วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 10 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2543

สารบัญ

- **เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้น** 9

  สุรพล ขุมทรัพย์ วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์

- **การเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยด้วยมีเดียมผงสำเร็จรูปในระดับอุตสาหกรรม** 19

  สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์

  สินสมุทร นิลฉวี

- **ความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร** 29

  นพพร พัฒนประสิทธิ์ สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล

  วิไล ลินจงสุบงกช

- **ศึกษาระดับแอนติบอดี้ที่ให้ความคุ้มโรคในโคและสุกรภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีลิควิดเฟส บล็อคกิ้ง อีไลซ่า** 41

  วิไล ลินจงสุบงกช อนุโรจน์ ภู่ศิริมงคล

  สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล ร่มพฤกษ์ อุดล

- **ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคและปริมาณความเข้มข้นของ** Montanide 80 **ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์** 51

  นริศ ว่องวัฒนากูล สินสมุทร นิลฉวี

  สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ

- **การทดสอบหาอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี** Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation 61

  ไชยา สง่าประโคน นพพร พัฒนประสิทธิ์

- **กองบรรณาธิการ** 73

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 10 No. 1-2 September 2000

Contents

- Comparison of BHK-21 C-13 Suspension Cell Growth in Premixed and Prepared Growth Medium for Suspension Cell Culture (GMS) 9

  Surapon Khumsab Worapong Srivilirit

- An Industrial Scale Cultivation of IFFA-3 Suspension Cell Growth in Premixed Medium 19

  Saipin Khumsab Surapon Khumsab Sinsamut Nilchavee

- The Relationship of Neutralizing Antibody Titers and Percent Protection after Vaccination with Foot and Mouth Disease Vaccine in Cattle and Pigs 29

  Nopporn Patanaprasit Somkiet Petchvanichkul Wilai Linchongsubongkoch

- Study of Protective Antibody Titer in Cattle and Pigs after Vaccination with Foot and Mouth Disease Vaccine by Liquid Phase Blocking ELISA 41

  Wilai Linchongsubongkoch Anuroj Phusirimongkol

  Somkiet Petchvanichkul Romphroke Udon

- Relation between Phase Invertion Temperature and Various Concentration of Montanide 80 in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine Production 51

  Narit Wongwattanakul Sinsamut Nilchavee Sahawatchara Ungvanijban

- Detection of 146S Particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine by Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation 61

  Chaiya Sangaprakhon Nopporn Patanaprasit

- Editorial board 73

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 10 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2543 Volume 10 No.1-2 September 2000

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านการผลิตชีวภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีน
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2543 พิมพ์เผยแพร่ ตุลาคม 2544 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	พยนต์	สินสุวงศ์วัฒน์
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ
กองบรรณาธิการ	สมใจ	กมลศิริพิชัยพร
	ไชยา	สง่าประโคน
	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ
	กฤษดา	ลิมปนานนท์
	เดิมพล	รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์	
	ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130	
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ : เดือนมีนาคม และกันยายน	
พิมพ์ที่	ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย	
	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	

The Journal of Veterinary Biologics

Editor	Payont	Sinsuwonkwat
Assistant editor	Ratchanee	Atthi
Editorial board	Somjai	Kamolsiripichaiporn
	Chaiya	Sangaprakhon
	Sahawatchara	Ungvanijban
	Kritsada	Limpananont
	Dermpol	Ratanawonk
Office	Division of Veterinary Biologics,	
	Pakchong, Nakhonratchasima, 30130	
Publications	twice a year in March and September	

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน วัตถุประสงค์ เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ และหน่วยงานอื่นที่คล้ายกัน งานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

เรื่องที่จะนำลง

1. งานวิจัย (Technical papers) : เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง
2. บทความ (Articles) : เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน
3. เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

การส่งเรื่อง ส่งถึงกองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทร. 044-311592 Fax. 044-312870

ต้นฉบับ

1. ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น
2. ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ **พิมพ์**บนกระดาษ A 4 ส่งมาพร้อมกับ Floppy-Disk ขนาด 3.5 นิ้ว โดยพิมพ์บทความด้วยโปรแกรม MS. word
3. มีความยาวไม่เกิน 12 หน้า

การลำดับเรื่อง

1. **ชื่อเรื่อง** (Title) ควรสั้นชัดเจน ได้ใจความตรงตามเนื้อหา ควรงดเว้นการใช้อักษรย่อ นอกจากเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย

2. **ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน** (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มใต้ชื่อเรื่องโดยไม่ต้องมีคำนำหน้า นาย นาง นางสาว ฯลฯ พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวกเป็นหมายเหตุ (foot note)

3. **บทคัดย่อ** (Abstract) เขียนสั้นๆให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของเนื้อเรื่อง กรณีต้นฉบับเป็นภาษาไทย ต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ เขียนแยกหน้าต่างหากไว้หลังเอกสารอ้างอิง และหากเป็นต้นฉบับภาษาอังกฤษ ให้เขียนบทคัดย่อภาษาไทยไว้หลังเอกสารอ้างอิง

4. **คำสำคัญ** (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 4 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาไทยสะกดทับศัพท์ อยู่ใต้บทคัดย่อ

5. **เนื้อหา** (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

5.1 **บทนำ** (Introduction) อธิบายถึงปัญหา ความเป็นมา และวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

5.2 **อุปกรณ์และวิธีการ** (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้ว ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ข้างล่างของหน้านั้น

5.3 **ผล** (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยายอย่างละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลาย ๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือ รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมทั้งบรรยายประกอบเป็นภาษาอังกฤษ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น ๆ

รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น ๆ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง

5.4 **วิจารณ์** (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงาน การวิจารณ์ควรเปรียบเทียบกับผลการทดลองของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว ควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ ปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 **สรุป** (Conclusion) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ หากเป็นบทความการตรวจเอกสาร (Review paper) หรือการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความที่สำคัญ คุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

5.6 **กิตติกรรมประกาศ** (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือที่ได้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

5.7 **เอกสารอ้างอิง** (References)

ก. **กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไล และคณะ, 2532)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Lin และ Lee (1981), Kumagai และคณะ (1961) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Lin and Lee, 1981) (Kumagai et al., 1961)

ข. **การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง** ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

กัญญา สุวินทรากร และอนุทิน หาญวีรพล 2534 การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไซน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่าย โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชชสารสัตวแพทย์ 21(2) : 69-78

Johnson, R.H. and Collings, D.F., 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci., 12 : 570-572

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำราให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการ) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

Van Oirschot, J.T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6th ed. Leman, A.D. ed., Iowa State University Press, Iowa. p. 293-297

การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ให้ใช้ตัวอักษร Cordia UPC ขนาด 16 ยกเว้นหัวข้อให้ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) แสดงให้ชัดเจน

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 mm) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 1.5 นิ้ว หรือ 3.17 ซม.

ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 1 นิ้ว หรือ 2.5 ซม.

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบในบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กองผลิตชีวภัณฑ์ ไม่ให้แยกเป็น กองผลิตชีว- ภัณฑ์ เป็นต้น
- หลังเครื่องหมาย . และ , เคาะ 1 เคาะ
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่าง (...) และคำข้างในวงเล็บ

การลำดับหน้า

ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3..... ที่มุมขวาด้านบน

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title)

หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไป โดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)
- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ให้ใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ หรือ *พิมพ์ด้วยตัวเอน* ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) คือประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific alphabet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ตัวอย่าง

จุลชีพ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ตัวเอน

พืช เช่น Oryza sativa L. หรือพิมพ์ตัวเอน

สัตว์ เช่น Spiella inermis หรือพิมพ์ตัวเอน

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้ว ให้ผู้เขียนเพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอย ในมีเดียมผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้น

สุรพล ขุมทรัพย์[1] วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์[1]

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอยใน Growth Medium for Suspension Cell Culture (GMS) ชนิดผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้นจากสารละลาย สต๊อคในขวด Woulff จำนวน 5 passage พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมทั้งสองชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดี อยู่ในช่วงระหว่าง 16 - 20 X 10^5 cell/ml ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

คำสำคัญ : เซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอย GMS

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย (Suspension cell culture) (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1986) และนำเซลล์ BHK-21 C-13 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากไตของตัวอ่อนหนู Hamster (Nardelli and Panina, 1976) มาใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน โดยเพาะเลี้ยงใน Growth Medium for Suspension Cell Culture (GMS)

การผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณและคุณภาพดีนั้นมีปัจจัยหลายประการ การเตรียมมีเดียมให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอทุกๆชุดการผลิต เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้เซลล์ที่ดีมีคุณภาพ แต่ในทางปฏิบัติมีหลายปัจจัยที่เป็นอุปสรรคในการเตรียมมีเดียม ปัญหาเรื่องสารเคมีเป็นปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยซื้อสารเคมีจากหลายบริษัท และการเตรียมมีเดียมในปริมาณน้อยๆยิ่งมีโอกาสผิดพลาดได้สูงเพราะในส่วนผสมใช้สารเคมีบางชนิดในปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงนิยมเตรียมในรูปสารละลายสต๊อคความเข้มข้นสูง แต่สารละลายสต๊อคจะมีปัญหาคุณภาพของสารเสื่อมลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (Parker, n.d.) และหากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จะมีผลกระทบต่อเซลล์จากสารพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541)

การทดลองใช้มีเดียมผงสำเร็จรูปในการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C-13 จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะลดปัญหาความผิดพลาดต่างๆ และเพิ่มความสะดวกในการเตรียมมีเดียม ให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอทุกๆชุดการผลิต

การทดลองนี้เป็นการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูป และปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น เพื่อทราบผลของประสิทธิภาพของมีเดียมทั้งสองชนิด ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปพัฒนาการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เซลล์ BHK-21 C-13

เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากไตของตัวอ่อนหนู Hamster (Nardelli and Panina, 1976) passage ที่ 16-20 ในสภาพแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ GMS ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์

ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 x 10 เท่า

2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

2.1 ชนิดผงสำเร็จรูป (Premixed powder)[1] มีส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรใน Table 1

2.2 เตรียมจากการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรใน Table 1 ให้เป็นสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า (10 × conc. GMS)

3. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Woulff bottle) แบบแขวนลอย ขนาด 2 ลิตร จำนวน 40 ขวด

4. water bath

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C-13 จาก Seed cell ในมีเดียม GMS+5% Calf serum[2] เพื่อขยายเป็นเซลล์เริ่มต้นให้มีปริมาณ 5×10^5 เซลล์/มล.

2. การเตรียมมีเดียม

2.1 เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูป จำนวน 20 ลิตร โดยชั่งตามอัตราส่วน 15.314 กรัม/ลิตร ละลายใน Deionized Water (DW) ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ[3] เติม Flumequine 90%[4] , Colimycin[5] และ $NaHCO_3$[6] ปริมาณ 50, 37.5 และ 2,400 มก./ลิตร ตามลำดับในสารละลายข้างต้น ปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้สารละลาย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วทำการกรองปลอดเชื้อในตู้ Laminar air flow ด้วยเครื่องกรอง Disc filter ที่ใช้แผ่นกรอง Pore size 0.45 และ 0.2 ไมครอน มีเดียมปลอดเชื้อที่ได้บรรจุลงขวดปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 20 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการเพาะเซลล์

---

[1] HyClone ®, U.S.A. Lot no. AJF 10535A

[2] Moregate®, New Zealand Lot no.11280119

[3] Millipore®, U.S.A. Super Q

[4] Far-ca®, Italy Lot no. 104/98

[5] Kayaku®, Japan. Lot no. MCB-610

[6] BDH®, England Lot no. K23752142671

[7] Organotechnie®, France Lot no. 368

[8] Gibco BRL®, Scotland Lot no. 3100893

[9] Gibco BRL®, Scotland Lot no. 3003407

2.2 เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า ละลาย ใน DW ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ เติม Flumequine 90%, Colimycin, Meat peptone,[7] Lactalbumin hydrolysate[8] , Tryptose phosphate broth[9]และ $NaHCO_3$ ปริมาณ 50, 37.5, 1,000, 2,500, 2,000 และ 2,400 มก./ลิตร ตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 6.8 แล้วทำการกรองปลอดเชื้อ บรรจุลงขวดปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 20 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการเพาะเซลล์

3. นำเซลล์ BHK-21 C-13 จากข้อ 1 มาทำการเพาะเลี้ยงในขวด Woulff โดยใช้มีเดียมที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 ปริมาตร 1 ลิตร ชนิดละ 2 ขวด เติม 5% Calf serum ควบคุม pH โดยใช้ 4% CO_2 เพาะเลี้ยงใน ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเปนชัน (Suspension cell culture set) ควบคุมอุณหภูมิ 37.0 °C ใช้ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงต่อ 1 Passage เก็บตัวอย่างเซลล์ครั้งละ 2 มล. จากขวดเพื่อดูลักษณะและนับจำนวน แล้วทำการ Subculture เซลล์ข้างต้นโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุก Passage ลงในมีเดียมทั้ง 2 ชนิด ต่อไปจนครบ 5 Passage ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในทุก Passage เท่ากับ 5×10^5 เซลล์/มล. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C-13 ในมีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูป ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ใน Passage ที่ 1 ถึง 5 เป็น 12.91, 16.97, 18.46, 19.83 และ 20.22×10^5 เซลล์/มล. ตามลำดับ และมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ใน Passage ที่ 1 ถึง 5 เป็น 18.45, 16.42,18.44, 18.78 และ 20.06×10^5 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดัง Table 2 เมื่อนำค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์มาเปรียบเทียบทางสถิติ (t- test) พบว่า Passage ที่ 2, 3, 4 และ 5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน Passage ที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table1 Growth Medium for Suspension Cell Culture (GMS), Premixed powder and Stock Solution (Concentrate Solution) Formula.

Component	Quantity (mg / l)	
	Premixed powder	Stock solution
NaCl	5,120	5,120
KCl	320	320
$MgSO_4$anhydrous	78.1	-
$MgSO_4.7H_2O$	-	160
$NaH_2PO_4.H_2O$	99.1	-
$NaH_2PO_4.2H_2O$	-	112
D-glucose anhydrous	3,600	3,600
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	0.05	0.05
$CaCl_2$ anhydrous	159.3	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	211
L-Arginine HCl	16.8	16.8
L-Cystine	-	9.6
L-Cystine . 2HCl	12.5	-
L-Glutamine	240	240
L-Histidine	7.8	7.8
L-Isoleucine	21	21
L-Leucine	21	21
L-Lysine HCl	29	29
L-Methionine	6	6
L-Phenylalanine	13	13
L-Threonine	19	19
L-Tryptophan	3	3
L-Tyrosine	14	14

Table1 (continued)

Component	Quantity (mg / l)	
	Premixed powder	Stock solution
L-Valine	19	19
Choline chloride	2	2
Folic acid	2	2
myo-Inositol	4	4
Nicotinamide	2	2
D-Pantothenic acid calcium salt	2	2
Pyridoxal HCl	2	2
Thiamine HCl	2	2
Riboflavine	0.2	0.2
Meat peptone	1,000	-
Lactalbumin hydrolysate	2,500	-
Tryptose phosphate broth	2,000	-

Table2 Average cell (BHK-21 C-13) growth in GMS premixed powder and Stock solution after cultivation for 48 hours.

