วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 6 ฉบับที่ 2 กันยายน 2539

The Journal of Verterinary Biologics Vol. 6 No.2 September 1996

- การใช้เครื่องกรอง Glass Fiber ชนิด Cartridge ในการ Clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย.....1

- การใช้เครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่อง ในการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ใส.....10

- การใช้ Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น.....16

- ศึกษาการตกตะกอนของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ Suspension ในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย.....26

- การแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21.....33

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858 - 1134

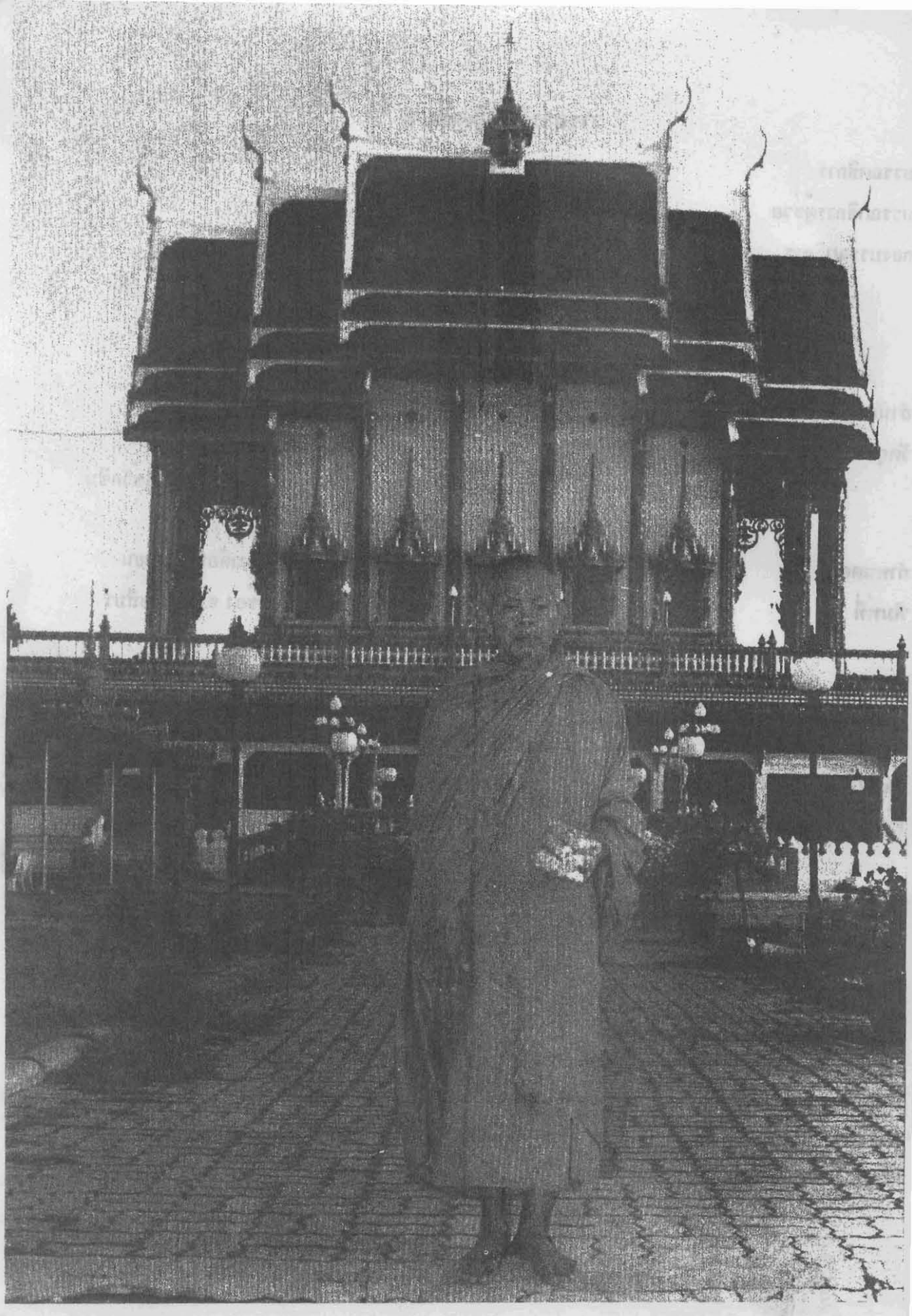
วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
บรรณาธิการผู้ช่วย	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	สหวัชร์ อึ้งวณิชบรรณ
	ไชยา สงฆ์ประโคน
	เฉิมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพ ฯ
วัตถุประสงค์	1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์
	2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคสัตว์
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน มีนาคม และเดือน กันยายน
พิมพ์ที่	ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS

Editor in chief	Ab Kongthon
Assistance Editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial Board	Somjai Kamolsiripichaiporn
	Sahawatchara Ungvanijban
	Chaiya Sangaprakon
	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 Development 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 ฉบับ คือ เดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2 ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นความหมายทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็น และประสบการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ควรพิมพ์ดีดบนกระดาษขนาด 8.8 × 11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ความยาวประมาณ 30 บรรทัดต่อหน้า มีความยาวทั้งหมดไม่เกิน 8 หน้าพิมพ์ โดยประมาณ

2. ชื่อเรื่อง บอกทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ควรกระทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. ชื่อผู้เขียน ใช้ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. บทคัดย่อ (Abstract) ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผลไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของเรื่อง ควรเขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

5. เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยควรประกอบด้วยหัวเรื่องต่อไปนี้

5.1 คำนำ (Introduction) เพื่ออธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ และอาจรวบรวมการตรวจเอกสาร (Literature review) เข้าไว้ด้วยกัน

5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and method) ควรประกอบด้วย

5.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการที่ใช้ทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 ผล (Results) เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็นถ้ามี ตาราง กราฟ หรือรูปภาพ ก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญและประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 คำขอบคุณ (Acknowledgement) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและเตรียมเอกสาร ลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 เอกสารอ้างอิง (Literature cited)

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาอังกฤษ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข,.... ในเอกสารภาษาไทย และ a, b.... ในเอกสารภาษาต่างประเทศไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยชื่อตัวนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินโดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนชื่อเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะตัวอักษรแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, De, Der, Von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนเอกสารอ้างอิงมีดังนี้นี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลขสำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น. หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์สิ่งมีชีวิตให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

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

(5) เอกสารที่ไม่ใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขลำดับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ Journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เรื่องนั้นอ้างถึงอีกทอดหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุพบท (preposition) ในบางกรณีเช่นชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้วให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึงหากมิใช่หนังสือตำราให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. ภาพประกอบ (Illustration)

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจึงใช้และผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 × 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย Lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ. ปากช่อง
จ. นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อทำความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การใช้เครื่องกรอง Glass fiber ชนิด Cartridge ในการ Clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

THE CLARIFICATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS FLUID BY GLASS FIBER CARTRIDGE FILTERS

วรากิจ จันทรัศมี[1] ประดิษฐ์ ป๊อกเทิง[1]

Varakit Chuntharusmi Pradit Poktherng

ABSTRACT

The efficiency of the glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) size 2.0 μ, length 30 inches was studied by filtration of foot and mouth disease virus fluid type O, A and Asia1 after clarified by ROBATEL. Three types of FMD virus fluid were filtrated through filters and the clear virus fluid yields were assayed by the percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml). The percent recovery of virus type O were 96.37%, 91.34%, 50% and 96.38% respectively. The percent recovery of virus type Asia1 were 97.6%, 100%, 100%, and 99.9% respectively while the percent recovery of 140S particle, virus infectivity and protein content of virus type A were 98.11%, 72.46% and 100% respectively.

The percent recovery of 140S virus particle which important for immunogen of all three types of FMD vaccine was higher than 96% indicated that glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) was the satisfactory equipment for the clarification of FMD virus fluid.

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพการกรองของเครื่อง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) ขนาด 2.0 μ ยาว 30 นิ้ว โดยการกรองน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ คือ O, A และAsia1 ที่ได้จากการทำให้ใสมาแล้วด้วยเครื่องปั่น ROBATEL พบว่าน้ำไวรัสทั้ง 3 ไทป์มีความใส โดย

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle (μg/ml), ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml), ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) ของไวรัสไทป์ O เท่ากับ 96.37%, 91.34%, 50% และ 96.38% ตามลำดับ มีเปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสไทป์ Asia1 เท่ากับ 97.6%, 100%, 100% และ 99.9% ตามลำดับ และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ปริมาณไวรัส และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 98.11%, 72.46% และ 100% ตามลำดับ

จากเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ซึ่งสำคัญสำหรับการกระตุ้นภูมิต้านทานของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ มีปริมาณสูงกว่า 96% แสดงว่าเครื่อง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ในการ clarify กากเซลล์ออกจากน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบเซลล์แขวนลอย (Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986) ซึ่งการผลิตโดยวิธีนี้น้ำไวรัส (virus fluid) ที่ได้จะมี กากเซลล์เจือปนอยู่เป็นจำนวนมาก กากเซลล์เหล่านี้จะต้องถูกขจัดออกจากน้ำไวรัสก่อนที่จะนำน้ำไวรัสไปทำไวรัสเข้มข้น โดยการตกตะกอนกากเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C. แต่ยังไม่สามารถขจัดกากเซลล์ออกได้หมด กากเซลล์เหล่านี้จะถูกขจัดออกโดยเครื่องปั่นแยกกากเซลล์ ROBATEL* ซึ่งจะยังคงมีกากเซลล์หลุดลอดออกจากเครื่องปั่นได้ มีรายงานว่าเครื่องปั่น continuous centrifuge ชนิด Basket-type ปั่นด้วยอัตรา 90-120 ลิตร/ชั่วโมง สามารถปั่นเซลล์ออกได้ 95% (Zwernen et al, 1981; Ball, 1985) กากเซลล์ที่หลงเหลือจากการปั่นโดย ROBATEL เมื่อเข้าสู่กระบวนการทำไวรัสเข้มข้นด้วยเครื่อง ultrafitration จะทำให้เกิดการอุดตันภายในไส้กรองได้

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยจึงใช้เครื่องกรองขนาด 2.0 μ มาทำการกรองกากเซลล์ออกจากน้ำไวรัสที่ผ่านออกมาจากเครื่อง ROBATEL ก่อนผ่านเข้าเครื่องทำไวรัสเข้มข้น โดยนำเครื่องกรอง LIFEGARD CARTRIDGE FILTERS** ซึ่งเป็น glass fiber มีคุณสมบัติเป็น depth adsorption สามารถขจัดสิ่งสกปรกได้ปริมาณสูง ซึ่งปริมาณ virus adsorption ขึ้นอยู่กับ pH ของน้ำไวรัส (Ball, 1985)

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไส้กรอง LIFEGARD CARTRIDGE FILTERS ในการ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

---

*เครื่องปั่นแยกต่อเนื่อง บริษัท ROBATEL ประเทศฝรั่งเศส

**บริษัท Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องกรอง LIFEGARD CARTRIDGE FILTERS ขนาด pore size 2.0 μ ยาว 30 นิ้ว พร้อม housing และสาย flexible hose

2. ไวรัส

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O (O/Udorn/87), A (A/Nakhon Pathom/87) และ Asia1 (Asia1/Petchburi/85) ที่ผ่านการ clarify แล้ว โดยเครื่องปั่น ROBATEL

วิธีการ

1. การนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการใส่ไส้กรอง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) ใน housing แล้วนึ่งฆ่าเชื้อเครื่องกรองพร้อมอุปกรณ์ประกอบต่างๆ เช่น สาย flexible hose ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C. ความดัน 1.5 กก./ซม.^{3} เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อัดอากาศบริสุทธิ์เพื่อเก็บความดันและปล่อยให้เย็นลง

