE
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CHART No. 2210-110 Imp.
AB, Stockholm, Sweden.

FIGURE 2.



1 AB, Stockholm, Sweden. CHART No. 2210-110 Imp.

FIGURE 3.


STANDARD CURVE
AREA (CM²)
1
2
3
4
5
6
7
8
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
140-S (µg/ml)

ตารางที่ 1 ปริมาณ 140-S ใน raw virus ที่ได้จากการผลิตไวรัสเพื่อผลิตเป็นวัคซีนในแต่ละชุด

Batch	Weights of 140-S particles (µg/ml)		
	Type O	Type A	Type As-1
1	1.81	1.60	1.90
2	1.89	0.94	2.30
3	2.26	0.61	2.50
4	1.89	1.20	2.00
5	2.19	1.35	2.50
6	2.05	1.10	1.10
7	1.50	1.00	1.90
8	2.42	1.80	2.60
9	1.00	0.63	-
10	1.46	2.40	-

ตารางที่ 2 แสดงค่า 140-S, complement fixation (CF), infectivity titer ($TCID_{50}$) ใน raw virus ของแต่ละไทป์ที่ได้จากการผลิตในแต่ละชุด

Type	Batch	140-S (µg/ml)	CF titer	infectivity titer ($TCID_{50}$/ml)
O	01	1.81	275	7.5
	02,03	1.89	481	7.9
	05	2.26	311	6.5
	06	1.89	389	6.1
	07	2.19	432	7.3
	09	2.05	385	6.3
	12	1.50	335	7.3
	13	2.42	427	6.3
	14	1.00	288	6.7
	16	1.46	372	7.1

Type	Batch	140-S (μg/ml)	CF titer	infectivity titer (TCID$_{50}$/ml)
A	201	1.60	447	7.5
	202	0.94	407	6.7
	203	0.61	372	7.1
	204	1.20	724	7.1
	205	1.35	646	7.5
	207	1.10	646	6.9
	208	1.00	479	7.5
	210	1.80	424	7.7
	211	0.63	372	7.9
	219	2.40	480	7.1

Type	Batch	140-S (μg/ml)	CF titer	infectivity titer (TCID$_{50}$/ml)
As-1	407	1.90	724	7.5
	408	2.30	676	ND
	409	2.50	553	7.1
	410	2.00	556	7.3
	412	2.50	668	7.5
	413	1.10	417	6.5
	415	1.90	479	7.7
	417	2.60	407	6.7

ตารางที่ 3 แสดงค่า 140-S, Complement fixation (CF), infectivity titer ($TCID_{50}$) Concentrated-purified virus Type A ที่ความเข้มข้น 275 เท่า

Type A : Concentrated-purified virus (x 275)

Batch	140-S (ug/ml)	CF	$TCID_{50}$/ml
201	225	46,800	8.3
202	236	50,100	8.1
203	284	67,600	8.7
204	250	127,400	9.1
205	255	107,200	8.9
207	260	55,000	9.9
210	324	102,300	9.3
211	255	87,100	9.5
219	277	72,400	9.1

สรุปและวิจารณ์

ผลการตรวจวัดค่า raw virus และ concentrated purified ไวรัส ในขบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี CFT, $TCID_{50}$ และ Sucrose density ultracentrifuge หรือ uv-peak ในเบื้องต้นนี้ ค่าที่ได้จากการตรวจวัดไม่มีความสัมพันธ์กัน ปริมาณ 140-S ในraw virus ทั้ง 3 ไทป์ มีปริมาณเฉลี่ย 1-2 ไมโครกรัมต่อซีซี. ปริมาณ 140-S ของไทป์เอ ใน concentrated-purified ไวรัสที่ความเข้มข้น 275 เท่าลดลงราว 50% เมื่อเทียบกับ original raw virus

การตรวจวัดหาปริมาณ 140-S ในปัจจุบัน มีความสำคัญในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เนื่องจากการใช้ปริมาณ 140-S ซึ่งเป็นส่วนที่กระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างภูมิคุ้มโรค (7) เป็นตัวกำหนดขนาดของวัคซีน การวัดหาค่า CF และ $TCID_{50}$ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองวิธี ไม่อาจจะนำค่าที่ได้มากำหนดเป็นมาตรฐานขนาดของวัคซีนได้ เนื่องจากขาดความแน่นอนในการที่จะตรวจค่า 140-S ว่ามีมากน้อยเพียงใด การวัดหาค่า CF และ $TCID_{50}$ ในปัจจุบัน จึงควรเป็นเพียงค่าประกอบในขบวนการผลิตไวรัสเท่านั้น

ดังนั้นการที่เราสามารถวัดหาปริมาณ 140-S ใน virus preparation ไม่ว่าจะเป็น original หรือ concentrate ย่อมมีประโยชน์อย่างยิ่ง ที่จะสามารถทราบได้ว่าไวรัสที่ผลิตได้ในแต่ละชุดมีปริมาณ 140-S อยู่มากน้อยเพียงใด ซึ่งประโยชน์ที่ได้จะสามารถกำหนดได้ถึงขนาดวัคซีนในแต่ละชุดหรือในแต่ละไทป์ ให้ได้มาตรฐานเท่า ๆ กันทุกชุด วัคซีนแต่ละชุดที่ผลิตก็จะมีมาตรฐานไม่แตกต่างกันเหมือนที่เคยผลิตผ่านมา

เอกสารอ้างอิง

1. Bachrach, H.L. Trautman, R. and Breese, S.S. 1964. Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease viurs. Am. J. of Veterinary research 25:333-342.
2. Barteling, S.J. and Meloen, R.H. 1974. A simple method for the quantification of 140-S particles of foot and mouth disease virus. Arichiv fur die gesamte virusforschung 45:362-364.
3. Doel, T.R., Pletton, B.W. and Staple, R.F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradients. Develop. Biol. Standard 50:209-219.
4. Doel, T.R. and Movat, G.N. 1985. An international collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 2. Quantification of 146 S particles. Journal of Biological Stardardization 13:335-344.

5. Montnaturapoj, M. 1986. The industrial scale production of BHK21 clone 13 cells in suspension in FMD Laboratory in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. Vol.37 No.2 June:91-99.

6. Terpstra, C., Frenkel, S., Straver, P.J., Barteling, S.J. and Van Bekkum, J.G. 1976. Comparison of Laboratory techniques for the evaluation of the antigenic potency of foot and mouth disease virus cultures and vaccines. International Symposium on foot-and-mouth disease, Lyon. Develop. Biol. Standard. Vol.35:333-342.

7. Wild, T.F. and Brown, F. 1968. A study of the physical properties of the immunising antigen of foot and mouth disease virus and the effect of various inactivating agents on its structure. Archiv for die gesamte virusforchung 24:866-103.

การปรับปรุงวิธีหาปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิล ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ซูโครสเดนซีตี้เกรเดี้ยน

THE IMPROVEMENT OF THE QUANTIFICATION OF FMDV-140S PARTICLES BY A SUCROSE DENSITY GRADIENT PROCEDURE

พิศมัย เลียมจรัสกุล[1] เชิงชาย จันทรัศมี[1] เฉลิมศักดิ์ พิธรัตน์[1]

Pisamai Leamcharaskul Cherngchai Chuntharusmi Chalermsak Pittarat

Abstract

Quantification of 140S particles assay method by sucrose gradient was improved. To be a standard procedure many factors : such as equipment, technics etc. were considered. MS2-ribophage-standard was used in the system o the assay. Accuracy of this method was shown. Calculation from standard linear graph of adenine solution with th equation $E^{1\%}_{1cm\ 254} = 74.5$ indicated low levels of variation.

บทคัดย่อ

วิธีการหาปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิล จากตัวอย่างไวรัส โดยวิธีซูโครสเกรเดี้ยน ได้ถูกปรับปรุงให้ได้มาตรฐาน โดยการหาปัจจัยที่เหมาะสม เช่ เครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการและเทคนิค รวมทั้งการใช้สารมาตรฐาน เอ็มเอส 2 ร่วมเป็นมาตรฐานของการตรวจสอบและใช้เส้นกราฟมาตรฐานของอะดีนีนเป็ แนวทางการคำนวณร่วมกับสูตร $E^{1\%}_{1cm\ 254} = 74.5$

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์กีบคู่ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจให้แก่ผู้เลี้ยงสัตว์เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการใช้วัคซี เพื่อป้องกันโรคนี้ในสัตว์เลี้ยง แต่เนื่องจากการตอบสนองทางด้านความคุ้มโรคของวัคซีนนั้นเกี่ยวข้องกับปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิล ในวัคซีน (3, 11) ดั นั้นการหาปริมาณ 140 เอส ที่มีอยู่ในไวรัสที่เตรียมขึ้นสำหรับการผลิตวัคซีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (2, 8) อย่างไรก็ตามวิธีการหาปริมาณ 140 เอส ซึ่ โดยปรกติแล้ว คือวิธีซูโครสเกรเดี้ยน (Sucrose gradient) (2) ควรมีมาตรฐานเพียงพอ จึงสามารถลดระดับความแปรเปลี่ยน (Variation) ของค่ 140 เอส ที่วัดได้ และส่งผลถึงคุณภาพของวัคซีนที่ดี (4)

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวข้องกับวิธีหาปริมาณ 140 เอส อยู่บ้าง แต่พบว่าใช้เวลานานในการอ่านผล(9) และไม่สะดวกในการหาพื้นที่ของ 14 เอส พีค (10) ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์ปรับปรุงวิธีการตรวจหาปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิล ด้วยวิธีซูโครสเกรเดี้ยน ให้ได้มาตรฐาน โดยการใช้เครื่องยูวี ไมนิเดอร์ ร่วมกับสารมาตรฐาน เอ็มเอส 2 (MS2-Ribophage Standard) ในการตรวจ และใช้เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายอะดีนีน (Adenin Solution) ในการคำนวณเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตวัคซีน

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องทำเกรเดี้ยน

1.1 ชนิดคอมพิวเตอร์ (Gradient Master, Towa-Biocomp Co. Ltd.)

1.2 ชนิดธรรมดา (Continuous gradient former, Sanplateck Co. Ltd.) พร้อมกับปั๊ม (Peristaltic pump; 2115, LKB Co. Ltd.) และเครื่องปั่นแม่เหล็ก (Magnetic stirror; AS-2T, Cole Parmer Co. Ltd.)

2. เครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์ (Ultracentrifuge; L8, Beckman Co. Ltd.) พร้อมโรเตอร์ (Rotor) และหิวบ์ (Tube)ชนิดโพลีอัลโลเมอร์ (Poly-allomer) กับชนิดอุลตร้าเคลียร์ (Ultraclear)

3. เครื่องวัดค่า 140 เอส ของ ISCO Inc., U.S.A. ซึ่งประกอบด้วยเครื่องแอบซอร์บแบนซ์-ฟลูออเรสเซนซ์ ดิเทคเตอร์ (Absorbance/Fluorescence detector; UA-5 series) พร้อมด้วย ออพทิเคิ้ลยูนิท (Type-6 optical unit), เครื่องเดนซิตี้เกรเดี้ยนแฟรคชั่นเนเตอร์ (Density gradient fractionator; Model-185) และเครื่องบันทึกผล (Recorder; Model 165)

4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่นดียู-70 (Du 70, Beckman Co. Ltd.)

5. อื่น ๆ เช่น เครื่องชั่งน้ำหนักสาร, เครื่องไมโครเซนตริฟิวก์, เครื่องวัดการหักเหของแสง (Refractometer), เครื่องถ่ายเอกสารพร้อมด้วยกระดาษถ่ายเอกสาร (Standardized paper, A4, FMA Corporation Ltd.) และเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ (Fraction collector, Retriever IV, ISCO Inc., U.S.A.) เป็นต้น

6. สารเคมีต่างๆ เช่น ซูโครส (Sucrose), ฟลูออรีเนิท (Fluorinert; FC-40 หรือ FC-70, Sigma Co. Ltd. หรือ Sumitomo3M Co. Ltd.), อะดีนีน (Adenine, Sigma chemical Ltd.), สารมาตรฐาน เอ็มเอส 2 (MS2-Ribophage standard, crude harvest solution, ATCC 155971-B) และอื่นๆ

7. ตัวอย่างไวรัสจากงานผลิตวัคซีนโคและกระบือ

วิธีการ

1. หาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างไวรัสก่อนที่จะนำมาหาปริมาณ 140 เอส

1.1 ซูโครส

เตรียมน้ำตาลจากต่างประเทศ จำนวน 6 ตัวอย่าง และจากในประเทศตามท้องตลาด จำนวน 10 ตัวอย่าง (ดูตารางที่ 2 และ 3) ความเข้มข้น 45% นำไปหาค่าการดูดกลืนของแสง (Optical density, OD) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์และเครื่องวัดค่า 140 เอส ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (nm)

1.2 ซูโครสเกรเดี้ยนและเครื่องทำเกรเดี้ยน

เตรียมซูโครสเกรเดี้ยน 10-45% ด้วยเครื่องทำเกรเดี้ยน 2 รุ่น คือ รุ่นคอมพิวเตอร์ (Gradient Master, Towa-Biocomp Co. Ltd.) และรุ่นธรรมดา (Continuous gradient former, Sanplateck Co.Ltd.) จำนวน 4-6 ตัวอย่างต่อเครื่อง นำไปหาค่าการหักเหของแสง(Refractive index value, RI) หลังจากผ่านเข้าเครื่องแฟรคชั่นเนเตอร์ (Fractionator) จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ (%) ความเข้มข้นของซูโครสจากค่า RI ที่ได้

1.3 ปริมาตรตัวอย่างและเวลาในการปั่นด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์

นำตัวอย่างไวรัสปริมาตร 0.5 และ 1 มล. มาทำการตรวจสอบหาปริมาณ 140 เอส ตามวิธีในตารางที่ 1 โดยใช้เวลาในการปั่นด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์ นาน 1,2,3 และ 4 ชม. เปรียบเทียบลักษณะของพีคที่ได้

