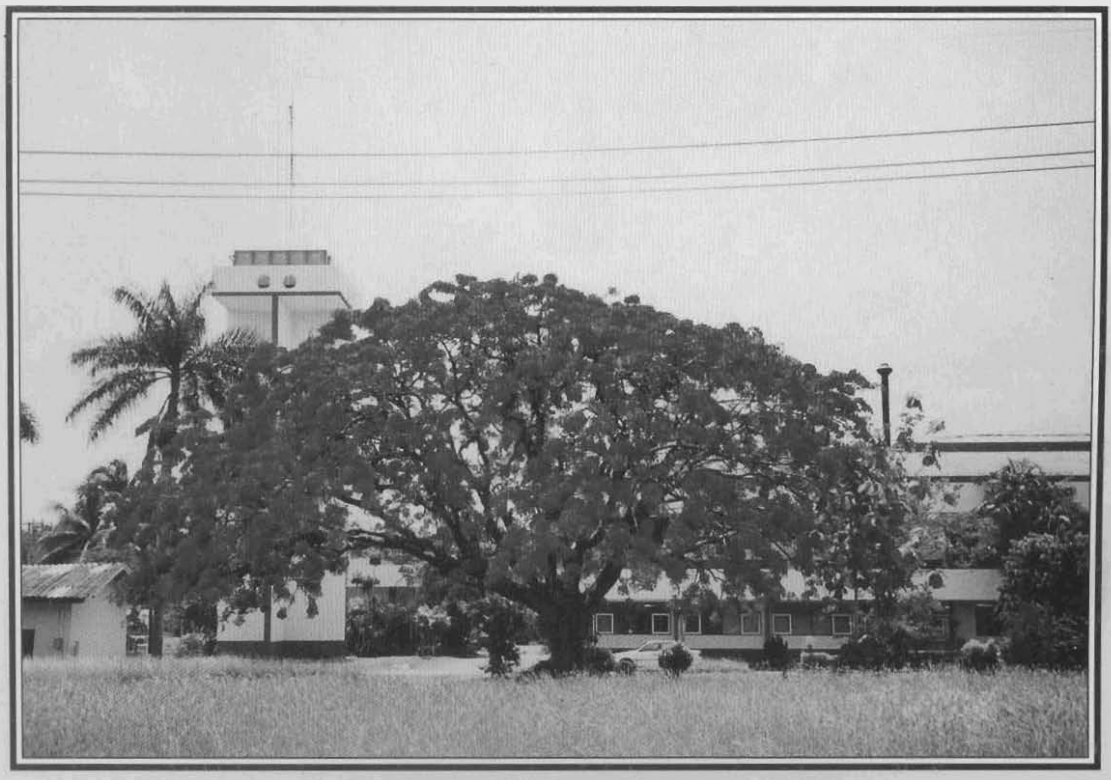
วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 11 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2544

The Journal of Veterinary Biologics Vol. 11 No. 1-2 September 2001



เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858 - 1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 11 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2544

สารบัญ

- **ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์** 9
  ไชยา สง่าประโคน กฤษดา ลิมปนานนท์
- **เปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ในการทำไวรัสเข้มข้น 25 เท่า และ 50 เท่า โดยเครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic** 19
  จาตุรนต์ พลราช รัชพล สืบพรหม
- **การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ** 27
  สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ จาตุรนต์ พลราช
- **การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี ระหว่างไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในประเทศไทยโดยวิธี ลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า** 37
  ร่มพฤกษ์ อุดล สมใจ กมลศิริพิชัยพร
- **เปรียบเทียบการใช้ บล็อค ไดลูเอ็น ชนิดต่าง ๆ ในการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ลิควิด เฟส บล๊อกกิ้ง อีไลซ่า** 45
  อนุโรจน์ ภู่ศิริมงคล ดิลก อ้วนพรมมา
  ปณิธาน ทองทา วิไล ลินจงสุบงกช
- กองบรรณาธิการ

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 11 No. 1-2 September 2001

Contents

- The Effect of Temperature on the amount of 146S particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine 9

  Chaiya Sangaprakhon Kritsada Limpananont

- Percent recovery of Foot and Mouth Disease Virus type O cultured in IFFA-3 cell after 25 and 50 times concentration process using Carbon-Ceramic Ultrafiltration 19

  Jaturon Polrach Rachapol Subprom

- The Growth of IFFA-3 Suspension Cell in Amino Acid and Vitamins Mixture 27

  Saipin Khumsab Surapon Khumsab Jaturon Polrach

- Serological Correlation between Field Isolates and Vaccine Strain of Foot and Mouth Disease Virus Type O in Thailand by Liquid Phase Neutralizing ELISA Test 37

  Romphruke Udon Somjai Kamolsiripichaiporn

- Comparison of Various Types of Blocked Diluent in Seromonitoring of FMDV by Liquid Phase Blocking ELISA 45

  Anuroj Phusirimongkol Dilok Aunpromma

  Panithan Thongtha Wilai Linchongsubongkoch

- Editorial board

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 11 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2544 Volume 11 No.1-2 September 2001

วัตถุประสงค์

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

ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2544 พิมพ์เผยแพร่ สิงหาคม 2545 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

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 พิมพ์บนกระดาษ 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 การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไขน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่าย 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

ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์

ไชยา สง่าประโคน
กฤษดา ลิมปนานนท์*

บทคัดย่อ

อุณหภูมิมีผลต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ จากการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation พบว่าการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 4°ซ, 15°ซ และ 20°ซ เป็นเวลา 35 วัน ปริมาณอนุภาค 146S ของวัคซีนเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนการเก็บ ขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 5, 14, 28 และ 35 วัน ปริมาณอนุภาค 146S ลดลงเฉลี่ย 11.93, 41.76, 58.24 และ 64.77% ตามลำดับ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ ที่ 37°ซ เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 14 วัน ปริมาณอนุภาค 146S ลดลงเฉลี่ย 44.41, 63.97, 68.16 และ 100% ตามลำดับ

คำสำคัญ: อุณหภูมิ อนุภาค 146S ซูโครสเด็นซิตี้เกรเดี้ยนอัลตร้าเซนตริฟิวเกชั่น วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์

---

*งานทดสอบคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อที่สำคัญสำหรับสัตว์กีบคู่ การขจัดโรคดังกล่าวนอกจากการทำลายสัตว์แล้วยังสามารถป้องกันได้โดยการฉีดวัคซีนให้สัตว์ โดยปกติการเก็บวัคซีนจะต้องเก็บที่อุณหภูมิที่แนะนำบนฉลากคือ 5 ± 3 องศาเซลเซียส เพื่อคงสภาพของวัคซีนให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคดีที่สุด แต่ในการนำไปใช้ในท้องที่ ที่ต้องมีการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งวัคซีนในขณะที่อุณหภูมิของอากาศร้อนและระยะทางไกลๆ ซึ่งอาจมีผลทำให้คุณภาพของวัคซีนเสื่อมลง

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ ที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ มีอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อโรคและในกระบวนการผลิตจำเป็นต้องปรับปริมาณอนุภาค 146S ก่อนผสมเป็นวัคซีน วิธีการหาปริมาณอนุภาค 146S มีหลายวิธี แต่นิยมใช้วิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation (Bartelling et al.,1974 ; Doel et al., 1982 ; Doel et al., 1985 ; Shirai et al., 1990 ; พิสมัย และ คณะ, 2535 ; มนตรี และ เชาวฤทธิ์, 2535)

จุดประสงค์ในการทดลองในครั้งนี้ เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกันในกรณีใช้วัคซีนไม่หมดขวด นำมาเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป ว่าปริมาณอนุภาค 146S มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนและเป็นประโยชน์สำหรับผู้ใช้วัคซีนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ ที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ จำนวน 2 ชุด ๆ ละ 30 ขวด คือ วัคซีนชุด HT 44 L และชุด HT 44 M
2. เครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวส์
   - 2.1 Beckman L7-55R Ultracentrifugator, Beckman Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model SW 41
   - 2.2 Beckman L8-60M Ultracentrifugator, Beckman Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model SW 40
   - 2.3 Centrikon T-2180 Ultracentrifugator, Kontron Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ Swing type model TST 41.14

3. 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

1. การเก็บวัคซีน

นำวัคซีนที่ต้องการทดสอบทั้ง 2 ชุด แต่ละชุดแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ, 15°ซ, 20°ซ, 25°ซ และ 37°ซ

2. การหาปริมาณอนุภาค 146S

- วัคซีนแต่ละชุด แต่ละอุณหภูมิ (6 ขวด/แต่ละอุณหภูมิ) หาค่าเฉลี่ยของปริมาณอนุภาค 146S ก่อนเก็บวัคซีน, หลังเก็บ 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 และ 35 วัน เมื่อนำวัคซีนออกมาทดสอบแต่ละครั้งแล้ว นำวัคซีนเก็บกลับที่อุณหภูมิเดิมเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของแต่ละอุณหภูมิที่ระยะเวลาต่างกัน ค่าเฉลี่ยในแต่ละอุณหภูมิและแต่ละชุดวัคซีน

- การหาอนุภาค 146S โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation โดยเขย่าวัคซีนก่อนนำไปทดสอบ ใช้วัคซีนปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่บน Sucrose gradient ที่มีความเข้มข้น 15-45% ในหลอดเซนตริฟิวส์(Ultraclear™) ที่มีขนาด 9/16 x 3*1/2* นิ้ว ปริมาตรความจุ 13.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวส์ด้วยแรง Relative Centrifugal Force(RCF) ที่ r_{Max} ประมาณ 222,200 x g (RCF = 1.12 r_{Max} (RPM/1000)^2) เป็นเวลา 3*1/2* ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำ Fraction collection โดยใช้แรงดันของเครื่อง Peristaltic pump ในอัตรา 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผ่าน flow cell ที่มี path length 3 mm. ของเครื่อง 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 ที่ได้เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (มนตรี และ เชาวฤทธิ์, 2535)

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของวัคซีนชุด HT 44 L และชุด HT 44 M เมื่อเก็บไว้ที่วันและอุณหภูมิต่างๆ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Amount of 146S Particles (μg/ml) in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine after storage at different temperature.