2. การกรองไวรัส

ปิดอากาศลดความดันภายในเครื่องกรอง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) เป็นศูนย์แล้วส่งน้ำไวรัสจากถัง buffer ด้วยความดัน 0.4-0.5 กก./ซม.^{3} เข้าเครื่องกรอง แล้วส่งไวรัสหลังการกรองเข้าสู่ถังขนาด 3,000 ลิตร เพื่อทำไวรัสเข้มข้นด้วยเครื่อง ultrafiltration ต่อไป

3. เก็บตัวอย่างไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 ก่อนและหลังเข้าเครื่อง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัส 140S particle (μg/ml) โดยวิธี sucrose density gradient, ปริมาณ virus antigen (cfu/ml) โดยวิธี complement fixation test และปริมาณ virus infectivity โดยวิธี CPE method (microtechnique) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) โดยวิธี Folin's method ตามลำดับ โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากน้ำไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 จำนวนอย่างน้อยไทป์ละ 7 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของไวรัสแต่ละชนิด

ผลการทดลอง

จากการทดลองกรองน้ำไวรัสทั้ง 3 ไทป์ ครั้งละ 3,500 ลิตร โดยใช้เครื่อง LIFEGARD CARTRIDGE FILTERS ปรากฏว่าน้ำไวรัสหลังการกรองมีลักษณะใสปราศจากกากเซลล์และสิ่งเจือปนอื่น ๆ และเมื่อนำน้ำไวรัสก่อนและหลังการกรองไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัส ปริมาณแอนติเจน และปริมาณโปรตีน พบว่าไวรัสไทป์ O มีเปอร์เซนต์ recovery ของปริมาณ 140S particle (μg/ml), ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml), ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน

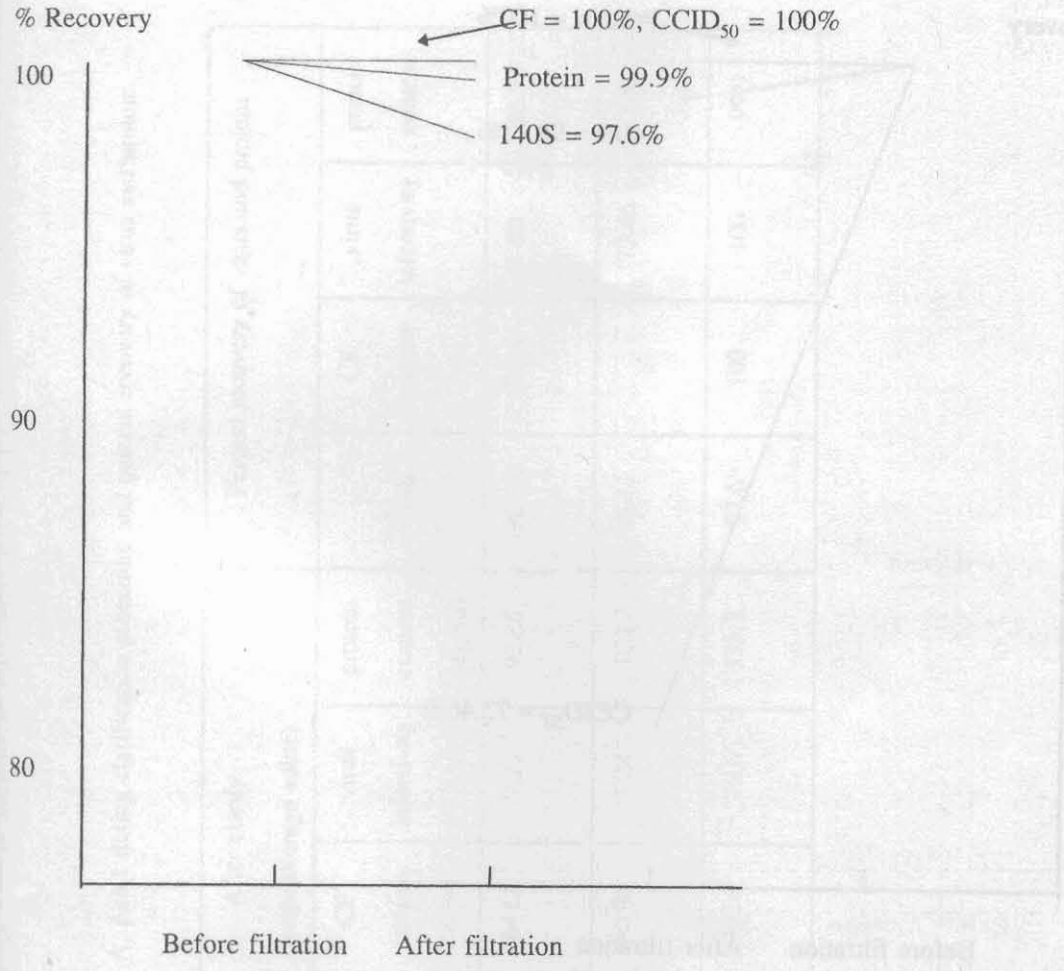


Figure 2 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml) virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of FMD virus type Asia1 in the clarification procedure by glass fiber cartridge filters (LIFEGARD).

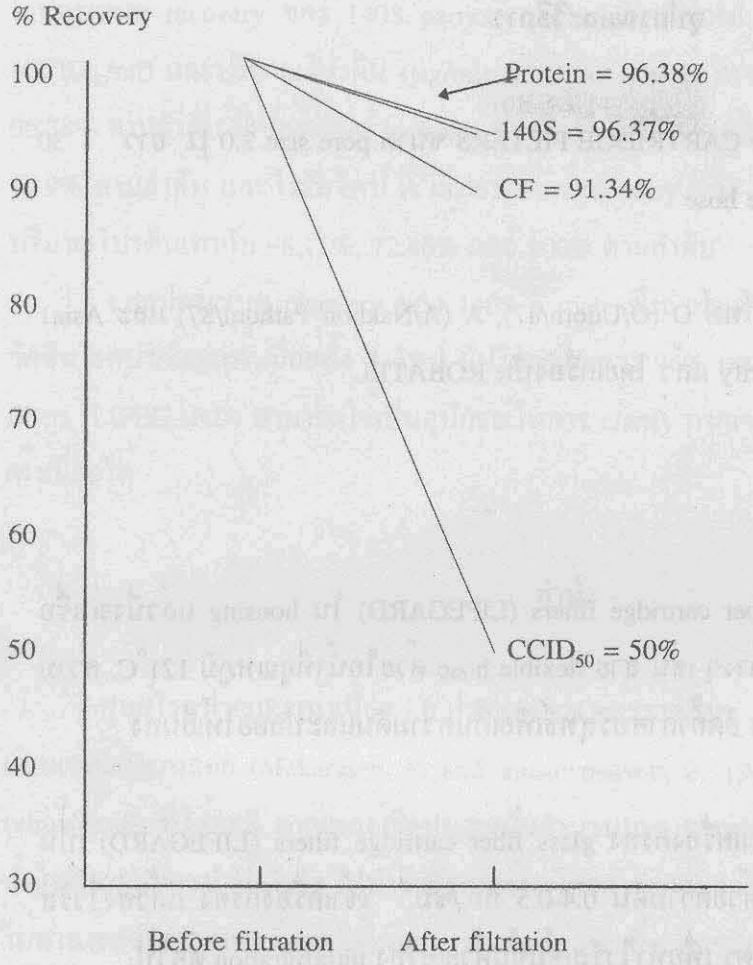


Figure 1 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of FMD virus type O in the clarification procedure by glass fiber cartridge filters (LIFEGARD).

(μg/ml) เท่ากับ 96.37%, 91.34%, 50% และ 96.38% ตามลำดับ (Table 1, Figure 1) เปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสไทป์ Asia1 เท่ากับ 97.6%, 100%, 100% และ 99.9% ตามลำดับ (Table 1, Figure 2) และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของปริมาณ 140S particle ปริมาณไวรัส และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 98.11%, 72.46% และ 100% ตามลำดับ (Table 1, Figure 3)

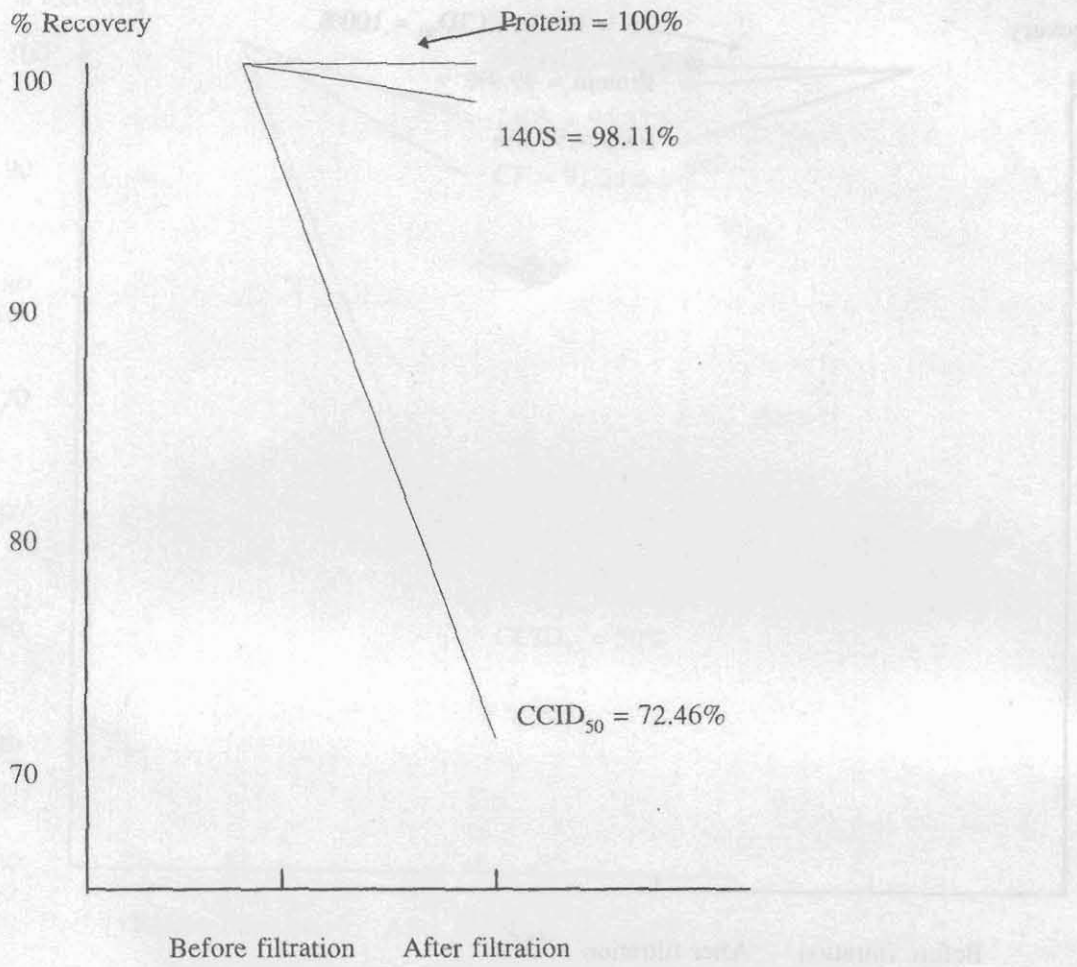


Figure 3 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of FMD virus type A in the clarification procedure by glass fiber cartridge filters (LIFEGARD).