1.4 สารมาตรฐาน เอ็มเอส 2

ทำการเพิ่มจำนวนเอ็มเอส 2 โดยวิธีเพลทไลเซท (Plate lysate method) (7) จากนั้นเติม 0.025 มล. ของ เอ็มเอส 2 ที่ได้ และตัวอย่างไวรัสลงบนซูโครสเกรเดี้ยน 10-45% นำไปหาค่า 140 เอส ตามวิธีการในตารางที่ 1 และ 6 สังเกตุลักษณะของพีคที่ได้

1.5 กระดาษ

นำกระดาษมาสุ่มตัวอย่างเพื่อตัดขนาดพื้นที่ 8 ขนาดระหว่าง 0.25-8.00 ซม^2 ขนาดละ 10 ตัวอย่าง จากนั้นชั่งน้ำหนักและคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์การเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% Standard deviation, % SD) และเปอร์เซนต์ความแตกต่างสูงสุด (% Maximum difference, % Diff)

1.6 อัลตร้าเซนตริฟิวก์ทิวบ์

นำทิวบ์ 2 ชนิด คือ ชนิดไฮดีอัลโลเมอร์ และชนิดอุลตร้าเคลียร์ มาใช้ในการปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวก์ ตามวิธีการในตารางที่ และ 6 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของทิวบ์ทั้งสอง

1.7 วิธีการให้ตัวอย่างผ่านเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส

นำตัวอย่างมาตรวจสอบหาค่า 140 เอส โดยใช้วิธีการให้ตัวอย่างผ่านเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส (Fractionating method) 2 ระบบ คือ ระบบการแทง (Pierce system) และระบบการวัดจากปลายถึงก้นทิวบ์ (Top entry system) ตามวิธีการใน Instruction manual of density gradient fractionator model 185 (6) จากนั้นเปรียบเทียบความสะดวกในการใช้งานของทั้ง 2 ระบบ

1.8 สารละลายเชส (Chase solution)

ทดลองนำเอาสารละลายเชส 2 อย่าง คือ ฟลูออริเนท และ ซูโครส ความเข้มข้น 60% มาใช้ดันตัวอย่างเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส ตามวิธีของระบบการวัดจากปลายถึงก้นทิวบ์ เปรียบเทียบคุณสมบัติและความสะดวกของการดันตัวอย่างเข้าเครื่อง

2. ตรวจสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ

2.1 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่นดิย-70

ใช้สารละลายอะดีนีน (A1-A6) ทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องตามวิธีของ Doel และ Mowat (4)

2.2 เครื่องวัดค่า 140 เอส

2.2.1. วัดความถูกต้องของอัตราการไหล (Flow rate, มล./นาที) ของตัวอย่างเข้าฟโลเซลล์ (Flow cell) ทุกค่า โดยการวัดปริมาตรที่ถูกดันออกมาในเวลาที่กำหนด คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละค่า และค่า % คอมเพนเซทแฟคเตอร์ (% Compensate factor, % Com)

2.2.2. วัดความเที่ยงตรงของอัตราการหมุนของกระดาษกราฟ (Chart speed, ซม./ชม.) ทุกค่า โดยการวัดความยาวของกระดาษกราฟในเวลาที่กำหนด คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละค่า และค่า % Com

2.2.3. วัดความเที่ยงตรงของการแคลิเบรทเครื่องและเซนซิทิวิตี้ ด้วยการแคลิเบรทเครื่องโดยใช้มาตรฐานปรกติของเครื่อง (OD$_{254}$ 0.42) ที่เซนซิทิวิตี้ 0.5 วัดค่า OD ของสารละลายอะดีนีน (A1-A6) ด้วยเครื่องวัดค่า140 เอส ตามวิธีการของ Doel และ Mowat (4) เป็นจำนวน 3 ครั้ง (แคลิเบรทใหม่ทุกครั้งที่วัด) จากนั้นทดลองใช้ อะดีนีน เป็นมาตรฐานภายนอก (External standard)ในการแคลิเบรทเครื่อง ที่เซนซิทิวิตี้ 0.1 แทนมาตรฐานเดิมของเครื่อง เปรียบเทียบค่า OD ที่ได้

3. ตรวจสอบความเที่ยงตรงของเทคนิคที่ตรวจสอบค่า 140 เอส

นำตัวอย่างไวรัสมาทำการตรวจหาปริมาณ 140 เอส เป็นจำนวนทั้งสิ้น 17 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง ใน 5 การทดลองหรือการแคลิเบรท ตามวิธีการในตารางที่ 1 และ 6 คำนวณหาค่าเฉลี่ย, % SD และ % Diff จากน้ำหนักกระดาษที่ได้ทั้งหมด

4. หาเส้นกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 140 เอส กับ พื้นที่ของ 140 เอส พีค

เตรียมสารละลายมาตรฐาน อะดีนีน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนของแสง (D' = OD$_{254}$ x ml) ที่ความยาวคลื่น 254 nm ระหว่าง 0.001-0.03125 นำไปผ่านเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส เพื่อบันทึกผลเป็นรูปกราฟ ถ่ายเอกสารพีคที่ได้จากนั้นตัดพีค บันทึกค่าน้ำหนักกระดาษของพีค แล้วคำนวณค่าพื้นที่พีคจากทฤษฎีและการทดลอง รวมทั้งค่าคอมเพนเซทแฟคเตอร์ (Compensate factor) จากพื้นที่ดังกล่าว

ผลการทดลอง

1. ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างไวรัส

1.1. ซูโครส

ตามตารางที่ 2 และ 3 พบว่าในจำนวนน้ำตาลต่างประเภทที่ทดสอบนั้น น้ำตาลตัวอย่างที่ 6 ของบริษัทเมิร์ค (Merck Co. Ltd.) ให้ค่าระดับแบคกราวด์ (Background) ที่เหมาะสม คือเป็นซูโครสที่เมื่อนำตัวอย่างมาทดสอบร่วมด้วยที่เซนซิทิวิตี้ (Sensitivity) 0.1 จะให้ระดับแบคกราวด์ที่ต่ำและเอียงในแนวนอนกว่าตัวอย่างอื่น (ดูลักษณะระดับแบคกราวน์ของซูโครส ในรูปที่1) พื้นที่ของพีคจากตัวอย่างจะตรงกับความเป็นจริงและสะดวกในการเก็บพีคมากที่สุด ค่าการดูดกลืนของแสงที่วัดได้คือ 0.07 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (nm) สำหรับน้ำตาลในประเภทที่ทดสอบนั้น พบว่าน้ำตาลตัวอย่างที่ 1 จาก บ. มิตรผล จังหวัดราชบุรี ให้ค่าแบคกราวด์ที่ดีกว่าตัวอย่างอื่น แต่ค่าการดูดกลืนของแสงมากกว่าน้ำตาลจากบริษัทเมิร์ค (Merck Co. Ltd.) เล็กน้อย คือ 0.1 ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้น้ำตาลตัวอย่างที่ 6 (ดูตารางที่ 2)

1.2 ซูโครสเกรเดี้ยนและเครื่องทำเกรเดี้ยน

จากรูปที่ 2 พบว่าค่าเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของซูโครสที่คำนวณได้จากหลอดต่าง ๆ คือ แฟรคชั่น (Fraction) ที่ 1 ถึง 30 ในตัวอย่างเดียวกันมีความต่อเนื่องกันดีและเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างทั้งหมด ความเอียงของกราฟที่ได้ค่อนข้างแน่นอน คุณภาพของซูโครสเกรเดี้ยนจึงเหมาะสมที่จะแยกหาปริมาณ 140 เอส