Days	Amount of 146S Particles (μg/ml)														
	4° C			15° C			20° C			25° C			37° C		
	No.1	No.2	Av.	No.1	No. 2	Av.	No.1	No. 2	Av.	No.1	No. 2	Av.	No.1	No. 2	Av.
0	3.65	3.43	3.54	3.65	3.50	3.58	3.68	3.56	3.62	3.58	3.45	3.52	3.60	3.55	3.58
1	3.55	3.36	3.46	3.63	3.46	3.55	3.60	3.48	3.54	3.50	3.37	3.44	2.20	1.78	1.99
3	3.60	3.34	3.47	3.60	3.40	3.50	3.68	3.50	3.59	3.22	3.32	3.27	1.85	1.70	1.78
5	3.52	3.32	3.42	3.60	3.43	3.52	3.55	3.43	3.49	3.17	3.03	3.10	1.30	1.27	1.29
7	3.50	3.43	3.47	3.63	3.40	3.52	3.70	3.45	3.58	2.50	2.88	2.69	1.26	1.20	1.23
10	3.55	3.32	3.44	3.67	3.45	3.56	3.62	3.44	3.53	2.25	2.82	2.54	1.17	1.10	1.14
14	3.58	3.35	3.47	3.63	3.44	3.54	3.63	3.50	3.57	1.98	2.20	2.09	0	0	0
21	3.46	3.38	3.42	3.60	3.44	3.52	3.52	3.53	3.53	1.82	2.10	1.96	0	0	0
28	3.53	3.43	3.48	3.63	3.46	3.55	3.55	3.53	3.54	1.53	1.40	1.47	0	0	0
35	3.50	3.30	3.40	3.55	3.40	3.48	3.50	3.50	3.50	1.40	1.07	1.24	0	0	0

No. 1 = Vaccine Batch No. HT 44 L

No. 2 = Vaccine Batch No. HT 44 M

Av. = Average

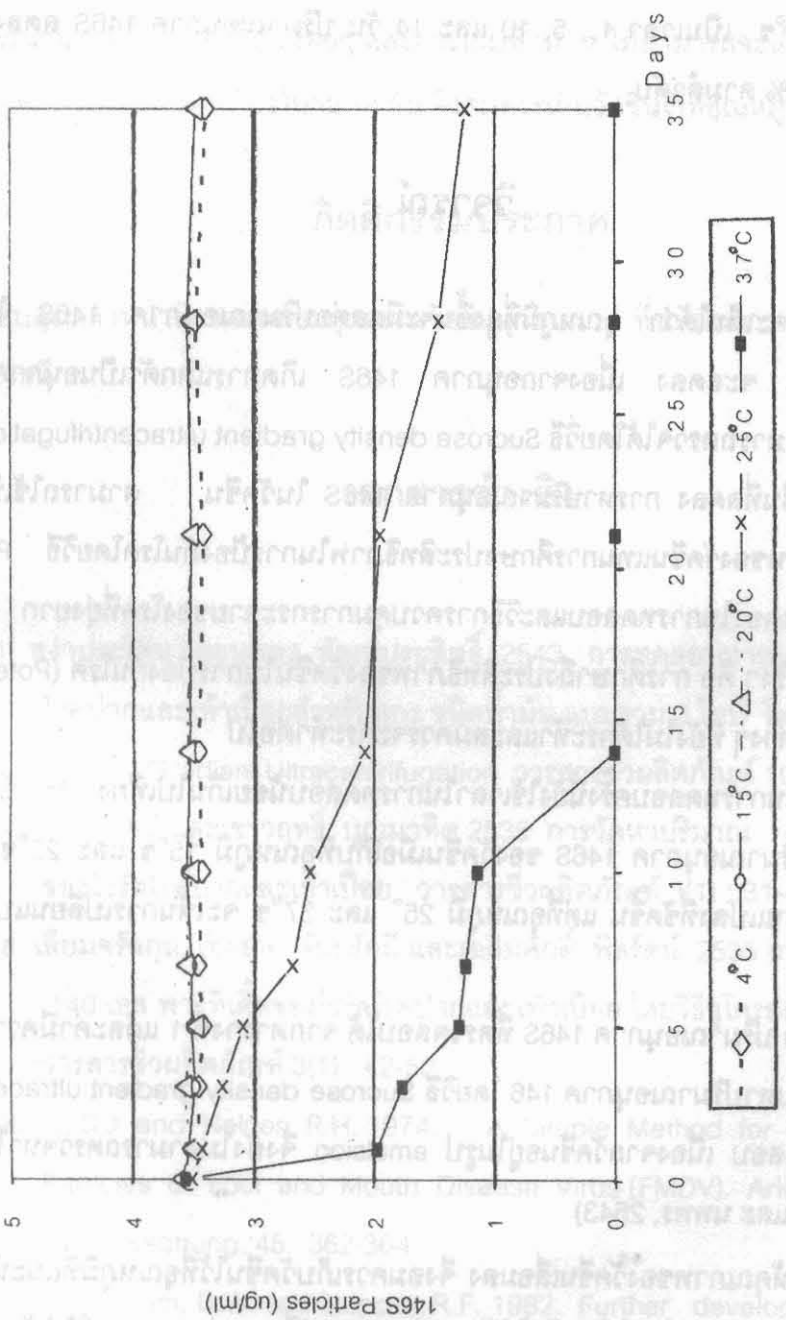


Figure 1 The effect of storing temperature on the amount of 146S particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine.

จะเห็นว่าทั้ง 2 ชุดวัคซีนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ปริมาณอนุภาค 146S ที่ตรวจพบจะมีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน โดยการเก็บที่ 4°ซ, 15°ซ และ 20°ซ เป็นเวลา 35 วัน ปริมาณอนุภาค 146S จะลดลงไปจากก่อนการเก็บเล็กน้อย และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ และ 37°ซ เป็นเวลา 35 วัน พบว่าปริมาณอนุภาค 146S ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Table 1 และ Figure 1) โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณอนุภาค 146S เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 5, 14, 28 และ 35 วัน ลดลงเฉลี่ย 11.93, 41.76, 58.24 และ 64.77% ตามลำดับ ขณะที่เก็บที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 14 วัน ปริมาณอนุภาค 146S ลดลงเฉลี่ย 44.41, 63.97, 68.16 และ 100% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะมีผลต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีน โดยปริมาณอนุภาค 146S จะลดลง เนื่องจากอนุภาค 146S เกิดการแตกตัวเป็นอนุภาคอื่นเช่น 12S (Tsuda,1984) ซึ่งไม่สามารถตรวจได้โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation และยังมีผลต่อความคุ้มโรคของวัคซีนที่ลดลง การหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีน สามารถใช้เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้คุณภาพของวัคซีนแทนการศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันโรคโดยวิธี Potency test ซึ่งจำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบและวิธีการควบคุมการกระจายของโรคที่ยุ่งยาก แต่สิ่งที่บอกถึงคุณภาพที่ดีของวัคซีนจริงๆ คือ การศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรค (Potency test) เมื่อเก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ยังไม่ได้กระทำและสมควรจะกระทำต่อไป

อย่างไรก็ตามในการทดสอบครั้งนี้ยังใช้เวลาในการทดสอบน้อยเกินไปเพียง 35 วัน ทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอนุภาค 146S ของวัคซีนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 15°ซ และ 20°ซ หากเวลามากกว่านี้อาจเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 25° และ 37°ซ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

เป็นที่สังเกตุว่า ปริมาณอนุภาค 146S ที่ตรวจสอบได้ จากตารางที่ 1 แต่ละค่ามีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย ซึ่งการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146 โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation นี้ยังมีข้อจำกัดในการทดสอบ เนื่องจากวัคซีนอยู่ในรูป emulsion จึงยังไม่สามารถตรวจหาได้ 100% จากปริมาณที่มีอยู่ (ไชยา และ นพพร, 2543)

ดังนั้นเพื่อไม่ให้คุณภาพของวัคซีนเสื่อมลง จึงสมควรเก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิที่แนะนำ (5 ± 3 °ซ) จะดีที่สุดหรือเมื่อเกิดปัญหาจะต้องให้วัคซีนได้รับผลจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้น้อยที่สุดและระยะเวลาสั้นที่สุด

สรุป

อุณหภูมิมีผลต่อการเก็บวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ, 15°ซ และ 20°ซ เป็นเวลา 35 วัน ปริมาณอนุภาค 146S จะลดลงไปจากก่อนการเก็บเล็กน้อย ขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ ปริมาณอนุภาค 146S จะลดลง โดยลดลงมากกว่า 40% หลังจากเก็บไว้นาน 14 วัน และลดลงเรื่อยๆ และการเก็บที่ 37°ซ ไม่สามารถจะเก็บวัคซีนไว้ได้โดยปริมาณอนุภาค 146S ลดลง 100% เมื่อเก็บไว้นาน 14 วัน จึงสมควรเก็บวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิที่แนะนำ(5 ± 3 °ซ)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานทดสอบคุณภาพวัคซีนทุกคน ที่ช่วยในการทดลองในครั้งนี้จนประสบความสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ไชยา สง่าประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์ 2543 การทดสอบหาอนุภาค 146 S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1- 2) : 61-71

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

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

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: 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 : 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. : 123-128.

The Effect of Temperature on the amount of 146S particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine

Chaiya Sangaprakhon*

Kritsada Limpananont*

Abstract

The temperature effected the amount of 146S particles in Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine. It was found that after storage the vaccine at 4°C, 15°C and 20°C for 35 days, the amount of 146S particles measured by sucrose density gradient ultracentrifugation method decreased a little when compared to those at pre-storage. After storing the vaccine at 25° C for 5, 14, 28 and 35 days, the average amount of 146S particles were 11.93, 41.76, 58.24 and 64.77% decrease, respectively; Whereas they were 44.41, 63.97, 68.16 and 100% decrease after storing the vaccine at 37°C for 1, 5, 10 and 14 days, respectively.

Keywords : Temperature, 146S particles, Sucrose density gradient ultracentrifugation, Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine

---

* Vaccine Quality Control Section

Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

เปอร์เซ็นต์ recovery ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ในการทำไวรัสเข้มข้น 25 เท่า และ 50 เท่า โดยเครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic

จาตุรนต์ พลราช[1] รัชพล สีบพรหม[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาเปอร์เซ็นต์ recovery ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 หลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้น ด้วยเครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic (CARBOCEP) จนมีความเข้มข้นเป็น 25 เท่า กับความเข้มข้น 50 เท่า พบว่าที่ความเข้มข้น 25 เท่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอมีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยของ 146S particle , ไวรัสแอนติเจน และ ปริมาณไวรัส 64.52% , 59.82% และ 25.24% ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 50 เท่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอมีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยของ 146S particle , ไวรัสแอนติเจน และ ปริมาณไวรัส 22.92% , 25.64% และ 11.51% ตามลำดับ แสดงว่าการทำให้น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 เข้มข้นที่ 25 เท่า จะได้เปอร์เซ็นต์ recovery ของไวรัสมากกว่าการทำให้เข้มข้นที่ 50 เท่า

คำสำคัญ : เปอร์เซ็นต์ recovery ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เซลล์ IFFA-3 คาร์บอน-เซรามิค อัลตร้าฟิลเตรชั่น

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดรวม 3 ไทป์ (Trivalent) จากไวรัสแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน ซึ่งผลิตจากเซลล์แขวนลอย (Makarasen and Sinsuwongwat, 1986) การเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์แขวนลอยจะทำให้ได้ไวรัสแอนติเจนในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็นในการผลิตวัคซีนให้มีปริมาณเพียงพอ

การผลิตไวรัสแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในปัจจุบันได้เพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์แขวนลอยชนิด IFFA-3 และ BHK ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster (Nardelli and Panina,1976) น้ำไวรัสที่ได้จะผ่านกระบวนการ clarify โดยการปั่นแยกกากเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นแยกกากเซลล์ต่อเนื่อง และกรองกากเซลล์ด้วยเครื่องกรอง glass fiber ชนิด cartridge fiber ขนาด 2.0 ไมครอน ยาว 30 นิ้ว (วราภิจ และประดิษฐ์, 2539) แล้วจึงนำน้ำไวรัสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยเครื่อง ultrafiltration ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้นอีกโดยกระบวนการใช้สารเคมี หลังจากนั้นจึงทำการ inactivate ไวรัส ด้วย Binary ethylenimine (BEI) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -198°C เพื่อใช้เป็นไวรัสแอนติเจนในการผลิตวัคซีนต่อไป

ในการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอให้เข้มข้น ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ใช้เครื่อง ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic (CARBOCEP) แทนเครื่อง Hollow Fiber และวิธีปัจจุบันใช้เครื่อง CARBOCEP ในการทำน้ำไวรัสให้เข้มข้น 50 เท่า ซึ่งเมื่อนำมาใช้ทำเข้มข้นน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์แขวนลอยชนิด IFFA-3 พบว่ามีการสูญเสียไวรัสมาก จนปริมาณไวรัสแอนติเจนไม่เพียงพอต่อการผลิตวัคซีน จึงมีแนวความคิดว่าควรจะลดการสูญเสียไวรัส โดยลดความเข้มข้นในกระบวนการทำน้ำไวรัสเข้มข้น และเพื่อความเหมาะสมกับขีดความสามารถของเครื่องมือ และความสะดวกในกระบวนการผลิตขั้นต่อไป จึงได้ลดความเข้มข้นของน้ำไวรัสลงเป็น 25 เท่า ดังนั้นการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการลดการสูญเสียไวรัสในกระบวนการทำน้ำไวรัสเข้มข้น โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ recovery ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์แขวนลอยชนิด IFFA-3 หลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Ultrafiltration ชนิด CARBOCEP จนมีความเข้มข้นเป็น 25 เท่า กับความเข้มข้นเป็น 50 เท่า โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ recovery ของ 146S particle ซึ่งเป็นอนุภาคที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Nardelli and Panina,1976) ไวรัสแอนติเจน และปริมาณไวรัส เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการผลิตไวรัสแอนติเจนให้ได้ปริมาณมากขึ้น

อุปกรณ์ และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic (CARBOCEP)[1] สำหรับทำไวรัสเข้มข้น
2. ถัง reservoir ขนาด 3,200 ลิตร
3. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอที่ได้จากการเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ปริมาตร 2,500 ลิตร ที่ผ่านการ Clarify แล้วด้วยเครื่องปั่นแยกกากเซลล์ต่อเนื่อง ROBATEL[2] และ เครื่องกรอง glass fiber ชนิด cartridge fiber ขนาด 2.0 ไมครอน

วิธีการ

1. การนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อเครื่อง CARBOCEP ถัง reservoir 3,200 ลิตร ท่อยางส่งและรับไวรัส ด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.1-1.5 กก./ซม^3. เป็นเวลา 1 ชม.