Table 1 The assay of virus antigen and protein content of FMDV type O, A, Asia1 during clarification procedure and percent recovery of virus and protein

Material	Before clarify (mean average value)				After clarify (mean average value)				Percent recovery of virus and protein			
virus (type)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	Protein content (μg/ml)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S	CF antigen	virus infectivity	protein content
O (n=10)	1.93	703.7	7.52	957.1	1.86	642.8	7.22	922.5	96.37	91.34	50	96.38
A (n=7)	2.12	<100	7.38	992	2.08	<100	7.24	1051.8	98.11	-	72.46	100
Asia1 (n=10)	1.27	772	6.92	533.8	1.24	792.9	7.16	533.7	97.6	100	100	99.9

n = number of sample

วิจารณ์

จากผลการทดลองกรองน้ำไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 จำนวน 27 ครั้ง ๆ ละ 3,500 ลิตร พบว่าน้ำไวรัสที่กรองได้มีความใสปราศจากกากเซลล์ ไม่พบการอุดตันของไส้กรอง ซึ่งแสดงว่าไส้กรองสามารถกรองน้ำไวรัสได้ผลดี สามารถจับกากเซลล์ได้จำนวนมาก เพราะมีคุณสมบัติเป็น depth adsorption (Ball, 1985) ประกอบกับน้ำไวรัสที่ผ่านการ clarify โดยเครื่อง ROBATEL มีกากเซลล์เจือปนอยู่เป็นจำนวนน้อย จึงไม่ทำให้เกิดการอุดตันของไส้กรองระหว่างการกรอง และน้ำไวรัสทั้ง 3 ไทป์ ที่นำมากรองเมื่อนำไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัส ปริมาณแอนติเจน และปริมาณโปรตีนหลังการกรองเปรียบเทียบกับปริมาณก่อนการกรองพบว่ามีปริมาณ 140S particle (μg/ml) ลดลงน้อยกว่า 3.63% ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ลดลงน้อยกว่า 8.66% ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) ลดลงน้อยกว่า 50% และปริมาณโปรตีนลดลงน้อยกว่า 3.62% การที่ปริมาณ 140S particle ลดลงอาจมีสาเหตุมาจากส่วนหนึ่งของไวรัสถูกดูดซึมติดอยู่ในไส้กรอง ส่วนค่าโปรตีนในน้ำไวรัสพบว่ามีการสูญเสียน้อยเนื่องมาจากไส้กรองมีคุณสมบัติเป็น negative charge (Ball, 1985) ไม่มีการจับโปรตีนในน้ำไวรัสที่มีสภาวะเป็นด่างระหว่างการกรอง ดังแสดงใน Figure 1, 2 และ 3 สำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ในไวรัสไทป์ A ที่ได้มีค่าต่ำมาก อาจเกิดจากซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบเป็นคนละ subtype กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน จึงทำให้ไม่สามารถนำมาคำนวณได้

สรุป

เครื่อง glass fiber cartridge filters (LIFEGARD) สามารถ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดี ได้น้ำไวรัสที่ใสปราศจากกากเซลล์ โดยมีการสูญเสีย 140S particle น้อยกว่า 3.63% และไส้กรองมีอายุการใช้งานได้นานเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในกระบวนการผลิตวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

1. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. p. 180-201.
2. Ball, G.D. 1985. Clarification and Sterilization. In : Animal cell Biotechnology, Vol. 2. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.), Academic press, United Kingdom. p. 87-125.
3. Zwerner, R.K., Cox, R.M., Lynn, J.D., and Acton, R.T. 1981. Five-year perspective of the large-scale growth of mamalian cells in suspension culture. Biotechnol. Bioeng. 23, p. 2717-2735.

การใช้เครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่องในการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ใส

THE CLARIFICATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS FLUID BY SEPARATING CONTINUOUS CENTRIFUGE

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1] วรากิจ จันทรัศมี[1]

Wacharee Sinsuwonkwat Varakit Chuntharusmi

ABSTRACT

The clarification of foot and mouth disease virus fluid type O, A and Asia1 was done by the separating continuous centrifuge (ROBATEL). Three types of FMD virus fluid were centrifuged by ROBATEL and the clear virus fluid yields were assayed by the percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml). The percent recovery of virus type O were 98.46%, 100%, 52.53% and 97.7% respectively. The percent recovery of virus type Asia1 were 99.2%, 98%, 66% and 92.14% respectively while the percent recovery of 140S particle, virus infectivity and protein content of virus type A were 97.24%, 100% and 100% respectively.

The percent recovery of 140S particle which important for immunogen of all three types of FMD vaccine was higher than 97% indicated that ROBATEL was the satisfactory equipment for the clarification of FMD virus fluid.

บทคัดย่อ

การใช้เครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่อง (ROBATEL) ปั่นแยกกากเซลล์ออกจากน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ คือ ไทป์ O, A และ Asia1 พบว่าน้ำไวรัส ทั้ง 3 ไทป์ มีความใส มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle (μg/ml), ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml), ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) ของไวรัสไทป์ O เท่ากับ 98.46%, 100%, 52.53% และ 97.7% ตามลำดับ มีเปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสไทป์ Asia1 เท่ากับ 99.2%, 98%, 66% และ 92.14% ตามลำดับ และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ปริมาณไวรัส

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 97.24%, 100%, และ 100% ตามลำดับ

จากเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ซึ่งสำคัญสำหรับกระตุ้นภูมิต้านทานของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ มีปริมาณสูงกว่า 97% แสดงว่าเครื่อง ROBATEL สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ในการปั่นแยกกากเซลล์ออกได้

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบเซลล์แขวนลอย (suspension cell culture method) (Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986) ซึ่งการผลิตโดยวิธีนี้น้ำไวรัส (virus fluid) ที่ได้จะมีกากเซลล์เจือปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นก่อนที่จะนำน้ำไวรัสไปผลิตเป็นวัคซีนจะต้องทำการขจัดกากเซลล์ออก เพราะกากเซลล์จะเป็นตัวการทำให้เกิดการแพ้วัคซีน (Wiblin, 1985) การขจัดกากเซลล์ในขั้นตอนแรกโดยการตกตะกอนกากเซลล์ที่ 4°C. (Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986) ยังคงมีกากเซลล์ หลงเหลืออยู่ไม่สามารถขจัดออกได้หมด จึงนำเครื่องกรอง Funda* ซึ่งใช้ Diatomaceous earth มาเป็น filter aids ในการกรองขจัดกากเซลล์ออกก่อนนำไปสู่กระบวนการทำไวรัสเข้มข้น เพื่อผลิตเป็นวัคซีน monovalent ต่อไป (เชิงชาย และพยนต์, 2533) Zwerner และคณะ (1981) ได้ใช้เครื่องปั่นต่อเนื่องแบบ Basket-type ในการขจัดกากเซลล์และ celite ที่หลงเหลือจากการกรองด้วยเครื่องกรอง Funda ซึ่งได้มีรายงานไว้ว่าเครื่องปั่นแบบ Basket-type สามารถปั่นขจัดกากเซลล์ได้ถึง 95%

ปี พ.ศ. 2539 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้มีโครงการปรับปรุงการผลิตเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอเพื่อใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการเปลี่ยนแปลงการผลิตวัคซีนชนิด monovalent เป็นวัคซีน trivalent ซึ่งต้องใช้ปริมาณไวรัสเพิ่มมากขึ้นทำให้ปริมาณกากเซลล์มากขึ้นจึงจำเป็นต้องปรับปรุงการขจัดกากเซลล์โดยใช้เครื่อง ROBATEL**

---

* เครื่อง Funda filter สำหรับแยกกากเซลล์ออกจากน้ำไวรัส โดยใช้สาร celite เป็น filter aids ในการกรอง บริษัท Ishikawajima Heavy Industrial Co.Ltd. Japan

**เครื่องปั่นแยกต่อเนื่อง ROBATEL รุ่น CHV 1400 บริษัท ROBATEL ประเทศฝรั่งเศส

เครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่อง (ROBATEL) เป็นอุปกรณ์ที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้นำมาใช้แทนเครื่องกรอง Funda ในการขจัดกากเซลล์ออกจากน้ำไวรัส โดยทั่ว ๆ ไปเครื่องปั่นชนิด continuous centrifuge จะใช้เป็นอุปกรณ์ในการขจัดกากเซลล์หยาบ ในกระบวนการเพาะไวรัสแบบเซลล์แขวนลอยก่อนนำไวรัสไปสู่กระบวนการอื่น เครื่องปั่น ROBATEL แตกต่างจาก Basket-type คือเป็น separating continuous centrifuge โดยที่เครื่อง ROBATEL สามารถนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้โดยไม่ต้องถอดประกอบ เครื่อง ROBATEL รุ่น CHV 1400 สามารถปั่นไวรัสได้ในอัตรา 500 ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่ Basket-type ปั่นได้ในอัตรา 90-120 ลิตร/ชั่วโมง เท่านั้น (Ball, 1985) นอกจากนี้เครื่องปั่น ROBATEL ยังสามารถสลัดกากเซลล์ออกได้ขณะทำการปั่นโดยไม่ต้องหยุดเครื่อง สามารถปั๊มน้ำไวรัสออกจากเครื่องได้ และสามารถเพิ่มความดันในถัง buffer tank ให้เป็น 0.4-0.5 ก.ก./ซม.^{3} ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลักดันน้ำไวรัสผ่านเครื่องกรองขนาด 2.0 μ เพื่อเข้าสู่กระบวนการทำไวรัสเข้มข้นต่อไป

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองใช้เครื่อง ROBATEL ในการขจัดกากเซลล์ออกจากน้ำไวรัสที่มีปริมาณการผลิตมาก ครั้งหนึ่งประมาณ 3,500-4,500 ลิตร เพื่อประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นต่อเนื่อง ROBATEL รุ่น CHV1400 พร้อมสาย flexible hose
2. เซลล์

   BHK_{21} C_{13} Suspension Cell
3. ไวรัส

   ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O (O/Udorn/87), A (A/Nakhon Pathom/87) และ Asia1 (Asia1/Petchburi/85)

วิธีการ

1. การนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อเครื่อง ROBATEL พร้อมอุปกรณ์ประกอบต่าง ๆ เช่น สาย flexible hose สำหรับรับส่งไวรัส และถัง buffer tank ที่อุณหภูมิ 121°C. ความดัน 1.5 กก./ซม.^{3} เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการเดินเครื่อง ROBATEL ที่ความเร็วรอบต่ำ (2102 รอบ/นาที) แล้วปล่อยไอน้ำเข้าเครื่อง ทำการอัดอากาศเพื่อทำให้เครื่องแห้งและเก็บความดันภายในเครื่อง และถัง buffer หยุดเครื่องแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

2. การปั่นแยกไวรัส

ปิดอากาศลดความดันภายในเครื่องและถัง buffer ให้เป็นศูนย์ เปิดวาล์วน้ำเย็น 4°C. เพื่อลดความร้อนของเครื่อง เปิดวาล์วน้ำ deionized water เพื่อพร้อมในการสลัดกาก แล้วเดินเครื่องรอบสูง (6,790 รอบ/นาที) ส่งไวรัสจากถัง 5,000 ลิตร ที่ได้ทำการตกตะกอนกากเซลล์ที่ 4°C.ไว้แล้ว เป็นเวลา 40 ชั่วโมงผ่านเข้าเครื่องด้วยอัตรา 500 ลิตร/ชั่วโมง พร้อมปรับวาล์ว outlet ให้มีความดันภายในเครื่องเป็น 2-4 กก./ซม.^{3} เพื่อควบคุมไม่ให้น้ำไวรัสเกิดเป็นฟองและมีกากเซลล์หลุดลอดเจือปนออกมามาก ส่งไวรัสหลัง clarify แล้วไปเก็บไว้ที่ถัง buffer พร้อมกับเก็บความดันในถังไว้ที่ 0.4-0.5 กก./ซม.^{3} เพื่อใช้เป็นแรงดันน้ำไวรัสออกจากถังเพื่อผ่านน้ำไวรัสเข้าเครื่องกรอง glass fiber ขนาด 2.0 μ ต่อไป

3. เก็บตัวอย่างไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 ก่อนและหลังเข้าเครื่อง ROBATEL แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัส 140S particle (μg/ml) โดยวิธี sucrose density gradient, ปริมาณ virus antigen (cfu/ml) โดยวิธี complement fixation test และปริมาณ virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) โดยวิธี CPE method (microtechnique) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) โดยวิธี Folin's method ตามลำดับ โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากน้ำไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 จำนวนอย่างน้อยไทป์ละ 7 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของไวรัสแต่ละชนิด