เมื่อเปรียบเทียบ เกรเดี้ยนที่ได้จากเครื่องทำเกรเดี้ยน ทั้ง 2 ชนิด พบว่าคุณภาพใกล้เคียงกัน และเนื่องจากเครื่องทำเกรเดี้ยนแบบธรรมดา (Sanplateck) ทำเกรเดี้ยนได้ทีละหลอด แต่ละหลอดใช้เวลานานประมาณ 20 นาที ในขณะที่เครื่องแบบคอมพิวเตอร์ (Towa-Biocomp) สามารถทำเกรเดี้ยนได้ทีละ 6 หลอดในเวลาเดียวกัน โดยใช้เวลาประมาณ 10 นาทีเท่านั้น

ดังนั้น เครื่องทำเกรเดี้ยนแบบคอมพิวเตอร์ (Towa-Biocomp) จึงถูกเลือกในการหาปริมาณ 140 เอส เนื่องจากความสะดวกดังกล่าว

1.3 ปริมาตรตัวอย่างและเวลาในการปั่นด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์

ลักษณะของ 140 เอส พีคที่ได้จาก 0.5 มล. นั้นค่อนข้างเล็ก หากมีปริมาณ 140 เอส ในตัวอย่างไวรัสน้อยมาก อาจจะทำให้อ่านผลผิดพลาด ส่วนพีคที่ได้จาก 1 มล. มีขนาดใหญ่มากกว่าแต่ไม่ใหญ่เกินกว่าขนาดของแผ่นกราฟ ดังนั้นปริมาตรที่เหมาะสมของตัวอย่างไวรัสที่ใช้ในการทดสอบนั้นคือ 1 มล. นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3 พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นตัวอย่างบนซูโครสเกรเดี้ยน 3 และ 4 ชม. สามารถแยก 140 เอส พาร์ทิเคิ้ล ได้ดีมากกว่า 1 และ 2 ชม. และได้พีคที่ชัดเจน สะดวกในการวัด เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 3 และ 4 ชม. พบว่าลักษณะพีคจาก 4 ชม. ดีมากกว่า 3 ชม.เล็กน้อย แต่เนื่องจากพีคที่ได้จาก 4 ชม.นั้น อยู่เกือบถึงปลายทิวบ์ ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปั่นตัวอย่างเป็น 3.5 ชม.

1.4 สารมาตรฐาน เอ็มเอส 2

ลักษณะของ เอ็มเอส 2 พีค นั้น ใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เพียงแต่จะเป็นคอนโทรล (Control) ของการทดลองแต่ยังเป็น 80 เอส พรีมาร์คเกอร์ (80S premarker) (ดูรูปที่ 4)

1.5 กระดาษ

พบว่าค่า % SD และเปอร์เซนต์ Diff ของน้ำหนักกระดาษสูง เมื่อขนาดพื้นที่เล็ก และต่ำเมื่อขนาดพื้นที่ใหญ่ โดยปรกติแล้วพื้นที่ 140 เอส พีคที่ได้จากการตรวจสอบตัวอย่างไวรัสมีค่าประมาณ 1-6 ซม^2 เมื่อพิจารณาร่วมผลจากขนาดพื้นที่ดังกล่าวพบว่า % SD ของกระดาษพื้นที่ 1 และ 6 ซม^2 มีค่าเป็น ±4.5 และ ±2.0 % (n=10) ตามลำดับ ส่วน % Diff ของกระดาษพื้นที่ดังกล่าว มีค่าเป็น 11.6 และ 5.1 % (n=10) ตามลำดับ นอกจากนั้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักกระดาษและพื้นที่กระดาษนั้น เป็นลักษณะของกราฟเส้นตรง (r=0.99996) ดังแสดงในรูปที่ 5 จึงสรุปได้ว่าค่าน้ำหนักของกระดาษค่อนข้างคงที่มากเหมาะสมสำหรับการนำไปหาค่า 140 เอส ของตัวอย่าง

1.6 อุลตร้าเซนตริฟิวก์ทิวบ์

เนื่องจากทิวบ์ชนิดโพลี่อัลโลเมอร์ มีอายุการใช้งานได้นานมากกว่าชนิดอุลตร้าเคลียร์ ซึ่งเกิดรอยร้าวและแตกง่ายขณะปั่นด้วยอุลตร้าเซนตริฟิวก์ ดังนั้นจึงเลือกใช้โพลี่อัลโลเมอร์ทิวบ์ในการตรวจสอบค่า 140 เอส เพื่อป้องกันการสูญเสียตัวอย่าง ค่าใช้จ่าย และเวลาในการทดสอบ

1.7 วิธีการให้ตัวอย่างผ่านเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส

เนื่องจากการใช้ระบบการวัดจากปลายถึงก้นทิวบ์ ทำให้สามารถนำทิวบ์กลับมาใช้ในการทดสอบต่อไปได้อีกหลายครั้ง และสะดวกในการตรวจสอบตัวอย่างมากกว่าระบบการแทงซึ่งไม่สะดวกและใช้ทิวบ์ได้เพียง 1 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงพิจารณาใช้ระบบการวัดจากปลายถึงก้นทิวบ์ในงานวิจัยนี้

1.8 สารละลายเชส (Chase solution)

ฟลออริเน็ท มีคุณสมบัติคือ ไม่เหนียว ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่ราดเร้าในการทำปฏิกิริยา (inactive) ความหนาแน่นสูง (มากกว่า 1.8) และไม่ละลายในน้ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้ฟลออริเน็ทเป็นสารละลายเซสแทน 60% ซูโครส ซึ่งหนืด ละลายในน้ำได้ เพื่อสะดวกในการดันตัวอย่างไวรัสผ่านเข้าฟโล-เซลล์ของเครื่องวัดค่า 140 เอส

2. ความเที่ยงตรงของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่นดียู-70

สารละลายอะดีนีนความเข้มข้น A1-A6 มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 254 nm เป็น 0.4677, 0.3743, 0.2838, 0.1881, 0.0908 และ 0.0471 ตามลำดับ (r = 0.99994) และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Doel และ Mowat พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์จึงมีความเที่ยงตรงสูง

3. ความเที่ยงตรงของเครื่องวัดค่า 140 เอส

3.1 จากตารางที่ 4 พบว่าค่า % Con มีค่าประมาณ 99% ดังนั้นอัตราการไหลของตัวอย่างเข้าโฟลเซลล์ (Flow cell) มีความเที่ยงตรงดี

3.2 เมื่อพิจารณาค่า % Con ของอัตราการหมุนระหว่าง 12-600 รอบ/นาที พบว่ามีค่าประมาณ 100% (ดูตารางที่ 4) ดังนั้นอัตราการหมุนของกระดาษกราฟ จึงมีความเที่ยงตรงมาก (ดูพารามิเตอร์ปรากฏในตารางที่ 6)