2. การทำน้ำไวรัสเข้มข้นด้วยเครื่อง CARBOCEP

ส่งไวรัสที่ผ่านการ clarify แล้ว ลงถัง 3,200 ลิตร เมื่อได้น้ำไวรัสประมาณ 500 ลิตร จึงเดินเครื่อง CARBOCEP โดยเดินเครื่อง feeder pump ก่อนเพื่อส่งน้ำไวรัสเข้าเครื่อง CARBOCEP เมื่อความดันเครื่อง CARBOCEP เพิ่มขึ้นเป็น 1.8 กก./ซม^3. แล้วทำการเดินเครื่อง Circulation pump พร้อมปรับอัตราการไหลของน้ำไวรัสเข้าเครื่องและควบคุมความดันในเครื่อง CARBOCEP ไม่เกิน 4 กก./ซม^3. ขณะเดียวกันก็ปรับอัตราการไหลออกของน้ำ filtrate ไม่ให้มากกว่าอัตราการไหลของน้ำไวรัสเข้าเครื่อง CARBOCEP ทำการ Circulate น้ำไวรัสระหว่างเครื่อง CARBOCEP และถัง reservoir 3,200 ลิตร ไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้นตามต้องการ โดยความเข้มข้นเป็น 25 เท่า ปริมาณของน้ำไวรัส 2,500 ลิตร ลดลงเหลือ 100 ลิตร และความเข้มข้นเป็น 50 เท่าปริมาณของน้ำไวรัส 2,500 ลิตร ลดลงเหลือ 50 ลิตร ปิดเครื่อง CARBOCEP และเก็บตัวอย่าง

3. การแบ่งกลุ่มการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัวอย่าง คือกลุ่มที่ทำน้ำไวรัสเข้มข้นเป็น 25 เท่า และกลุ่มที่ทำน้ำไวรัสเข้มข้นเป็น 50 เท่า เก็บตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ก่อนการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง CARBOCEP และหลังจากการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง CARBOCEP แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณ 146S particle (μg/ml) โดยวิธี Sucrose

---

[1] Carbon-Ceramic Ultrafiltration รุ่น 2s 151, Tech-sep , France

[2] ROBATEL, รุ่น CHV 1400, ROBATEL, France

density gradient (Nardelli and Panina, 1976) ปริมาณไวรัสแอนติเจน (CFU/ml) โดยวิธี Complement fixation test (สมศักดิ์, 2527) และ ปริมาณ virus infectivity ($TCID_{50}$/ml) โดยวิธี CPE method (microtechnique) (ราตรี, 2533)

ผลการทดลอง

จากการทดลองทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ให้เข้มข้นด้วยเครื่อง CARBOCEP จนมีความเข้มข้น เป็น 25 เท่า และ 50 เท่า เก็บตัวอย่างไปตรวจสอบหา 146S particle (μg/ml) , ปริมาณไวรัสแอนติเจน (CFU/ml) , ปริมาณ virus infectivity ($TCID_{50}$/ml) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย พบว่าที่ความเข้มข้น 25 เท่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ มีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย ของ 146S particle , ปริมาณแอนติเจน , ปริมาณไวรัส เท่ากับ 64.52%, 59.82% และ 25.24% ตามลำดับ ในขณะที่ ที่ความเข้มข้น 50 เท่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ มีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย ของ 146S particle , ปริมาณไวรัสแอนติเจน , ปริมาณ virus infectivity เท่ากับ 22.92%, 25.64%, 11.51% ตามลำดับ (Table 1)

วิจารณ์

เครื่อง CARBOCEP เป็น ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic มี molecular weight cut off 100,000 daltons ลักษณะเป็น cylindrical form ทนกรดและด่างตั้งแต่ระดับ pH 0-14 สามารถนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 300°C ทนแรงดัน 10 bar ทนต่อสารเคมี เช่น chloroform เครื่องปั๊มสำหรับ circulate น้ำไวรัสระหว่างการทำเข้มข้นมีความเร็วสูง ซึ่งจะทำให้เกิดแรงดันในการดันน้ำไวรัสและโปรตีนที่มี molecular weight น้อยกว่า 100,000 dalton ผ่านเครื่องออกมา และในขณะเดียวกันแรงดันของเครื่องปั๊มจะทำให้เกิดแรง tangential flow ผลักดันไม่ให้โปรตีนหรือสารที่มี molecule ใหญ่เกาะติดผิวไส้กรอง ซึ่งจะก่อให้เกิด concentration polarization (Van Der Marel, 1985) อันเป็นสาเหตุให้ไส้กรองอุดตัน ในกระบวนการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ให้เข้มข้น พบว่าขณะที่น้ำไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น จะมีการสูญเสียของปริมาณ 146S particle มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับความสูญเสียของ CF antigen และ virus infectivity ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งการสูญเสีย 146S particle ส่วนมากเกิดขึ้นภายในเครื่อง CARBOCEP เป็นเพราะเมื่อน้ำไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น จะเกิด concentration polarization (Van Der Marel, 1985) บนผิวไส้กรองเพิ่มขึ้น ทำให้มีการติดค้างของไวรัสอยู่บนผิวไส้กรอง และเกิดจาก

146S particle บางส่วนเกิดการแตกย่อยเป็น subunit virus protein (วรากิจ และโฆษิต , 2539) ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ แตกต่างจาก ผลการทดลองการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอเข้มข้น 50 เท่า ที่ได้เปอร์เซ็นต์ recovery ของ 146S particle เท่ากับ 90.43% (วรากิจ และโฆษิต, 2539) อาจเป็นผลจาก การเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ใช้เซลล์ที่ต่างชนิดกัน จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์ recovery ของ 146S particle แตกต่างกัน

สรุป

การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ให้เข้มข้น โดยเครื่อง CARBOCEP ที่ความเข้มข้น 25 เท่า มีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย ของ146S particle เท่ากับ 64.52% มากกว่าเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยของ146S particle ที่ความเข้มข้น 50 เท่า ซึ่งเท่ากับ 22.92% แสดงว่าการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ให้เข้มข้นโดยเครื่อง CARBOCEP ที่ความเข้มข้น 50 เท่า มีการสูญเสีย 146S particle มากกว่าการทำให้มีความเข้มข้น 25 เท่า ดังนั้นการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ให้มีความเข้มข้น 25 เท่า โดยเครื่อง CARBOCEP จะทำให้ได้ปริมาณไวรัสมากกว่าการทำไวรัสให้มีความเข้มข้น 50 เท่า ซึ่งเป็นประโยชน์ในการผลิตไวรัสแอนติเจนได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น นำไปผลิตวัคซีนได้มากขึ้น จากกำลังการผลิตเซลล์เท่าเดิม

เอกสารอ้างอิง

ราตรี วงษ์วัชรดำรง 2533 การวัดระดับความเข้มข้นของไวรัส ปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ : หน้า 97 - 106

วรากิจ จันทรัศมี และประดิษฐ์ ป๊อกเหิง 2539 การใช้เครื่องกรอง glass fiber ชนิด cartridge ในการ clarify น้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6(2) : 1 - 9

วรากิจ จันทรัศมี และโฆษิต สินสุวงศ์วัฒน์ 2539 การใช้เครื่อง ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic ในการทำน้ำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6(2) : 16 - 25

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา 2527 การตรวจหาแอนติบอดีย์และแอนติเจน ไวรัสวิทยาทั่วไป (General Virology) : หน้า 75 - 76

Makarasen,P. and Sinsuwongwat,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. : 180 - 201.

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 : 9 - 25.

Van Der Marel, P. 1985. Concentration . In : Animal cell Biotechnology (2) : p 185 - 215.

Table 1 Percent recovery of FMD Virus type O antigen after concentration process using Carbon-Ceramic Ultrafiltration (CARBOCEP).

Sample		mean value ($\bar{X}$)			mean Percent Recovery ($\bar{X}$)		
		146S (μg/ml)	CF antigen (CFU/ml)	Virus infectivity ($TCID_{50}$/ml)	146S	CF antigen	Virus infectivity
25X (n=5)	Before concentration (2,500 Liters)	1.86	1,022.6	$10^{7.54}$	100	100	100
	After concentration (100 Liters)	30.0	15,292	$10^{8.34}$	64.52	59.82	25.24
50X (n=5)	Before concentration (2,500 Liters)	1.78	663.72	$10^{6.50}$	100	100	100
	After concentration (50 Liters)	20.4	8,508	$10^{7.26}$	22.92	25.64	11.51

Percent recovery of Foot and Mouth Disease Virus type O cultured in IFFA-3 cell after 25 and 50 times concentration process using Carbon-Ceramic Ultrafiltration

Jaturon Polrach[1] Rachapol Subprom[1]

Abstract

The percent recovery of Foot and Mouth Disease Virus type O cultured in cell IFFA-3 after 25 and 50 times concentration process by Carbon-Ceramic Ultrafiltration (CARBOCEP) were studied. The result showed that percent recovery of 146S particle, virus antigen and the amount of virus at 25 times concentration were on the average 64.52% , 59.82% and 25.24% consequently. The percent recovery of 146S particle, virus antigen and amount of virus at 50 times concentration were on the average 22.92% , 25.64% , and 11.51% consequently. These result indicated that the concentration process at 25X concentration give more percent recovery than the concentration process at 50X concentration.