ผลการทดลอง

จากการทดลองปั่นน้ำไวรัสจำนวน 3,500 ลิตร โดยใช้อัตราการไหล 500 ลิตร/ชั่วโมง ใช้เวลาประมาณ 7.5 ชั่วโมง น้ำไวรัสที่ได้มีความใสปราศจากกากเซลล์ และเมื่อนำน้ำไวรัสก่อน และหลังการปั่นไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัส ปริมาณแอนติเจน และปริมาณโปรตีน พบว่าไวรัสไทป์ O มีเปอร์เซนต์ recovery ของปริมาณ 140S particle (μg/ml), ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) เท่ากับ 98.46%, 100%, 52.53% และ 97.7% ตามลำดับ เปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสไทป์ Asia1 เท่ากับ 99.2%, 98%, 66% และ 92.14% ตามลำดับ และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของปริมาณ 140S particle ปริมาณไวรัสและปริมาณโปรตีนเท่ากับ 97.24%, 100% และ 100% ตามลำดับ (Table 1)

วิจารณ์

ในขบวนการเตรียมไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจะต้องผ่านเครื่องกรองขนาด 2.0 μ เพื่อขจัดกากเซลล์ ซึ่งถ้าใช้น้ำไวรัสที่ไม่ผ่านเครื่องปั่นจะเกิดการอุดตันได้ง่าย แต่จากการใช้เครื่องปั่น ROBATEL ก่อนนำมาเข้าเครื่องกรอง สามารถลดการอุดตัน โดยมีการสูญเสีย

Table 1 The assay of virus antigen and protein content of FMDV type O, A, Asia1 during clarification procedure and percent recovery of virus and protein

Material	Before clarify (mean average value)				After clarify (mean average value)				Percent recovery of virus and protein			
virus (type)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S	CF antigen	virus infectivity	protein content
O (n=10)	1.96	686.2	7.8	979.8	1.93	703.7	7.52	958	98.46	100	52.5	97.7
A (n=7)	2.18	<100	7.55	935.4	2.12	<100	7.55	992	97.24	-	100	100
Asia1 (n=10)	1.28	776	7.12	585.8	1.27	7.61	6.94	539.8	99.2	98	66	92.14

n = number of sample

ปริมาณ 140S particle ของไวรัสไทป์ O มีค่าเท่ากับ 1.54% ไทป์ A มีค่าเท่ากับ 2.76% และไทป์ Asia1 มีค่าเท่ากับ 0.8% สำหรับค่าการตรวจปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ในไวรัสไทป์ A ที่ได้ค่าต่ำมากอาจเกิดจากซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบเป็นคนละ subtype กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน จึงทำให้ไม่สามารถนำมาคำนวณได้

สรุป

เครื่องปั่นแยกต่อเนื่อง (ROBATEL) สามารถ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดี ได้น้ำไวรัสที่ใสปราศจากกากเซลล์โดยมีการสูญเสีย 140S particle ของไวรัสทั้ง 3 ไทป์ น้อยกว่า 2.8% เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในกระบวนการผลิตวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

1. เชิงชาย จันทรัศมี พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2533 การใช้เครื่องกรองฟุนด้าในการ clarify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ปีที่ 1 เล่ม 1 หน้า 28-30
2. พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ เชิงชาย จันทรัศมี วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ 2533 การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกรแบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 1 เล่ม 1 หน้า 8
3. Ball , G.D. 1985. Clarification and Sterilization. In : Animal cell Biotechnology, Vol. 2. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.), Academic press, United Kingdom. p. 87-125.
4. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. p. 180-201.
5. Wiblin, C.N. 1985. Pyrogenicity and Carcinogenicity Test. In : Animal Cell Biotechlnology, Vol.2. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.), Academic Press, United Kingdom. p. 321-354.
6. Zwerner, R.K., Cox, R.M., Lynn, J.D., and Acton, R.T. 1981. Five-year perspective of the large-scale growth of mamalian cells in suspension culture. Biotechnol. Bioeng. 23, p. 2717-2735.

การใช้เครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น

THE CONCENTRATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS FLUID BY CARBON-CERAMIC ULTRAFILTRATION

วรากิจ จันทรัศมี[1] โฆษิต สินสุวงศ์วัฒน์[1]

Varakit Chuntharusmi Kosit Sinsuwonkwat

ABSTRACT

The efficiency of carbon-ceramic ultrafiltration (CARBOSEP) was studied for the concentration of foot and mouth disease virus fluid type O, A and Asia1. After 50 time concentration, the concentrated virus fluid and the filtrated fluid yields were assayed by the percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml). The recovery of the concentrated virus type O were 90.43%, 96.22%, 93.09% and 60.4% respectively while the filtrated fluid were 0%, <11.28%, 6.10% and 39.98% respectively. The recovery of the concentrated virus type Asia1 were 91.92%, 97.74%, 34.69% and 39.16% respectively while the filtrated fluid were 0%, <20.6%, 0.49% and 20.20% respectively. The recovery of 140S particle, virus infectivity and protein content of the concentrated virus type A were 89.89%, 46.55% and 54.26% respectively while the filtrated fluid were 0%, 3.92% and 17.25% respectively.

The percent recovery of 140S particle which important for immunogen of all three types of FMD vaccine was between 89%-91% and the ability of protein purification was between 39%-60% indicated that the carbon-ceramic ultrafiltration (CARBOSEP) was the satisfactory equipment for concentration of FMD virus fluid.

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ชนิดเข้มข้นโดยเครื่อง ultrafiltration ชนิด carbon-ceramic (CARBOSEP) โดยทำน้ำไวรัสเข้มข้นได้ประมาณ 50 เท่า พบว่าไวรัสไทป์ O มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle (μg/ml), ไวรัสแอนติเจน (cfu/ml) ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) ของน้ำไวรัสเข้มข้นเท่ากับ 90.43%, 96.22%, 93.09% และ 60.04% ตามลำดับ และน้ำ filtrate มีค่าเท่ากับ 0%, <11.28%, 6.10% และ 39.98% ตามลำดับ เปอร์เซนต์ recovery ของน้ำไวรัสเข้มข้นของไวรัสไทป์ Asia1 เท่ากับ 91.92%, 97.74%, 34.69% และ 39.16% ตามลำดับ และน้ำ filtrate มีค่าเท่ากับ 0%, <20.6%, 0.49% และ 20.20% ตามลำดับ และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ปริมาณไวรัสและปริมาณโปรตีนเท่ากับ 89.89%, 46.55% และ 54.26% ตามลำดับ และ น้ำ filtrate เท่ากับ 0%, 3.92% และ 17.25% ตามลำดับ

จากเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ซึ่งสำคัญสำหรับการ กระตุ้นภูมิต้านทานของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ มีค่าระหว่าง 89%-91% และความสามารถในการ purify โปรตีนมีค่าระหว่าง 39%-60% แสดงว่าเครื่อง corbon-ceramic ultrafiltration (CARBOSEP) สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้นได้

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี suspension cell culture method (Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986) และผลิตวัคซีนชนิด monovalent เรื่อยมา ซึ่งไม่เพียงพอต่อการควบคุมป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย อีกทั้งยังสิ้นเปลืองเวลาและแรงงานในการฉีดวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยโดยกรมปศุสัตว์จึงได้มีโครงการปรับปรุงคุณภาพและปริมาณการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการปรับปรุงการผลิตวัคซีนเดิมจากการผลิตวัคซีนแบบ monovalent มาเป็นวัคซีน trivalent ซึ่งการผลิตวัคซีน trivalent จะต้องใช้ virus antigen จำนวนมาก เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนเพราะความต้องการวัคซีนในแต่ละปีมีปริมาณมาก ในขั้นตอนของการผลิตวัคซีน trivalent นั้น นอกจากจะต้องผลิตน้ำไวรัสเป็นจำนวนมากแล้ว น้ำไวรัสเหล่านั้นจะต้องมาผ่านกระบวนการ clarify และทำไวรัสให้เข้มข้นก่อนนำน้ำไวรัสเข้มข้นไปทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น แล้ว inactivate และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -198°C. สำหรับใช้ในการ formulate เป็นวัคซีนต่อไป

น้ำไวรัสที่ผลิตในแต่ละครั้งมีปริมาณตั้งแต่ 3,500 ลิตร ถึง 4,500 ลิตร ซึ่งเครื่องมือที่จะใช้ในการทำไวรัสเข้มข้นนั้น จะต้องมีความทนทานใช้ง่ายและไม่ทำให้ไวรัสสูญหายไปในขบวนการทำไวรัสเข้มข้น ดังนั้นศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยจึงใช้เครื่อง ultrafiltration ชนิดใหม่แทน Hollow fiber ที่เคยใช้ในการทำไวรัสเข้มข้น 10 เท่า สำหรับผลิตเป็นวัคซีน monovalent (พยนต์ และคณะ 2533)

เครื่อง CARBOSEP* เป็น ultrafiltration ชนิด carbon-ceramic มี molecular weight cut off 100,000 daltons เป็น cylindrical form มีพื้นที่ในการกรอง 3.4 m^2 มีความทนต่อกรดและด่างสูงตั้งแต่ระดับ pH 0-14 สามารถนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้สูงถึง 300°C. ทนต่อแรงดันสูงมากกว่า 10 bar มีความทนต่อสารเคมี เช่น chloroform เครื่องปั๊มที่ใช้สำหรับ circulate น้ำไวรัสระหว่างการทำเข้มข้น มีความเร็วสูง ซึ่งความเร็วของเครื่องปั๊มที่สูงนี้จะทำให้เกิดแรงดันในการผลักดันน้ำไวรัสและโปรตีนที่มี molecular weight น้อยกว่า 100,000 daltons ผ่านเครื่องกรองออกมา ขณะเดียวกันแรงดันของเครื่องปั๊มก็จะก่อให้เกิดแรง tangential flow ซึ่งจะเป็นแรงที่จะผลักดันโปรตีนหรือสารที่มี molecule ขนาดใหญ่ไม่ให้เกาะจับติดบนผิวของไส้กรอง ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้เกิด concentration polarization (Van Der Marel, 1985) อันจะทำให้เครื่องไม่เกิดการอุดตันขณะทำการ concentration

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองใช้เครื่อง CARBOSEP ในการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่อง CARBOSEP เพื่อประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง CARBOSEP รุ่น 2S 151 ถัง reservoir ขนาด 3,000 ลิตร และถังขนาด 250 ลิตร

2. ไวรัส

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, (O/Udorn/87), A (A/Nakhon Pathom/87) และ Asia1 (Asia1/Petchburi/85) ที่ผ่านการ clarify แล้ว โดยเครื่องกรอง glass fiber ขนาด 2.0 μ

*carbon-ceramic ultrafiltration รุ่น 2S 151 บริษัท Tech-sep ประเทศฝรั่งเศส

วิธีการ

1. การนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อเครื่อง CARBOSEP ถังขนาดความจุ 3,000 ลิตร และ 250 ลิตร ท่อยางส่งและรับไวรัส ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C. ความดัน 1.5 กก./ซม.^{3} เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อัดอากาศบริสุทธิ์เข้าถัง 3,000 ลิตร ถัง 250 ลิตร และเครื่อง CARBOSEP เพื่อเก็บความดัน แล้วปล่อยให้เครื่องและถังเย็นลง