3.3 จากตารางที่ 4 พบว่า ค่า OD ของการแคลิเบรทครั้งเดียวกัน ให้ค่าใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าจะใช้เซนซิทิวิตี้ที่ต่างกัน ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะดีนีนและค่า OD ที่ได้เป็นกราฟเส้นตรง (r>0.996) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับค่าที่ได้จากเครื่องดียู-70 พบว่าใกล้เคียงกัน สำหรับค่า OD ของการแคลิเบรทต่างครั้งกัน พบว่าต่างกันเล็กน้อย และเมื่อปรับปรุงการแคลิเบรทโดยใช้ อะดีนีน เป็นมาตรฐานภายนอกพบว่ายังมีความแตกต่างกันเล็กน้อยเช่นเดิม ดังนั้นการแคลิเบรทมีความสำคัญในการวัดค่า 140 เอส ให้มีความเที่ยงตรง

4. ความเที่ยงตรงของเทคนิคที่ตรวจสอบค่า 140 เอส

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซนต์ SD และเปอร์เซนต์ Diff พบว่ามีค่าเป็น ±10.5 % และ ±43 % (n = 17) ตามลำดับ (ดูตารางที่ 5) ดังนั้นค่าเปอร์เซนต์ความเที่ยงตรง (% Accuracy) ที่ได้จากตัวอย่างที่ทำการทดสอบเพียง 1 ครั้ง จะมีค่าเป็น ±21.5% หากทำการทดสอบเป็นจำนวน 2 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง จะให้ค่าประมาณ ±10% ในงานทดสอบปรกติทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ครั้ง ดังนั้นเทคนิคสำหรับงานวิจัยนี้มีความเที่ยงตรงดี

5. เส้นกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 140 เอส กับพื้นที่ของ 140 เอส พีค

จากค่าคอมเพนเซทเพลเลอร์ของพื้นที่ที่ได้จากพีคของสารละลายอะดีนีน (OD_{254} = 0.002-0.03125) ซึ่งมีค่าประมาณ 1 เห็นได้ว่าค่าพื้นที่ที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับทางทฤษฎีมาก และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนของแสง (D') และพื้นที่ของกระดาษ จะได้เส้นกราฟมาตรฐานเส้นตรง (r = 0.9973) (ดูรูปที่ 6)

ตารางที่ 1: สรุปวิธีการหาปริมาณ 140 เอส

1. ปั่นตัวอย่างไวรัสด้วยไมโครเซนตริฟิวก์ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ.เก็บส่วนใส (Supernate)ไว้ตรวจสอบ
2. เติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 มล.พร้อมทั้งสารละลายมาตรฐานเอ็มเอส2 ปริมาตร 0.025 มล.ลงบนซูโครสเกรเดี้ยน 10-45%แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์ ด้วยความเร็ว 36,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลานาน 3.5 ชม.
3. อ่านค่าการดูดกลืนของแสงออกมาในรูปของกราฟโดยการใช้เครื่องวัดค่า 140 เอส ที่แคลิเบรท (Calibrate) ไว้แล้วความยาวคลื่น 254 nm ตามพารามิเตอร์ (Parameter) ที่กำหนดในตารางที่ 6
4. ถ่ายเอกสารกราฟที่ได้ โดยใช้กระดาษที่ผ่านการทดสอบแล้ว
5. ตัดพีค (Peak) ที่ได้จากกระดาษ
6. ชั่งน้ำหนักกระดาษที่ตัดไว้โดยใช้เครื่องชั่งวิเคราะห์
7. คำนวณหาความเข้มข้นของ 140 เอส จากน้ำหนักกระดาษโดยใช้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักกระดาษและความเข้มข้นของ 140 เอส (ดูสูตรการคำนวณในวิจารณ์)

ตารางที่ 2 ซูโครสต่างประเทศที่นำมาทดสอบเพื่อทำซูโครสเกรดเดียน

เกรด	เลขที่	บริษัทที่ผลิต
1. Pure	PDM7116	Wago pure chem. Ind., ญี่ปุ่น
2. Guarantee	M9R4037	Nacalai Tesque, Inc., ญี่ปุ่น
3. Extrapure	M9R4509	Nacalai Tesque, Inc., ญี่ปุ่น
4. Microbiology	020 K1280665	Merck Co. Ltd., เยอรมัน
5. Microbiology	626 K2481451	Merck Co. Ltd., เยอรมัน
6. Microbiology	007 K1280665	Merck Co. Ltd., เยอรมัน

ตารางที่ 3 ซูโครสในประเทศที่นำมาทดสอบเพื่อทำซูโครสเกรดเดียน

ชื่อ	แหล่งที่มา
1. น้ำตาลทรายมิตรผล	บริษัทน้ำตาลมิตรผล, จ. ราชบุรี
2. น้ำตาลทรายมิตรผล	โรงงานรามเกษตรกรอุตสาหกรรม จ. ชัยภูมิ
3. น้ำตาลอิมพีเรียล	บริษัทยูไนเต็ดเตร์ฟูดส์, กรุงเทพ
4. น้ำตาลสตาร์	บริษัทกมล แอล. พี., กรุงเทพ
5. น้ำตาลบุลบุอย	บริษัทเฮลธ์เทรดดิ้ง(ประเทศไทย) กรุงเทพ
6. น้ำตาลซูการ์เมท	ห้างหุ้นส่วนจำกัดเทพรสอุตสาหกรรม, กพ.
7-10.น้ำตาลทรายทั่วไปที่แข่งขายเป็นกิโล	ร้านค้าในตลาดอำเภอปากช่อง

ตารางที่ 5 ความเที่ยงตรงของเทคนิคที่ตรวจสอบค่า 140 เอส

ตัวอย่างไวรัส ตัวอย่างที่	น้ำหนักกระดาษ (140 เอส พีค, มก.) จากการทดลองครั้งที่ 1	2	3	4	5	รวม
1.	11.8	12.3	11.3	10.7	12.9	
2.	12.2	13.6	10.2	11.2	12.4	
3.			11.4	9.3	12.0	
4.			8.7	11.1		
5.				10.0		
6.				12.2		
ค่าเฉลี่ย	12.0	13.0	10.4	10.8	12.4	11.4
% SD	1.7	5.0	10.5	8.6	2.96	10.5
% Diff	3.3	10.0	26.0	26.9	7.2	43.0

ตารางที่ 6 พารามิเตอร์ของเครื่องวัดค่า 140 เอส ที่ใช้ในงานวิจัย

พารามิเตอร์ (Parameter, หน่วย) (ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดได้ในเครื่อง)	ค่าพารามิเตอร์ปรกติที่ใช้จริง
1. เซนซิทิวิตี้ (Sensitivity), (0.002-2.0)	0.1
2. ความยาวเต็มที่ของสเกล(Recorder full scale length, cm), (20.0)	20.0
3. ความยาวของส่วนที่แสงผ่านฟโลเซลล์ (Light path length of flow cell, cm), (1.0)	1.0
4. อัตราการไหลของตัวอย่าง (Flow rate, ml/mmin), (0.375-6.0)	0.75
5. ความเร็วของการหมุนของกราฟ (Chart speed, cm/hr), (0.6-1200)	60.0
6. ปริมาตรตัวอย่าง(Sample load volume, ml)	1.0