Keywords : percent recovery , Foot and Mouth Disease Virus type O, cell IFFA-3 , Carbon-Ceramic ultrafiltration

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

การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ

สายพิณ ขุมทรัพย์[1] สุรพล ขุมทรัพย์[1] จาตุรนต์ พลราช[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ (Amino acid and vitamins mixture) โดยเพาะเลี้ยงในถังขนาด 1,400 ลิตร จำนวน 18 ครั้ง และ 3,200 ลิตร จำนวน 26 ครั้ง วัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำจำนวนเท่าของการแบ่งตัว (Multiplication rate) ที่ 44 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 พบว่าในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร มีจำนวนเท่าของการแบ่งตัวเป็น 5.46 และ 4.93 เท่า ตามลำดับ และสูงกว่าค่าต่ำสุดของมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คำสำคัญ: กรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ, เซลล์IFFA-3ชนิดแขวนลอย,จำนวนเท่าของการแบ่งตัว

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

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

การเตรียมมีเดียมให้มีคุณภาพดี และสม่ำเสมอทุกชุดการผลิต เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การผลิตเซลล์ประสบผลสำเร็จ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ แต่การเตรียมมีเดียมมักมีอุปสรรคในการเตรียมหลายประการ ปัญหาเรื่องสารเคมีเป็นปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยซื้อสารเคมีจากหลายบริษัท การเตรียมในรูปสารละลายสต๊อคความเข้มข้นสูง จะมีปัญหาคุณภาพของสารเสื่อมลง ตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (Parker, n.d.) และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลกระทบต่อเซลล์จากสารพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541) และเนื่องจากกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสร้างโปรตีน (บุญยืน, 2522) ซึ่งโปรตีนและวิตามินนี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การนำกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จมาใช้ในการเตรียมมีเดียม เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังขนาด 1,400 ลิตรและ 3,200 ลิตร โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง ตามลำดับ และนำจำนวนเท่าของการแบ่งตัว (Multiplication rate) ภายหลังการเพาะเลี้ยงที่ 44 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย (APHIS-US Department of Agricalture,1989) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เซลล์ IFFA-3

เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster passage ที่ 37-44 ในสภาพแขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยง Basal Medium Eagle (BME) ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x10 เท่า

2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย ใช้สารเคมีชนิดต่างๆตามสูตรใน Table1 สำหรับกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ[1] มีส่วนประกอบต่างๆตามสูตรใน Table2 ละลายใน Deionized Water (D.W.) ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ[2] ตามลำดับ ใช้ Bovine calf serum[3] 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 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น ซึ่งเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากถังขนาด 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

4. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

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

---

[1] Gibco®, U.S.A. Lot no. 1011871

[2] Millipore®, U.S.A. Super Q

[3] Moregate®, New Zealand Lot no. 80280116

Table1 Basal Medium Eagle (BME), without amino acid and vitamins mixture formula.

Component	Quantity (mg/l)	Component	Quantity (mg/l)
NaCl	6,800	Penicillin G	120.42
KCl	400	Dihydrostreptomycin	50
$MgCl_2$ anhydrous	79.6	Meat peptone	2,000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	139.7	Yeast extract	1,000
D-glucose anhydrous	1,000	$NaHCO_3$	2,050
$CaCl_2$ anhydrous	200		

Table2 Amino acid and vitamins mixture formula.

Component	Quantity (mg/l)	Component	Quantity (mg/l)
L-Arginine HCl	21	L-Tyrosine	18
L-Cystine 2HCl	15.6	L-Valine	23.5
L-Glutamine	300	D(+)Biotin	1
L-Histidine	8	Choline chloride	1
L-Isoleucine	26	Folic acid	1
L-Leucine	26	myo-Inosital	2
L-Lysine HCl	36.5	Nicotinamide	1
L-Methionine	7.5	D-Pantothenic acid calcium salt	1
L-Phenylalanine	16.5	Pyridoxal HCl	1
L-Threonine	24	Thiamine HCl	1
L-Tryptophan	4	Riboflavine	0.1

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 1,400 ลิตร จำนวน 18 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 0.85, 1.36 และ 2.34 x 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1 และ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมงเป็น 1.33 $\pm$ 0.2372, 2.78 $\pm$ 0.7804 และ 5.46 $\pm$ 0.9704 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3 ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 3,200 ลิตร จำนวน 26 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง เป็น 0.88, 1.20 และ 2.50 x 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1 และ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมงเป็น 1.08 $\pm$ 0.4382, 1.85 $\pm$ 0.6463 และ 4.95 $\pm$ 1.0330 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3

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

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

Table3 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.[a]	1.33±0.2372	2.78±0.7804	5.46±0.9704	18
3,200 L.[b]	1.08±0.4382	1.85±0.6463	4.93±1.0330	26

SD=Standard deviation

[a] and [b] : Non-significantly different ($P<0.05$)

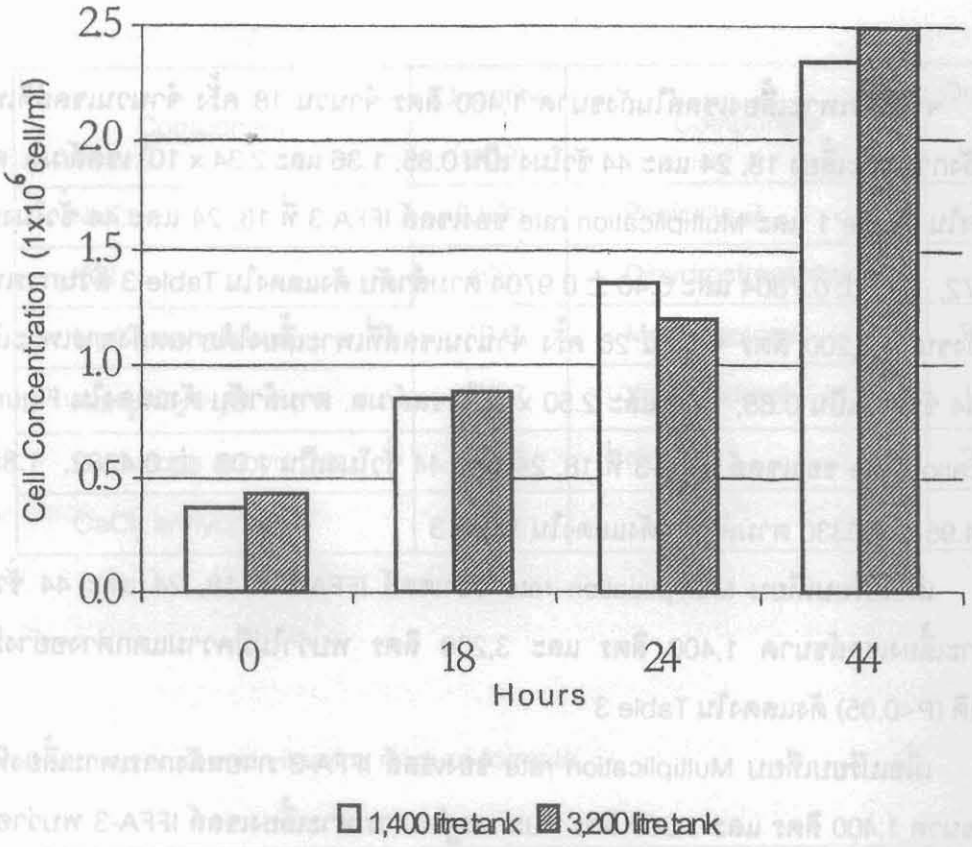


Figure1 Cell concentration per ml at 0, 18, 24 and 44 Hours of culture (mean) in 1,400 and 3,200 litre tank.

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง แต่Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ในถังขนาด 1,400 ลิตร จะสูงกว่าในถังขนาด 3,200 ลิตร อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของเซลล์ (Freshney,1994) และการปรับสภาพเข้าสู่สมดุลย์ของเซลล์ เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในถังขนาด 3,200 ลิตร ต้องรับมาจากถังขนาด 1,400 ลิตร และมีการลดเปอร์เซนต์ serum ลงจาก 5%ในถังขนาด 1,400 ลิตร เป็น 3%ในถังขนาด 3,200 ลิตร เพื่อมิให้มีโปรตีนที่ไม่ต้องการ ซึ่งจะนำไปสู่การแพ้วัคซีน และเป็นการลดต้นทุนการผลิต และอาจเนื่องมาจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน ในถังขนาด 1,400 ลิตร จะมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่ำกว่าในถังขนาด 3,200 ลิตร ซึ่งควรจะได้ทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 44 ชั่วโมง ในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร กับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าอยู่ในช่วงที่สามารถใช้งานได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ต่ำสุดของมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 พบว่าสูงกว่าเกณฑ์ต่ำสุดของมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงว่ากรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3ได้

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ด้วยมีเดียมสำเร็จรูปในระดับอุตสาหกรรม พบว่าสามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3ได้ (สายพิณ และคณะ,2543) แสดงว่ามีเดียมสำเร็จรูป และกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3ในระดับอุตสาหกรรมได้ ควรจะได้ทำการศึกษาในรายละเอียดต่างๆถึงผลดี ผลเสีย ของการใช้มีเดียมสำเร็จรูป และกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงปริมาณ และคุณภาพของเซลล์ที่ดีเป็นสำคัญ เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

สรุป

เมื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ที่เพาะเลี้ยงในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณ Multiplication rate พบว่า Multiplication rate ที่ 44 ชั่วโมง อยู่ในช่วงที่สามารถใช้งานได้ในถังทั้ง 2 ขนาด เมื่อเทียบกับมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย พนักงานหน่วยเตรียมน้ำยาเคมีฯ พนักงานหน่วยเพาะเลี้ยงเซลล์ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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

บุญยืน สาริกะภูติ 2522 กรดอะมิโน โปรตีน โรงพิมพ์ทิพย์เนตรการพิมพ์ เชียงใหม่ : หน้า 20

สายพิณ ขุมทรัพย์, สุรพล ขุมทรัพย์ และ สินสมุทร นิลฉวี 2543 การเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ด้วยมีเดียมผงสำเร็จรูป ในระดับอุตสาหกรรม วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2) : 19-26

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

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

Makarasen,P. and Sinsuwongwat,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. : 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 : 9-25.

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

The Growth of IFFA-3 Suspension Cell in Amino Acid and Vitamins Mixture

Saipin Khumsab[1] Surapon Khumsab[1] Jaturon Polrach[1]

Abstract

The growth of IFFA-3 suspension cell in 1,400 litres and 3,200 litres tank (18 and 26 replicates) containing the medium with amino acid and vitamins mixture were studied. The cell concentration was measured after 18, 24 and 44 hours. The multiplication rate were compared to the reference standard at 44 hours. The result showed that multiplication rates in 1,400 and 3,200 litres tank were 5.46 and 4.93 times respectively which were significantly different ($P<0.05$) from the minimum of standard value.

Key words : Amino acid and vitamins mixture, IFFA-3 suspension cell, Multiplication rate

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

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ ระหว่างไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในประเทศไทย โดยวิธี ลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า

ร่มพฤกษ์ อุดล [1] สมใจ กมลศิริพิชัยพร [1]

บทคัดย่อ

การศึกษาหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r - value) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอของไวรัสที่ระบาดในท้องที่ ในประเทศไทย ระหว่างปี 2542 - 2544 จำนวน 80 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับไวรัส O/Udornthani/87 ที่ใช้ผลิตวัคซีน โดยวิธี Liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) พบว่า r - value อยู่ระหว่าง 0.25 - 1 โดย 93.75% ของไวรัสที่นำมาศึกษามี r - value มากกว่า 0.4 และ 6.25 % ของไวรัสที่นำมาศึกษามี r - value อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.39 แสดงให้เห็นว่า ไวรัสไทป์โอที่ระบาดอยู่ในท้องที่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส O/Udornthani/87 จึงสามารถใช้ไวรัสตัวนี้เป็น seed vaccine ได้ต่อไป

คำสำคัญ : ความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ลิควิดเฟส อีไลซ่า

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย มีหน้าที่ความรับผิดชอบในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งการผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพนั้นมีปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งคือ การคัดเลือก seed ไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติหรือความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี (r - value) ใกล้เคียงกับไวรัสที่ระบาดในท้องที่ ทั้งนี้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางซีโรโลยีได้ง่าย เนื่องจากเป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีความเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติทางด้านแอนติเจนของไวรัสค่อนข้างสูง ดังจะเห็นได้ว่ามีการจำแนกเป็นหลาย Subtype จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาติดตามความเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านแอนติเจนของไวรัสจากท้องที่แต่ละชนิด เพื่อพิจารณาว่าไวรัสที่ระบาดในท้องที่ในปัจจุบันยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนหรือไม่ ในปี พ.ศ. 2533 – 2535 ได้มีการศึกษา r - value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ระหว่างไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน O/Udornthani/87 (O/UDN/87) กับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ (FMDV Type O) ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยโดยวิธี liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) เพื่อเปรียบเทียบ r - vaule ระหว่าง O/UDN/87กับเชื้อท้องที่ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยจำนวน 56 ตัวอย่างทุกตัวอย่างมี r – value มากกว่า 0.4 (วิไลและคณะ,2535) ต่อมาในปี พ.ศ. 2537 - 2541 ก็มีการศึกษา r – value ในวิธีการเดียวกันกับเชื้อไวรัสท้องที่ไทป์โอ 74 ตัวอย่าง มี r - value มากกว่า 0.4 = 97.30 %, r -value อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.39 = 2.7 % (วิไลและคณะ,2543) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสท้องที่ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยในช่วงเวลาดังกล่าวส่วนใหญ่ยังมีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ เป็นกลุ่มเดียวกันกับไวรัส O/UDN/87 ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ครั้งนี้จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำอย่างต่อเนื่อง เพื่อเฝ้าระวังความเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่ระบาดอยู่ในท้องที่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย</u>