Passage	Premixed powder ($\times 10^5$ cell/ml)	Stock solution ($\times 10^5$ cell/ml)	SD.
1	12.91[a]	18.45[a]	3.51
2	16.97	16.42	6.69
3	18.46	18.44	2.12
4	19.83	18.78	4.23
5	20.22	20.06	1.14

[a] Significantly different ($P < 0.05$)

SD = Standard Deviation

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า Passage ที่ 1 ของการทดลอง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูปมีปริมาณเซลล์น้อยกว่าในมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Freshney, 1994) เพราะเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปใน Passage ที่ 2, 3, 4 และ 5 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูปมีปริมาณเซลล์มากกว่า มีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น เมื่อนำค่าปริมาณเซลล์มาเปรียบเทียบทางสถิติ (t-test) พบว่า Passageที่1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งควรจะทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป ส่วน Passageที่ 2, 3, 4 และ 5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมมีเดียมโดยเตรียมจากสารละลายสต๊อค และเตรียมจากมีเดียมผงสำเร็จรูปได้ผลดีเหมือนกัน หากใช้สารเคมีที่มีคุณภาพดีในการเตรียมสารละลายสต๊อคและเตรียมสารละลายสต๊อคใหม่ๆ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมมีเดียมจากมีเดียมผงสำเร็จรูปก็มีความสะดวกรวดเร็วกว่าการเตรียมจากสารละลายสต๊อคมาก

มีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูป มีสารเคมีบางชนิดที่เปลี่ยนไปจากมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น (Table1) เนื่องจากต้องการให้มีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูปอยู่ในสถานะที่สามารถละลายได้ดีในน้ำ เพื่อความสะดวกในการใช้งาน จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนสารเคมีบางชนิดให้สามารถละลายได้ดีในน้ำด้วย ซึ่งมีผลต่อน้ำหนักที่ใช้ แต่น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต้องการไม่เปลี่ยนแปลง

การทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตมีเดียม ทั้งด้านการเพิ่มคุณภาพ และการเก็บรักษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

สรุป

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอยโดยใช้มีเดียมที่เตรียมจาก GMS ชนิดผงสำเร็จรูป และชนิดที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น พบว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในมีเดียมทั้ง 2 ชนิด เติบโตอยู่ในระหว่าง $16 - 20 \times 10^5$ cell/ml

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ พนักงานหน่วยซัสเปนชั่น และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนให้การทดลองนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 แบคทีเรียและการทำให้เกิดโรค จุลชีววิทยาทั่วไป ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. หน้า 639

Freshney ,R. I. 1994. Culture of Animal Cell. In : A Manual of Basic Technique. 3rd ed, Wiley-Liss, Inc. Publisher New York. p 71-103

Makarasen,P. and Sinsuwonkwat,P. 1986. Vaccine and Vaccine Production, Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control (Group Training Course) February 24-March 16, Bangkok, Thailand. p.180-183

Nardelli , L. and Panina , G.F. 1976. The Use of Suspension Cultures for FMD Vaccine Production. Criteria for the Evaluation of Cells, Virus and Vaccine. In : International Symposium on Foot-and-Mouth Disease, Lyon 1976. Develop. Biol. Standard., Vol. 35, p. 9-25

Parker, C. R. n.d. Chemically defined media, Method of tissue culture 3rd ed, Harper and Row Publisher, New York. p. 62-80

Comparison of BHK-21 C-13 Suspension Cell Growth in Premixed and Prepared Growth Medium for Suspension Cell Culture (GMS)

Surapon Khumsab[1] Worapong Srivilirit[1]

Abstract

The comparison of BHK-21 C-13 suspension cell growth in premixed and prepared growth medium for suspension cell culture (GMS) was conducted in woulff bottles five passages continuously. The result indicated that BHK-21 C-13 suspension cell can grow well ranging from 16 - 20 X 10^5 cell/ml in both media which was not significantly different. ($P<0.05$)

Key words : BHK-21 C-13 suspension cell, GMS

---

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

การเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ด้วยมีเดียมผงสำเร็จรูปในระดับอุตสาหกรรม

สายพิณ ขุมทรัพย์[1] สุรพล ขุมทรัพย์[1] สินสมุทร นิลฉวี[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาผลการใช้ Basal Medium Eagle (BME) ชนิดผงสำเร็จรูป ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในถังขนาด 1,400 ลิตร จำนวน 21 ครั้ง และ 3,200 ลิตร จำนวน 17 ครั้ง โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังเพาะเลี้ยงที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมงตามลำดับ และนำจำนวนเท่าของการแบ่งตัว (Multiplication rate) ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่ 44 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 พบว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในถังทั้ง 2 ขนาด

คำสำคัญ : BME เซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย จำนวนเท่าของการแบ่งตัว

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย (Suspension cell culture) (Makarasen and Sinsuwonkwat,1986) และนำเซลล์ IFFA-3 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster (Nardelli and Panina,1976) มาใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเมื่อ ค.ศ.1989 โดยเพาะเลี้ยงใน Basal Medium Eagle (BME)

การผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณ และคุณภาพดีนั้นมีปัจจัยหลายประการ การเตรียมมีเดียมให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอทุกๆชุดการผลิตเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้เซลล์ที่ดีมีคุณภาพ แต่ในทางปฏิบัติมีหลายปัจจัยที่เป็นอุปสรรคในการเตรียมมีเดียม ปัญหาเรื่องสารเคมีเป็นปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยซื้อสารเคมีจากหลายบริษัท และการเตรียมมีเดียมน้อยๆ ยิ่งมีโอกาสผิดพลาดได้สูง การเตรียมในรูปสารละลายสต๊อคความเข้มข้นสูงจะมีปัญหาคุณภาพของสารเสื่อมลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (Parker, n.d.) และหากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จะมีผลกระทบต่อเซลล์จากสารพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น (นงลักษณ์ และปรีชา , 2541) ในการทดลองใช้มีเดียมผงสำเร็จรูปในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Woulff bottle) พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตได้ดี (สายพิณ และสินสมุทร, 2542)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของมีเดียมผงสำเร็จรูป ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง ตามลำดับ และนำจำนวนเท่าของการแบ่งตัว(Multiplication rate) ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่ 44 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 (APHIS-US Department of Agriculture,1989) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสวัคซีนโรคปาก-และเท้าเปื่อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เซลล์ IFFA-3

เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster passage ที่ 37-44 ในสภาพแขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยง Basal Medium Eagle (BME) ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์

ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x10 เท่า

2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย ใช้ BME ชนิดผงสำเร็จรูป[1] มีส่วนประกอบต่างๆตามสูตรใน Table1 ละลายใน Deionized Water ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ[2] มีส่วนผสมของ Penicillin G 0.012%[3], Dihydrostreptomycin 0.005%[4], $NaHCO_3$ 2.05%[5], Bovine calf serum[6] 5% สำหรับถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร และ 3% สำหรับถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.80-6.95 แล้วทำการกรองปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านไส้กรองชนิด Cartridge ขนาด Pore size 0.2 ไมครอน

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1 ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร

ขนาดของถัง 1,400 ลิตร มีความสูง 1,895 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1,100 มิลลิเมตร ความสูงของใบพัดจากก้นถังประมาณ 170 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.32 – 0.42 x 10^6 เซลล์ / มล. ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 800 ลิตรให้ Dissolved oxygen 30 % โดยเครื่อง Automatic oxygen regulator และปล่อยให้อากาศเข้าถังปริมาณ 20 ลิตร/ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 35.5°C ความเร็วรอบการหมุนของ Agitator เท่ากับ 80 rpm เก็บตัวอย่างจำนวน 5 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์หลังเพาะเลี้ยงที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง

3.2 ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร

ขนาดของถัง 3,200 ลิตร มีความสูง 2,200 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1,400 มิลลิเมตร ความสูงของใบพัดจากก้นถังประมาณ 175 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นซึ่งเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากถังขนาด 1,400 ลิตร เป็นเวลา 44 ชั่วโมง 0.32 – 0.42 x 10^6 เซลล์/ มล. ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 1,800 ลิตร โดยปรับให้มีสภาพเช่นเดียวกับถังเพาะเลี้ยงขนาด 1,400 ลิตร เก็บตัวอย่างจำนวน 5 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์หลังเพาะเลี้ยงที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง

---

[1] Hyclone®, U.S.A. Lot no. AHG8660A

[2] Millipore®, U.S.A. Super Q

[3] Pharma and Chemic Vertrieb®, Germany Lot no.SG0326

[4] ICN®, U.S.A. Lot no. 97033

[5] BDH®, England Lot no. S180296

[6] Moregate®, New Zealand Lot no. 80280117

4. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลการนับจำนวนเซลล์เป็นค่า Cell concentration ต่อ มล. แล้วนำมาคำนวนหาจำนวนเท่าของการแบ่งตัว (Multiplication rate) โดยคำนวณจากจำนวนเซลล์ที่เพาะได้ต่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเปรียบเทียบ Multiplication rate ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่ 44 ชั่วโมง เทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ซึ่งจะต้องมี Multiplication rate ที่ 44 ชั่วโมง เป็น 4-6 เท่าด้วย t-test

Table1 Basal Medium Eagle (BME) premixed powder formula

Component	Quantity (mg/l)	Component	Quantity (mg/l)
NaCl	6,800	L-Threonine	24
KCl	400	L-Tryptophan	4
$MgCl_2$ anhydrous	79.6	L-Tyrosine	18
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	139.7	L-Valine	23.5
D-glucose anhydrous	1,000	D(+)Biotin	1
$CaCl_2$ anhydrous	200	Choline chloride	1
L-Arginine HCl	21	Folic acid	1
L-Cystine 2HCl	15.6	myo-Inosital	2
L-Glutamine	300	Nicotinamide	1
L-Histidine	8	D-Pantothenic acid calcium salt	1
L-Isoleucine	26	Pyridoxal HCl	1
L-Leucine	26	Thiamine HCl	1
L-Lysine HCl	36.5	Riboflavine	0.1
L-Methionine	7.5	Meat peptone	2,000
L-Phenylalanine	16.5	Yeast extract	1,000

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 1,400 ลิตร จำนวน 21 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 0.78, 1.28 และ 2.29 x 10^6 เซลล์/มล.ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure1 และ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 1.1 $\pm$ 0.4784, 2.46 $\pm$ 0.9497 และ 5.19 $\pm$ 1.1908 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table2 ส่วนการเพาะเลี้ยงในถังขนาด 3,200 ลิตร จำนวน 17 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 0.74, 1.03 และ 2.43 x 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure1 และ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 0.96 $\pm$ 0.3341, 1.76 $\pm$ 0.4292 และ 5.62 $\pm$ 0.9481 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table2

เมื่อเปรียบเทียบ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่ 44 ชั่วโมง ในถังขนาด 1,400 และ 3,200 ลิตร กับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 พบว่าอยู่ในช่วงที่สามารถใช้งานได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ต่ำสุดของมาตรฐาน พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง ระหว่างถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร พบว่า ที่ 18 และ 44 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงใน Table 2

Figure1 Cell concentration per ml at 0, 18, 24 and 44 hours of culture (mean) in 1,400 and 3,200 litre tanks.

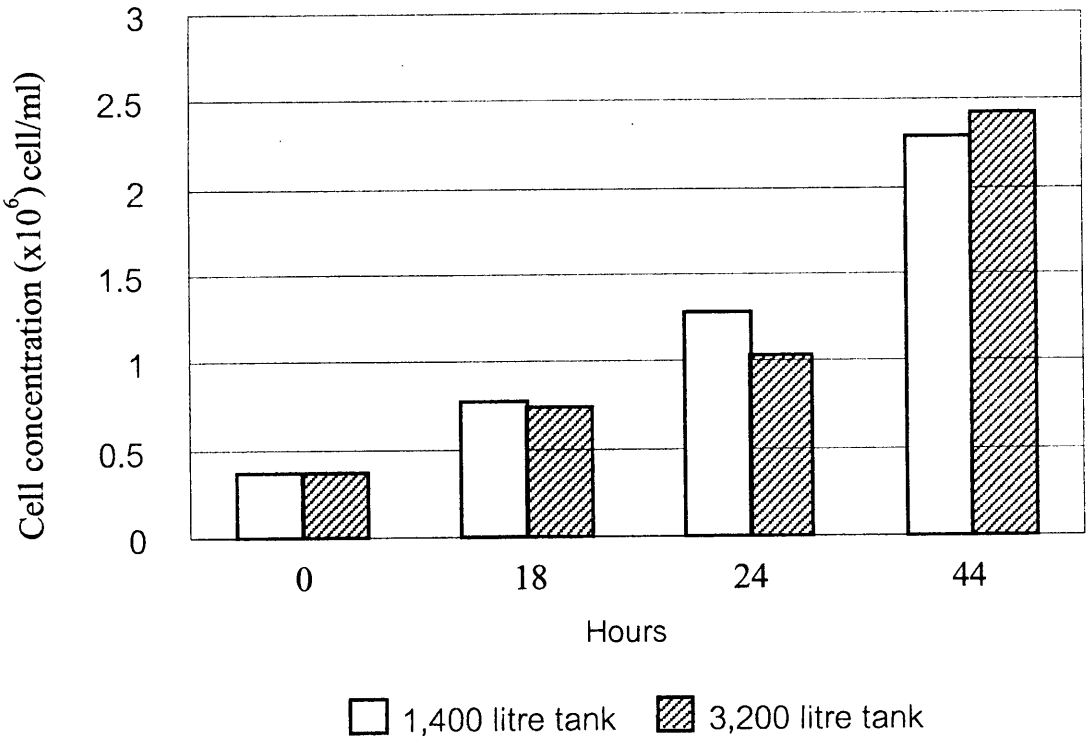


Table 2 Multiplication rate of IFFA-3 cell culture at 18, 24 and 44 hours in 1,400 and 3,200 litre tank

Tank	Multiplication rate (mean ± SD)			Number of Observation
	18 hr.	24 hr.	44 hr.	
1,400 L.	1.1±0.4784	2.46±0.9497[a]	5.19±1.1908	21
3,200 L.	0.96±0.3341	1.76±0.4292[b]	5.62±0.9481	17

SD = Standard deviation

a and b : Significantly different ($P<0.05$)

วิจารณ์

จากผลการศึกษานี้พบว่า ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง มีค่า Multiplication rate ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อาจเป็นผลจากการปรับสภาพเข้าสู่สมดุลย์ ซึ่งใช้เวลาแตกต่างกัน เนื่องจากขนาดของถังและปริมาตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไม่เท่ากัน และอาจเป็นผลจาก Bovine calf serum ที่ใช้เปอร์เซนต์แตกต่างกัน โดยใช้ปริมาณ 5% สำหรับถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร และปริมาณ 3% สำหรับถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร ซึ่งเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังขนาด 3,200 ลิตร จะต้องมีการลดปริมาณ serum ลงเพื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป และเพื่อมิให้มีโปรตีนที่ไม่ต้องการ ซึ่งจะนำไปสู่การแพ้วัคซีน และเป็นการลดต้นทุนการผลิต นอกจากปัจจัยการปรับสภาพเข้าสู่สมดุลย์ และ serum แล้วอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมของเซลล์ด้วย (Freshney,1994) เนื่องจากเซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นของถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร ต้องรับมาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตรซึ่งเปลี่ยนสภาพการเพาะเลี้ยงทั้งขนาดของถัง และเปอร์เซนต์ serum ที่ใช้ควรจะได้ทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

เมื่อเก็บตัวอย่างที่ 44 ชั่วโมง พบว่า Multiplication rate ของเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ขนาด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ปรับสภาพเข้าสู่สมดุลย์และสภาพแวดล้อมได้แล้วเซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตมีเดียมให้มีคุณภาพดี เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

สรุป

เมื่อศึกษาผลของมีเดียมผงสำเร็จรูป ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในถังทั้ง 2 ขนาด

กิตติกรรมประกาศ

. ขอขอบคุณ น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ น.สพ.รัชพล สืบพรหม พนักงานหน่วยเพาะเลี้ยงเซลล์ พนักงานหน่วยเตรียมน้ำยาเคมีฯ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวก ให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 แบคทีเรียและการทำให้เกิดโรค จุลชีววิทยาทั่วไป ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. หน้า 639

สายพิณ ขุมทรัพย์ และสินสมุทร นิลฉวี 2542 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9(1-2) : 19-25

APHIS-US Department of Agriculture.1989. Results of the IFFA-3 Cell Quantity Control, APHIS-US Department of Agriculture, Hyattsville, Maryland. p. 1-8.