2. การทำน้ำไวรัสเข้มข้น

ปิดอากาศและลดความดันในถัง 3,000 ลิตร ถัง 250 ลิตร และเครื่อง CARBOSEP ลงเป็นศูนย์ แล้วส่งไวรัสจากการกรองด้วยเครื่องกรอง 2.0 μ ลงถัง 3,000 ลิตร เมื่อได้น้ำไวรัสประมาณ 300 ลิตร ก็เดินเครื่อง CARBOSEP โดยเดินเครื่อง feeder pump (primary pump) ก่อน เพื่อส่งน้ำไวรัสเข้าเครื่อง CARBOSEP เมื่อความดันในเครื่อง CARBOSEP เพิ่มขึ้นเป็น 1.8 กก./ซม.^{3} แล้วก็ทำการเดินเครื่อง circulation pump (secondary pump) พร้อมปรับอัตราการไหลของน้ำไวรัสเข้าเครื่องและควบคุมความดันในเครื่อง CARBOSEP ไม่เกิน 4 กก./ซม.^{3} ขณะเดียวกันก็ปรับอัตราการไหลออกของน้ำ filtrate ทำการ circulate น้ำไวรัสระหว่างเครื่อง CARBOSEP และถัง 3,000 ลิตรไปเรื่อย ๆ จนกว่าปริมาตรของน้ำไวรัสประมาณ 3,500-3,600 ลิตรจะถูกทำให้เข้มข้นประมาณ 50 เท่า ปิดเครื่อง CARBOSEP พร้อมกับใช้อากาศบริสุทธิ์ดันน้ำไวรัสเข้มข้นเข้าสู่ถัง 250 ลิตร ที่ลดความดันไว้แล้ว และควบคุมอุณหภูมิของน้ำไวรัสเข้มข้นไว้ที่ 4°C. เพื่อเข้าสู่ขบวนการทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ด้วยสารเคมีต่อไป

3. เก็บตัวอย่างไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 ก่อนและหลังเข้าเครื่อง CARBOSEP แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณ 140S particle (μg/ml) โดยวิธี sucrose density gradient ปริมาณ virus antigen (cfu/ml) โดยวิธี complement fixation test และปริมาณ virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) โดยวิธี CPE method (microtechnique) และปริมาณโปรตีน (μg/ml) โดยวิธี Folin's method ตามลำดับ โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากน้ำไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 อย่างละ 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของไวรัสแต่ละชนิด

ผลการทดลอง

จากการทดลองทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้นด้วยเครื่อง CARBOSEP สามารถทำน้ำไวรัสจำนวน 3,450-3,600 ลิตรให้มีความเข้มข้นประมาณ 53-57 เท่า ได้น้ำไวรัสเข้มข้น 65 ลิตร โดยใช้เวลา 11 ถึง 12 ชั่วโมง ผลการตรวจสอบหาปริมาณไวรัส ปริมาณแอนติเจน และปริมาณโปรตีนของน้ำไวรัสเข้มข้นของไวรัสไทป์ O มีเปอร์เซนต์ recovery ของปริมาณ 140S particle (μg/ml) ปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ปริมาณไวรัส ($CCID_{50}$/ml) และปริมาณโปรตีน

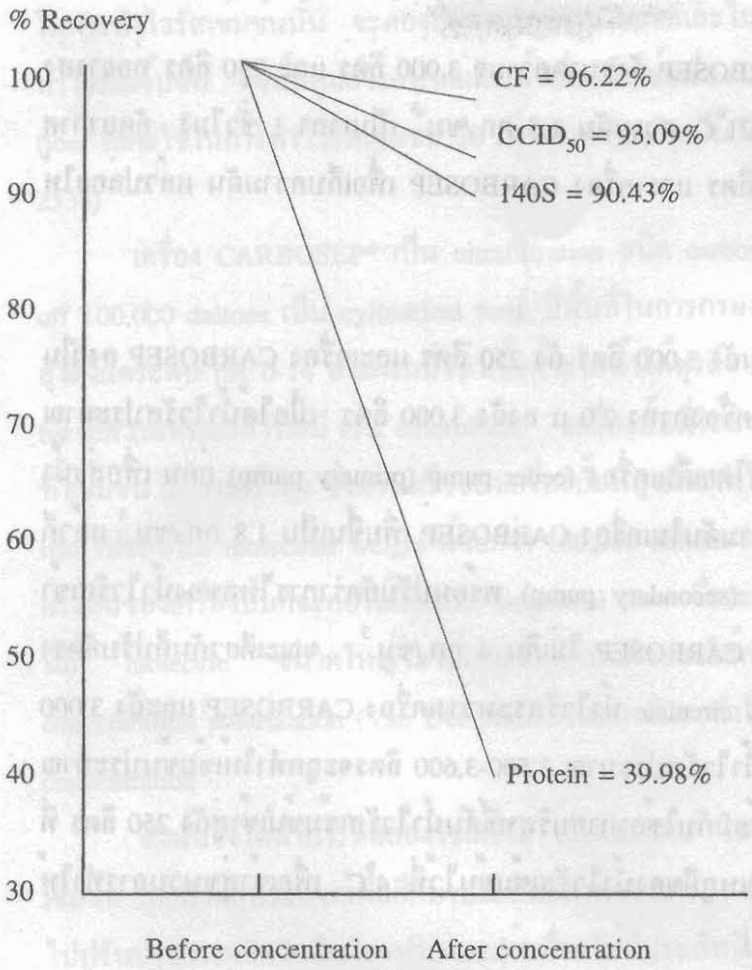


Figure 1 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of the concentrate FMD virus type O in the concentration procedure by CARBOSEP.

(μg/ml) เท่ากับ 90.43%, 96.22%, 93.09% และ 60.04% ตามลำดับ และของน้ำ filtrate เท่ากับ 0%, <11.28%, 6.10% และ 39.98% ตามลำดับ (Table 1, Figure 1) น้ำไวรัสเข้มข้นไทป์ Asia1 มีเปอร์เซนต์ recovery เท่ากับ 91.92%, 97.74%, 34.69% และ 39.16% ตามลำดับ และน้ำ filtrate เท่ากับ 0%, <20.6%, 0.49% และ 20.20% ตามลำดับ (Table 2, Figure 2) และไวรัสไทป์ A มีเปอร์เซนต์ recovery ของ 140S particle ปริมาณไวรัส และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 89.89%, 46.55% และ 54.26% ตามลำดับ และน้ำ filtrate เท่ากับ 0%, 3.92% และ 17.25% ตามลำดับ (Table 3, Figure 3)

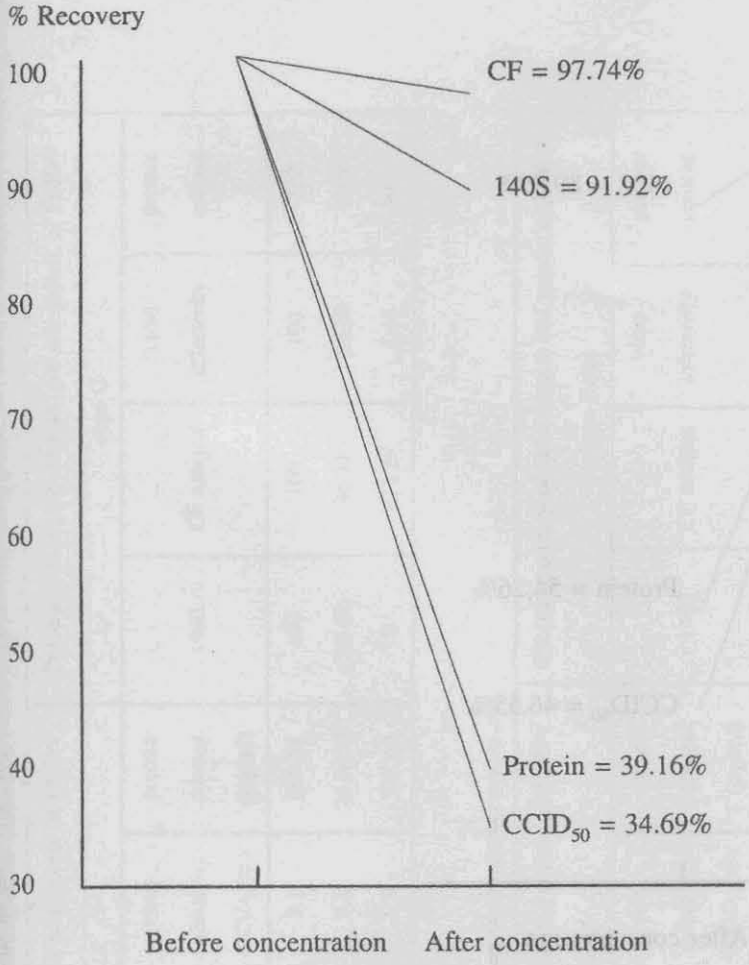


Figure 2 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus antigen (cfu/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of the concentrate FMD virus type Asia1 in the concentration procedure by CARBOSEP.

วิจารณ์

จากผลการทดลองทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 พบว่าระหว่างการทำไวรัสเข้มข้นทั้ง 3 ไทป์ไม่พบการอุดตันของเครื่อง CARBOSEP แต่ในขณะที่น้ำไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น อัตราการกรองของเครื่อง CARBOSEP จะลดลงตามลำดับ เป็นเพราะเกิด concentration polarization (Van Der Marel, 1985) บนผิวของไส้กรองเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการกรองลดลง จากการตรวจสอบปริมาณไวรัส ปริมาณแอนติเจน และปริมาณโปรตีนทั้ง 3 ไทป์ โดยเปรียบเทียบปริมาณก่อนและหลังการทำให้เข้มข้น พบว่าความสูญเสียของปริมาณ 140 S particle เมื่อเทียบกับความสูญเสียของ virus infectivity ให้ผลสอดคล้องกัน การสูญเสีย 140S particle ส่วนมากเกิดขึ้นภายในเครื่อง CARBOSEP ในกระบวนการทำไวรัสให้เข้มข้นโดยมีการติด

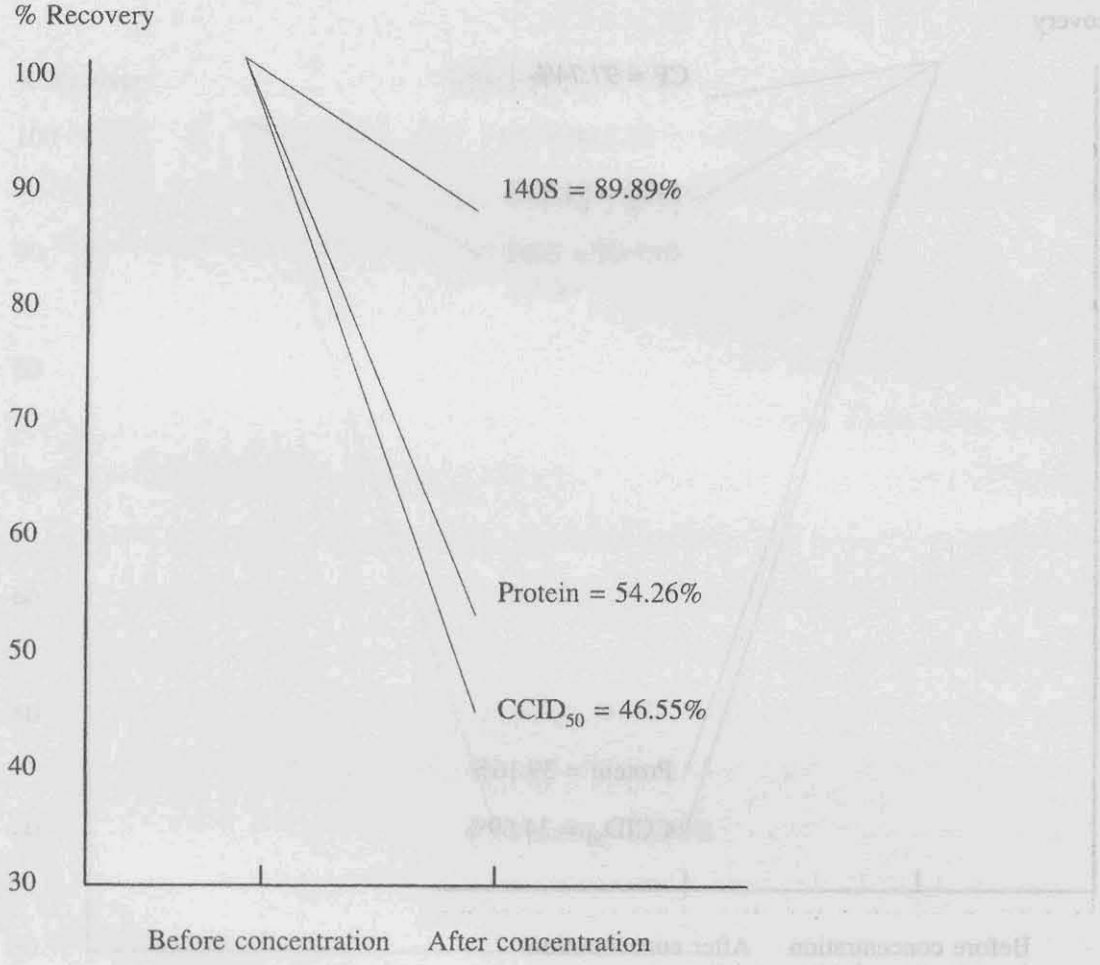


Figure 3 The percent recovery of 140S particle (μg/ml), virus infectivity ($CCID_{50}$/ml) and protein content (μg/ml) of the concentrate FMD virus type A in the concentration procedure by CARBOSEP.