ไวรัสที่ใช้เป็น seed ในการผลิตวัคซีนคือ O/UDN/87 ที่ได้มาจากการผ่านเซลล์ Baby Hamster Kidney cell (BHK-21 Clone13) monolayer จำนวน 4 passage ส่วนไวรัสที่ใช้ในการศึกษาคือไวรัสที่ส่งมาจากท้องที่ต่างๆเพื่อทำการวินิจฉัยและจำแนกชนิดจำนวน 80 ตัวอย่างจากโค,กระบือและสุกร ที่ส่งมาจาก 11 เขต คือเขต 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 และเขต 12 รวม 36 จังหวัดระหว่างปี พ.ศ. 2542 - 2544 นำมาผ่านลงในทิชชูคัลเจอร์เซลล์ (primary lamb kidney cell และBHK-21 Clone13 จำนวน 5 - 9 passage) เพื่อเพิ่มปริมาณและความรุนแรง เก็บไวรัส (Virus fluid) แต่ละตัวอย่างมาจำแนกชนิดโดยวิธี ELISA ชนิด Indirect double sandwich ELISA เพื่อยืนยันชนิดไวรัส และ

หาความรุนแรงของไวรัสแต่ละชนิดโดยเลือก dilution ที่ให้ค่า O.D. 1.0 – 1.5 แล้วจึงตรวจสอบหา r - value โดยวิธี LP ELISA

2. เตรียม Immune serum

Immune serum เตรียมจากโคทดลองของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยที่ได้ทำการฉีดวัคซีน ชนิด Trivalent (O, A , Asia -1) จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 3 อาทิตย์ แล้วเจาะ serum 21 วัน หลังฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 เก็บซีรั่มและนำไป inactivate โดยแช่ใน water bath 56 ° C นาน 30 นาที แล้ว block ด้วย normal rabbit serum ปริมาณเท่ากัน

3. Liquid phase neutralizing ELISA test (LP ELISA)

ทำการทดสอบแบบ double antibody sandwich ELISA (Hamblin et al., 1986) และทำการเจือจางซีรั่มแบบ 2 fold dilution (Kitching et al., AFRC Pirbright, UK) โดย มีการเปลี่ยนแปลง ELISA buffer จาก Gelatin เป็น 3% BSA เป็นส่วนประกอบ ทุกตัวอย่างทำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

4. การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r - value)

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ ระหว่างไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนกับไวรัสท้องที่ โดยการคำนวนจากค่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของซีรั่มที่ได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA และนำมาหาอัตราส่วนระหว่างไตเตอร์ที่ได้จากไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เพื่อนำมาหา r - value และวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์โดยวิธีของ Brooksby (1968) ดังนี้

$$r = \frac{\text{serum titer against heterologous field strain}}{\text{serum titer against homologous vaccine strain}}$$

กำหนด r - value ดังนี้ (Samuel et al.,1990 and Doughty et al.,1995)

r = 0 - 0.19 highly significant serological variation from the reference strain

r = 0.2 - 0.39 significant difference from the reference strain but protection may be satisfactory if using a sufficiently potent vaccine.

r = 0.4 - 1 not significant difference from reference strain

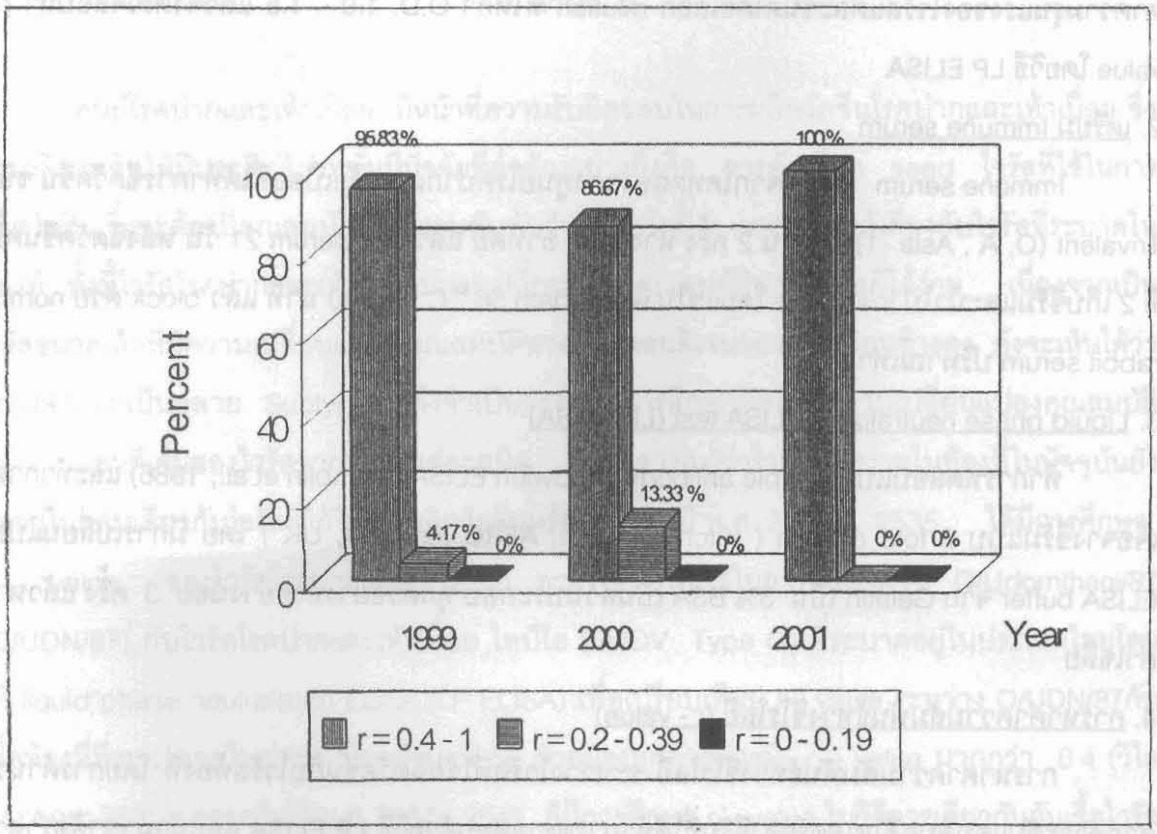


Figure 1 r - value of type O FMDV in 1999, 2000, 2001

ผลการทดลอง

ผลจากการยืนยันเชื้อไวรัสพบว่าไวรัสทั้ง 80 ตัวอย่างเป็นไทป์โอและไวรัสทุกตัวอย่างนำมาหาความรุนแรงไวรัสโดยให้ค่า O.D. 1.0 – 1.5

ผลการหา r – value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ได้จากท้องที่ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2542-2544 จำนวน 80 ตัวอย่าง กับ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ใช้ผลิตวัคซีน (O/UDN/87) โดยวิธี LP ELISA พบว่าทั้ง 80 ตัวอย่างมี r - value อยู่ระหว่าง 0.25 - 1 เมื่อนำมาจัดช่วงค่าเปรียบเทียบกับการกำหนดมาตรฐานพบว่า 75 ตัวอย่าง(93.75 %)ของไวรัสที่นำมาศึกษามี r - value มากกว่า 0.4 และ 5 ตัวอย่าง(6.25%) ของไวรัสที่นำมาศึกษามี r - value อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.39 รูปภาพที่ 1 แสดงช่วงค่า r - value range ของไวรัสที่ระบาดในท้องที่ ในปี พ.ศ. 2542,2543 และ 2544 โดยในปี พ.ศ.2542 จำนวน 24 ตัวอย่าง มี r - value มากกว่า 0.4 จำนวน 23 ตัวอย่าง (95.83 %) และ มี r - value อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.39 จำนวน 1 ตัวอย่าง(4.71 %) ในปี พ.ศ.2543 จำนวน 30 ตัวอย่าง มี r - value มากกว่า 0.4 จำนวน 26 ตัวอย่าง(86.67 %) และมี r – value อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.39 จำนวน 4 ตัวอย่าง (13.33 %) และในปี พ.ศ. 2544 จำนวน 26 ตัวอย่างมี r - value มากกว่า 0.4 ทุกตัวอย่าง(100 %)แสดงถึงความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ ที่ใกล้เคียงกัน

วิจารณ์

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) ด้วยวิธี LP ELISA ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี single dilution โดยการทำ dilution serum เพียงอย่างเดียวและใช้ปริมาณไวรัสคงที่ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเดียวกับ World Reference Laboratory (WRL) ประเทศอังกฤษ (Kitching et al., AFRC Pirbright, UK) การหา r - value ด้วยวิธี LP ELISA แบบ single dilution นี้ถูกพัฒนาขึ้นมาแทน serum neutralization Test (SN Test) (Hamblin et al.,1986) เพราะอ่านผลได้รวดเร็ว ไม่ต้องระวังปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธี SN test ซึ่งใช้ cell culture เมื่อเปรียบเทียบ r - value ที่ได้จากวิธี LP ELISA แบบ single dilution กับ SN Test แล้วจะให้ผลใกล้เคียงกัน (Crowther,1987) r - value ที่ได้จากการทดสอบพบว่า 93.75 % ของ FMD type O ที่นำมาศึกษามี r - value อยู่ระหว่าง 0.4 – 1 และ 6.25 % ของ FMD type O ที่นำมาศึกษามี r - value อยู่ระหว่าง 0.2 - 0.39 แสดงให้เห็นว่า FMD type O ที่ระบาดอยู่ในท้องที่ส่วนใหญ่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ O/UDN/87 (Samuel et al.,1990 and Doughty et al.,1995)

ในปี 2542 r – value อยู่ในช่วง 0.4 –1 = 95.83% ปี 2543 r – value อยู่ในช่วง 0.4 -1 = 86.67% แต่ในปี พ.ศ. 2544 r - value จะอยู่ในช่วง 0.4 – 1 ทั้งหมด (100 %) แสดงว่า FMDV type O ที่ระบาดในท้องที่มีแนวโน้มจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ O/UDN/87ทั้งหมด

เมื่อพิจารณา r – value ในช่วง 0.20 – 0.39 ทั้ง 5 ตัวอย่างในตารางที่ 1 เป็นที่น่าสังเกตว่าในเขตที่มีการเลี้ยงสัตว์หนาแน่น (เขต 2 และ เขต 7) มี r – value อยู่ในช่วง 0.20 – 0.39 ถึง 50 % และ 22.2 % ตามลำดับแต่จำนวนตัวอย่างจากท้องที่ที่ส่งมายังมีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนนัก

ตารางที่ 1 r - value ของเชื้อท้องที่ ไทป์โอที่มีช่วงค่า r ระหว่าง 0.2-0.39

ลำดับที่	เขต	r- value 0.2-0.39	จำนวนตัวอย่าง	คิดเป็น(%)
1	2	1 ตัวอย่าง	2	50%
2	5	1 ตัวอย่าง	21	4.8%
3	7	2 ตัวอย่าง	9	22.2%
4	12	1 ตัวอย่าง	16	6.3%