ตารางที่ 4: ความเที่ยงตรงของเครื่องวัด 140 เอส

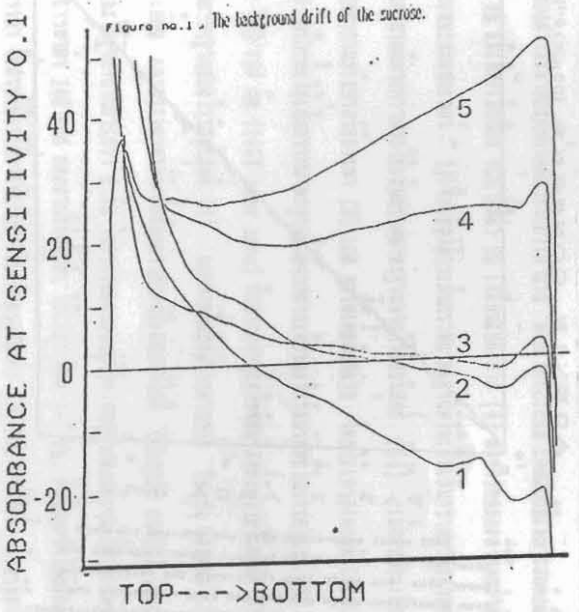
อัตราการไหลของตัวอย่าง,มล/นาที	เวลา (นาที)	ปริมาตรที่ควรได้จริง (มล)	ค่าเฉลี่ยของปริมาตรที่ได้ 5 ครั้ง.(X±SD)	% Con
6.00	5	30.0	30.26±0.08	99.14
3.00	10	30.0	30.18±0.10	99.40
1.50	20	30.0	30.16±0.10	99.47
0.75	40	30.0	30.12±0.10	99.60
0.375	60	22.5	22.68±0.10	99.92

อัตราการหมุนของกราฟ, ชม/รม.	เวลา (นาที)	ความยาวที่ควรได้ (มล)	ค่าเฉลี่ยของความยาวที่ได้ 5 ครั้ง (X±SD)	% Con
1200	0.5	10.0	12.52±0.08	79.9
600	1.0	10.0	10.02±0.03	99.8
300	1.0	5.0	5.01±0.03	99.8
120	5.0	10.0	9.99±0.01	100.1
60	10.0	10.0	10.03±0.02	99.7
30	10.0	5.0	4.98±0.01	100.4
12	20.0	4.0	3.99±0.01	100.3
6	60.0	6.0	6.04±0.04	99.3
3	120.0	6.0	5.98±0.02	100.3
1.2	180.0	3.6	3.58±0.02	100.6

ความเข้มข้นของสารละลายอะดีนีน(µg/ml)		ค่าการดูดกลืนของแสงที่เซนซิทีวิตี้ 2.0	1.0	0.5	0.2	0.1	0.05
1.	A1 7.14	0.44	0.44	0.410			
	A2 5.71	0.36	0.36	0.355			
	A3 4.29	0.27	0.26	0.260			
	A4 2.86	0.18	0.18	0.173	0.172		
	A5 1.43	0.09	0.08	0.083	0.081	0.081	
	A6 0.71	0.05	0.04	0.040	0.039	0.039	0.040
	A0 0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000
r		0.9999	0.9999	0.9983	0.9994	0.9998	
2.	A1 7.14	0.43	0.43	0.430			
	A2 5.71	0.35	0.35	0.344			
	A3 4.29	0.26	0.26	0.256			
	A4 2.86	0.18	0.17	0.170	0.171		
	A5 1.43	0.08	0.08	0.078	0.078	0.081	
	A6 0.71	0.04	0.04	0.035	0.035	0.039	0.040
	A0 0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000
r		0.9998	0.9997	0.9998	0.9984	0.9998	

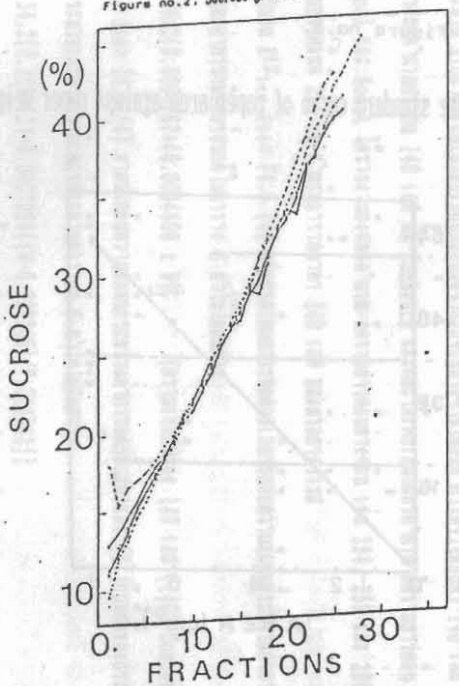
ความเข้มข้นของสารละลายอะดีนีน(µg/ml)		ค่าการดูดกลืนของแสงที่เซนซิทีวิตี้ 2.0	1.0	0.5	0.2	0.1	0.05
3.	A1 7.14	0.50	0.49	0.490			
	A2 5.71	0.40	0.40	0.395			
	A3 4.29	0.33	0.31	0.305			
	A4 2.86	0.18	0.16	0.160			
	A5 1.43	0.08	0.07	0.070	0.070	0.070	
	A6 0.71	0.04	0.03	0.030	0.028	0.028	0.028
	A0 0.00	0.00	0.00	-0.002	-0.003	-0.003	
r		0.996	0.996	0.996			

Figure no.1. The background drift of the sucrose.



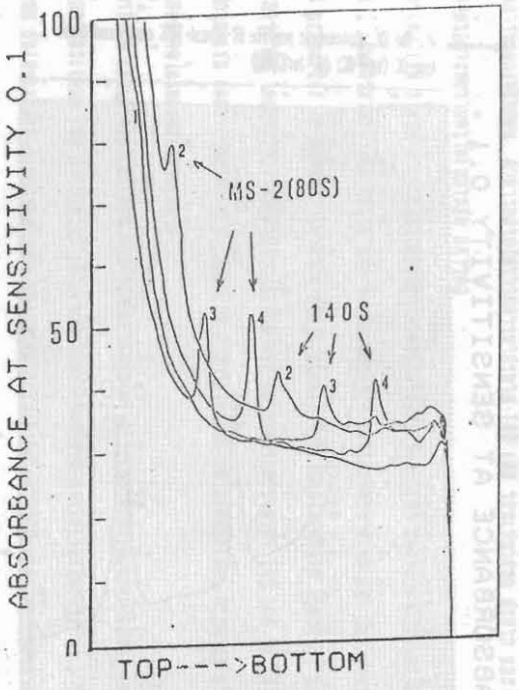
The number of the chart line corresponds to that of sucrose represented at table no. 2. The linear sucrose gradients were prepared to be 10-45%with use of different grades of sucrose. The gradient was fractionated from top to bottom and the absorbance was monitored under normal 140S assay condition.

Figure no.2. Sucrose gradient



Sucrose gradients (10-45%) were prepared by continuous gradient former (Sanplateck Co. Ltd.). They were fractionated and measured refractive index value and then, calculated to sucrose concentration from a standard curve of sucrose concentration against refractive index value.