Freshney,R. I. 1994. Culture of Animal Cell. In: A Manual of Basic Technique. 3rd ed, Wiley-Liss, Inc. Publisher New York. p. 71-103

Makarasen,P. and Sinsuwonkwat,P. 1986. Vaccine and Vaccine Production, Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control (Group Training Course) February 24-March 16, Bangkok, Thailand. p.180-183

Nardelli , L. and Panina , G.F. 1976. The Use of Suspension Cultures for FMD Vaccine Production. Criteria for the Evaluation of Cells, Virus and Vaccine. In : International Symposium on Foot-and-Mouth Disease, Lyon 1976. Develop. Biol. Standard., Vol. 35, p. 9-25

Parker, C. R. n.d. Chemically defined media, Method of tissue culture. 3rd ed, Harper and Row Publisher, New York. p. 62-80

An Industrial Scale Cultivation of IFFA-3 Suspension Cell in Premixed Medium

Saipin Khumsab[1] Surapon Khumsab[1] Sinsamut Nilchavee[1]

Abstract

The IFFA-3 suspension cell culture in 1,400 litres tank for 21 replicates and 3,200 litres tank for 17 replicates with premixed powder of Basal Medium Eagle (BME) were studied. The cell concentration was measured after 18, 24 and 44 hours. The multiplication rate was compared to the reference standard. The result showed that IFFA-3 suspension cell can grow well in both tanks.

Key words : BME, IFFA-3 suspension cell, Multiplication rate

---

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

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร

นพพร พัฒนประสิทธิ์[1] สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล[1] วิไล ลินจงสุบงกช[1]

บทคัดย่อ

ทดสอบหาระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มโคจำนวน 801 ตัว และสุกรจำนวน 508 ตัว ซึ่งฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์คือ โอ,เอ และเอเซียวัน โดยวิธี Serum neutralization test เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดพิษทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ในโค พบว่าระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ให้ความคุ้มโรค 100% สำหรับไทป์ โอ, เอ และเอเซียวัน เท่ากับ 1.83, 1.79 และ 2.16 ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคสำหรับไทป์ โอ, เอ และ เอเซียวัน มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.96, 0.97 และ 0.96 ตามลำดับ

ในสุกร พบว่าระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ให้ความคุ้มโรค 100% สำหรับไทป์ โอ, เอ และเอเซียวัน เท่ากับ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคสำหรับไทป์ โอ, เอ และเอเซียวัน มีค่า r เท่ากับ 0.91, 0.95 และ 0.94 ตามลำดับ

คำสำคัญ : วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย นิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ เปอร์เซนต์ความคุ้มโรค โค สุกร

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

บทนำ

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ได้ผลแน่นอนที่สุด คือการหาประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรคสัตว์ โดยการฉีดพิษทับด้วยไวรัสชนิดเดียวกันกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน แต่เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนด้วยวิธีนี้ ต้องใช้สัตว์จำนวนมากและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายท่านพยายามหาวิธีตรวจหาระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้จากซีรั่มของสัตว์ ภายหลังการฉีดวัคซีน โดยใช้ cell culture ซึ่ง sensitive ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Seller, 1955; Van Bekkum, 1959; Martin and Chapman, 1960; De Leeuw et al., 1979) มีรายงานจำนวนมากกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้หลังจากฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย และความคุ้มโรคหลังจากฉีดพิษทับในโค (Mackowick et al., 1962; Van Bekkum, 1970; Sutmöller and Vieira, 1980) ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์นี้จะสูงสุดเมื่อใช้ซีรั่มของโคหรือสุกรหลังจากฉีดวัคซีนแล้ว 3-4 สัปดาห์ (Dannacher et al, 1972)

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ได้ใช้วิธี Serum neutralization test ควบคู่กับการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน (Potency test) โดยการฉีดพิษทับในโคและสุกร การศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร ตั้งแต่ พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2542 ระยะเวลา 8 ปี เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้หลังจากฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคหลังจากฉีดพิษทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเดียวกันกับที่ใช้ผลิตวัคซีนในโคและสุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, และเอเซียวัน สำหรับใช้ใน Serum neutralization test เตรียมจากไวรัสซึ่งใช้สำหรับฉีดพิษทับหลังจากฉีดวัคซีน โดยนำมาผ่าน IRP_1 cell line (pig kidney cell line) จำนวน 3-5 passage นำมาตรวจสอบเพื่อหาระดับความรุนแรงของไวรัส โดยใช้การ titrate ใน secondary lamb kidney cell และคำนวณหา titer โดย Karber method (Karber, G. 1931)

2. ตัวอย่างซีรั่ม

ซีรั่มจากโคจำนวน 801 ตัว และสุกรจำนวน 508 ตัว ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ตั้งแต่ พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2542 โดยโคและสุกรได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

ชนิด 3 ไทป์ คือ โอ, เอ, และเอเชียวัน หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้โดยวิธี Serum neutralization test และฉีดพิษทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

3. Serum neutralization test

ซีรั่มที่ต้องการตรวจหาระดับแอนติบอดี้โดยวิธี Serum neutralization test นำมา Inactivate ที่ 56°C 30 นาที แล้วทำให้เจือจางแบบ three fold dilution จาก 1:3 –1:758 ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัสปริมาตรที่เท่ากับซีรั่ม คือ 0.05 มิลลิลิตร ซึ่งมีความรุนแรง 320 $TCID_{50}$/ml ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator (5% CO_2) จากนั้นเติม secondary lamb kidney cell ในแต่ละหลุม ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator อ่านผลการเปลี่ยนแปลงของ cell (cytopathogenic effect-CPE) โดยใช้กล้อง inverted microscope คำนวณค่า SN titer โดยวิธีของ Karber, G. (1931) โดยมีค่าเป็น log_{10}

4. Potency test

โค ทำ PD_{50} โดยเจือจางวัคซีนด้วย Carbonate buffer เป็น 1:1, 1:3 และ 1:9 ฉีดให้โค 3-5 ตัว ต่อ dilution ในขนาดโด๊สปกติ (2 ml) เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เจาะเลือดเพื่อตรวจสอบ SN titer และฉีดพิษทับด้วยไวรัสขนาดความรุนแรง 10,000 CID_{50} เข้าในเยื่อบุลิ้น (intradermolingual) โดยฉีด 2 จุด ๆ ละ 0.1 ml ในกลุ่มโคฉีดวัคซีน และกลุ่ม control จำนวน 2 ตัว อ่านผล 5-8 วัน โคกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรคต้องไม่มีวิการที่เท้า และจากการคำนวณหาความคุ้มโรคโดยวิธี Probit (ใช้ computer software ANAVAR-GWBASIC Programme Realise Par Le Departement De Biomathematique De Rhone-Merieux IFFA) ต้องมีค่าอย่างน้อย 3PD_{50}/dose (European Pharmacopoeia, 1985)

สุกร ฉีดวัคซีนในขนาดโด๊สปกติ (2 ml) เข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) สุกร 5 ตัว หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เจาะเลือดตรวจสอบ SN titer และฉีดพิษทับด้วยไวรัสขนาดความรุนแรง 100 PID_{50} เข้าในผิวหนัง (intradermal) บริเวณ Coronary band เท้าหลังซ้ายจำนวน 1 ml ในกลุ่มสุกรฉีดวัคซีน และกลุ่ม control จำนวน 2 ตัว อ่านผล 5-7 วัน สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรคต้องไม่มีวิการที่เท้าอื่นนอกจากเท้าที่ฉีดพิษทับ คำนวณเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคต้องมีค่าอย่างน้อย 60%

Table 1 SN titer and protection after intradermolingual challenge in cattle classified according to FMDV type administered.

SN titer	FMDV type					
	O		A		Asia1	
	a[1]	b[2]	a	b	a	b
≥0.24	1/48	2.08	7/42	16.67	3/26	11.54
0.36	1/35	2.86	0/11	0	2/10	20.00
0.48	1/11	9.09	4/14	28.57	1/13	7.96
0.60	4/21	19.95	5/13	38.46	1/15	6.67
0.72	1/15	6.67	5/11	45.45	5/19	26.32
0.82	4/13	30.77	3/7	42.86	2/10	20.00
0.96	4/16	25.00	5/10	50.00	5/12	41.67
1.08	6/14	42.86	12/16	75.00	12/23	52.17
1.20	8/18	44.44	7/10	70.00	11/12	91.67
1.32	9/13	69.23	6/8	75.00	6/12	50.00
1.44	12/15	80.00	8/9	88.89	9/13	69.23
1.56	9/11	81.82	9/10	90.00	10/14	71.43
1.68	14/16	87.50	10/12	83.33	12/14	85.71
1.80	4/4	100.00	4/4	100.00	9/11	81.82
1.92	8/8	100.00	6/6	100.00	8/8	100.00
2.04	6/6	100.00	8/8	100.00	8/8	100.00
2.16	5/5	100.00	6/6	100.00	7/7	100.00
2.28	5/5	100.00	3/3	100.00	7/7	100.00
2.40	8/8	100.00	6/6	100.00	4/4	100.00
2.52	5/5	100.00	2/2	100.00	6/6	100.00
2.64	6/6	100.00	2/2	100.00	8/8	100.00
2.76	5/5	100.00	3/3	100.00	3/3	100.00
2.88	-	-	1/1	100.00	4/4	100.00
3.00	2/2	100.00	3/3	100.00	8/8	100.00
≥3.12	6/6	100.00	2/2	100.00	9/9	100.00

1 : number of protected cattle / total number of cattle.

2 : percent protection.

Total number of cattle challenged with type O 306

Total number of cattle challenged with type A : 219

Total number of cattle challenged with type Asia1 : 276

Table 2 SN titer and protection after intradermocoronary challenge in pigs classified according to FMDV type administered.

SN titer	FMDV type					
	O		A		Asia1	
	a[1]	b[2]	a	b	a	b
≤0.24	2/47	4.26	0/28	0	3/17	17.65
0.36	2/19	10.53	0/12	0	4/13	30.77
0.48	1/22	4.55	0/5	0	2/4	50.00
0.60	3/17	17.65	1/11	9.09	2/5	40.00
0.72	2/10	20.00	3/8	37.50	5/10	50.00
0.84	3/10	30.00	2/5	40.00	6/11	54.55
0.94	8/14	57.14	3/7	42.86	9/11	81.82
1.08	7/13	53.85	3/5	60.00	8/9	88.89
1.20	3/7	42.86	2/3	66.67	7/9	77.78
1.32	2/4	50.00	4/4	100.00	12/14	85.71
1.44	8/9	88.89	9/9	100.00	7/8	87.50
1.56	4/5	80.00	5/5	100.00	11/11	100.00
1.68	9/9	100.00	5/5	100.00	4/4	100.00
1.80	5/5	100.00	4/4	100.00	4/4	100.00
1.92	5/5	100.00	-	-	7/7	100.00
2.04	9/9	100.00	4/4	100.00	5/5	100.00
2.16	3/3	100.00	4/4	100.00	1/1	100.00
2.28	4/4	100.00	1/1	100.00	2/2	100.00
2.40	2/2	100.00	1/1	100.00	5/5	100.00
2.52	1/1	100.00	1/1	100.00	5/5	100.00
2.64	4/4	100.00	1/1	100.11	1/1	100.00
2.76	2/2	100.00	1/1	100.00	2/2	100.00
2.88	-	-	-	-	1/1	100.00
3.00	-	-	1/1	100.00	2/2	100.00
≥3.12	-	-	-	-	2/2	100.00

1 : number of protected pigs / total number of pigs.

2 : percent protection.

Total number of pigs challenged with type O : 221

Total number of pigs challenged with type A : 124

Total number of pigs challenged with type Asia1 : 163

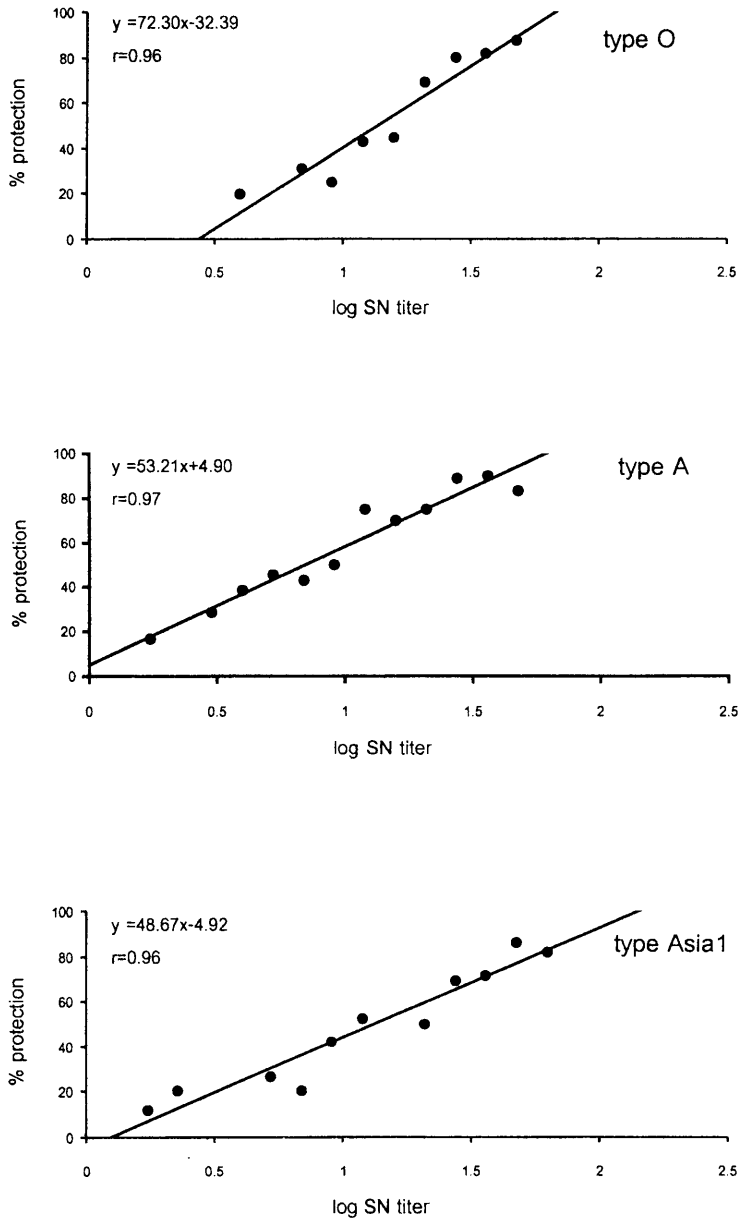


Figure 1 Regression between $\log_{10}$ neutralizing antibody titers and percent protection in cattle. Cattle were challenged intradermolingually with the FMDV type O, A and Asia1 homologous strain 3 weeks after vaccination with trivalent FMD vaccines. Data points based on 10-90 percent protection are shown.