ค้างของ 140S particle อยู่กับผิวของไส้กรอง ultrafiltration เนื่องจาก concentration polarization และ 140S particle บางส่วนเกิดการแตกย่อยเป็น subunit virus protein ซึ่งตรวจสอบได้จากค่า CF antigen ที่เพิ่มขึ้น จากการตรวจค่า 140S particle ในส่วนของน้ำ filtrate มีค่าเป็นศูนย์ เพราะปริมาณ 140S particle ที่หลุดออกมากับน้ำ filtrate มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถตรวจสอบโดยวิธี sucrose density gradient ได้

ส่วนค่าโปรตีนที่มีปริมาณการ recovery ของไวรัสทั้ง 3 ไทป์ (O, A และ Asia1) มีค่าประมาณ 39%-60% แสดงว่าเครื่องสามารถ purify โปรตีนได้ประมาณ 40%-60% สำหรับค่าการตรวจปริมาณแอนติเจน (cfu/ml) ในไวรัสไทป์ A ที่ได้ต่ำมากอาจเกิดจากซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบเป็นคนละ subtype กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนจึงทำให้ไม่สามารถนำมาคำนวณได้

Table 1 The assay of virus antigen and protein content of FMDV type O during concentration procecure

The concentration procedure			The amount of virus antigen and protein of FMDV type O				Percent recovery of virus antigen and protein of FMDV type O			
materials virus type O n = 2	volume (L)	concentration (X)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S	CF antigen	virus infectivity	protein content
virus fluid	3,500	1	2.3	870	7.1	805.57	100	100	100	100
conc. by CARBOSEP	65	53.84	112	45,080	8.8	26,045.8	90.43	96.22	93.09	60.04
filtrated fluid	3,435	1	0	<100	5.9	328.19	0	<11.28	6.10	39.98

Table 2 The assay of virus antigen and protein content of FMDV type Asia1 during concentration procecure

The concentration procedure			The amount of virus antigen and protein of FMDV type Asia1				Percent recovery of virus antigen and protein of FMDV type Asia1			
materials virus type Asia1 n = 2	volume (L)	concentration (X)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S	CF antigen	virus infectivity	protein content
virus fluid	3,450	1	0.7	475.5	7.8	298.37	100	100	100	100
conc. by CARBOSEP	65	57.5	37	26,725	>9.1	6,719.3	91.92	97.74	34.69	39.16
filtrated fluid	3,390	1	0	<100	5.5	60.3	0	<20.6	0.49	20.20

n = number of sample

Table 3 The assay of virus antigen and protein content of FMDV type A during concentration procecure

The concentration procedure			The amount of virus antigen and protein of FMDV type A				Percent recovery of virus antigen and protein of FMDV type A			
materials virus type A n = 2	volume (L)	concentration (X)	140S (μg/ml)	CF antigen (cfu/ml)	virus infectivity ($CCID_{50}$/ml)	protein content (μg/ml)	140S	CF antigen	virus infectivity	protein content
virus fluid	3,600	1	2.35	<100	8.0	1,096.94	100	100	100	100
conc. by CARBOSEP	65	55.38	117	<100	9.4	32,968.45	89.89	-	46.55	54.26
filtrated fluid	3,535	1	0	<100	5.3	192.76	0	-	3.92	17.25

n = number of sample

สรุป

เครื่อง carbon-ceramic ultrafiltion (CARBOSEP) ใช้ทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ เข้มข้นประมาณ 50 เท่า มีเปอร์เซนต์ recovery ของไวรัส 140S particle ได้ประมาณ 89%-91% เมื่อเทียบกับเครื่อง ultrafiltration ชนิด Hollow fiber ซึ่งมีเปอร์เซนต์ recovery ตั้งแต่ 60%-100% (Van Der Marel, 1985) และสามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด trivalent ได้

เอกสารอ้างอิง

1. พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์, เชิงชาย จันทรัศมี, วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ 2533 การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกรแบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 1 เล่มที่ 1 หน้า 6-9

2. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. p. 180-201.

3. Van Der Marel, P. 1985. Concentration. In : Animal Cell Biotechnology, Vol.2. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.), Academic Press, United Kingdom. p. 185-215.

ศึกษาการตกตะกอนของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ Suspension ในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

STUDY ON THE SEDIMENTATION OF $BHK_{21}C_{13}$ SUSPENSION CELL IN THE PROCESS OF FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE PRODUCTION

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1] สุรพล ขุมทรัพย์[1] วรากิจ จันทรัศมี[1]

Wacharee Sinsuwonkwat Surapon Khumsab Varakit Chuntharusmi

ABSTRACT

The sedimentation of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell in 100 ml glass tube, 50 L. and 5,000 L. fermenters were studied and found that the optimum temperature for preservation of cells with the viability of cells more than 80%. was 4°C. The temperature of 4°C. and 10°C. were suitable for cell sedimentation in 50 L. fermenter for 48 hrs. with the viability of cells more than 89% and 92% respectively. The temperture of 4°C. was suitable for cell sedimentation in 5,000 L. fermenter for 72 hrs. with the viability of cells more than 89%. The sedimentation of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell at 25°C. and 37°C. were not recommended because cells died more than 50% and 96% respectively after sedimented for 24 hrs.

บทคัดย่อ

ศึกษาการตกตะกอนเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ในหลอดขนาด 100 ซีซี. ถังเพาะขนาด 50 ลิตร และถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร พบว่าที่อุณหภูมิ 4°C. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์เมื่อทำการตกตะกอน โดยเซลล์มีชีวิตมากกว่า 80% ที่อุณหภูมิ 4°C. และ 10°C. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาด 50 ลิตร ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเซลล์มีชีวิตมากกว่า 89% และ 92% ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ 4°C. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเซลล์มีชีวิตมากกว่า 89% ส่วนอุณหภูมิที่ 25°C. และ 37°C. ไม่แนะนำให้ใช้ในการตกตะกอนเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension เพราะว่าหลังจากตกตะกอน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตายมากกว่า 50% และ 96% ตามลำดับ

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค-กระบือ ด้วยวิธี suspeension cell culture (Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986) ในการเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในกระบวนการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำเป็นต้องใช้ถังเพาะ (fermenter) ขนาดใหญ่ เพื่อผลิตเซลล์และไวรัสให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ผลิตวัคซีน แต่ถังเพาะขนาดใหญ่นี้ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการตกตะกอนเซลล์มาก่อนจึงต้องทำการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะตกตะกอนเซลล์ เมื่อทำการเพาะขยายเซลล์ได้แล้วจะต้องทำการตกตะกอน เซลล์ เพื่อเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นน้ำยาสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส สำหรับงานที่มีขนาดเล็ก เช่นการทดลองในขวดแก้วขนาด 500 ซีซี. หรือในถังเพาะขนาดเล็กมักใช้วิธีการ centrifuge (Ball, 1985) เพราะเป็นการประหยัดเวลาและได้ผลดีมีการสูญเสียเซลล์จำนวนน้อย แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเพาะขนาดใหญ่ที่มีปริมาณมากไม่สะดวกต่อการ centrifuge เพราะเสี่ยงต่อการปนเปื้อน การตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาดใหญ่โดยการหยุดปั่นและตั้งทิ้งไว้ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ปลอดภัยต่อการปนเปื้อน แต่มีข้อเสียคือต้องใช้เวลานานมากและมีความสูญเสียเซลล์มากกว่าการ centrifuge

Wang และคณะ (1938) ได้ทำการทดลองตกตะกอนเซลล์ Burkitt lymphoma ในหลอด centrifuge ขนาด 35 ซีซี. ที่อุณหภูมิ 4°C., 25°C. และ 37°C. เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 4°C. และ 25°C. มีเซลล์มีชีวิตมากกว่า 90% ในขณะที่การตกตะกอนที่ 37°C. จะมีเซลล์ตายเพิ่มขึ้น 14% การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่สมบูรณ์จำนวนมากและมีชีวิตอยู่ได้นาน โดยทำการศึกษาการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C., 10°C., 25°C. และ 37°C. ในหลอดแก้วขนาด 100 ซีซี. ถังเพาะขนาด 50 ลิตร และถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ 5% serum growth media suspension (GMS) ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 2 วัน แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ใส่หลอดขนาด 100 ซีซี. หลอดละ 50 ซีซี. จำนวน 40 หลอด โดยแบ่งเป็น 4 ชุด ๆ ละ 10 หลอด แล้วแยกเก็บที่อุณหภูมิ 4°C., 10°C., 25°C. และ 37°C. เพื่อทำการตกตะกอน เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 หลอด หลังการตกตะกอนเพื่อนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทุกวันนาน 7 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์นาน 3 สัปดาห์

2. ทำการเพาะเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension ในถังขนาด 5,000 ลิตร จำนวน 4,200 ลิตร โดยใช้ น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (5% serum GMS) ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 2 วัน ทำการปรับอุณหภูมิและใช้เวลาในการตกตะกอนเซลล์ต่าง ๆ กันดังนี้

2.1 ตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 ตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 ตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.4 ตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยอุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รวม 72 ชั่วโมง

2.4 ตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยอุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวม 72 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาตามกำหนดทำการถ่ายน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (5% serum GMS) ออกโดยใช้ความดัน 1 กก./ซม.^{3} ด้วยอัตราความเร็ว 1,000 ลิตร/ชั่วโมง ให้เหลือน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ 600 ลิตร ในการตกตะกอนตามข้อ 2.1 และ 2.2 และเหลือ 300 ลิตร ในการตกตะกอนตามข้อ 2.3, 2.4 และ 2.5 แล้วเติมน้ำยาเพาะเลี้ยงไวรัส (0% serum GMS) เข้าถังให้ได้ปริมาตร 3,500 ลิตร

3. ทำการแบ่งเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension ที่ได้จากการเพาะในถัง 5,000 ลิตร จำนวน 40 ลิตร มาใส่ในถังเพาะขนาด 50 ลิตร ทำการปรับอุณหภูมิและใช้เวลาตกตะกอนต่าง ๆ กันดังนี้

3.1 ตกตะกอนเซลล์ที่ 4°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 ตกตะกอนเซลล์ที่ 10°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาตามกำหนดทำการถ่ายน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (5% serum GMS) ออกโดยใช้ความดัน 1 กก./ซม.^{3} ให้เหลือน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ 5 ลิตร แล้วเติมน้ำยาเพาะเลี้ยงไวรัส (0% serum GMS) เข้าถังให้ได้ปริมาตร 40 ลิตร

ผลการทดลอง

จากการทดลองตกตะกอนเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าในหลอดแก้ว 100 ซีซี. ที่อุณหภูมิ 4°C. หลังการตกตะกอน 2 วัน พบเซลล์มีชีวิต อยู่เฉลี่ย 80% หลังการตกตะกอน 3 และ 4 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 92.38% และ 93.77% ตามลำดับ หลังการตกตะกอนในวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 พบว่าเซลล์มีชีวิตโดยเฉลี่ย 83.24% หลังการตกตะกอนในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 พบเซลล์มีชีวิต 51.05%, 26.17% และ 22.34% ตามลำดับ (Table 1, Figure 1)

การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 10°C. พบว่าหลังการตกตะกอน 2 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่เฉลี่ย 91.2% หลังการตกตะกอน 3 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 84.0% หลังการตกตะกอน 4 วัน ถึง 7 วัน

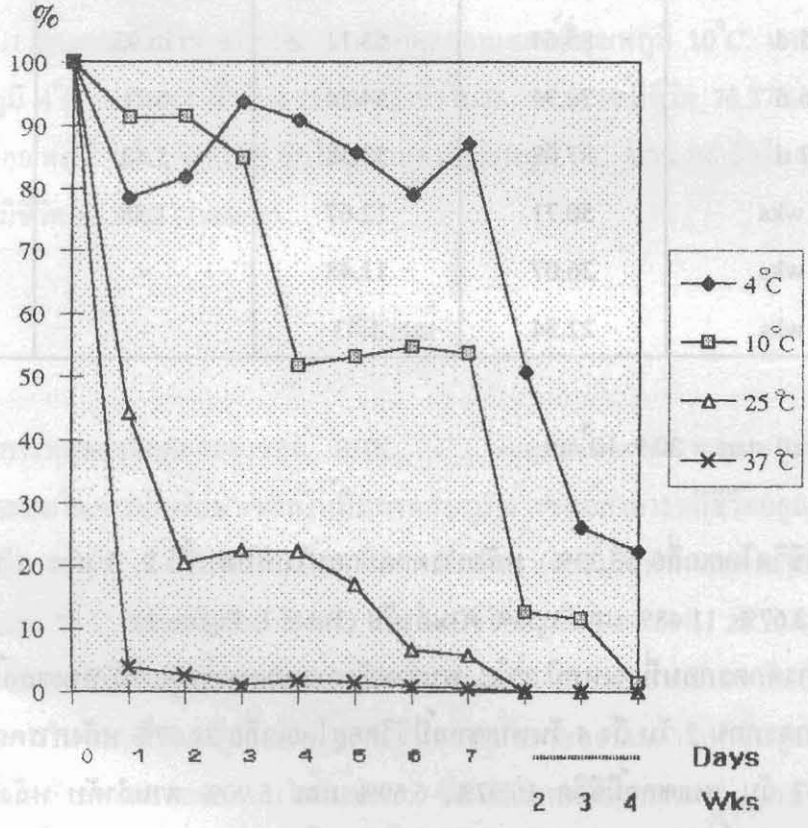


Figure 1. Percent recovery of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell sedimentation in 100 ml glass tube at 4°C., 10°C., 25°C. and 37°C.

Table 1 Percent recovery of $BHK_{21}C_{13}$ Suspension cell sedimentation in 100 ml glass tube at various temperatures and duration.

Duration	Temperature			
	4°C.	10°C.	25°C.	37°C.
0 d	100.00	100.00	100.00	100.00
1 d	78.46	91.14	44.28	3.96
2 d	81.81	91.29	20.47	2.75
3 d	93.77	84.68	22.48	1.05
4 d	90.90	51.67	22.22	1.85
5 d	85.64	53.11	16.93	1.58
6 d	78.94	54.54	6.71	0.79
7 d	87.08	53.58	5.82	0.52
2 wks	50.71	12.67	1.58	0
3 wks	26.07	11.48	-	-
4 wks	22.34	1.43	-	-

Average cell start = 20.9×10^5/ml

พบเซลล์มีชีวิตโดยเฉลี่ย 53.33% หลังการตกตะกอนในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 พบเซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 12.67%, 11.48% และ 1.53% ตามลำดับ (Table 1, Figure 1)

การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25°C. พบว่าหลังการตกตะกอน 1 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 44.12% หลังการตกตะกอน 2 วัน ถึง 4 วันพบเซลล์มีชีวิตอยู่โดยเฉลี่ย 21.67% หลังการตกตะกอน 5 วัน, 6 วัน และ 7 วัน พบเซลล์มีชีวิต 16.97%, 6.69% และ 5.90% ตามลำดับ หลังการตกตะกอน 2 สัปดาห์ พบเซลล์มีชีวิต 1.58% (Table 1, Figure 1)

การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 37°C. พบว่าหลังการตกตะกอน 1 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 3.95% หลังการตกตะกอน 2 วัน พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 2.75% หลังการตกตะกอน 3 วัน ถึง 5 วัน พบเซลล์มีชีวิตโดยเฉลี่ย 1.49% หลังการตกตะกอน 2 สัปดาห์ เซลล์จะตายหมด (Table 1, Figure 1)

การตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาด 50 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C., 10°C. และ 25°C. หลังการตกตะกอน 48 ชั่วโมง พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 89.64%, 93.94% และ 54.79% ตามลำดับ (Table 2)

การตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C. และ 10°C. หลังการตกตะกอน 48 ชั่วโมง โดยเหลือน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (5% serum GMS) อยู่ที่ระดับ 600 ลิตร พบเซลล์มีชีวิตอยู่ 73.71% และ 83.18% ตามลำดับ (Table 2) การตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C.

Table 2 Percent recovery of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell sedimentation in 50 L. and 5,000 L. fermenters at various temperatures after sedimented for 48 hours.

Temperature	Percent recovery of cell	
	50 L. Fermenter	5,000 L. Fermenter
4°C.	89.64	70.61
10°C.	93.94	-
25°C.	54.19	83.18

นาน 72 ชั่วโมง พบเซลล์มีชีวิต 89.64% การตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C. นาน 24 ชั่วโมง ตามด้วยอุณหภูมิ 4°C. นาน 48 ชั่วโมง (รวม 72 ชั่วโมง) พบเซลล์มีชีวิต 76.37% และการตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C. นาน 48 ชั่วโมง ตามด้วยอุณหภูมิ 4°C. นาน 24 ชั่วโมง (รวม 72 ชั่วโมง) พบเซลล์มีชีวิต 83.85% (Table 3)

วิจารณ์

จากการทดลองตกตะกอนเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension พบว่าอุณหภูมิ 4°C. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์ให้มีสภาพสมบูรณ์ เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่มากกว่า 80% และอยู่ได้นานถึง 7 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเซลล์เมื่อทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 10°C., 25°C. และ 37°C. นานเพียง 4 วัน พบว่าเซลล์มีชีวิตอยู่เพียง 51.69%, 22.22%, และ1.85% ตามลำดับ การที่เซลล์มีชีวิตอยู่ได้นานที่อุณหภูมิ 4°C. อาจเนื่องจากเซลล์จะมีเมตาโบลิซึ่มต่ำ เซลล์จึงมีชีวิตอยู่ได้นานในขณะที่อุณหภูมิ 10°C., 25°C. และ 37°C. เซลล์มีเมตาโบลิซึ่มสูงกว่า จึงทำให้เซลล์ตายมากขึ้นหลังจากการตกตะกอนได้ไม่นาน ซึ่งผลการทดลองตกตะกอนของเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension นั้น ที่อุณหภูมิ 4°C. ได้ผลใกล้เคียงกับการตกตะกอนเซลล์ Burkitt Lymphoma โดยเซลล์มีชีวิตมากกว่า 90% แต่การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 25°C. ได้ผลแตกต่างกันมากโดยเซลล์ Burkitt Lymphoma หลังการตกตะกอน50 ชั่วโมง มีชีวิตมากกว่า 90% ในขณะที่เซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension หลังตกตะกอน 48 ชั่วโมง มีชีวิตเพียง 20.47% ส่วนการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 37°C. เซลล์จะตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (Wang และคณะ, 1938) สำหรับระยะเวลาการตกตะกอนของเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension ที่เหมาะสมนั้น ในระยะเวลา 48 ชั่วโมงแรกจะพบว่าที่อุณหภูมิ 10°C. เซลล์จะมีการตกตะกอนมากกว่าและเร็วกว่าการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C. ซึ่งอาจเนื่องจากน้ำยา

Table 3 Percent recovery of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell sedimentation in 5,000 L. fermenter with the remaining of 5% serum at the level of 300 L. at various temperatures and time intervals.

Temperatures and time intervals	Percent recovery of cell
4°C. (72 hrs)	89.64
10°C. (24 hrs) + 4°C. (48 hrs)	76.37
10°C. (48 hrs) + 4°C. (24 hrs)	83.85

เพาะเลี้ยงเซลล์มีความหนืดลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จึงทำให้เซลล์ตกตะกอนได้เร็วกว่า ส่วนการตกตะกอนเซลล์ในถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร เซลล์จะใช้ระยะเวลาในการตกตะกอนที่นานกว่าในถังเพาะที่มีขนาดเล็ก เพราะระยะทางในการตกตะกอนของเซลล์ลงมาสู่ก้นถังมีระยะทางที่ยาวกว่า

สรุป

การตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C. นาน 72 ชั่วโมง เป็นอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension ในถังขนาด 5,000 ลิตร โดยเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่มากกว่า 80% สำหรับการตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C. และ 37°C. นั้น ไม่ควรนำมาใช้ในการตกตะกอนเซลล์ BHK_{21} C_{13} suspension เพราะหลังการตกตะกอน 24 ชั่วโมง เซลล์ตายเป็นจำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

1. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Programe on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. p.180-201.
2. Ball, G.D. 1985, Clarification and Sterilization. In : Animal Cell Biotechnology, Vol 2. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.), Academic press, United Kingdom. p.87-125.
3. Wang, D.I.C. Sinskey, J.J. Gerner, R.E. and De Filippi, R.P. (1968). Effect of centrifugation on the viability of Burkitt lymphoma cell. Biotechnol. Bioeng. 10, p.641-649.

การแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21

The Isolation of Foot and Mouth Disease Virus by FLL-YFT cell and BHK-21 cell

ธนรัตน์ จานุกิจ[1] สมใจ กมลศิริพิชัยพร[1] วรัญญู ชมเฟื่องแก้ว[1]

Thanarat Janukit Somjai Kamolsiripichaiporn Varunyu Chomfuangkaew

ABSTRACT

The Foot and Mouth Disease virus (FMDV), field strains, were isolated by using cell line, FLL-YFT cell and BHK-21 cell. The isolation of 174 samples ; 111 samples of type O, 38 samples of type A and 25 samples of type Asia1 were studied for sensitivity of the cytopathic effect (CPE). The CPE observed at the first passage of FMDV type O, A and Asia1 in FLL-YFT cell were 91.89% (102/111), 100%(38/38) and 96%(24/25) respectively while the CPE observed in BHK-21 cell were 70.27%(78/111), 65.79%(25/38) and 56% (14/25) respectively. The results indicated that FLL-YFT cell and BHK-21 cell line can be used for isolation of FMD field samples. Furthermore the FLL-YFT cell presented a higher sensitivity of the CPE than the BHK - 21 cell.