Figure no.3. Ultracentrifugation time



Each number represents ultracentrifugation time:1: 1 hr.,2: 2hrs., 3: 3 hrs. and 4: 4 hrs. respectively. Each of 1 ml of type Asia-1 virus was loaded onto 10-45% sucrose gradient with crude MS-2 Phage fluid (25ul). The ultracentrifugation speed was set at 36,000 rpm (4°C). SW-40Ti rotor was used.

Figure no.4. The UV. photometric profile of normal 140S assay condition: type CC (type CC: Al. lot17/90)

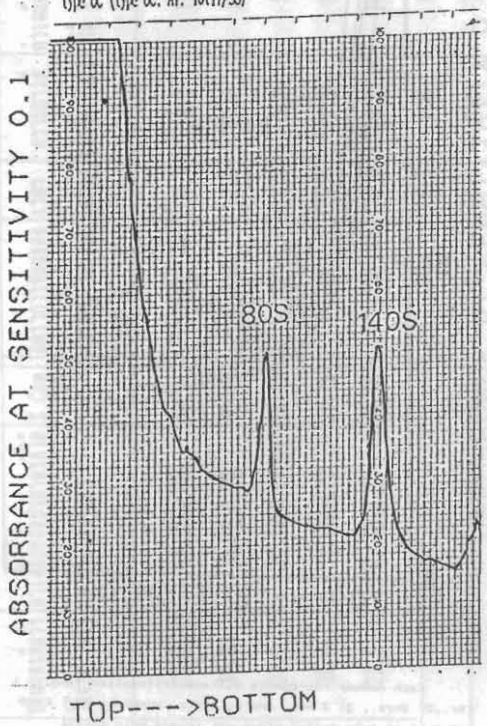


Figure no.5.

The standard curve of paper area against paper weight

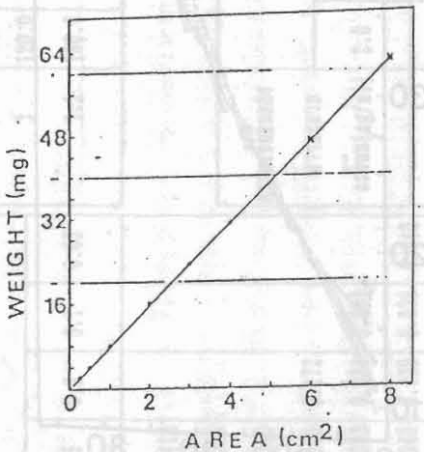
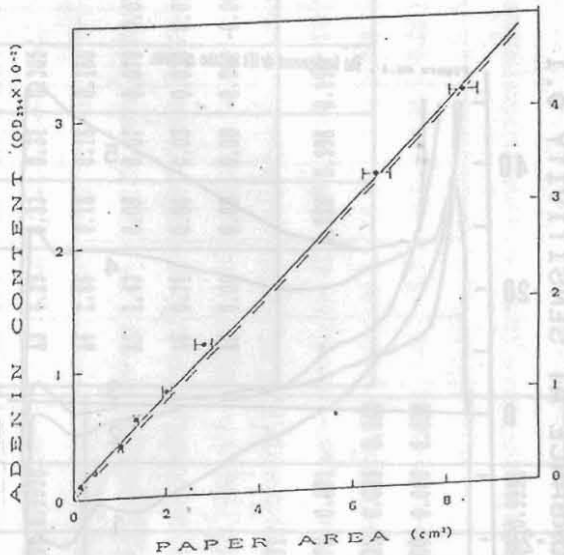


Figure no.6



140S model experiment with use adenine standard solution: The relationship between adenine content and paper area. The solid line represents the relationship from experiment value and the dot line represents the theoretical relationship. The 140S content was calculated with use: $E^{1\%}_{1cm}$ 264:74.5 (J.Biol.Stand 13, 335-344, 1985)

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ สามารถสรุปได้ว่าวิธีการหาปริมาณ 140 เอส วิธีนี้เป็นวิธีที่ดี สะดวก และได้มาตรฐาน เพราะเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยทั้งหมดในการตรวจตัวอย่างพบว่ามีความเหมาะสม กล่าวคือ

1) สารเคมี เช่น ซูโครส สามารถใช้ระดับแบคคราวด์ที่เหมาะสม, ฟลูออริเนท มีคุณสมบัติไม่หนืดและไม่ละลายในน้ำ จึงสะดวกในการใช้ และโดยเฉพาะเอ็มเอส 2 เป็นสารมาตรฐานที่ดี คือเป็น RNA bacteriophage รูปทรงกลมขนาดเล็ก มีค่า Sedimentation coefficient เป็น 79-80S (5) จึงทำหน้าที่เป็น premarker ได้ อีกทั้งมีความคงตัวสูง (High stability) ไม่ก่อให้เกิดโรค (Lack of pathogenicity) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ FMDV และประการสำคัญ ได้เคยมีรายงานว่าสามารถใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการตรวจหาค่า 140 เอส ได้ (4)

2) อุปกรณ์ เช่น อุลตร้าเซนตริฟิวก์ทิวบ์ ไม่แตกง่าย สามารถใช้ได้หลายครั้งก่อนจะเสีย, กระดาษสำหรับถ่ายเอกสารจากฟิลม์ที่ได้ ให้ค่าน้ำหนักที่สม่ำเสมอไม่ว่าจะถูกตัดที่จุดใดในแผ่นหรือจากแผ่นใด

3) เครื่องมือ เช่นเครื่องทำเกรเดียน สามารถทำเกรเดียนได้รวดเร็วและได้เกรเดียนที่สม่ำเสมอ, เครื่องวัดค่า 140 เอส มีความเที่ยงตรงดีมาก

4) วิธีการและเทคนิค เช่น การปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวก์ หากใช้เวลาในการปั่น 3.5 ชม. และใช้ปริมาตรตัวอย่าง 1 มล.จะได้ฟิลม์ที่มีขนาดเหมาะสม ชัดเจนและสะดวกในการตัด, การให้ตัวอย่างผ่านเข้าเครื่องวัดค่า 140 เอส ใช้ระบบการวัดจากปลายถึงก้นหิวบ์ ซึ่งสะดวกและประหยัด, การแคลิเบรท เนื่องจากการแคลิเบรทมีความสำคัญในการวัดค่า 140 เอสเป็นอย่างมาก ดังนั้นหากทำการหาค่าเฉลี่ยจากการทดสอบตัวอย่างละ 2 ครั้ง จะมี % ความเที่ยงตรงประมาณ ±10% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากสถาบันต่างๆในโลกที่ทำการตรวจสอบค่า 140 เอส (4) เห็นได้ว่ามีความเที่ยงตรงดี

สำหรับการหาสูตรคำนวณปริมาณ 140 เอส นั้น Bachrach และคณะได้เคยเสนอสูตรคำนวณที่ความยาวคลื่น 259 nm ไว้เมื่อปี ค.ศ. 1964 ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Doel และ Mowat ได้รายงานถึงสูตรคำนวณที่ความยาวคลื่นต่างๆกัน เช่น 254, 259 และ 260 nm เป็นต้น เพื่อความสะดวกในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 254 nm สำหรับการวัดหาค่า 140 เอส ของตัวอย่างไวรัส