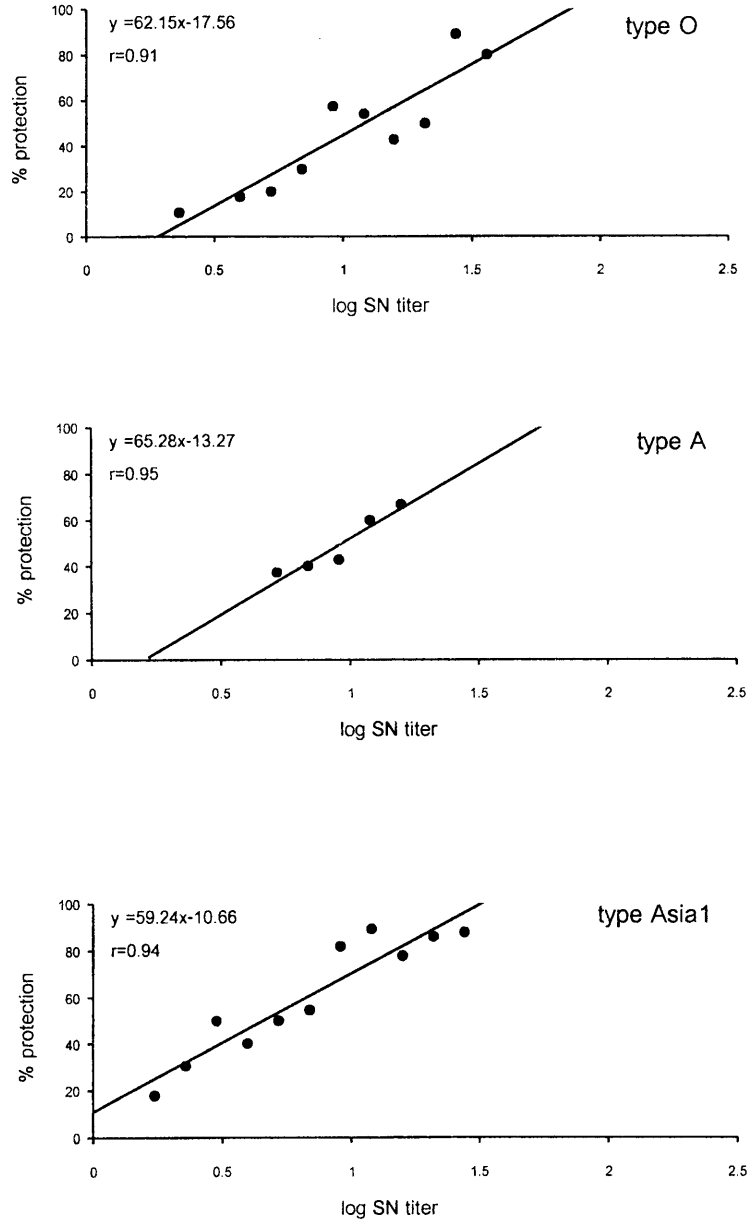


Figure 2 Regression between $\log_{10}$ neutralizing antibody titers and percent protection in pigs. Pigs were challenged intradermocoronarily with the FMDV type O, A and Asia1 homologous strain 3 weeks after vaccination with trivalent FMD vaccines. Data points based on 10-90 percent protection are shown.

Table 3 SN titer at which 100% of the cattle and pigs could be considered protected after vaccination with FMD vaccine. Based on the equation of linear regression line.

Vaccine	FMDV type		
	O	A	Asia1
Cattle	1.83	1.79	2.16
Pig	1.89	1.74	1.41

ผลการทดลอง

Table 1 และ 2 แสดงจำนวนโคและสุกรที่คุ้มโรค, จำนวนโคและสุกรที่ใช้ทั้งหมด และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคในแต่ละระดับของนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้

Figure 1 และ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด 3 ไทป์ วัคซีนโคไทป์โอ, เอ และเอเซียวัน มีค่า Correlation Coefficient (r) เท่ากับ 0.95, 0.97 และ 0.96 ตามลำดับ และวัคซีนสุกรไทป์โอ, เอ และเอเซียวัน มีค่า r เท่ากับ 0.91, 0.95 และ 0.94 ตามลำดับ

Table 3 แสดงระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ ที่สามารถให้ความคุ้มโรคได้ 100% โดยการฉีดพิษทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ และเอเซียวัน สำหรับวัคซีนโคเท่ากับ 1.83, 1.89 และ 2.16 ตามลำดับ และสำหรับวัคซีนสุกรเท่ากับ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการตรวจสอบซีรั่มโคและสุกรจำนวนทั้งสิ้น 1,309 ตัวอย่าง (โค 801 ตัวอย่าง, สุกร 508 ตัวอย่าง) ซึ่งเก็บซีรั่มในระยะ 3 สัปดาห์ ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ เพื่อทำการตรวจสอบและหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ กับเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค โคที่ได้รับการฉีดพิษทับด้วยไวรัสไทป์โอ 306 ตัว ไทป์เอ 219 ตัว และไทป์เอเซียวัน 296 ตัว ตาม Table 3 มีความคุ้มโรค 100% ที่ระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ 1.83, 1.79 และ 2.16 ตามลำดับ เมื่อคำนวณจากค่าสมการของ linear regression line ใน Figure 1

Van Maanen และ Terpstra (1989) รายงานเกี่ยวกับการจัดแบ่งระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ ที่ใช้เป็นหลักเกณฑ์การตัดสินผลการตรวจสอบ SN test ในการค้าสัตว์ระหว่างประเทศดังนี้ ถ้าระดับ แอนติบอดี้ต่ำกว่า 0.90 ถือว่าเป็น Negative ถ้าอยู่ในช่วง 1.0 ถึง 1.50 อยู่ในช่วงที่ไม่แน่นอน และถ้าระดับแอนติบอดี้สูงกว่า 1.50 เป็นที่มั่นใจได้ว่าสามารถให้ความคุ้มโรคได้

สุกรที่ได้รับการฉีดพิษทับด้วยไวรัสไทป์โอ 221 ตัว ไทป์เอ 124 ตัว และไทป์เอเซียวัน 163 ตัว ตาม Table 3 จะให้ความคุ้มโรค 100% ที่ระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ เมื่อคำนวณจากค่าสมการของ linear regression line ใน Figure 2 จะเห็นว่าระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ อยู่ในระดับสูงและมั่นใจได้ว่าสามารถให้ความคุ้มโรคได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับแอนติบอดี้ต่อไทป์เอเซียวันต่ำกว่า 1.50 เล็กน้อย แต่ยังจัดอยู่ในช่วงที่พอจะให้ความคุ้มได้ (Van Maanen and Terpstra, 1989)

การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ กับเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค ให้ค่า r หลังฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์ พบว่าค่า r ของวัคซีนทั้ง 3 ไทป์ในโคและสุกร มีค่าสูงมากกว่า 0.91 ทุกไทป์แสดงว่าค่าระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ และค่าเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคมีความสัมพันธ์สูง Van Maanen และ Terpstra (1989); Van Bekkum (1970); Sutmoller และ Vilira (1980) รายงานว่าระดับแอนติบอดี้ระยะ 3-4 สัปดาห์ภายหลังได้รับการฉีดวัคซีนโคและสุกร จะให้ค่าระดับแอนติบอดี้สูงสุด และสูงพอที่จะให้ความคุ้มโรคได้เมื่อทำการฉีดพิษทับ ในปัจจุบันการผลิตวัคซีนในต่างประเทศได้พยายามศึกษาค้นคว้าและทดลองการตรวจสอบทาง Potency test ของวัคซีนแต่ละชุด โดยอาศัยค่ามาตรฐานและความเชื่อมั่นในการตรวจสอบทางซีรั่มวิทยาอย่างเดียว โดยไม่มีการฉีดพิษทับในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่าย และป้องกันไม่ให้มีการแพร่กระจายเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลองไปสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้

สรุป

ค่าระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกรมีความสัมพันธ์สูง โดยเมื่อคำนวณจากสมการ linear regression line มีค่า correlation coefficient (r) ของทุกไทป์มากกว่า 0.91

ระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ให้ความคุ้มโรค 100% สำหรับไทป์โอ, เอ และเอเซียวัน ในโคเท่ากับ 1.83, 1.79 และ 2.16 ตามลำดับ ในสุกรเท่ากับ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

European Pharmacopoeia. 1985. second edition. Published under the direction of the council of Europe (partial agreement): 63

Dannacher, G., Fedida, M., Coudert, M. and Peillon, M. 1972. Durée de l'immunité conférée par la vaccination anti-aphteuse du porc. Bull. Off. Int. Epizoot. 77: 1100

De Leeuw, P.W., Tiessink, J.W.A. and Frenkel, S. 1979. Vaccination of pigs with formaldehyde inactivated aluminium hydroxide foot-and-mouth disease vaccines, potentiated with diethylaminoethyldextran (DEAE-D). Zentralbl. Veterinarmed. Reithe B 26: 85

Karber, G. 1931. Archive experimental pathology. Pharmak. 162: 480

Mackowiak, C., Lang. R., Fontaine, J., Camand, R. and Petermann, H.G. 1962. Relation entre titer d'anticops neutralisants et protection des animaux après vaccination anti-aphteuse. Ann. Inst. Pasteur 103: 252

Martin, W.B. and Chapman, W.G. 1960. The tissue cultre colour test for assaying the virus and neutralising antibody of foot-and-mouth disease and its application to the measurement of immunity in cattle. Res. Vet. Sci. 2: 53

Sellers. R.F. 1955. Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures. Nature 176: 547

Sutmöller. P. and Vieira, A. 1980. The relationship of neutralising antibody titers for foot-and-mouthdisease virus and the protection of cattle. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aphtosa 57: 39-40

Van Bekkum, J.G. 1959. Neutraliserende Antistoffen in Sera van tegen Mond and Klauwzeer geënte Runderen. Thesis, University of Utrecht:

Van Bekkum, J.G. 1970. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD virus. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, FAO. Brescia, 1969: 38

The Relationship of Neutralizing Antibody Titers and Percent Protection after Vaccination with Foot and Mouth Disease Vaccine in Cattle and Pigs

Nopporn Patanaprasith[1] Somkiat Petchwanichkul[1] Wilai Linchongsubongkoch[1]

Abstract

Sera from 801 cattle and 508 pigs vaccinated against Foot and Mouth Disease virus types O, A and Asia1 were tested by serum neutralization test. The antibody titers were compared with percent protection against challenge.

In cattle, neutralizing antibody titer giving 100% protection for types O, A and Asia1 were 1.83, 1.79 and 2.16, respectively. The correlation coefficients between the neutralizing antibody titer and % protection for types O, A and Asia1 were 0.96, 0.97 and 0.96, respectively.

In pigs, neutralizing antibody titer giving 100% protection for types O, A and Asia1 were 1.89, 1.74 and 1.41, respectively. The correlation coefficients between the neutralizing antibody titer and % protection for types O, A and Asia1 were 0.91, 0.95 and 0.94, respectively.

Key words : Foot and Mouth Disease Vaccine, Neutralizing Antibody, % Protection, Cattle, Pigs

---

[1]Foot and Mouth Disease Center, Veterinary Biologics Division,
Department of Livestocks Development, Pakchong, Nakhonratchasima, 30130.

ศึกษาระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรคในโคและสุกรภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีลิควิดเฟส บล็อคกิ้ง อีไลซ่า

วิไล ลินจงสุบงกช อนุโรจน์ ภู่ศิริมงคล สมเกียรติ เพชรวานิชกุล ร่มพฤกษ์ อุดล

บทคัดย่อ

ศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) จากซีรัมระยะ 3 สัปดาห์ ภายหลังการฉีดวัคซีนโคจำนวน 130 ตัว และสุกรจำนวน 125 ตัว ซึ่งผ่านการทดสอบ potency test แล้ว พบว่ามีความคุ้มโรคภายหลังการฉีดพิษทับด้วย challenge virus ที่ระดับความรุนแรง 10,000 ID_{50} สำหรับการทดสอบวัคซีนชนิดเอเควียสในโคและระดับความรุนแรง 100 ID_{50} สำหรับวัคซีนชนิดน้ำมันในสุกร โดยสังเกตจากสัตว์ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีวิการที่ปากและเท้าภายใน 1 สัปดาห์หลังจากได้รับการฉีดพิษทับ ในโคระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอและเอเชียวัน เท่ากับ 1.982± 0.611 (1:96), 2.332±0.464 (1:214) และ 2.00 ± 0.514 (1:100) ตามลำดับ ในสุกร ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.925 ± 0.545 (1:84), 1.950 ± 0.491 (1:90) และ 1.861 ± 0.588 (1:72) ตามลำดับ

คำสำคัญ : วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ระดับความคุ้มโรค แอลพีอีไลซ่าไตเตอร์

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ มีหน้าที่รับผิดชอบในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรและโค-กระบือ การทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนด้วยวิธี potency test โดยใช้สัตว์ทดลองเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพตามหลักเกณฑ์และได้มาตรฐานของ European Pharmacopoeia (1985) ซึ่งขั้นตอนการตรวจสอบ potency test ของ finish product ที่ได้จากการฉีดพิษทับด้วย challenge virus ในระดับความรุนแรง 10,000 ID_{50} สำหรับวัคซีนชนิดเอเควียสในโค และระดับความรุนแรง 100 ID_{50} สำหรับการทดสอบวัคซีนชนิดน้ำมันในสุกร วัคซีนที่ผ่านการตรวจสอบจะต้องมีค่า potency test มากกว่า $3PD_{50}$ สำหรับวัคซีนโค-กระบือ และมีค่าความคุ้มโรคมากกว่า 60% สำหรับวัคซีนสุกร นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบระดับแอนติบอดีในโคและสุกรที่ใช้ทดสอบคุณภาพวัคซีนทั้งระยะก่อนฉีดวัคซีนและระยะ 3 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนหรือก่อนฉีดพิษทับ การศึกษาถึงระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีในระดับที่สามารถให้ความคุ้มโรคได้นั้นเป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประโยชน์ในการวางแผนการการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Serum neutralization (SN) test เป็นวิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดี โดยใช้ tissue culture ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย ให้ความจำเพาะและความไวสูง (Van Bekkum,1959) ปัจจุบันได้มีการนำวิธี liquid phase blocking ELISA (Hamblin et al.,1986 ; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมสัตว์ภายหลังการฉีดวัคซีน ซึ่งเป็นการตรวจสอบวิธีหนึ่งที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศหรือ Office International des Epizooties (OIE Manual, 1996)) กำหนดให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบทางแอนติบอดีของโรคปากและเท้าเปื่อย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือ

1. ตรวจสอบระดับแอนติบอดีจากซีรัมโค และสุกร ระยะ 3 สัปดาห์ภายหลังฉีดวัคซีนชนิดไตรวาเลนท์ (โอ เอ และเอเชียวัน) ด้วยวิธี LP ELISA
2. ศึกษาแอนติบอดีในระดับที่สามารถให้ความคุ้มโรคในโคและสุกรที่ใช้ทดสอบ potency test ภายหลังการฉีดพิษทับ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างซีรัม

เจาะเลือดและเก็บซีรัมจากโคและสุกร ที่ใช้ทดสอบ potency test ในระยะ 3 สัปดาห์

หลังฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์ จำนวนทั้งสิ้น 255 ตัวอย่าง (โค = 130 สุกร = 125)

2. เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O/Udornthani/87, A/Nakhonpathom/87, และ Asia1/Petchburi/85 ซึ่งใช้เป็น seed vaccine strain นำมาผ่านบน BHK-21 เซลล์ จำนวน 7 - 9 passage ตรวจหาระดับความรุนแรงของไวรัสโดยวิธี antigen titration โดยใช้หลักการคำนวณของ Hamblin et al. (1986) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA

3. Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

ตรวจระดับแอนติบอดี แบบ duplicate–well two fold dilution series โดย coat rabbit anti O , A, และ Asia 1 ลงบน solid phase ใน ELISA plate ของแต่ละไทป์ ใช้ 0.05 M. Carbonate-bicarbonate buffer เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C แยกเตรียม virus-serum mixture ใน U-shape plate โดยเจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution และเตรียมปริมาณไวรัสที่มีความเข้มข้นคงที่ เมื่ออ่านค่า 50% ของ OD_{max} ที่ 450 nm. มีค่า = 1.5 โดยใช้ phosphate buffer saline tween-20 (PBST) เป็น diluent จากนั้นเติมไวรัสและซีรัมในปริมาตรเท่ากัน คือ 50 ไมโครลิตร ขณะเดียวกันเตรียม virus control และ strong positive, weak positive และ negative control serum ในแต่ plate นำไปเขย่าค้างคืนในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C จากนั้น transfer mixture ของ virus-serum ลงบน plate ที่ coat ไว้แล้ว นำไป incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม guinea-pig anti O, A และ Asia1 (ซึ่ง block ด้วย normal bovine serum) เขย่าที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นเติม conjugate (anti GP IgG-HRP Conjugate) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ทำการเติม substrate ที่มีส่วนผสมของ 0.01% tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้ H_2O_2 เป็นตัว catalyst ปล่อยไว้ในอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ 450 nm. โดยใช้เครื่องอ่าน Labsystem Multiskan MS นำค่า OD ของแต่ละ dilution มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดี ซึ่งได้จากการคำนวณค่า dilution ของซีรัมที่อยู่ระหว่างค่า 50% ของ OD_{max} และมีค่าอยู่ระหว่าง 1.0-1.5 ตามวิธีการของ Hamblin et al. (1986)

4. การอ่านผลความคุ้มโรคภายหลังฉีดพิษทับ

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโคและสุกร เป็นชนิดไตรวาเลนท์ คือไทป์โอ เอ และเอเซียวัน การอ่านผลความคุ้มโรคในการศึกษาครั้งนี้โดยหลังจากฉีดพิษทับในโคและสุกรหลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 3 สัปดาห์และทำการฉีดพิษทับที่ระดับความรุนแรง 10,000 ID_{50} ในโค และระดับ

ความรุนแรง 100 ID_{50}ในสุกร สังเกตอาการภายใน 1 สัปดาห์ โคและสุกรที่ไม่แสดงอาการป่วยและไม่เกิดวิการที่ปากและเท้ายกเว้นบริเวณที่จุดฉีด แสดงว่ามีความคุ้มโรค ดังนั้นข้อมูลที่นำมาใช้วิเคราะห์หาระดับแอนติบอดีครั้งนี้จะคัดเลือกเฉพาะโคและสุกรที่ให้ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนด้วยขนาดโด๊สปกติ ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้จริงในพื้นที่

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจสอบซีรัมโครระยะ 3 สัปดาห์ภายหลังฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์

ระดับแอนติบอดีที่สามารถให้ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์ ระยะ 3 สัปดาห์ ตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยที่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.982 ± 0.611 (1:96), 2.332± 0.464 (1:214) และ 2.00 ±0.514 (1:100) ตามลำดับ ดังแสดงใน table 1 และ figure 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

2. ผลการตรวจสอบซีรัมสุกรระยะ 3 สัปดาห์ภายหลังการฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์

ระดับแอนติบอดีที่สามารถให้ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์ ระยะ 3 สัปดาห์ ตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยที่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.925±0.545 (1:84), 1.950±0.491 (1:90) และ 1.861±0.588 (1:72) ตามลำดับ ดังแสดงใน table 1 และ figure 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

Table 1. The mean of protective antibody level in cattle and pigs which were determined by LP ELISA at 3 weeks post vaccination.

Source of serum	Number of sample	Mean of antibody titer post vaccination with FMDV (Log_{10})		
		O	A	Asia1
Cattle*	130	1.982 ± 0.611 (1:96) n = 32	2.332 ± 0.464 (1:214) n = 49	2.00 ± 0.514 (1:100) n = 49
Pig*	125	1.925 ± 0.545 (1:84) n = 34	1.95 ± 0.491 (1:90) n = 31	1.861 ± 0.588 (1:72) n = 60

* = Sera were taken from protected animals after direct challenge

Figure 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เป็นการแสดงผลการกระจายของระดับแอนติบอดี หรือ LP ELISA titer ของโคและสุกรแต่ละตัวและค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีที่สามารถให้ความคุ้มโรคได้ภายหลังการฉีดพิษทับ โดยตรวจดูอาการและไม่มีวิการเกิดขึ้นภายในเวลา 1 สัปดาห์

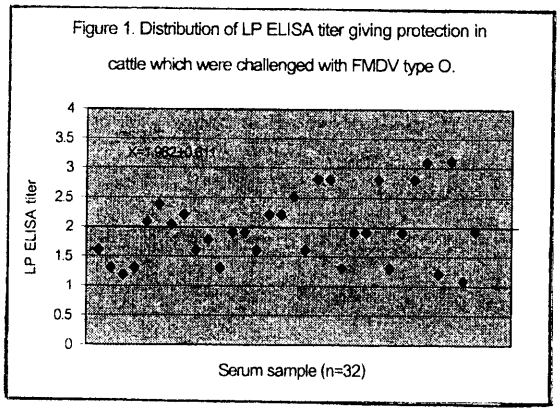


Figure 1. Distribution of LP ELISA titer giving protection in cattle which were challenged with FMDV type O.

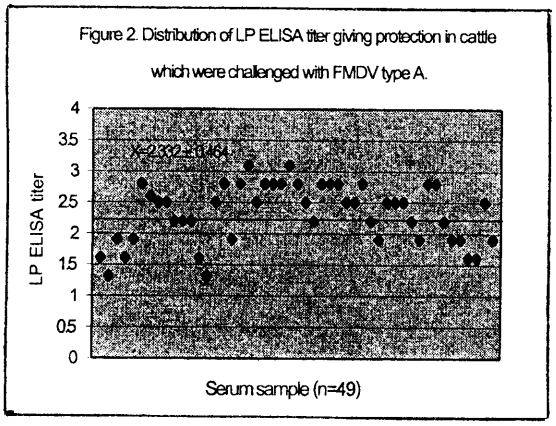


Figure 2. Distribution of LP ELISA titer giving protection in cattle which were challenged with FMDV type A.

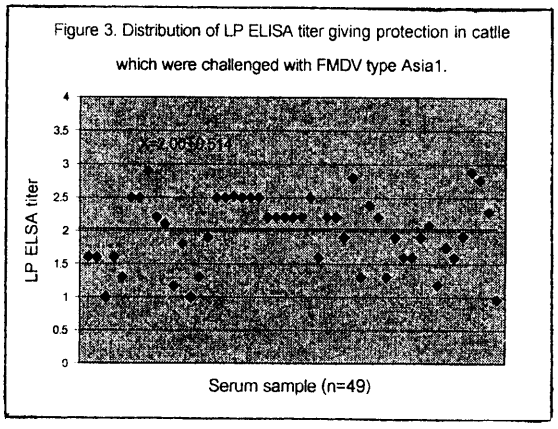


Figure 3. Distribution of LP ELISA titer giving protection in catlle which were challenged with FMDV type Asia1.

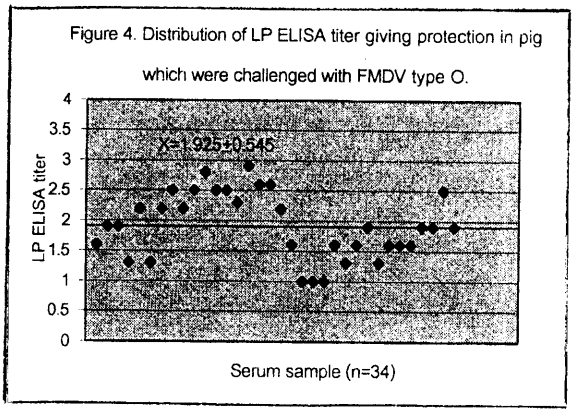


Figure 4. Distribution of LP ELISA titer giving protection in pig which were challenged with FMDV type O.

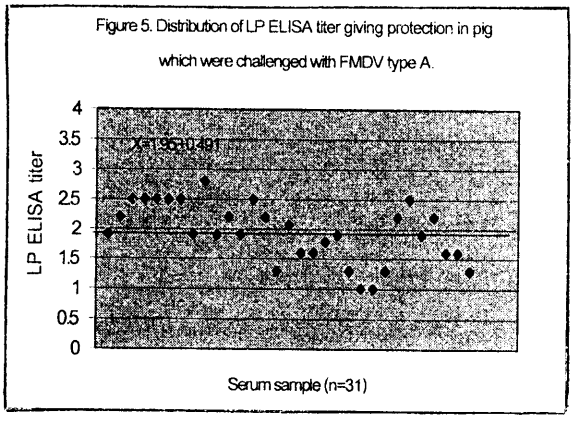


Figure 5. Distribution of LP ELISA titer giving protection in pig which were challenged with FMDV type A.

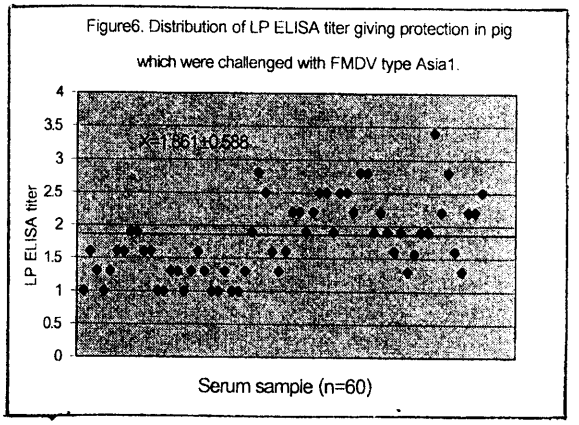


Figure6. Distribution of LP ELISA titer giving protection in pig which were challenged with FMDV type Asia1.

X = Arithmetic mean of protective antibody titer measured by LP ELISA

± = Sample standard deviation

วิจารณ์

การศึกษาระดับแอนติบอดีที่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมโคและสุกร ระยะ 3 สัปดาห์หลังการฉีดวัคซีนไตรวาเลนท์ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี LP ELISA ในโคทดสอบ potency test จำนวน 130 ตัว พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยที่สามารถให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวันเท่ากับ 1.982 ± 0.611 (1:96), 2.332 ± 0.464 (1:214) และ 2.00 ± 0.514 (1:100) ตามลำดับ ในสุกรทดสอบ potency test จำนวน 125 ตัว เท่ากับ 1.925 ± 0.545 (1:84), 1.95 ± 0.491 (1:90) และ 1.861± 0.585 (1:72) ตามลำดับ ดังแสดงใน table 1 หากมองในภาพรวมค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีทั้ง 3 ไทป์ในโคจะต้องไม่ต่ำกว่า1:96 และในสุกรจะต้องไม่ต่ำกว่า 1:72 จึงจะให้ความคุ้มโรคได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการการทดลองของ Hamblin et al. (1987) และ World Reference Laboratory (unpublished paper) ในการหาระดับแอนติบอดีที่สามารถให้ความคุ้มโรคในโค มีค่าเท่ากับ 1: 100 และการทดลองของ Maanen and Terpstra (1989) พบว่าระดับแอนติบอดีในสุกรที่สามารถให้ความคุ้มโรคมีค่าไม่ต่ำกว่า 1:52 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ค่าเฉลี่ยสูงกว่าเล็กน้อยซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกัน เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA เป็นวิธีที่ให้ความไวสูงและในกรณีนี้ได้ค่าความเบี่ยงเบนค่อนข้างกว้าง และการตรวจสอบซีรัมโคและสุกรในระยะ 3 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนจะเป็นระยะที่สัตว์จะสร้างแอนติบอดีได้สูงสุดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Van Bekkum (1959) และ Sutmoller and Vieira (1980) พบว่าระดับแอนติบอดีระยะ 3-4 สัปดาห์ภายหลังฉีดวัคซีน จะให้ค่าระดับแอนติบอดีสูงสุดและสูงพอที่ให้ความคุ้มโรคได้เมื่อทำการฉีดพิษทับ ในทำนองเดียวกันจาก figure 1 - 6 เป็นการแสดงผลการกระจายค่า LP ELISA titer ของไทป์โอ เอ และเอเชียวันของโคและสุกรแต่ละตัวที่ไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบวิการภายหลังฉีดพิษทับ กรณีโคและสุกรที่พบวิการหรือแสดงอาการป่วยจะไม่นำค่า LP ELISA titer มาทำการวิเคราะห์ จะเห็นว่าสัตว์บางตัวมีระดับแอนติบอดีต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของแต่ละไทป์แต่สัตว์เหล่านั้นยังสามารถให้ความคุ้มโรคได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสัตว์บางตัวมีความต้านทานโรคสูงจึงไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบวิการเมื่อได้รับการฉีดพิษทับ การสร้างระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ในพื้นที่ภายหลังการฉีดวัคซีนจะมีระดับแอนติบอดีสูงหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างประกอบกันได้แก่ สุขภาพสัตว์ อายุสัตว์ จำนวนครั้งของการฉีดวัคซีนและประสิทธิภาพวัคซีนเป็นต้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่เพื่อประโยชน์ในการกำหนดแผนการฉีดวัคซีนได้อย่างมั่นใจ ถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพื่อลดความสูญเสียและประหยัดงบประมาณค่าใช้จ่ายในการฉีดวัคซีนในพื้นที่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย นายสัตวแพทย์นพพร พัฒนประสิทธิ์ นายยงยุทธ ชูรัตน์ นางสาวกฤตยา สุนทร และนางสาวศรัญญา แพงตะคุ ที่ให้ความร่วมมือและให้ความอนุเคราะห์ในการอ่านผล potency test ในสัตว์ทดลองและตรวจสอบซีรัม

เอกสารอ้างอิง

European Pharmacopoeia. 1985. Second edition. Published under the direction of the council of Europe (partial agreement). p 63

OIE Manaul of standard for diagnostic tests and vaccines. 1996 . Chapter 2.1.1. Foot and Mouth Disease . p 47-56.

Hamblin,C., Barnett,I.T.R and Crowther,J.R. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. II. Application. J. Immunol. Methods. 93 : 123-129

Hamblin,C., Kitching,R.P., Donaldson, A.I., Crowther, J.R. and Barnett,I.T.R. 1987. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. Epidem. Inf. 99 : 733-744

Linchongsubongkoch, W and Janukij,T. 1994 . Detection of antibody titer to FMDV by liquid phase ELISA. Proceedings on an Annual Seminar of Veterinary Biologics Division. 63-72

Sutmoller, P. and Vieira, A. 1980. The relationship of neutralizing antibody titers for foot and mouth disease virus and the protection of cattle. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aphtosa. 57 : 39-40

Van Bekkum, J.G. 1959. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD virus. Report of the meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for Control of Foot and Mouth Disease. Brescia, Italy.FAO. 38-40

Van Maanen,C and Terpstra, C. 1989. Comparison of a liquid phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency test of foot and mouth disease vaccines. J. of Immunol. Methods. 124 : 111-119

Study of Protective Antibody Titer in Cattle and Pigs after Vaccination with Foot and Mouth Disease Vaccine by Liquid Phase Blocking ELISA

Wilai Linchongsubongkoch Anuroj Phusirimongkol
Somkiat Petchwanichkul Romphruke Udon

Abstract

The antibody titer against foot and mouth disease virus (FMDV) type O, A and Asia1 in sera of 130 cattle and 125 pigs at 3 weeks post vaccination in vaccine potency test were studied by liquid phase blocking ELISA (LP ELISA). These animals were protected after direct challenge with 10,000 ID_{50} of FMD homologous virus in cattle and 100 ID_{50} in pig. The protective level were defined as no presenting of clinical sign and localized lesion at the mouth and feet in experimental challenge animals. In cattle, the mean of protective antibody titer to FMDV type O, A and Asia1 were 1.982± 0.611 (1:96) , 2.332± 0.464 (1:214) and 2.00 ± 0.514 (1:100) respectively. In pig, the mean of protective antibody titer to FMDV type O, A and Asia1 were 1.925±0.545 (1:84), 1.950±0.491 (1:90) and 1.861± 0.588 (1:72) respectively.