วิไลและคณะ (2535) ได้ทดสอบเปรียบเทียบหา r - value ระหว่าง SN Test กับ LP ELISA แบบ 2-dimension ของไวรัสไทป์โอ ปรากฏว่าสามารถนำเอาวิธี LP ELISA แบบ 2 dimension มาใช้แทนวิธี SN Test ได้และเมื่อเปรียบเทียบ r - value ที่ได้จากวิธี LP ELISA แบบ single dilution กับ SN Test แล้วจะให้ผลใกล้เคียงกัน (Crowther,1987) จึงน่าจะมีการทดลองหา r - value เปรียบเทียบ

ระหว่างวิธี LP ELISA แบบ single dilution กับ LP ELISA แบบ 2 dimension ในไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยว่ามีค่าใกล้เคียงกันหรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางพิจารณาเลือกชนิดของ LP ELISA ในการศึกษา r - value ต่อไป

สรุป

ไวรัสในท้องที่ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสวัคซีนไทป์โอที่ใช้ในการผลิตวัคซีน (O/Udornthani/87) และสามารถใช้ O/Udornthani/87 เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีนไทป์โอต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ แอบ คงทน ที่ให้คำปรึกษา ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย น.สพ. พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์, สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช , น.สพ. นพพร พัฒนประสิทธิ์ , คุณวรัญญู ชมเฟื่องแก้ว, คุณธนรัตน์ จานุกิจ และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิไล ลินจงสุบงกช, สมใจ กมลศิริพิชัยพร และธนรัตน์ จานุกิจ 2535 การแบ่งชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โดยวิธีลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า สัตวแพทย์สาร 43(3) : 29 – 39

วิไล ลินจงสุบงกช, สุนันท์ ร่มลำดวน, สมใจ กมลศิริพิชัยพร และธนรัตน์ จานุกิจ 2543 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทย บทคัดย่อการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38, 1-4 กุมภาพันธ์ : 137

Brooksby, J.B. 1968. Variants and immunity : Definition for Serology investigation. International symposium on foot and mouth disease. Variants and immunity. Lyon. Symposium Series. Immun. Stand. 8 : 1 – 10.

Crowther, J.R. 1987. ELISA in FMD diagnosis and differentiation and the use of monoclonal antibodies. In Foot and Mouth Disease. 17th Conference of the O.I.E. Foot and Mouth Disease Commission. Paris, 1-3 October 1986. O.I.E. Paris. : 178 - 195.

Doughty, W.J., R.A. Lunt, W. Linchongsubongkoch, L.J.Gleeson, and A. Kongthon. 1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. Rev.sci. tech. Off. Int. Epiz. 14 (3) : 547 – 555.

Hamblin, C., I.T.R. Barnett, and R.S. Hedger. 1986. A new enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for the antibodies against foot and mouth disease virus. II. Application. J. Immun Methods . 93 : 122 - 129.

Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. Rapid correlation between field isolates and Vaccine strains of foot and mouth disease virus. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright, Working, Surrey, UK.

Samuel, A.R., Ouldridge E.J.,Arrowsmith, A.E.M., Kitching, R.P. and Knowles, N.J. 1990. Antigenic analysis of serotype O of foot and mouth disease virus isolates from the Middle East 1981 – 1988. Vaccine. 8 : 390 - 396.

Serological Correlation between Field Isolates and Vaccine Strain of Foot and Mouth Disease Virus Type O in Thailand by Liquid Phase Neutralizing ELISA Test

Romphruke Udon[1] Somjai Kamolsiripichaiporn[1]

Abstract

Antigenic variation of Foot and Mouth Disease virus type O field isolates from 1999 - 2001 in Thailand were studied. The liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) was used to determine r - value of 80 field viruses and the vaccine strain(O/Udornthani / 87). The range of r-value was 0.25 - 1 which 93.75 % gave r - value greater than 0.4 while 6.25 % gave r-value between 0.2 - 0.39 . The results indicated that these field viruses type O belonged to the same group of O/Udornthani / 87. Therefore,O/Udornthani / 87 still can be use as a seed vaccine in production line .

Key words : r-value ,Foot and Mouth Disease type O , LP ELISA

---

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

เปรียบเทียบการใช้ บล๊อค ไดลูเอ็น ชนิดต่าง ๆในการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ลิควิด เฟส บล็อกกิ้ง อีไลซ่า

อนุโรจน์ ภู่ศิริมงคล [1] ดิลก อ้วนพรมมา [1]
ปณิธาน ทองทา [1] วิไล ลินจงสุบงกช [1]

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบการใช้ บล๊อค ไดลูเอ็น 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย 0.5% gelatin, 5% Anlene skimmed milk และ 5% Marvel skimmed milk เพื่อลดปฏิกิริยาจับกันแบบไม่จำเพาะ ในขั้นตอนการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) ทำการทดสอบซีรัม จำนวน 158 ตัวอย่าง โดยใช้ บล๊อค ไดลูเอ็น แต่ละชนิด ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน นำมาหาค่าความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้ 0.5% gelatin กับ Anlene skimmed milk, 0.5% gelatin กับ Marvel skimmed milk และ Marvel skimmed milk กับ Anlene skimmed milk ค่า r ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ มีค่าเท่ากับ 0.79, 0.90 และ 0.81 ตามลำดับ, ไทป์เอ มีค่าเท่ากับ 0.73, 0.80 และ 0.66 ตามลำดับ และไทป์เอเชียวัน มีค่าเท่ากับ 0.84, 0.84 และ 0.78 ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถใช้ บล๊อค ไดลูเอ็น ทั้ง 3 ชนิด ในการตรวจสอบทางซีรัมวิทยา โดยวิธี LP ELISA ได้

คำสำคัญ : บล๊อค ไดลูเอ็น, ลิควิด เฟส บล็อคกิ้ง อีไลซ่า, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

---

[1]ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การนำ liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) มาใช้ในการตรวจสอบด้านซีรัมวิทยาเชิงปริมาณเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันพบว่าให้ความไว ความจำเพาะสูง อ่านผลรวดเร็ว ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และยังสามารถใช้แทนวิธี virus neutralization (VN) test ได้ (Hamblin et.al., 1986 ; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำวิธี LP ELISA มาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบงานด้าน subtyping (Kitching et.al.,1988) และศึกษาด้าน antigenic variation ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในท้องที่ (Linchongsubongkoch et.al., 2000) การเตรียมสารละลายเพื่อใช้เจือจางสารตรวจสอบในแต่ละขั้นตอนของการตรวจสอบ LP ELISA เป็นสิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญต้องใช้สารละลายที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาจับกันแบบไม่จำเพาะ (non specific binding reaction) ในขบวนการตรวจสอบ เพื่อแก้ปัญหาในการอ่านผลผิดพลาดเช่น false positive, false negative หรือเกิด background สูงเป็นต้น มีรายงานผลการใช้โปรตีนชนิดต่าง ๆ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และสารโปรตีนที่นิยมใช้เป็น blocked diluent ได้แก่ 0.5% gelatin, 3% bovine serum albumin (Kitching et. al., 1988), 10% normal bovine serum + 5% normal rabbit serum และ 5% skimmed milk ปัจจุบันการตรวจสอบ LP ELISA ของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย จะใช้ blocked diluent ที่ประกอบด้วย 0.5% gelatin ใน PBST (0.1 M phosphate buffer saline + 0.05% tween 20) ซึ่งวิธีนี้ต้องเพิ่มขั้นตอนการ block ตัวอย่างซีรัมด้วย normal rabbit serum ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการตรวจสอบเสมอ พบว่าในแต่ละปีต้องใช้ปริมาณ normal rabbit serum จำนวนมาก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารโปรตีนอย่างอื่นมาใช้ทดแทน gelatin และ normal rabbit serum โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน โดยใช้ blocked diluent ชนิดต่างๆ กัน คือ 0.5% gelatin, 5% skimmed milk จากในประเทศและต่างประเทศ พร้อมทั้งศึกษาค่าความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ, เอ และ เอเชียวัน ในรูปของสมการ linear regression line และหาค่า correlation coefficient (r) ของการใช้ blocked diluent ที่ประกอบด้วย 0.5% gelatin, 5% skimmed milk จากในประเทศและต่างประเทศ

4. Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

ตรวจระดับแอนติบอดี แบบ duplicate-well two fold dilution โดย coat rabbit anti O, A และ Asia1 ลงบน solid phase ปริมาตร 50 µl ต่อหลุมใน 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 PBST เป็น diluent จากนั้นเติมไวรัสและซีรัมในปริมาตรเท่ากัน คือ 50 µl ขณะเดียวกัน เตรียม virus control และ strong positive, weak positive และ negative control serum ในแต่ละ plate นำไปเขย่าค้างคืนในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °C จากนั้น transfer mixture ของ virus-serum ปริมาตร 50 µl ต่อหลุมลงบน plate ที่ coat ไว้แล้ว นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม guinea-pig anti O, A และ Asia1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยใช้ blocked diluent ที่ต้องการศึกษาเปรียบเทียบ 3 ชนิด คือ PBST+0.5% gelatin, PBST+ 5% Anlene skimmed milk, PBST+5% Marvel skimmed milk เขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นเติม conjugate (anti GP IgG-HRP Conjugate) ซึ่งเตรียมใน blocked diluent ทั้ง 3 ชนิดปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม incubate นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ทำการเติม substrate ที่มีส่วนผสมของ 0.01% tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้ H_2O_2 เป็น catalyst ปล่อยไว้ในอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ 450 nm. โดยใช้เครื่องอ่าน Microplate*1 นำค่า OD ของแต่ละ dilution มาคำนวณหาระดับแอนติบอดี ซึ่งได้จากการคำนวณ ค่า dilution ของซีรัมที่อยู่ระหว่าง 50% ของ OD_{max} และมีค่าอยู่ระหว่าง 1.0-1.5 ตามวิธีการของ Hamblin et al. (1986)

5. การอ่านผลและเปรียบเทียบค่า correlation coefficient (r)

อ่านค่าระดับแอนติบอดี ที่ได้จากการตรวจสอบ LP ELISA (Hamblin et al.1986) จากซีรัมแต่ละตัวอย่างโดยใช้ blocked diluent ทั้ง 3 ชนิด ดังรายละเอียดในข้อ 3. เปรียบเทียบและแสดงความสัมพันธ์ในรูปของสมการ linear regression line และ ค่า correlation coefficient (r) ค่า r มีค่าใกล้ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์ในทางเดียวกัน

*1 Labsystem Multiskan MS

ผลการทดลอง

1. ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ โดยใช้ blocked diluent ที่ประกอบด้วย 0.5% gelatin ซึ่งเป็นวิธีเดิมในปัจจุบันกับ 5% Anlene skimmed milk และ 5% Marvel skimmed milk ให้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.79, 0.90 และ 0.81 ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1, 2 และ 3

2. ผลการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ โดยใช้ blocked diluent ที่ประกอบด้วย 0.5% gelatin กับ 5% Anlene skimmed milk และ 5% Marvel skimmed milk ให้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.73, 0.80 และ 0.66 ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 4, 5 และ 6

3. ผลการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน โดยเปรียบเทียบ blocked diluent ที่ประกอบด้วย 0.5% gelatin, 5% Anlene skimmed milk และ 5% Marvel skimmed milk ให้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.84, 0.84 และ 0.78 ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 7, 8 และ 9

สรุปผลและวิจารณ์

การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ, เอ และ เอเชียวัน โดยวิธี LP ELISA จากการใช้ blocked diluent ที่มีส่วนประกอบของ PBST+ 5% Anlene skimmed milk และ PBST+ 5% Marvel skimmed milk เปรียบเทียบกับ PBST +0.5% gelatin ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ให้ค่า correlation coefficient (r) สูงทั้ง 3 ไทป์ คือ ไทป์โอ มีค่าเท่ากับ 0.79,0.81 และ 0.90 ตามลำดับ ไทป์เอ มีค่าเท่ากับ 0.73,0.80 และ 0.66 ตามลำดับ และไทป์เอเชียวัน มีค่าเท่ากับ 0.84, 0.84 และ 0.78 ตามลำดับ แสดงว่าสามารถใช้ blocked diluent ทั้ง 2 ชนิดทดแทน gelatin ได้ และจากรายงานของ Linchongsubongkoch et.al. (1998) มีการเตรียม blocked diluent ที่มีส่วนประกอบของ PBST+5% skimmed milk และ PBST+10% normal bovine serum +5% Normal rabbit serum ในการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ reagent kit ที่ผลิตจาก World Reference Laboratory (WRL) ประเทศอังกฤษ และ FMD Center ประเทศไทย พบว่าได้ค่า correlation coefficient (r) สูงและสามารถใช้แทนกันได้ ดังนั้นการใช้ blocked diluent ที่มีส่วนประกอบของ skimmed milk powder ยี่ห้อ Marvel จากประเทศอังกฤษ และยี่ห้อ Anlene จากประเทศไทยซึ่งหาซื้อง่ายตามท้องตลาดและราคาถูก ไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ผลการทดลองพบว่าการใช้ 5% Marvel skimmed milk เป็นส่วนประกอบใน block diluent นั้นค่า correlation coefficient ค่อนข้างสูงทั้ง 3 ไทป์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Linchongsubongkoch

et. al. (2000) ดังแสดงใน figure 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สารโปรตีนที่ได้จาก gelatin หรือ skimmed milk powder อย่างใดอย่างหนึ่งทดแทนกันได้ การเลือกใช้โปรตีนเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างของผู้ใช้ เช่น ความสะดวกสบายในการเตรียม คุณภาพมาตรฐาน แหล่งการจัดซื้อหาง่ายและราคาถูก เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวกฤตยา สุนทร นางสาวศรัญญา แพงตะคุ และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความร่วมมือและให้ความอนุเคราะห์ ในการเตรียมสารละลาย และเตรียมวัสดุอุปกรณ์ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

Hamblin,c.,Barnett,I.T.R., 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.

Herrnann,J.E., Hendry,R.M., Collins,MM.F. 1979. Factors of involved in enzyme linked immunoassay and evaluation of the method of identification of enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 10: 210-217.

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

Linchongsubongkoch W., Romlumdoan,S., Kamolsiripichaiporn,S., Janukit,T. 2000. Antigenic relationship of foot and mouth disease viruses field outbreak in Thailand. IAEA-TECDOC-1150. : 105-112.

Kohno, T., Hashida, S., Ishikawa, E. 1985. A more Sensitive enzyme immunoassay of anti-insulin IgG in guinea pig serum with less non-specific binding of normal guinea pig serum.J. biochem. 98 : 379-384.

Colling, A. 2000. The external quality assurance program (EQAP) for the FAO/IAEA antibody FMD ELISA in South East Asia. IAEA-TECDOC-1150. : 29-48.

Vogt,R.F., Phillips,D.L., Hendersan,L.O., Whitfield, W., Spierto, F.W. 1987. Qualitative differences among various proteins as blocking agents for microtiter plates. J. Immunol. Heath. 101: 43-50.

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างซีรัม

ซีรัมโคและสุกรจำนวนทั้งสิ้น 158 ตัวอย่าง ที่ส่งจากท้องที่มายังศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี ภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด 3 ไทป์

2. เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ, เอ และ เอเซียวัน ซึ่งเป็น seed สำหรับผลิตวัคซีนในปัจจุบัน คือ O/Udornthani/87, A/Sakolnakorn/97 และ Asia1/Petchaburi/85 ผ่านไวรัสลงบนทิชชูคัลเจอร์ BHK-21 เก็บไวรัสเมื่อเกิด 100% cytopathic effect (CPE) ในเวลา 18 ชั่วโมง โดยนำไปปั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากเซลล์เพื่อใช้ในการตรวจสอบ titrate ไวรัสทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี Indirect double antibody sandwich ELISA คำนวณหาค่า dilution ที่เหมาะสมของไวรัสแต่ละไทป์ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบ LP ELISA ต่อไป โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุดของไวรัส ที่ให้ค่า optical density (OD) เท่ากับ 1.5 ตามวิธีการของ Hamblin et.al. (1986)

3. เตรียม blocked diluent

เตรียม blocked diluent 3 ชนิด เพื่อใช้ในการเจือจางสารตรวจสอบในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย guinea pig detecting antibody และ สารละลาย conjugate ดังนี้

- 0.5% gelatin[*1] ใน PBST (0.1M phosphate buffer saline + 0.05% tween 20) (v/v) pH7.6

-5% Marvel skimmed milk[*2] ใน PBST (0.1M phosphate buffer saline + 0.05% tween 20) (w/v) pH7.6

- 5% Anlene skimmed milk[*3] ใน PBST (0.1M phosphate buffer saline + 0.05% tween 20) (w/v) pH7.6

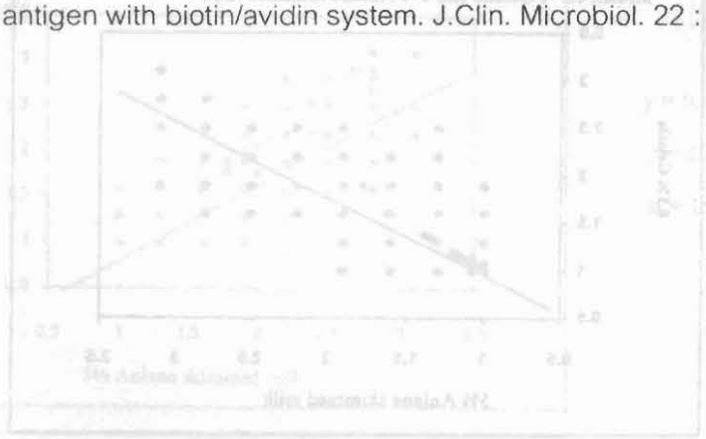
[*1] Chemical preparing in laboratory and uses as routine assay

[*2] Skimmed milk powder product from UK

[*3] Skimmed milk powder product from Thailand

Kitching.R.P., Rendle,R., Ferris,N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates vaccine strains of foot and mouth disease virus. Vaccine. 6 : 403-408

Gary, W.G.J.R., Kaplan,E.J., Stine, E.S., Anderson,J.L. 1985. Detection of Norwalk Virus antibodies and antigen with biotin/avidin system. J.Clin. Microbiol. 22 : 274-278.



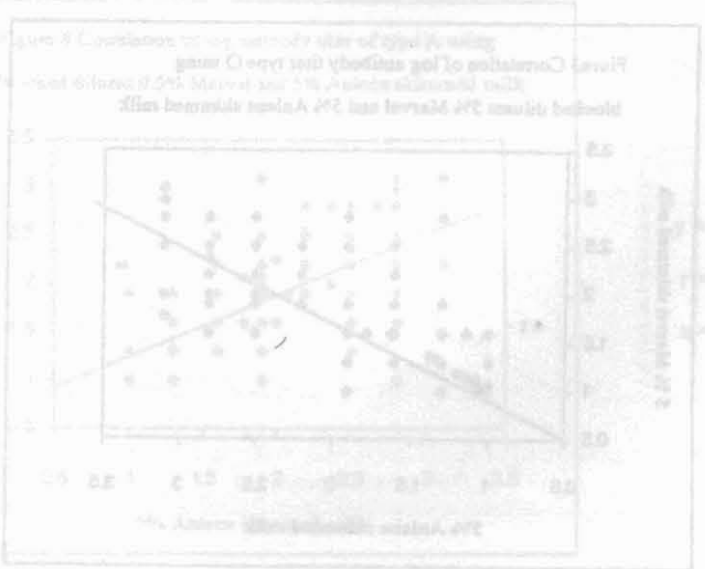
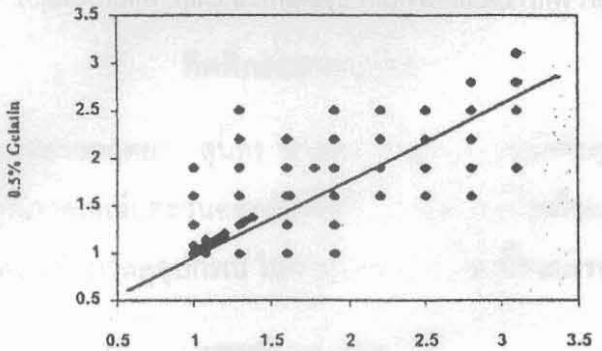


Figure1 Correlation of log antibody titer type O using blocked diluent 0.5% Gelatin and 5% Anlene skimmed milk

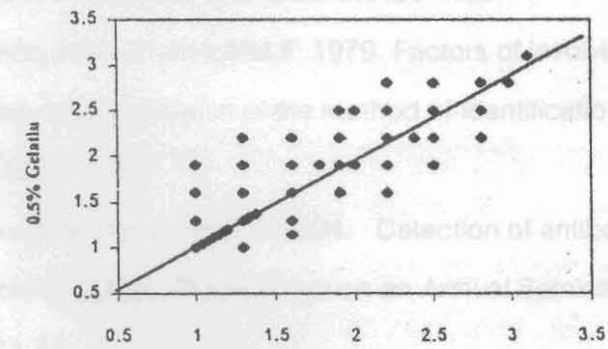


y =0.594+0.655X

r = 0.79

n = 158

Figure 2 Correlation of log antibody titer type O using blocked diluent 0.5% Gelatin and 5% Marvel skimmed milk

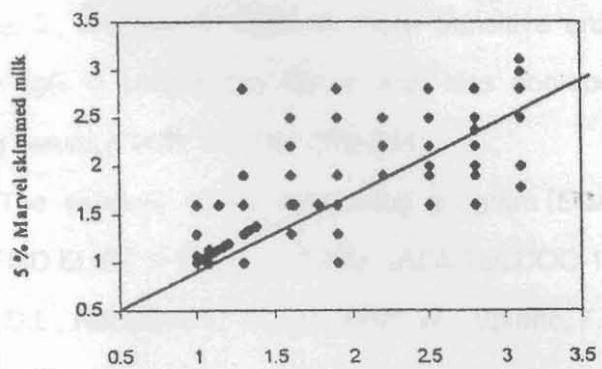


y = 0.293+0.85X

r = 0.90

n = 158

Fiure3 Correlation of log antibody titer type O using blocked diluent 5% Marvel and 5% Anlene skimmed milk

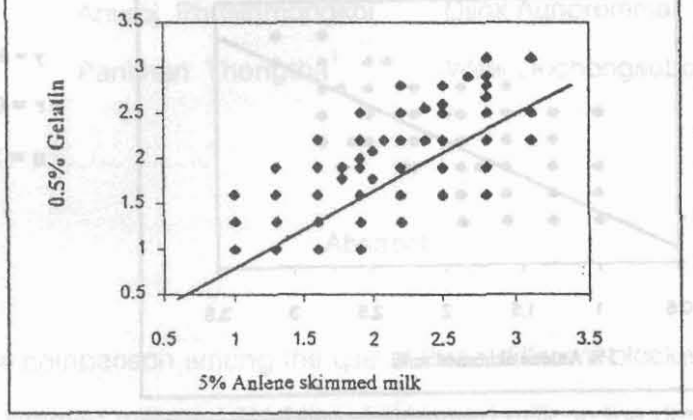


y = 0.479+0.704X

r = 0.81

n = 158

Figure 4 Correlation of log antibody titer of type A using blocked diluent 0.5% Gelatin and 5% Anlene skimmed milk

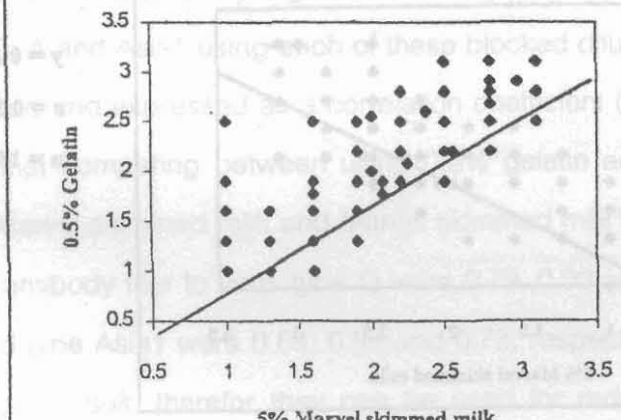


y = 0.452 + 0.755X

r = 0.73

n = 158

Figure 5 Correlation of log antibody titer of type A using blocked diluent 0.5% Gelatin and 5% marvel skimmed milk