เมื่อนำสูตรคำนวณ $E^{1\%}_{1cm\ 254}$= 74.5 (4) มาผนวกกับผลการทดลองเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนของแสง (D^t) กับน้ำหนักของกระดาษ (มก, W) และค่าพารามิเตอร์ปรากฏในตาราง 6 ทำให้ได้สมการ

$$Z = 134.2\{0.0004767+(0.0004808 \times W)\}$$ [ความเข้มข้นของ 140 เอส (140S Concentration, ug/ml) = Z]

หรือจากสูตร $E^{1\%}_{1cm\ 254}$= 74.5 (4) มาผนวกกับความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนของแสง (D^t)กับพื้นที่ของกระดาษ, ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของกระดาษกับพื้นที่ของกระดาษและค่าพารามิเตอร์ปรากฏในตารางที่ 6 ทำให้ได้สมการ

$$Z = 134.2[0.0006124+0.0037094\{(W-0.282206)/7.714842\}]$$

การหาปริมาณ 140 เอส สามารถคำนวณได้จากสูตรทั้งสอง เมื่อใช้ค่าพารามิเตอร์ปรากฏ ซึ่งจะให้ผลใกล้เคียงกันมาก

เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายอะดีนีนได้ถูกใช้ในการคำนวณ ด้วยเหตุที่อะดีนีน มีคุณสมบัติเหมาะสมคือมีความคงตัวสูง และเมื่อเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นระหว่าง 240-260 nm แม้เพียงเล็กน้อย จะทำให้ค่า OD เปลี่ยนแปลงมาก (4) ผลการทดลองที่ได้พบว่าค่าพื้นที่ 140 เอส พีค ใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎีเป็นอย่างมาก (ค่าคอมเพนเซทแฟคเตอร์ = 1) จึงเชื่อได้ว่าเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้เป็นเส้นกราฟมาตรฐานจริง ซึ่งสอดคล้องกับเหตุผลที่ว่าการใช้เส้นกราฟมาตรฐานอะดีนีนในการคำนวณดีมากกว่าการใช้เส้นกราฟมาตรฐานจากไวรัสบริสุทธิ์ (4) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานในประเทศไทยของ Shirai และคณะ (1990) ซึ่งได้เคยพยายามปรับปรุงวิธีการหา 140 เอส พาร์ทิเคิ้ลดังกล่าว โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการวิเคราะห์หาปริมาณ 140 เอส ด้วยวิธีซูโครสเกรเดียน พร้อมทั้งใช้เส้นกราฟมาตรฐานที่ได้จากการเจือจางไวรัสบริสุทธิ์ในการคำนวณ (9) แต่เมื่อใช้เครื่องคอมพิวเตอร์แล้วพบความยากลำบากในการหาพื้นที่ของ 140 เอส พีค (140S peak area) อีกประการหนึ่งไวรัสบริสุทธิ์มีความไม่คงตัว ทำให้ค่าพื้นที่ดังกล่าวจะสูงเกินกว่าความเป็นจริงเมื่อคำนวณจากเส้นกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์ (4) นอกจากนั้นยังมีรายงานของ Tsuda และคณะ (1987) ซึ่งได้เคยทำการแยก 140 เอส พาร์ทิเคิ้ล โดยวิธีซูโครสเกรเดียน และตรวจหาพาร์ทิเคิ้ลดังกล่าวด้วยวิธีเอสอาร์ไอดี (Single radial immunodiffusion,SRID) พบว่าต้องใช้มีมีประสพการณ์ในการอ่านผล และใช้เวลานานมากกว่า 2 วัน ในการรอผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน กับ สเปคซิฟิคแอนติซีรั่ม (Specific antiserum) (10) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธีการหาค่า 140 เอส ของงานวิจัยนี้แล้ว ใช้เวลาเพียง 5-7 ชม. ซึ่งน้อยกว่าวิธีดังกล่าว

จากเหตุผลต่างๆที่กล่าวมา จึงสรุปได้ว่าวิธีการที่ปรับปรุงขึ้นเพื่อตรวจหาค่า 140 เอส พาร์ทิเคิ้ล ด้วยวิธีซูโครสเกรเดียน โดยการใช้เครื่องยูวี-โมนิเตอร์ (UV-Monitor) ร่วมกับสารมาตรฐานเอ็มเอส 2 (MS2 ribophage standard) ในการตรวจ และใช้เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายอะดีนีน

(Adenine solution) ในการคำนวณนี้ เป็นวิธีที่ดี สะดวก และได้มาตรฐานเหมาะสม สำหรับงานประจำและงานวิจัย และเป็นแนวทางที่ดีในการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตวัคซีนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Toru Inoue และ ดร. พิจิตร ผดุงเสน ที่ช่วยเป็นที่ปรึกษาและสนับสนุนการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Bachrach, H.L., Trautman, R., Breese, S.S. 1964. Chemical and Physical Properties of Virtually Pure Foot -and-Mouth Disease Virus. Am. J. Vet. Res. 25: pp 333-342.

2. Barteling, S.J. and Moloen, R.H. 1974. A Simple Method for the Quantification of 140S Particles of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV). 45: pp 362-364.

3. Brown, F. and Newman, J.F.E. 1963. In Vitro Measurement of the Potency of Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccine. J. Hyg. 61: pp 345-351.

4. Doel, T.R. and Mowat, G.N. 1985. An International Collaborative Study on Foot and Mouth Disease Virus Assay Methods. 2. Quantification of 146S Particles. 13: pp 335-344.

5. Fiers, W. 1979. Comprehensive Virology. Structure and Function of RNA Bacteriophages. 13: pp 69-204.

6. Instruction Manual of Density Gradient Fractionator Model 185, ISCO Inc., U.S.A., 4 p.

7. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. pp 55-73.

8. Rweyemamu, M.M., Black, L., Boge, A., Thorne, A.C. and Terry, G. M. 1984. The Relationship between the 140S Antigen Dose in Aqueous Foot-and-Mouth Disease Vaccines and the Serum Antibody Response of Cattle. J. Bio. Std. 12: pp 111-120.

9. Shirai, J., Chatchawanchonteera, A., Sinsuwongwat, W., Makarasen, P. and Sugimura, T. 1990. Estimation of 140S Particles in Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Vaccine by Using the Computer Analyzing System. Jpn. J.Vet. Sci. 52(3): pp 621-630.

10. Tsuda, T., Namba, K., Yamasaki, Y., Nilchavee, S., Pattanaprasit, N., Linchongsubongkoch, W. and Onodera, T. 1987. Quantitative Single Radial Immunodiffusion of Foot-and-Mouth Disease Viral Antigens Using Convalescent Cattle Sera. Jpn. J. Vet. Sci. 49(3): pp 461-468.

11. Wild, T.F. and Brown, F. 1968. A Study of the Physical Properties of the Immunising Antigen of Foot-and-Mouth Disease Virus and the Effect of Various Inactivating Agents on Its Structure. Arch. Gesamte Virusforsch. 24: pp 86-103.