Key words : Foot and Mouth Disease Vaccine, protective level, LP ELISA titer

---

[1]Foot and Mouth Disease Center, Veterinary Biologics Division,
Department of Livestocks Development, Pakchong, Nakhonratchasima, 30130.

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาค และปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์

นริศ ว่องวัฒนากูล* สินสมุทร นิลฉวี* สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ*

บทคัดย่อ

หาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาค (phase inversion temperature, PIT) ของสารทำอีมัลชั่นและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยแปรผันเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของ Montanide 80 ตั้งแต่ 2.0 – 9.0% w/v เมื่อใช้ Eumulgin M8 ปริมาณ 4% w/v พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของ Montanide 80 ใช้ได้ตั้งแต่ 4.0 – 7.2% w/v และแปรผกผันกับอุณหภูมิกลับวัตภาคซึ่งมีค่าตั้งแต่ 25°ซ - 8°ซ และให้อีมัลชั่นที่มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 ปี

คำสำคัญ : อุณหภูมิกลับวัตภาค สารทำอีมัลชั่น วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกร

* ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ. ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทนำ

ปี พ.ศ. 2533 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้เริ่มผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ ที่มีคุณลักษณะเป็นอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ที่ 4°ซ ด้วยเทคนิคการกลับวัตภาค (phase inversion technique) ที่ให้อีมัลชั่นคงตัวดี (พิมพร, 2534) โดยเตรียมวัตภาคน้ำ (aqueous phase) และวัตภาคน้ำมัน (oily phase) ที่ต้องมีสารทำอีมัลชั่นชนิดไม่มีประจุ (non-ionic) กลุ่ม polyoxyethylene ละลายรวมอยู่ด้วย อุณหภูมิขณะผสมต้อง สูงกว่าอุณหภูมิกลับวัตภาค (phase inversion temperature, PIT) หลังจากผสมแล้ว ในขั้นแรก จะได้อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) ที่มีความหนืดสูง เมื่อทำให้อีมัลชั่นเย็นลงจนถึง 4°ซ อุณหภูมิที่อีมัลชั่นนั้นกลับวัตภาคจนเปลี่ยนเป็นชนิดน้ำมันในน้ำในขั้นสุดท้าย ให้เรียกอุณหภูมิกลับวัตภาค หรือ hydrophilic - lipophilic balance (HLB) temperature ของสารทำอีมัลชั่นในอีมัลชั่นนั้น ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่คุณสมบัติในการชอบน้ำและชอบน้ำมันของสารทำอีมัลชั่นมีความสมดุลย์กัน (นวลจิรา, 2527; พิมพร, 2534)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคกับความคงตัวของอีมัลชั่นวัคซีนที่เกิดจากการใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ Montanide 80 ร่วมกับ Eumulgin M8 4% w/v (นริศ, 2541) มีประโยชน์ในการคาดคะเนความคงตัวของอีมัลชั่นในระหว่างการผลิตวัคซีน และนำไปสู่การศึกษาการลดอุณหภูมิผสมวัคซีนให้ต่ำลง เพื่อลดการสูญเสียปริมาณแอนติเจนในวัตภาคน้ำ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม sample batch vaccine

1. **วัตภาคน้ำ** ประกอบด้วย chloroformed Van Bekkum medium และ antigen (inactivated concentrated FMD virus) ตามมาตรฐานศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 36 ตัวอย่าง ๆ ละ 400 ซีซี

2. **วัตภาคน้ำมัน** ประกอบด้วย mineral oil[a] และสารทำอีมัลชั่นที่เป็นสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด ได้แก่ชนิดที่มี HLB number ต่ำ คือ Montanide 80[b] (Mannide monooleate) (Seppic, 1987a) ใช้ 2.0 – 9.0% w/v และชนิดที่มี HLB number สูง คือ Eumulgin M8[c] (Oleyl cetyl alcohol with 7 – 8 molecule ethylene oxide) (Henkel, 1997) ใช้ 4% w/v เป็นสารกลุ่ม polyoxyethylene ที่มีผลให้เกิด PIT ได้ เมื่อรวมกันนำไป autoclave แล้ว ปั่นทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ

[a]Exxon, France. [b]ICI, America. [c]Henkel, Germany

ห้องด้วย Magnetic stirrer จำนวน 36 ตัวอย่าง ๆ ละ 400 ซีซี

3. **การผสมวัคซีน** สองวัตภาคใช้อัตราส่วนเท่ากัน ปรับอุณหภูมิให้เท่ากันที่ 25°ซ โดยขณะที่ปั่นวัตภาคน้ำมันด้วย homogenizer[d] ให้ถ่ายเทวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันอย่างช้า ๆ จนหมด ปั่นต่อไปให้ครบ 4 นาที ในขั้นแรกจะได้อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน ที่ 25°ซ แบ่งอีมัลชั่นวัคซีนเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำมาหาอุณหภูมิกลับวัตภาค ส่วนที่สองนำเข้าห้องเย็น 4°ซ จนอีมัลชั่นมีอุณหภูมิ 4°ซ แล้ว จึงนำมาหาชนิดของอีมัลชั่น

การทดสอบอีมัลชั่น

Dilution test (**การทดสอบการกระจายตัวในน้ำ**)

1.ส่วนที่หนึ่ง เพื่อหาอุณหภูมิกลับวัตภาค

ใช้อีมัลชั่นชนิด w/o ที่ 25°ซ 4 ซีซี ใส่หลอดทดลอง 12/13 มม. ขนาด 6.5 ซีซี จุ่มเทอร์โมมิเตอร์แบบปรอทที่มีขีดบอกระดับอุณหภูมิ 0 – 100°ซ ลงในอีมัลชั่นให้ขีดระดับ 0°ซ อยู่เหนืออีมัลชั่นเพื่อให้ดูอุณหภูมิได้ง่าย จุ่มหลอดทดลองลงใน beaker ที่ใส่น้ำและเติมน้ำแข็งลงไป ขณะที่อุณหภูมิอีมัลชั่นลดลงทุก 0.5°ซ หยดอีมัลชั่นจากความสูงไม่เกิน 1 นิ้วเหนือผิวน้ำในอีก beaker หนึ่ง ถ้าจับตัวเป็นหยดน้ำมันลอยอยู่ แสดงว่าเป็นชนิด w/o ถ้ากระจายตัวละลายในน้ำเป็นสีน้ำนม แสดงว่าเป็นชนิด o/w แสดงว่าเกิดการกลับวัตภาคแล้ว บันทึกอุณหภูมิไว้

2.ส่วนที่สอง เพื่อหาชนิดของอีมัลชั่น

ใช้อีมัลชั่นที่อุณหภูมิเก็บรักษา 4°ซ หยดจากความสูงไม่เกิน 1 นิ้ว เหนือผิวน้ำ ถ้าจับตัวเป็นหยดน้ำมัน แสดงว่าเป็นชนิด w/o ถ้ากระจายตัวละลายในน้ำเป็นสีน้ำนม แสดงว่าเป็นชนิด o/w

Centrifugation test (**การปั่น**) **ที่ 4°ซ**

(Mekercher,1986; Bahnemann and Mesquita,1987)

โดยปั่นวัคซีน 1,400 x g นาน 30 นาที ดูการแยกชั้นด้วยตาเปล่า อีมัลชั่นต้องไม่แยกชั้น ควรเป็นเนื้อเดียวกัน

---

[d]Ultra Turrax T50, IKA-LABORTECHNIK, Germany

ผลการทดลอง

จากการทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ จำนวน 36 ตัวอย่าง Vaccine No. 1 ถึง 10 ซึ่งใช้ Montanide 80 2.0 – 3.8% w/v ไม่เกิดอีมัลชั่น Vaccine No. 11 ถึง 27 ซึ่งใช้ Montanide 80 4.0 – 7.2% w/v ให้อีมัลชั่นชนิด o/w ทำ Centrifugation Test แล้ว พบว่าไม่แยกชั้น ได้อีมัลชั่นวัคซีนที่ตรงตามวัตถุประสงค์ Vaccine No. 28 ถึง 36 ซึ่งใช้ Montanide 80 7.4 – 9.0% w/v ให้อีมัลชั่นชนิด w/o ที่ไม่ตรงตามวัตถุประสงค์ นั่นคือ ปริมาณที่เหมาะสมของ Montanide 80 ใช้ได้ตั้งแต่ 4.0 – 7.2% w/v ร่วมกับ Eumulgin M8 4% w/v อุณหภูมิกลับวัตภาคเกิดได้ตั้งแต่ 25°ซ - 8°ซ ให้ความคงตัวของอีมัลชั่นได้ไม่น้อยกว่า 1 ปี โดยไม่แยกชั้น (Table 1 และ Figure 1)

วิจารณ์

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชนิดของอีมัลชั่นในการผลิตอีมัลชั่นคือ ชนิดของสารทำอีมัลชั่นที่ละลายดีในวัตภาคใดวัตภาคนั้นจะเป็นวัตภาคภายนอก (Rieger, 1986) อัตราส่วนโดยปริมาตรของสองวัตภาค และลำดับการผสมที่มักเติมของเหลวที่จะเป็นวัตภาคภายในลงไปในของเหลวอีกชนิด (Rieger, 1986) (พิมพร, 2534)

การใช้ตัวทำอีมัลชั่นหลายชนิดร่วมกันจะเป็นการเพิ่มความคงตัวให้กับอีมัลชั่น เพราะจะสร้าง film ที่หนาแน่นและแข็งแรง โดยเกิดจากการเกิดสารเชิงซ้อน หรือการเรียงตัวของโมเลกุลอย่างใกล้ชิดที่ผิวประจัน โดยอาจจะเป็นสารลดแรงตึงผิวทั้งคู่ [ชนิดไม่มีประจุ มักใช้ชนิดที่ชอบน้ำ (HLB สูง) โดยเฉพาะกลุ่ม polyoxyethylene และชนิดที่ชอบน้ำมัน (HLB ต่ำ) ร่วมกัน] หรืออาจใช้ตัวช่วยทำอีมัลชั่นร่วมกับตัวทำอีมัลชั่นก็ได้ (Fox, 1974 ; Lin, 1975)

จากผลการทดลองใช้ Eumulgin M8 ปริมาณ 4% w/v ร่วมกับการแปรผันปริมาณที่เหมาะสมของ Montanide 80 ตั้งแต่ 4.0 – 7.2% w/v พบว่าขณะที่ใช้ Montanide 80 ปริมาณสูงขึ้น PIT จะลดต่ำลง หรือใช้ Montanide 80 ปริมาณลดลง PIT จะเพิ่มสูงขึ้น (Figure 1) เนื่องจาก Eumulgin M8 ที่เป็นสารกลุ่ม polyoxyethylene ที่มีผลทำให้เกิดการกลับวัตภาคนั้นถูกทำให้ละลายในวัตภาคน้ำมันก่อน เมื่อผสมวัคซีนแล้วจึงได้อีมัลชั่นชนิด w/o เพราะ Eumulgin M8 ยังละลายในวัตภาคน้ำได้น้อย แต่ละลายในวัตภาคน้ำมันได้มากกว่า แต่เมื่อทำให้อุณหภูมิของอีมัลชั่น w/o ลดลงมาจนถึงจุดที่ Eumulgin M8 ละลายในวัตภาคน้ำได้มากขึ้น แต่ละลายในวัตภาคน้ำมันได้ลดลง อีมัลชั่นจะกลับวัตภาคกลายเป็นชนิด o/w ในขั้นสุดท้าย ซึ่งจะให้ขนาด

หยดน้ำมันเล็กมาก และคงตัวมากกว่าการเติมน้ำมันลงในน้ำแต่แรก (Lin, 1975) และอุณหภูมิจุดนั้นทำให้สารทำอีมัลชั่นมีคุณสมบัติในการชอบน้ำและชอบน้ำมันมีความสมดุลย์กัน หมายความว่าอุณหภูมิมีผลต่อการละลายของ Eumulgin M8 ในภาวะที่ใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ Montanide 80 แต่ไม่มีผลในภาวะที่ Montanide 80 มีปริมาณสูงเกินความสมดุลย์ การเก็บ รักษาอีมัลชั่นแบบนี้ ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า PIT จะทำให้อีมัลชั่นคงตัว เพราะสารทำอีมัลชั่นยังคงละลายน้ำได้ดี (Eccleston, 1986)

เมื่อทราบค่า PIT ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่คุณสมบัติในการชอบน้ำและชอบน้ำมันของสารทำอีมัลชั่นมีความสมดุลย์กัน (HLB temperature) จะทำนาย HLB number ได้ และทราบว่าอีมัลชั่นจะอยู่ในสถานะแบบใด ดังนั้นในการผลิต industrial batch ควรระวังในการเลือก surfactant ratio ที่ใช้ Montanide 80 ปริมาณสูงเกินไป เพราะพบว่า ถ้า PIT มีค่าต่ำลง HLB number จะต่ำลงด้วย อีมัลชั่นเกิดความหนืดมากเกินไปจนไม่สามารถกลับวัตภาคได้ หรือถ้าใช้ปริมาณต่ำเกินไป PIT มีค่าสูงขึ้น HLB number จะมีค่าสูงขึ้นด้วย อีมัลชั่นจะหนืดน้อยลง และถ้าอุณหภูมิสูงกว่า PIT จะเหลวจนแยกชั้นได้ surfactant ratio ในการทดลองนี้ ทำให้ค่า PIT อยู่ระหว่าง 25^{o}ซ - 8^{o}ซ และศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้เลือกใช้ที่ 17^{o}ซ เพื่อให้ประหยัดและเกิดประโยชน์สูงสุด

สรุป

ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ ปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในช่วง 4.0 – 7.2% w/v มีความสัมพันธ์ชนิดแปรผกผันกับ PIT และทำให้เกิดการกลับวัตภาคตั้งแต่ 25^{o}ซ - 8^{o}ซ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ

เอกสารอ้างอิง

นริศ ว่องวัฒนากูล และสินสมุทร นิลฉวี 2541 การคัดเลือกปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิว (MONTANIDE 80) ในอีมัลชั่นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดรวม 3 ไทป์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง นครราชสีมา วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2541 หน้า 17-27

นวลจิรา อนุสสรนิติสาร 2527 เภสัชกรรมเทคโนโลยีของยาน้ำกระจายตัวและยากึ่งแข็ง ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กราฟิคอาร์ท กทม หน้า 50–125

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ 2534 อีมัลชั่นทางเครื่องสำอางค์ (cosmetic emulsion) ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 1-71

Bahnemann, H.G. and Mesquita, J.A. 1987. Oil adjuvant vaccine against Foot and Mouth Disease (Pan American FMD Center, Pan American Health Organization, Caixa, Postal 589 20001, Rio De Janeiro, Brasil) Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 53 : 25-30

Eccleston G.M. 1986. Application of emulsion stability theories to mobile and semi-solid o/w emulsion. Cosmetic + Toiletries ; 101(11), 73-92

Fox, C 1974. Cosmetic Emulsions. In : Emulsion and emulsion technology, Part 2. Surfactant Science Series, Vol 6. Lissant, K.J. ed., New York, Marcel Dekker.

Henkel Thai.Ltd.1997. Eumulgin M8. June 1997. p 1

Lin T.J., Kurihara H., Ohta H. 1975. Effect of phase inversion and surfactant location on the formation of o/w emulsion. J. Soc. Cosmetic Chem ; 26(3), 121 - 139

Mekercher,P.D. 1986. Oil adjuvants : Their use in veterinary biologics. In : Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics. The Iowa State University Press. p 1-6

Rieger M.M., 1986. Emulsions. In : "The theory and practice of industrial pharmacy." 3rd ed., Lachman L. Lieberman, H.A. and Kanig, J. L. eds., Philadelphia, Lea and Febiger.

Seppic. 1987a. Division Cosmetique - Phamacie, Paris Cedex 07, France. Montanide 80, Monograph,Toxicity and Uses. Vac.14, June 1987. p 1-4

Table 1 : Phase inversion temperature and characteristics of the emulsion using various concentration of Montanide 80 (4.0 – 7.2% w/v) and Eumulgin M8 at 4% w/v in swine trivalent Foot and Mouth disease oil emulsion vaccine.

Vaccine No.	Montanide 80 % w/v	Phase Inversion Temperature (^{o}C)	Emulsion Characteristics	
			Type of Emulsion at 4^{o}C	Stability
1	2.0	No	No Emulsion Formed	Separation
2	2.2	No	No Emulsion Formed	Separation
3	2.4	No	No Emulsion Formed	Separation
4	2.6	No	No Emulsion Formed	Separation
5	2.8	No	No Emulsion Formed	Separation
6	3.0	No	No Emulsion Formed	Separation
7	3.2	No	No Emulsion Formed	Separation
8	3.4	No	No Emulsion Formed	Separation
9	3.6	No	No Emulsion Formed	Separation
10	3.8	No	No Emulsion Formed	Separation
11	4.0	25	O/W	No Separation
12	4.2	24.5	O/W	No Separation
13	4.4	24	O/W	No Separation
14	4.6	24	O/W	No Separation
15	4.8	24	O/W	No Separation
16	5.0	23.5	O/W	No Separation
17	5.2	23.5	O/W	No Separation
18	5.4	22.5	O/W	No Separation

Table 1 (Continued)

Vaccine No.	Montanide 80 % w/v	Phase Inversion Temperature (^{o}C)	Emulsion Characteristics	
			Type of Emulsion at 4^{o}C	Stability
19	5.6	21	O/W	No Separation
20	5.8	19	O/W	No Separation
21	6.0	18	O/W	No Separation
22	6.2	17	O/W	No Separation
23	6.4	15	O/W	No Separation
24	6.6	12	O/W	No Separation
25	6.8	9	O/W	No Separation
26	7.0	8	O/W	No Separation
27	7.2	8	O/W	No Separation
28	7.4	No	W/O	No Separation
29	7.6	No	W/O	No Separation
30	7.8	No	W/O	No Separation
31	8.0	No	W/O	No Separation
32	8.2	No	W/O	No Separation
33	8.4	No	W/O	No Separation
34	8.6	No	W/O	No Separation
35	8.8	No	W/O	No Separation
36	9.0	No	W/O	No Separation

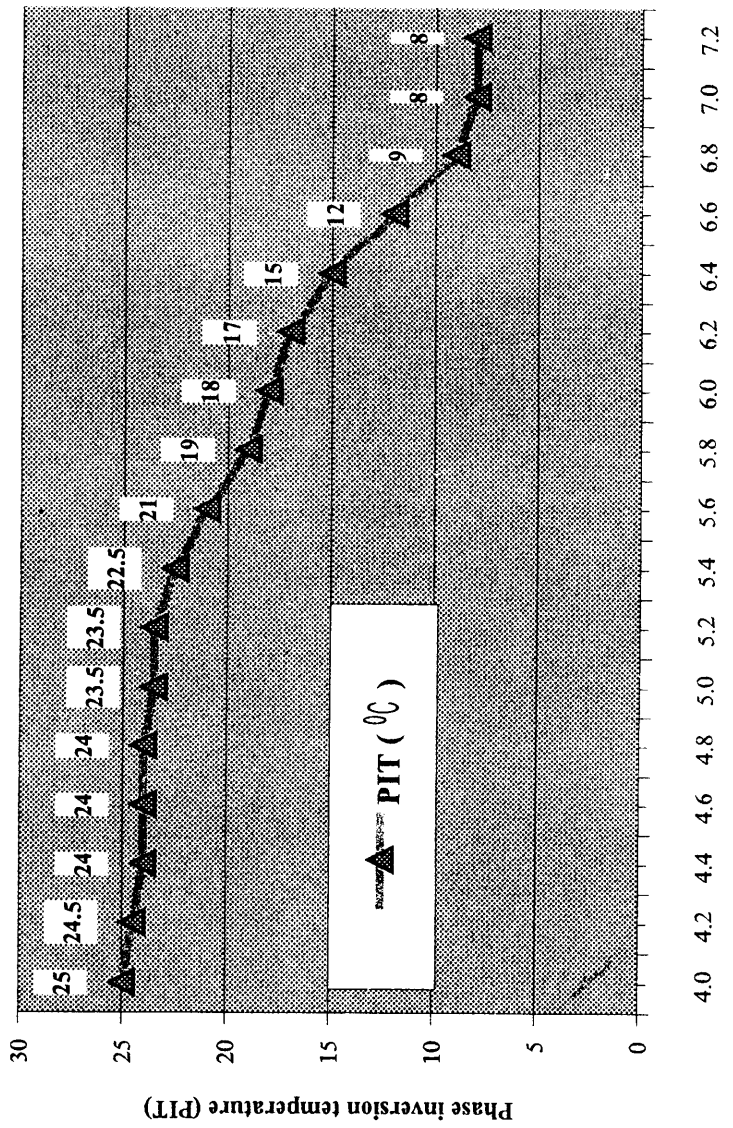


Figure 1 : Relation between phase inversion temperature and various concentrations of Montanide 80 (4.0 - 7.2% w/v) in swine trivalent Foot and Mouth Disease oil emulsion vaccine production.

Relation between Phase Inversion Temperature and Various Concentrations of Montanide 80 in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine Production

Narit Wongwattanakul* Sinsamoot Nilchavee* Sahawatchara Ungvanijban*

Abstract

The relation between phase inversion temperature (PIT) and Montanide 80 concentrations in swine trivalent Foot and Mouth Disease oil emulsion vaccine production was carried out by varying the percentage of Montanide 80 ranged from 2.0 – 9.0% w/v where as Eumulgin M8 was 4% w/v. It was found that the optimum range of Montanide 80 were 4.0 – 7.2% w/v and varied inversely with PIT at the range of 25°C - 8°C. The emulsion were stable at least 1 year.

Key words : Phase Inversion Temperature, Emulsifier, Swine FMD Vaccine

* Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130.

การทดสอบหาอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกร ชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation

ไชยา สง่าประโคน*
นพพร พัฒนประสิทธิ์*

บทคัดย่อ

นำวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation มาทดสอบหาอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ พบว่า จากการทดสอบซ้ำ จำนวน 30 ครั้ง ในวัคซีน 1 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบความถูกต้องทางเทคนิค มี %Coefficient of Variations (CVs) เท่ากับ 4.0578% (%CVs ที่ยอมรับ <10%)

การทดสอบในวัคซีนตัวอย่าง จำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ 146S มีค่าระหว่าง 3.39-5.43 μg/ml, ค่าเฉลี่ย 4.12 μg/ml, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ± 0.6630, %Coefficient of Variations(CVs) เท่ากับ 16.0922% ซึ่งคิดเป็น %Detection = 69.05% เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ 146S ในวัคซีนกับก่อนการผสมเป็นวัคซีน ในขณะที่วัคซีนปลอม จำนวน 2 ตัวอย่าง ไม่พบ 146S antigen

คำสำคัญ : ซูโครส เด็นซิตี้เกรเดี้ยน อัลตร้าเซนตริฟิวเกชั่น อนุภาค 146S วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สุกร

---

* งานทดสอบคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อที่สำคัญมากสำหรับสัตว์กีบคู่ ก่อให้เกิดการสูญเสียทั้งสุขภาพสัตว์และทางเศรษฐกิจให้แก่ผู้เลี้ยงหรือประเทศที่เกิดปัญหาเป็นอย่างมาก ดังเช่นหลายประเทศในยุโรป ที่เกิดการระบาดเมื่อต้นปี พ.ศ.2544 ทำให้ต้องมีการทำลายสัตว์เป็นจำนวนหลายล้านตัว สำหรับการขจัดปัญหาของโรคดังกล่าวนอกจากการทำลายสัตว์แล้ว ยังสามารถป้องกันได้โดยการฉีดวัคซีนให้สัตว์ สำหรับประเทศไทยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ ซึ่งทำการผลิตวัคซีน 2 ชนิด คือ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำ(เอเควียส) เป็นวัคซีนสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมันสำหรับสุกร ซึ่งความต้องการใช้วัคซีนในประเทศโดยเฉพาะวัคซีนสุกรสูงกว่ากำลังการผลิต จึงพบว่ามีการปลอมวัคซีนออกมาจำหน่ายในท้องที่ เช่นระหว่างปี พ.ศ. 2542-2543 ทำให้ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยต้องทำการพิสูจน์ เพื่อแยกความแตกต่างของวัคซีนปลอมจากวัคซีนที่ผลิตโดยศูนย์ฯ ซึ่งการพิสูจน์มีหลายวิธี เช่น การละลายของหยดวัคซีน(Dilution test), การทดสอบการนำไฟฟ้า(Conductivity test), การย้อมสีแบคทีเรีย(Gram's stain), หรือการดูที่ฉลากและภาชนะบรรจุ เป็นต้น แต่ยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมในการพิสูจน์หาแอนติเจนในวัคซีนชนิดน้ำมัน

ขณะที่ศูนย์ฯ มีการใช้วิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation (Bartelling et al.,1974; Doel et al., 1982; Doel et al., 1985; Shirai et al., 1990; พิสมัย และคณะ, 2535 ; มนตรี และ เชาวฤทธิ์, 2535) ในการตรวจหาปริมาณ 146S antigen ซึ่งเป็นอนุภาคของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์ได้ เป็นมาตรฐานในการกำหนดปริมาณแอนติเจนที่จะใส่ในวัคซีนชนิดน้ำและในวัตภาคน้ำของวัคซีนชนิดน้ำมันก่อนการผสมกับวัตภาคน้ำมันให้กลายเป็นวัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ โดยวิธีใช้อุณหภูมิกลับวัตภาค(Phase Inversion Technique) (นริศ และ สินสมุทร, 2541) แต่ยังไม่ทราบว่าปริมาณ 146S antigen หลังผสมเป็นวัคซีนแล้วว่าคงเหลืออยู่ปริมาณเท่าใด สำหรับวัคซีนชนิดน้ำ เคยมีการทดลอง Elute เอาไวรัสแอนติเจนออกมาจากอะลูมิเนียม ไฮดรอกไซด์ เยล แล้วนำไปหาปริมาณของไวรัสแอนติเจน พบว่าสามารถสกัดไวรัสออกมาได้เพียง 30% เท่านั้น (สุนีจิต, 2529)

ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือ เพื่อนำเอาวิธีการ Sucrose density gradient ultracentrifugation มาทดลองใช้ในการหาปริมาณ 146S antigen ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ เปรียบเทียบกับปริมาณ 146S antigen ที่ใส่เข้าไปในวัตภาคน้ำก่อนการผสมวัคซีน เพื่อหามาตรฐานการ

ทดสอบแอนติเจนในวัคซีนชนิดน้ำมัน และทดสอบเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างวัคซีนของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยและวัคซีนปลอมจากท้องที่

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ประกอบด้วยส่วนวัตภาคน้ำ(aqueous phase) ที่มีแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (inactivated concentrated FMD virus) ไทป์ 0, A และ Asia 1 รวม 3 ไทป์ และ Chloroformed Van Bekkum medium (ทำการเก็บตัวอย่าง ทดสอบหาปริมาณ 146S) ผสมกับส่วนของวัตภาคน้ำมัน(oily phase) ที่ประกอบด้วย Mineral oil และสารลดแรงตึงผิว(emulsifier) 2 ชนิด ปรับอุณหภูมิทั้ง 2 วัตภาคให้เท่ากัน(25°C) ใช้ปริมาณที่เท่ากัน โดยค่อยๆเทวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันอย่างช้าๆ ขณะที่ปั่น จนวัตภาคน้ำหมด จะได้วัคซีนอิมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (Water in Oil, W/O) และทำให้เย็นลงที่ 4 °C จะได้วัคซีนอิมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ(Oil in Water, O/W) โดยวัคซีนจะทำตามมาตรฐานของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 21 ตัวอย่างๆ ละ 150 มิลลิลิตร

2.วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน(วัคซีนปลอม) จำนวน 2 ตัวอย่าง (เป็นวัคซีนที่คณะกรรมการตรวจสอบข้อเท็จจริงเก็บมาพิสูจน์ จากอำเภอบัวใหญ่ จ. นครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2543)

3. เครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวส์

3.1 Beckman L7-55R Ultracentrifugator, Beckman Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model SW 41

3.2 Beckman L8-60M Ultracentrifugator, Beckman Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model SW 40

3.3 Centrikon T-2180 Ultracentrifugator, Kontron Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model TST 41.14

4. เครื่องวัดค่า 146S ประกอบด้วยเครื่อง UV monitor ของ LKB-Spectrometer model 2138-uvicords, เครื่องบันทึกแบบ 2 ช่องของ LKB-2 channels recorder model 2210 และ Peristaltic pump ของ Gilson model Minipuls 3

วิธีการ

การหาปริมาณแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (146S particles) โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation

เขย่าขวดวัคซีนก่อนนำไปทดสอบ ใช้วัคซีนปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่บน Sucrose gradient ที่มีความเข้มข้น 15-45% ในหลอดเซนตริฟิวส์(Ultraclear™) ที่มีขนาด 9/16 x 3 ½ นิ้ว ปริมาตรความจุ 13.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องอุลตร้าเซนตริฟิวส์ด้วยแรง Relative Centrifugal Force (RCF) ที่ r_{max} ประมาณ 222,200xg ($RCF = 1.12r_{max}(RPM/1000)^2$) เป็นเวลา 3½ ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำ Fraction collection โดยใช้แรงดันของเครื่อง Peristaltic pump ในอัตรา 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผ่าน flow cell ที่มี path length 3 มิลลิเมตรของเครื่อง UV monitor ที่ใช้ wave length 254 nm. , Paper speed 0.2 มิลลิเมตรต่อวินาที, UV Spectrometer sensitivity 0.1 (ABS range) และ recording amplification 100 mV. แล้วคำนวณหาปริมาณ 146S จากขนาดของ peak ที่ได้เทียบกับเส้นกร๊าฟมาตรฐาน (มนตรี และ เชาวฤทธิ์, 2535)

1.การตรวจสอบซ้ำ(Repeatability)เพื่อความถูกต้องของเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณ 146S

ใช้วัคซีนจำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาปริมาณแอนติเจน 146S ตามวิธีการในข้างต้น โดยทำซ้ำจำนวน 30 ครั้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD), เปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (%Coefficient of Variations(CVs)=(SD value/Mean value)x100) (Doel et al., 1985) เพื่อทดสอบว่าเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบได้ (%CVs < 10%)

2. การทดสอบหาปริมาณแอนติเจน 146S ในวัคซีนตัวอย่าง

ใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ ที่เตรียมไว้จำนวน 21 ตัวอย่าง และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยปลอม จำนวน 2 ตัวอย่างไปทดสอบหาปริมาณแอนติเจน 146S ตามวิธีการข้างต้น

2.1 เปรียบเทียบปริมาณแอนติเจนไวรัสในวัคซีน ก่อนการผสมและหลังผสมกับวัตภาคน้ำมันเป็นวัคซีนแล้ว เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแอนติเจน 146S โดยการทำซ้ำตัวอย่างละ 10 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยแต่ละชุดวัคซีน, ค่าเฉลี่ยรวมและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), %Coefficient of Variations(CVs)

2.2 ทดสอบหาปริมาณแอนติเจนของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยปลอม

2.3 เปรียบเทียบลักษณะของ 146S peak ที่ได้จากวัคซีนที่ผลิตจากศูนย์โรคปาก-และเท้าเปื่อยจริง, วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยปลอม กับตัวอย่างไวรัสที่ได้ในกระบวนการผลิตแอนติเจนไวรัส(Purified inactivated FMD virus)

ผลการทดลอง

1.การตรวจสอบซ้ำ (Repeatability) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค พบว่ามีค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.10 μg/ml, ค่าสูงสุดเท่ากับ 3.50 μg/ml, ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.30 μg/ml, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ± 0.1339, %Coefficient of Variations(CVs) เท่ากับ 4.0578% (Figure 1)

2.การทดสอบหาปริมาณ 146S ในวัคซีน : แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

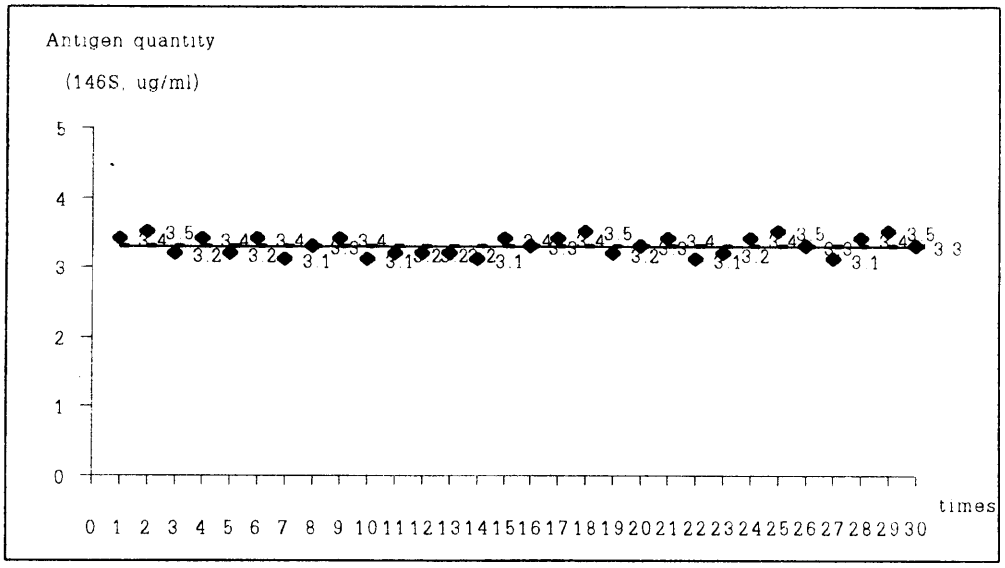
2.1 ปริมาณ 146S ในตัวอย่างวัคซีน จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยทำการตรวจสอบ 2 ขั้นตอน ดังนี้ คือ

2.1.1 วัตภาคน้ำก่อนที่จะผสมเป็นวัคซีน พบว่า มีปริมาณ 146S อยู่ระหว่าง 5.65 – 6.45μg/ml ,ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.98 μg/ml , ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ± 0.2562, %Coefficient of Variations(CVs) เท่ากับ 4.2843%

2.1.2 วัตภาคน้ำที่นำไปผสมกับวัตภาคน้ำมันเป็นวัคซีน พบว่ามีปริมาณ 146S ระหว่าง 3.39 - 5.43μg/ml, ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.12μg/ml, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ± 0.6630, %Coefficient of Variations(CVs) เท่ากับ 16.0922% ซึ่งคิดเป็น %Detection ของแอนติเจนที่ทดสอบได้หลังจากผสมกับวัตภาคน้ำมันแล้ว อยู่ระหว่าง 52.97- 96.11%, ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.05%, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ± 12.0786, %Coefficient of Variations(CVs) เท่ากับ 17.4925% (Table 1)

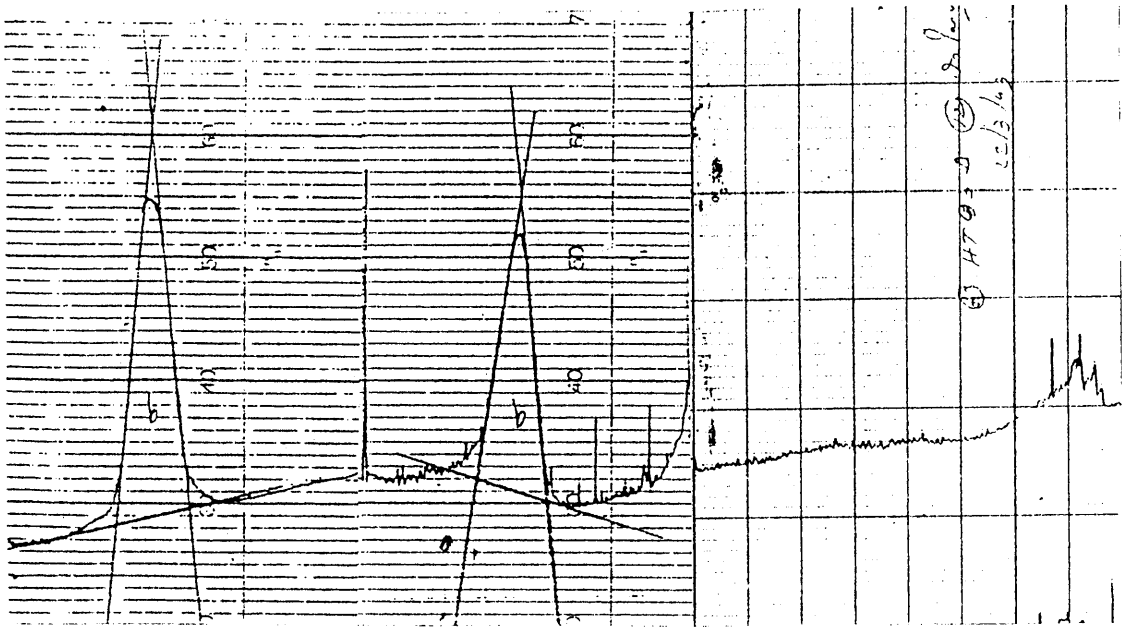
2.2 วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกรปลอม จำนวน 2 ตัวอย่าง จากท้องที่ ที่เก็บมาพิสูจน์เมื่อนำไปทดสอบพบว่า ตรวจไม่พบแอนติเจน 146S

2.3 ลักษณะของกราฟ 146S peak ที่ได้จากการทดสอบระหว่างแอนติเจนไวรัสที่ผลิตจากงานผลิตไวรัส (Inactivated virus) (Figure 2-A) และวัคซีนที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย พบว่ามีลักษณะที่เหมือนกัน แต่ลักษณะของ 146S peak ของวัคซีนจะไม่เรียบ (smooth) เท่ากับ peak ของแอนติเจนไวรัส (Figure 2-B) ขณะที่วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกรปลอม จะไม่มี 146S peak (Figure 2-C)



Min. = 3.10 Max.= 3.50 Mean = 3.3 SD ± 0.1339 %CVs = 4.0578%

Figure 1 The antigen quantity (146S, μg/ml) in one sample of Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine within 30 replicates.



A B C

Figure 2 The 146S peak from the purified inactivated FMD virus(A), swine trivalent FMD oil emulsion vaccine(B) and an imitated swine trivalent FMD oil emulsion vaccine(C).

Table 1 The comparison of FMDV antigen quantity (146S, μg/ml) before and after vaccine formulation.

No.	antigen quantity(146S, μg/ml)		
	before formulation	after formulation	% Detection*
1.	5.75	3.57	62.09
2.	6.00	3.47	57.83
3.	5.80	3.46	59.66
4.	6.25	3.62	57.92
5.	5.90	3.42	57.97
6.	6.40	3.39	52.97
7.	5.90	5.42	91.86
8.	6.10	5.12	83.93
9.	6.40	4.71	73.59
10.	5.80	4.53	78.10
11.	5.80	3.59	61.90
12.	5.75	3.67	63.83
13.	5.65	5.43	96.11
14.	5.80	3.83	66.03
15.	6.45	3.89	60.31
16.	5.70	4.71	82.63
17.	5.90	4.44	75.25
18.	6.00	4.32	72.00
19.	6.40	3.83	59.84
20.	5.80	4.34	74.83
21.	6.00	3.68	61.33
Min.	5.65	3.39	52.97
Max.	6.45	5.43	96.11
Mean	5.98	4.12	69.05.
SD	± 0.2562	± 0.6630	± 12.0786
%CVs	± 4.2843	± 16.0922	± 17.4925

* = ((before formulation – after formulation) / Mean) x 100

วิจารณ์

จากการทดสอบในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำวัคซีน จำนวน 1 ตัวอย่าง ไปทำการทดสอบหาปริมาณแอนติเจน(อนุภาค 146S) โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation โดยการทดสอบซ้ำ(Repeatability) จำนวน 30 ครั้ง พบว่า มีเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของการกระจาย(% CVs) เท่ากับ $\pm$ 4.0578% ซึ่งค่าที่ยอมรับได้จากการทดสอบซ้ำ จะมีค่า %CVs ไม่เกิน 10% แสดงว่า การทดสอบโดยวิธีการนี้มีความถูกต้องทางเทคนิค สามารถนำไปทดสอบและยอมรับได้

ในการทดสอบหาปริมาณ 146S จากวัตภาคน้ำก่อนการผสมเป็นวัคซีนและวัตภาคน้ำที่นำไปผสมกับวัตภาคน้ำมันเป็นวัคซีนแล้ว พบว่า ในตัวอย่างจะตรวจพบปริมาณ 146S antigen ได้ลดลง และ %CVs ของตัวอย่างวัคซีนมีค่า เท่ากับ 16.0922% ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าที่ยอมรับได้ อาจเป็นไปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทดสอบในครั้งนี้ มีปัจจัยอยู่หลายประการ ได้แก่ 1) ปัจจัยจากตัววัคซีน ซึ่งเป็นวัคซีน Oil emulsion ทำให้การ centrifuge ไม่สามารถแยกแอนติเจนทั้งหมดออกจาก emulsion ได้ เพราะ interaction ซึ่งเกิด chemical bond ระหว่างไวรัสโปรตีนที่เป็น Amphoteric molecule ที่มี R-group เป็น non-polar ของวัตภาคน้ำ กับ non-polar properties ของวัตภาคน้ำมัน 2) เนื่องมาจากอนุภาค 146S แตกตัวเป็น 12S ในขณะที่มีการผสมระหว่างวัตภาคน้ำและวัตภาคน้ำมัน ที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เพื่อให้เปลี่ยนวัตภาคเป็นวัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ (นริศ และ สินสมุทร, 2541; Tsuda, 1984) 3) เนื่องจากความหนืดของวัคซีน (Viscosity) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดวัคซีน 4) คุณสมบัติของวิธีที่ใช้ในการทดสอบ โดยอาจจะเกิดจากการรบกวนการดูดกลืนของแสง(Absorbance)ของวัตภาคน้ำมันที่ยังคงปนมากับ 146S peak 5) ความจำเพาะของวิธีที่ใช้ในการทดสอบ ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแอนติเจนกับโปรตีนอื่นๆ ที่มีค่า Swedburg Unit ที่เท่ากันได้

วิธีการทดสอบหาปริมาณ 146S โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation นี้ สามารถใช้ในการตรวจพิสูจน์ระหว่างวัคซีนที่ผลิตจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยและวัคซีนปลอมในท้องที่ได้ เพราะวัคซีนปลอมจะตรวจไม่พบ 146S antigen จึงเป็นประโยชน์ทางด้าน Quality Assay แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทดสอบทาง Quantity Assay อันเนื่องมาจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น

สรุป

วิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation สามารถใช้ในการยืนยันเพื่อพิสูจน์ว่าวัคซีนปลอมไม่มี 146S antigen ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการผลิตวัคซีน แต่ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจหาปริมาณ 146S ที่แน่นอนในวัคซีนชนิดน้ำมันได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพนักงานและเจ้าหน้าที่งานทดสอบคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ทุกคนที่ได้มีส่วนร่วมในการทดลองในครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นริศ ว่องวัฒนากูล และ สินสมุทร นิลฉวี 2541 การคัดเลือกปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิว(Montanide 80)ในอิมัลชั่นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 8(1) : 17-27

พิสมัย เลียมจรัสกุล, เชิงชาย จันทรัศมี และ เฉลิมศักดิ์ พิธรัตน์ 2535 การปรับปรุงวิธีหาปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิ้ลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีซูโครสเดนซิตี้เกรเดี้ยน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 42-52

มนตรี มนต์ธุรพจน์ และ เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต 2535 การวัดหาปริมาณ 146-S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 31-41

สุนีจิต คงทน 2529 การสกัดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากอลูมิเนี่ยมไฮดรอกไซด์ในวัคซีน เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่ม 2 : หน้า 147-150

Bartelling, S.J. and Neloen, R.H. 1974. A Simple Method for Quantification 140S Particles of Foot and Mouth Disease Virus(FMDV).Arichiv fur die gesamte virusforschung. 45: p 362-364

Doel, T.R., Flettom, B.W. and Stepple, R.F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradients. Develop. Bio. Standard. 50: p 209-219

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

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 Analysis System. Jpn. J. Vet. Sci. 52(3): 621-630

Tsuda, T. 1984. Characteristics of FMDV. Report of Third Country Group Trainning Programne on Foot and Mouth Disease Control (Group Trainning Course). February 20-March 9. Bangkok, Thailand. p 123-128

Detection of 146S Particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine by Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation Method

Chaiya Sangaprakhon*
Nopporn Patanaprasith*

Abstract

The application of Sucrose density gradient ultracentrifugation method for detection of 146S particles of Foot and Mouth Disease Virus in Swine trivalent Foot and Mouth Disease oil emulsion vaccine was carried out. The repeatability of the test with 30 replicates of one sample gave %Coefficient of Variation(CVs) = 4.0578% (%Accepted CVs < 10%).

In 21 samples of vaccine,the amount of 146S antigen compared between before and after mixing with oily phase were ranged from 3.39 – 5.43 μg/ml, mean 4.12 μg/ml, the Standard Deviation (SD) ± 0.6630, %Coefficient of Variation (CVs) = 16.0922%, %Detection = 69.05%. While 2 samples of imitated vaccine could not detect 146S antigen.

Key words : Sucrose density gradient ultracentrifugation, 146 S particles
Foot and Mouth Disease Vaccine, Swine

---

* Vaccine Quality Control Section
Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ฉบับนี้ (ปีที่ 10 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2543) เป็นการรวบ 2 ฉบับรวมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับนักวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ว่าจะมีผลงานวิจัยหรืองานวิชาการที่ส่งมาเพื่อพิมพ์เผยแพร่มากน้อยเพียงใด ทำให้การพิมพ์เผยแพร่ต้องล่าช้าออกไปบ้าง แต่ก็ยังคงเนื้อหาสาระที่เป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้สนใจทั่วไป

ในฉบับนี้มีผลงานวิจัยที่น่าสนใจ จำนวน 6 เรื่อง ซึ่งเป็นผลงานทางด้านโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด ประกอบด้วยการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK-21 C-13 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูปและมีเดียมที่เตรียมขึ้น, การเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยด้วยมีเดียมผงสำเร็จรูป ในระดับอุตสาหกรรม ความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดี้และเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร การศึกษาระดับแอนติบอดี้ที่ให้ความคุ้มโรคในโคและสุกรภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีลิควิดเฟสบล็อคกิ้งอีไลซ่า ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ และการทดสอบหาอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation ซึ่งคาดว่าผลงานดังกล่าวจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ผลิตวัคซีน ผู้ใช้วัคซีนรวมทั้งผู้สนใจทุกท่านและสมควรติดตามทุกเรื่อง

กองบรรณาธิการ