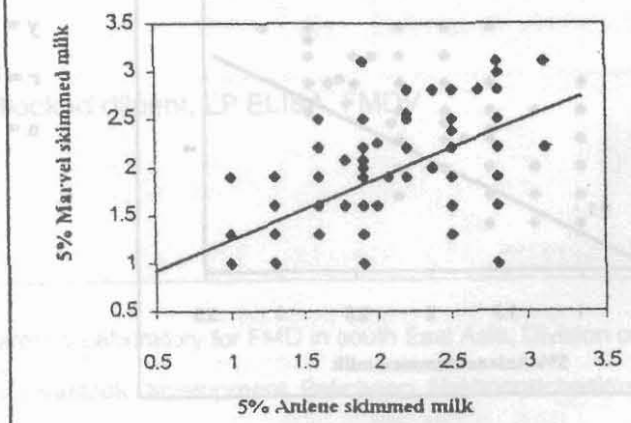


Y = 0.302 +0.841X

r = 0.80

n = 158

Figure 6 Correlation of log antibody titer of type A using blocked diluent 0.5% Marvel and 5% Anlene skimmed milk

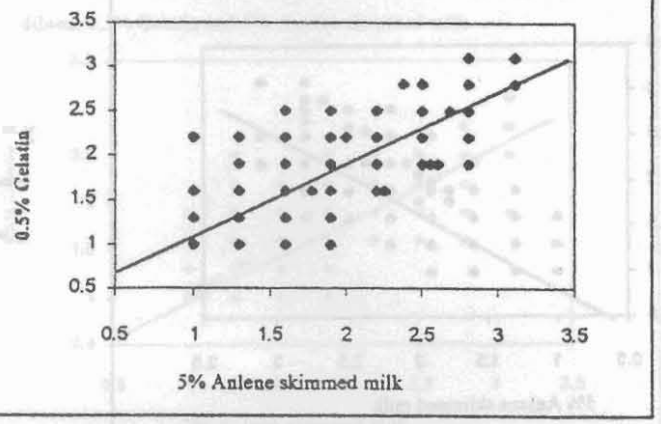


y = 0.708+0.646X

r = 0.66

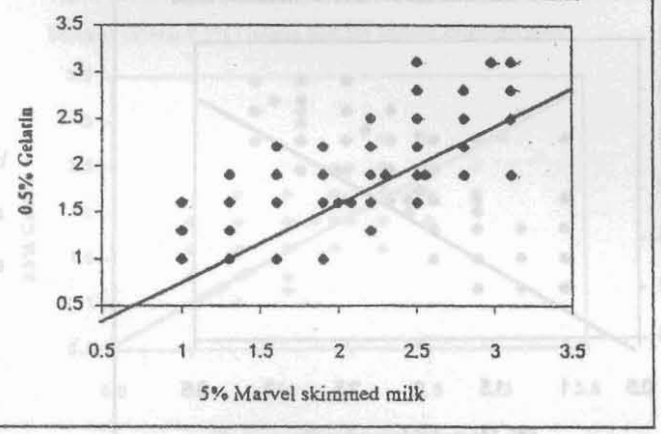
n = 158

Figure 7 Correlation of log antibody titer type Asia1 using blocked diluent 0.5% gelatin and 5% Anlene skimmed milk



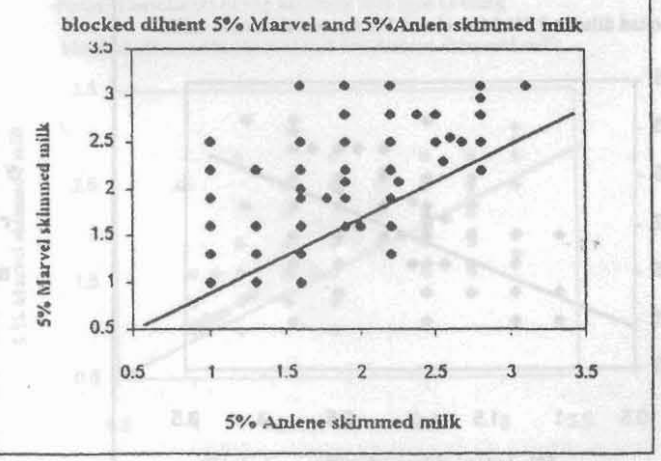
y = 0.386+0.799X
r = 0.84
n = 158

Figure 8 Correlation of log antibody titer type Asia1 using blocked diluent 0.5% Gelatin and 5% Marvel skimmed milk



y = 0.339+0.763X
r = 0.84
n = 158

Figure9 Correlation of log antibody titer type Asia1 using blocked diluent 5% Marvel and 5%Anlen skimmed milk



y = 0.485+0.823X
r = 0.78
n = 158

Comparison of Various Types of Blocked Diluent in Seromonitoring of FMDV by Liquid Phase Blocking ELISA

Anuroj Phusirimongkol[1] Dilok Aunpromma[1]
Panithan Thongtha[1] Wilai Linchongsubongkoch[1]

Abstract

The comparison among the use of three different blocked diluents :- 0.5% gelatin, 5% Anlene skimmed milk and 5% Marvel skimmed milk ,in the determination of antibody titer to foot and mouth disease virus (FMDV) by liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) were studied. One hundred and fifty eight serum samples were tested for the antibody titer to FMDV type O, A and Asia1 using each of these blocked diluents. The resulted antibody titer were compared and expressed as a correlation coefficient (r) within each type of viruses. It was shown that comparing between using 0.5% gelatin and Anlene skimmed milk, 0.5% gelatin and Marvel skimmed milk and Marvel skimmed milk and Anlene skimmed milk; the r value of log antibody titer to virus type O were 0.79, 0.90 and 0.81, type A were 0.73, 0.80 and 0.66 and type Asia1 were 0.84, 0.84 and 0.78, respectively. All blocked diluents gave high correlation result, therefor they can be used for reducing the non specific binding reaction in LP ELISA.

Key words: Blocked diluent, LP ELISA, FMDV

[1] Regional Reference Laboratory for FMD in south East Asia, Division of Veterinary Biologics. Department of Livestock Development, Pakchong, Nakhonratchasima, 30130

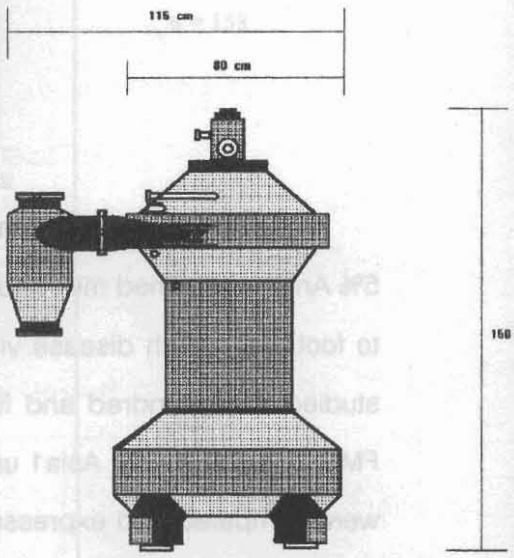
บริษัท ขอสนับสนุนวิชาการงานวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ด้วยความยินดี

เป็นตัวแทนเครื่อง Centrifuge และ Ultrafiltration จากยุโรป

HIGH SPEED CONTINUOUS CENTRIFUGE
ยี่ห้อ **ROBATEL**

CENTRIFUGE BLOW
ยี่ห้อ **ROUSSELET**

ULTRAFILTRATION & CONCENTRATION
ยี่ห้อ *TECH-SEP*



ROBATEL CHV 1400

พร้อมให้บริการและจัดจำหน่าย Eqipment ในระบบ Process อุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภา

รับบริการจัดหา Sparepart และซ่อมเครื่องมือทุกประเภท

นำเข้าผลิตภัณฑ์ สารเคมี , เครื่องแก้ว และ อื่น ๆ

N & A COMMERCIAL CO., LTD.

บริษัท เอ็น แอนด์ เอ คอมเมอร์เชียล จำกัด

87/116 เทศบาลสงเคราะห์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900

โทร. (02) 954-4610-13 แฟ็ก. (662) 591-4033

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ฉบับปีที่ 11 เล่มที่ 1 - 2 ฉบับนี้เป็นการรวบ 2 ฉบับรวมกันเช่นเดียวกับฉบับปีที่ 10 ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับนักวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ ว่าจะมีผลงานวิจัยหรืองานวิชาการที่ส่งมาเพื่อพิมพ์เผยแพร่มากน้อยเพียงใด เพราะทุกเรื่องต้องผ่านคณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ โดยแต่ละเรื่องต้องใช้ระยะเวลานานพอสมควร ทำให้การพิมพ์เผยแพร่ต้องล่าช้าออกไปด้วย

ในฉบับนี้เป็นผลงานทดลองที่น่าสนใจ จำนวน 5 เรื่อง ซึ่งเป็นผลงานทางด้านโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด ประกอบด้วย 1) ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ 2) เปอร์เซนต์ recovery ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ IFFA-3 ในการทำไวรัสเข้มข้น 25 เท่า และ 50 เท่า โดยเครื่อง Ultrafiltration ชนิด Carbon-Ceramic 3) การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ 4) การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ ระหว่างไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในประเทศไทยโดยวิธี ลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า และ 5) เปรียบเทียบการใช้ บล็อกไดลูเอ็น ชนิดต่างๆ ในการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี ลิควิด เฟส บล็อกกิ้ง อีไลซ่า ซึ่งผลงานเหล่านี้ล้วนเป็นประโยชน์สำหรับผู้ผลิตวัคซีน ผู้ใช้วัคซีนรวมทั้งผู้สนใจทุกท่านและสมควรติดตามทุกเรื่อง

กองบรรณาธิการ

อภินันทนาการ

จาก

บริษัท ภาวิวัฒน์ จำกัด

104 ซอยดำเนินกลางใต้ ถนนราชดำเนิน แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร

กรุงเทพฯ 10200

with the Complement of

PAVIWAT COMPANY LIMITED

104 SOI DAMNOEN KLANG TAI, RATCHADAMNOEN ROAD,

BOWONNIWET, PHANAKORN BKK 10200

Tel. 0–2246–6217-8 Fax. : 0–2224-1010

ใบสั่งโฆษณา

หนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" ของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

โทรศัพท์ 044-311592 แฟกซ์ 044-312870

เขียนที่.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าในนามบริษัท/ห้าง/ร้าน.....

ยินดีให้ความอุปการะการพิมพ์หนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" ดังนี้

ปีที่ ..... ฉบับที่ ..... เดือน..... พ.ศ. .....

ด้วยข้อความตามที่แนบมาหรือความเรียง ดังนี้ .....

.....

จำนวนเงินรวม.....บาท ( )

ซึ่งข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าโฆษณาแจ้งความกับเจ้าหน้าที่ของกองฯ ผู้จัดทำหนังสือที่ทำใบเสร็จรับเงินและหนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" มาให้ข้าพเจ้า จำนวน 2 เล่ม โดยไม่คิดมูลค่าหนังสือ

ลงนาม.....

(.....)

ตำแหน่ง.....

อัตราค่าลงโฆษณา ใน "วารสารชีวผลิตภัณฑ์"

ปกหลังด้านนอก	2,000 บาท
ปกหน้า-หลังด้านใน	1,000 บาท
ใบแทรกเดี่ยว	1,000 บาท

หมายเหตุ : ใบแทรกในฉบับ ผู้ลงโฆษณาจัดพิมพ์เอง