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเซลล์ FLL-YFT และ BHK-21 จากท้องที่จำนวนทั้งหมด 174 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นไทป์โอ จำนวน 111 ตัวอย่าง ไทป์เอ 38 ตัวอย่าง และไทป์

คำสำคัญ : ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย การแยกเชื้อ เซลล์ FLL-YFT เซลล์ BHK-21

KEY WORDS : Foot and Mouth Disease Virus isolation FLL-YFT cell BHK-21 cell

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[1]Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

เอเชียวัน จำนวน 25 ตัวอย่าง ผลการศึกษาความไวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน ในpassage ที่ 1 พบว่าเซลล์ FLL-YFT ให้ผลการเกิด CPE คิดเป็น 91.89% (102/111), 100% (38/38) และ 96% (24/25) ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ BHK-21 ให้ผลการเกิด CPE ใน passage ที่ 1 คิดเป็น 70.27% (78/111) , 65.79% (25/38) และ 56% (14/25) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงว่าสามารถใช้ เซลล์ FLL-YFT และ BHK-21 ในการแยกเชื้อไวรัสจากท้องที่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ FLL-YFT ให้ความไวในการเกิด CPE ได้เร็วกว่าเซลล์ BHK-21

คำนำ

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบันนิยมใช้การจำแนกชนิดของไวรัสด้วยวิธี Complement Fixation (CF) และ วิธี ELISA บางครั้งการอ่านผลการตรวจสอบไม่ชัดเจน เนื่องจากสาเหตุหลายประการเช่น การเก็บตัวอย่างที่เก่าหรือมีปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ผลการตรวจสอบไม่ชัดเจน จำเป็นจะต้องผ่านเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้เพียงพอ ในการแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) ควรผ่านเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 3-5 passages (บุศนีย์ และ คณะ, 2530) ซึ่งใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 10-15 วัน ปกติศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยใช้เซลล์ BHK-21 ในการแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่ต่อมา Dr. Akio Fukusho ได้นำเซลล์ Fetal Lamb Lung (FLL-YFT) จากสถาบันสุขภาพสัตว์ (NIAH) ประเทศญี่ปุ่น มาเพาะเลี้ยง ณ. ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ฝ่ายวิจัยและวินิจฉัยโรคจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อและนำมาทดลองใช้ในการแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเปรียบเทียบกับเซลล์ BHK-21 การทดลองครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกเซลล์ที่ให้ความไวสูงในการเพาะเลี้ยงไวรัส สำหรับนำมาใช้ในการแยกเชื้อไวรัสจากท้องที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้ผลดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

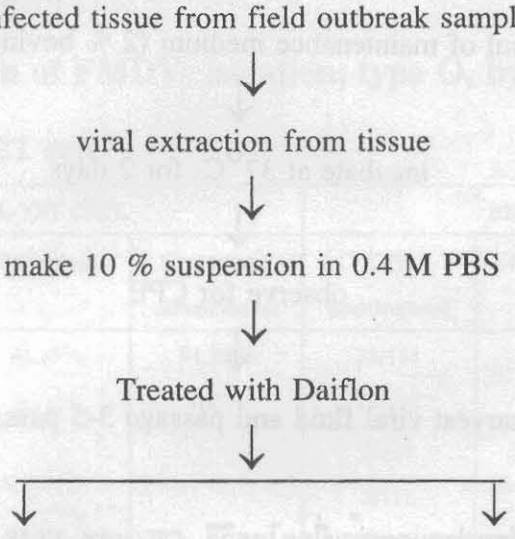
1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ FLL-YFT และ BHK-21

นำเซลล์ FLL-YFT และ BHK-21 ที่เกิด confluent monolayer มาทำการเพาะย่อย (subculture) แบบ stationary monolayer โดยย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย 0.1% Versene - Trypsin และใส่ในมีเดียม (growth medium)ซึ่งประกอบด้วย 5% Bovine Serum ในสารละลาย MEM แจกใส่ขวดเพาะเซลล์ขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไป incubate ในตู้ 37° C เป็นเวลา 2 วัน

2. การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากวิการเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างวิการเนื้อเยื่อ ที่ส่งเข้ามาตรวจวินิจฉัยโรคและจำแนกชนิดไวรัส จำนวน 147 ตัวอย่าง มาสกัดเพื่อแยกไวรัสออกจากเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปของสารละลายแขวนลอยเข้มข้น 10% (10% suspension) โดยบดกับทรายละเอียด และสารละลาย 0.4 M Phosphate buffer เติมสารละลาย 1, 1, 2-Trichlorotrifluoroethane (Daiflon) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่า 20 นาทีแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm 15 นาที และแยกเฉพาะส่วนน้ำใส (supernatant) มาตรวจสอบด้วยวิธี CF, ELISA และ Virus Isolation

Diagram of Processing Sample for Foot and Mouth Disease Diagnosis



3. การผ่านเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21 ที่เกิด confluent monolayer ภายใน 2-3 วัน ดูดมีเดียมเก่าทิ้ง ล้างด้วย 0.1 M. Phosphate buffer solution และเติม ส่วน supernatant ที่ได้แยกสกัดจากข้อ 2 ลงบนเซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21 ขวดละ 1 มิลลิลิตร นำไป adsorb ในตู้ incubator 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม maintenance medium ซึ่งประกอบด้วย 2 % Bovine Serum ในสารละลาย MEM ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไป incubate ในตู้ 37°C เป็นเวลา 2 วัน อ่านผลการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพต่อเซลล์ (cytopathic effect หรือ CPE) ทำการเก็บไวรัสโดยการ Freeze-thaw 1 ครั้ง และปั่นที่ความเร็ว 2,500 rpm 15 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใส (supernatant) ออกจากตะกอนแล้วนำ supernatant ไปตรวจจำแนกชนิดไวรัสและนำไปผ่านเซลล์ ทั้ง 2 ชนิด ตัวอย่างละ 5 passages

Diagram of Processing for Virus Isolation

Supernatant viral fluid

↓

inoculate onto tissue culture cell line , FLL-YFT and BHK-21

↓

Adsorb at 37°C for 1 hour

↓

add 5 ml of maintenance medium (2 % bovine serum)

↓

incubate at 37°C for 2 days

↓

observe for CPE

↓

harvest viral fluid and passage 3-5 passages

4. การจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี CF และ ELISA

นำ viral fluid จากข้อ 3 มาทำการตรวจจำแนกชนิดของไวรัส (Typing) โดยวิธี CF (Casey, 1965) และวิธี ELISA (Hamblin *et al*, 1984)

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากท้องที่ ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน จำนวนทั้งสิ้น 174 ตัวอย่าง โดยผ่านในเซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21 จำนวน 5 passages และการตรวจจำแนกชนิดของไวรัสโดยวิธี CF และ ELISA พบว่าเซลล์ FLL-YFT ให้ความไวในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (CPE) ได้เร็วกว่าเซลล์ BHK-21 การแยกเชื้อจากท้องที่ ไทป์โอ จำนวน 111 ตัวอย่าง ในเซลล์ FLL-YFT ให้ผล CPE ใน passage ที่1 คิดเป็น 91.89% (102/111) และตรวจพบ CPE ทุกตัวอย่างใน passage ที่ 2 คิดเป็น 100 % ขณะที่เซลล์ BHK-21 ใน passage ที่ 1 ให้ผล CPE เพียง 70.27 % (78/111) และต้องผ่านเชื้อไวรัสถึง 5 passages จึงจะตรวจพบ CPE ทุกตัวอย่างดังแสดงใน Table 1

ส่วนการผ่านไวรัสไทป์เอ จำนวนทั้งสิ้น 38 ตัวอย่าง ในเซลล์ FLL-YFT สามารถตรวจพบ CPE ได้ครบทุกตัวอย่างใน passage ที่ 1 คิดเป็น 100 % ขณะที่เซลล์ BHK-21 ใน passage ที่ 1 ตรวจพบ CPE เพียง 65.79 % (25/38) และเมื่อผ่านครบ 5 passages ตรวจพบ CPE เพียง 89.47% (34/38) และตรวจไม่พบ CPE คิดเป็น 10.52 % (4/38) แสดงใน Table 2

สำหรับการผ่านเชื้อไวรัสไทป์เอเชียวัน จำนวน 25 ตัวอย่าง ในเซลล์ FLL-YFT ใน passage ที่ 1 ตรวจพบ CPE คิดเป็น 96 % (24/25) และเมื่อผ่านไปครบ 5 passages ก็ยังตรวจไม่พบ CPE คิดเป็น 4% (1/25) ขณะที่เซลล์ BHK-21 ในpassage ที่ 1 ตรวจพบ CPE เพียง 56 % (14/25) และเมื่อผ่านไปครบ 5 passages ตรวจพบ CPE คิดเป็น 84% (24/25) และตรวจไม่พบ CPE คิดเป็น 16% (4/25) ดังแสดงใน Table 3

Table 1 Comparison of FMDV isolation, type O, by FLL-YFT cell and BHK-21 cell

passage level	FLL-YFT CELL			BHK-21 CELL		
	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation
1st	102/111	91.89%	91.89%	78/111	70.27%	70.27%
2nd	9/111	8.11%	100%	19/111	17.11%	87.39%
3rd				5/111	4.51%	91.89%
4th				2/111	1.80%	93.69%
5th				7/111	6.31%	100%

Table 2 Comparison of FMDV isolation , type A , by FLL-YFT cell and BHK-21 cell

passage level	FLL-YFT CELL			BHK-21 CELL		
	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation
1st	38/38	100%	100%	25/38	65.79%	65.79%
2nd				6/38	15.79%	81.58%
3rd				2/38	5.80%	86.84%
4th				1/38	2.6%	89.47%
5th				0/38	0%	89.47%
Negative				4/38	10.52%	-

Table 3 Comparison of FMDV isolation , type Asia 1, by FLL-YFT cell and BHK-21 cell

passage level	FLL-YFT CELL			BHK-21 CELL		
	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation	CPE positive/total	Percentage	Percentage accumulation
1st	24/25	96%	96%	14/25	56%	56%
2nd				4/25	16%	72%
3rd				2/25	8%	80%
4th				1/25	4%	84%
5th				0/25	0%	84%
Negative	1/25	4%	-	4/25	16%	-

วิจารณ์

การทดลองแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากท้องที่โดยวิธี virus isolationในเซลล์ BHK-21 (บุศนีย์ และ คณะ, 2530 ; Ferris and Donaldson,1984) และเซลล์ FLL-YFT จากผลการทดลองพบว่า สามารถใช้เซลล์ทั้งสองชนิด ในการแยกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากวิการตัวอย่างได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ FLL-YFT มีความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยดีกว่าเซลล์ BHK-21 โดยเซลล์ FLL-YFT สามารถตรวจพบการเกิด CPE ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ได้ทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกภายใน 1-2 passages ในขณะที่เซลล์ BHK-21 ต้องผ่านไวรัส 4-5 passages จึงจะตรวจพบ CPE ในทุกตัวอย่างที่ได้ผลบวก แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ FLL-YFT มีขีดจำกัดในการเพาะเลี้ยง เช่นความสามารถในการขยายและการแบ่งตัวของเซลล์น้อยกว่าเซลล์ BHK-21 ขณะที่เซลล์ BHK-21 สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่าและความสามารถในการแบ่งตัวมากกว่าเซลล์ FLL-YFT ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเปื่อยในปัจจุบันจึงยังคงใช้เซลล์ BHK-21ในการแยกเชื้อไวรัสโดยทำการ passage ไม่น้อยกว่า 5 passages และตรวจยืนยันโดยวิธี CF และ ELISA ซึ่งจะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ดีกว่าการใช้วิธี CF และ ELISA เท่านั้น

สรุป

ผลการทดลองพบว่า สามารถใช้เซลล์ FLL-YFT และเซลล์ BHK-21 ในการแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากวิการตัวอย่าง โดยเซลล์ FLL-YFT มีความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยดีกว่าเซลล์ BHK-21

เอกสารอ้างอิง

บุศนีย์ จันทร์ประเสริฐ สมใจ กมลศิริพิชัยพร แอบ คงทน ธนรัตน์ จานุกิจ 2530 การตรวจเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย ณ.ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 6 18-20 พฤษภาคม 2530 หน้า 179-187.

CASEY H. L., 1965. Standardised diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. U.S. Public Health Service, Washington D.C., Publ. Health Monogr., 74, 1-34.

FERRIS, N.P. and DONALDSON, A.I.1984 Comparative sensivity of bovine thyroid cells and BHK-21 cells for the innocuity testing of inactivated foot and mouth disease virus suspension. Report of a Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease. Brescia, Italy. FAO, Rome. 7-9.

HAMBLIN C., ARMSTRONG R.M. & HEDGER R.S. 1984. A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot and mouth disease virus in epithelial tissue. Vet. Microbial., 9 , 435-443.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพญ.วิไล ลินจงสุบงกช, Dr. Akio Fukusho และ สพญ.สุนันท์ ร่มลำดวน ที่ให้คำแนะนำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี