วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2547

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับโรคปากและเท้าเปื่อย..... 1
2. การป้องกันโรค..... 2

บทที่ 2 ไวรัสวัคซีนสำหรับสัตว์..... 3

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไวรัสวัคซีนสำหรับสัตว์..... 3
2. ประวัติและความเป็นมาของการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย..... 6

บทที่ 3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 9

1. เซลล์..... 9
2. มีเดีย..... 14
3. Seed virus..... 25
4. อุปกรณ์เครื่องมืออื่น ๆ ในการผลิต..... 26

บทที่ 4 การป้องกันและขจัดเชื้อปนเปื้อน..... 29

การ sterilization เครื่องมืออุปกรณ์ขนาดใหญ่..... 31

การกรอง..... 34

บทที่ 5 วิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย..... 42

I. การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Rolling bottle cell culture method... 43
II. การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Suspension cell culture method..... 47
III. การ clarify, concentration และ purification ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 48
IV. การ Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus..... 53
V. การเก็บแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อยในไนโตรเจนเหลว..... 53

บทที่ 6 การเตรียมวัคซีน..... 55

I. Adjuvants..... 55
II. การ formulate วัคซีนสำหรับสุกร..... 57
III. การ formulate วัคซีนสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ..... 58
IV. การเก็บวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย..... 58
V. การทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย..... 58

อาการของโรคทุกไทป์จะแสดงอาการของโรคคล้ายคลึงกันมาก จนไม่สามารถแยกออกได้ว่าเป็นไทป์ใด นอกจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ กล่าวคือสัตว์ที่เป็นโรคจะมีอาการ ซึม น้ำลายไหล กินอาหารไม่ได้ ถ้าเปิดปากดูจะพบว่า ลิ้น เพดานปาก เหงือก จะมีเม็ดตุ่มใสเกิดขึ้น และจะแตกไปในที่สุด โดยจะแตกภายใน 4-7 วัน หลังจากเกิดเม็ดตุ่มใสขึ้นที่ปากแล้ว เม็ดตุ่มใสนี้ก็จะไปเกิดขึ้นที่กีบเท้าทั้ง 4 เท้า บริเวณเหนือไรกีบทำให้สัตว์เดินไม่ได้ ในบางตัวกีบจะหลุดไปเลย

อัตราการตายของโรคนี้ไม่พบในสัตว์โต แต่จะพบมากในสัตว์อายุน้อย โดยมีอัตราการตายประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

การรักษา ทำการรักษาตามอาการ เช่น ทำแผล, ฉีดยาลดไข้ และฉีดยาป้องกันการติดเชื้ออื่น ๆ

สัตว์ที่หายจากโรคนี้แล้ว จะไม่เป็นโรคไทป์ที่เป็นแล้วเป็นเวลานาน 1-2 ปี แต่จะสามารถเป็นโรคในไทป์อื่น ๆ ได้ กล่าวคือไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละไทป์เมื่อเป็นแล้วไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามไทป์กัน ดังนั้นในการทำวัคซีนจึงต้องทำทุกไทป์ที่มีการระบาด เช่น ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย 3 ไทป์ คือ ไทป์ O, A และ Asia1 จึงต้องผลิตวัคซีน ไทป์ O, ไทป์ A และไทป์ Asia1 มาทำการฉีดทั้ง 3 ไทป์ จึงจะสามารถป้องกันได้ทั้ง 3 ไทป์ ถ้าฉีดไทป์ใดไทป์หนึ่งก็จะป้องกันได้ไทป์เดียว ส่วนอีก 2 ไทป์ที่ไม่ได้ฉีดก็สามารถเกิดการระบาดของโรคได้ ส่วนการผลิตวัคซีนจะผลิตเป็นชนิดไทป์เดียว, ชนิด 2 ไทป์ หรือชนิด 3 ไทป์รวมกัน ขึ้นอยู่กับเทคนิคทางการผลิตของแต่ละบริษัทจะดำเนินการ สัตว์ที่หายจากโรคนี้แล้วจะเป็นตัวเก็บเชื้อแพร่กระจายไปยังตัวอื่น ๆ ได้ (Reservoir)

2. การป้องกันโรค

โรคปากและเท้าเปื่อยสามารถป้องกันการเกิดโรคได้โดยการฉีดวัคซีน ซึ่งวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์นั้น จะมีทั้งสำหรับใช้ในโค กระบือ แพะ แกะ และใช้ในสุกร เป็น inactivated vaccine สามารถให้ความคุ้มโรคหรือป้องกันโรคได้นาน 6 เดือน สำหรับวิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จะได้กล่าวถึงในบทต่อไป

Diseases	Cell culture
Bovine ephemeral fever	BHK
Infectious bovine rhinotracheitis	Kidney
Rift Valley fever	CEF
Theileriasis	Bovine lymphoblasts
African horse sickness	Monkey kidney
Equine encephalitis	CEC
Equine rhinopneumonitis	Pig kidney
Swine fever (hog cholera)	Kidney
Pseudorabiles (Aujeszky)	Pig kidney
Teschen disease	CEF
Bluetongue	Sheep kidney
Sheep pox	BHK
Louping ill	Kidney
Contagious pustular dermatitis	Cat kidney
Wesselsbron disease	Lamb kidney
Fowl pox	CEF
Infectious bursal disease	CEC
Duck plague	CEF
Mink enteritis	Mink kidney
Laryngotracheitis	CEC
Transmissible gastroenteritis	Dog kidney

ไวรัสวัคซีนสำหรับสัตว์แบ่งเป็นชนิดใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม (7) **คือ**

1.1 Attenuated live virus vaccine

คือการทำไวรัสให้อ่อนกำลังลงโดยการนำมาผ่านในสัตว์ เช่น mice อายุต่าง ๆ, กระต่าย, chick embryos หรือ guinea pigs เป็นจำนวนหลาย ๆ passage จนกว่าจะอ่อนกำลังลง แล้วนำไวรัสที่ได้มาทำเป็นวัคซีนโดยที่เชื้อไวรัสนั้นยังมีชีวิตอยู่แต่อ่อนกำลังลงแล้ว เช่นการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรจากกระต่าย ฯ

ข้อดี ให้ความคุ้มโรคได้ระยะยาวนาน

ข้อเสีย

ก. เชื้อไวรัสที่ใช้ในการทำเป็นวัคซีนอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด outbreak ของโรคขึ้นได้ในบางกรณี

ข. ไวรัสที่นำมา passage จำนวนมาก ๆ passage เพื่อให้อ่อนกำลังลง อาจจะกลายพันธุ์กลับสู่สภาพก่อให้เกิดโรคได้

ค. ในกรณีที่เกิดการระบาดของ Subtype ใหม่ขึ้นในบางท้องที่ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย การผลิตวัคซีนอาจจะทำได้ไม่ทันท่วงที เนื่องจากต้องใช้เวลาในการผ่านเชื้อไวรัส และการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนก่อนจะนำไปใช้ในท้องที่

1.2 Inactivated vaccine หรือ Killed vaccine

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เริ่มผลิตขึ้นใช้ตั้งแต่เมื่อ 70 ปีที่แล้ว โดยการใช้ formaldehyde solution เจือจางเป็นตัว inactivated virus ที่ได้จากการนำเลือดจากสัตว์ป่วยระยะ Viremia มาผลิตเป็นวัคซีนและวัคซีนที่ผลิตได้นี้จะมีผลความคุ้มโรคได้

ข้อดี

ก. ในกรณีที่เกิด Subtype ใหม่เกิดขึ้นในบางท้องที่ เช่นโรคปากและเท้าเปื่อย การผลิตวัคซีนแบบ inactivated vaccine จะใช้ระยะเวลาสั้น ทำให้ผลิตใช้ได้ทันท่วงที

ข. ในการใช้วัคซีนแบบนี้ในท้องที่จะมีความปลอดภัยมากกว่า เพราะไม่ทำให้เกิด outbreak

ค. การผลิตวัคซีนแบบนี้ สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมาก

ข้อเสีย

ก. ให้ความคุ้มโรคได้ระยะสั้น

ข. บางกรณีพบว่าเกิด outbreak เพราะ incomplete inactivation ของไวรัส เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการ Inactivate virus มีคุณภาพไม่ดีทำให้การ inactivated virus ไม่สมบูรณ์

1.3 Sub-unit vaccine

เป็นวัคซีนที่ได้มาจากการแยกหรือสังเคราะห์ส่วนประกอบบางชนิดของเชื้อไวรัส โดยวิธีการทาง molecular biology แล้วนำมาผลิตเป็นวัคซีนต่อไป แต่วัคซีนที่ได้จากวิธีการนี้มักจะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี (low immunogenicity) และกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ระยะสั้น ดังนั้นวัคซีนชนิดนี้จึงต้องมีการกระตุ้นซ้ำ (Booster) หลายครั้ง เพื่อให้การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้ดียิ่งขึ้น

2. ประวัติและความเป็นมาของการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (21)

2.1 Schmidt Waldman vaccine

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยผลิตขึ้นใช้เมื่อปี ค.ศ. 1947 โดยการเก็บ virus fluid จากวิการของสัตว์ป่วย หรือเก็บจากเลือดของสัตว์ป่วยเมื่อเกิด Viremia เต็มที่ จากนั้นก็นำ virus fluid ที่ได้มา inactivated ด้วย formaldehyde solution และ adsorb ด้วย aluminium gel เพื่อผลิตเป็นวัคซีน

ข้อเสีย

ก. จำนวนสัตว์ป่วยจำกัด

ข. อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการแพร่กระจายของไวรัสไปยังสัตว์ที่ไม่เป็นโรคได้

2.2 Frenkel's vaccine

ในปี 1947 Frenkel ได้ปรับปรุงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยใหม่ โดยการรวบรวมเยื่อลิ้นวัวจากวัวที่ถูกฆ่าใหม่ ๆ จากโรงงานฆ่าสัตว์นำมาเพาะเชื้อไวรัสในน้ำยาเลี้ยงเยื่อลิ้น จากนั้นก็นำน้ำยาเลี้ยงเยื่อลิ้นที่มีไวรัสลอยอยู่มาผลิตเป็นวัคซีนต่อไป การผลิตวัคซีนด้วยวิธีนี้ให้ผลต่อความคุ้มโรคดีและผลิตได้รวดเร็ว ดังนั้นการผลิตวัคซีนด้วยวิธีนี้จึงเป็นที่นิยมไปเกือบทั่วโลก

ข้อเสีย

จำนวนเยื่อลิ้นที่ได้จากโรงงานฆ่าสัตว์ไม่เพียงพอ จึงทำให้ผลิตวัคซีนได้น้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการ

2.3 Tissue culture vaccine

ในปัจจุบันการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Tissue culture technique ซึ่งได้เจริญก้าวหน้ามากขึ้น โดยอาศัยการเพาะเซลล์ซึ่งอาจจะเป็น primary cell หรือการเพาะ cell line ก็ได้ แต่ที่ให้ผลผลิตได้ดีและสะดวกก็ต้องใช้ cell line เมื่อได้ปริมาณเซลล์มากเพียงพอแล้ว จึงทำการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์นั้น เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

A. Monolayer cell culture

คือการเพาะเซลล์แบบชั้นเดียว โดยการเพาะบนพื้นผิวของขวดเพาะเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นหลอดแก้ว ขวดแก้ว หลอดพลาสติก หรือขวดพลาสติก ก็ได้ และไวรัสก็จะสามารถผลิตได้จากเซลล์ที่เพาะได้จากขวดหรือหลอดเหล่านี้ และนำไวรัสที่ได้ไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป การเพาะเซลล์โดยวิธี Monolayer cell culture แบ่งออกเป็นหลายแบบ คือ

i. Stational cell culture คือการเพาะเซลล์บนขวด Raux flask เซลล์จะเจริญเติบโตบนพื้นผิวด้านหนึ่งของขวดซึ่งวางอยู่นิ่ง ๆ ที่ 37°C

ii. Rolling bottle cell culture คือการเพาะเซลล์โดยใช้ขวดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มม. สูง 500 มม. ขวดกลมขนาดอื่น ๆ หรือหลอด (Test tube) ฯลฯ เซลล์จะเจริญบนผิวขวดแก้วรอบ ๆ เนื่องจากขวดเพาะจะถูกหมุนรอบตัวตามแนวนอนด้วยความเร็วประมาณ 15 รอบ/ชั่วโมง และเพาะที่ 37°C

iii. Microcarrier cell culture method คือการเพาะเซลล์แบบ Monolayer cell culture โดยให้เซลล์เจริญเติบโตบนผิวของ beads และ beads นั้นแขวนลอยอยู่ในมีเดียที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น การเพาะเซลล์บน DEAE Sephadex A-50 beads

iv. Monolayer tissue culture fermentor (GYROGEN) คือการเพาะเซลล์แบบ Monolayer cell culture โดยใช้ fermentor ซึ่งเรียกว่า GYROGEN โดยเครื่อง fermentor นี้จะมีหลอดแก้วยื่นจากพื้นผิวของ fermentor ขึ้นมาเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และ fermentor ก็จะสามารถควบคุมอุณหภูมิ, pH, PO_2 และ ORP(Oxidation/Reduction Potential) ได้โดยอัตโนมัติ

B. Suspension cell culture method

คือการเพาะเซลล์แบบให้เซลล์แขวนลอยและเจริญเติบโตอยู่ในมีเดียที่ใช้เลี้ยงเซลล์ วิธีนี้ค้นพบโดย Capstic และคณะ (13) โดยการ adapt เซลล์จาก monolayer cell culture มาเพาะให้เป็นแบบ suspension การเพาะเซลล์แบบนี้สามารถควบคุมอุณหภูมิ, pH, PO_2, ORP ได้ และการเพาะแต่ละครั้งจะได้ปริมาณเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งขึ้นอยู่กับ fermentor ที่ใช้ในการเพาะเซลล์ในปัจจุบันนี้สามารถเพาะได้เป็นจำนวนนับพันลิตรขึ้นไป และเป็นผลให้สามารถผลิตไวรัสได้เป็นจำนวนมาก และผลิตเป็นวัคซีนได้มากเช่นกัน

2.4 Peptide vaccine (7)

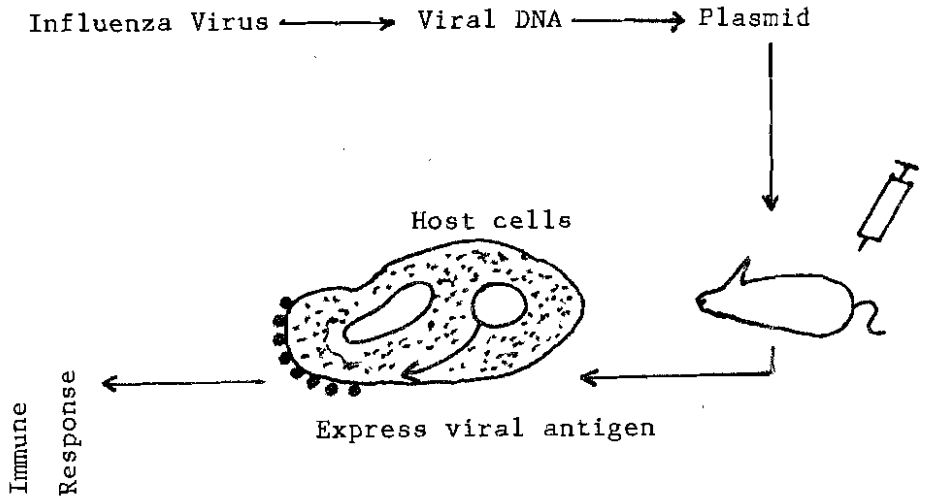
เป็นวัคซีนที่ผลิตขึ้นจากการนำ amino acid มาทำการสังเคราะห์ (synthesis) ทางเคมีให้มีการเรียงลำดับ chain ของกรด amino ให้เป็นไปตาม protein ของไวรัสในส่วนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มโรค เช่น VP1 แต่ถ้าจะให้ได้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรคได้ดี peptide chain ส่วนหนึ่งต้องไปเชื่อมต่อเข้ากับ T-cell เพราะตัว peptide เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มโรคได้ดีเท่าที่ควร ซึ่ง Wang และคณะ (30) ได้ทดลองผลิตและทดสอบการใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในสุกรที่ผลิตแบบ Peptide vaccine ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดี ข้อดีของ peptide vaccine คือ ไม่ต้องผลิตเชื้อไวรัสเพื่อใช้ในการผลิตเป็นวัคซีน ทำให้ไม่ต้องเสี่ยงต่อการ outbreak ของโรค

2.5 DNA vaccine (7)

DNA vaccine หรือ DNA vaccination เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการ คือ เมื่อนำยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนใด ๆ ที่สนใจไปต่อเชื่อมใน eukaryotic expression plasmid vector ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ยีนที่ต่อเชื่อมใน plasmid vector นั้นจะสร้างเป็น encoded protein ออกมา

ถ้าการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่เกิดขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและถ้า encoded protein นั้น ๆ มีคุณสมบัติเป็น antigenic protein ก็จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อ protein นั้น ๆ ขึ้น จากความเจริญก้าวหน้าของด้าน DNA technology ทำให้สามารถผลิตไวรัสวัคซีนสำหรับสัตว์ได้ ซึ่งกำลังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนาการผลิตไวรัสวัคซีนต่อไป

ภาพที่ 1 แสดงหลักการของวิธี DNA vaccination เพื่อป้องกัน influenza virus



บทที่ 3
อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
(Materials)

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในบทต้นว่าวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นวัคซีนที่ผลิตโดยใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เป็น active ingredient ดังนั้นจึงต้องเพาะขยายปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้ปริมาณมากเพียงพอตามความต้องการ แล้วจึงนำไปเข้าสู่ขบวนการต่าง ๆ ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

แต่การจะผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้ปริมาณมากพอนั้น จะต้องผลิตเซลล์สำหรับใช้เพาะไวรัสให้ได้มากเพียงพอก่อน จึงจะสามารถผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้มากตามที่ต้องการ ดังนั้นในบทนี้จะได้กล่าวถึงอุปกรณ์ (Materials) ที่สำคัญในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นลำดับไป

1. เซลล์ (cells)

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งการผลิตแบบ monolayer cell culture และ suspension cell culture ซึ่งเซลล์เหล่านั้นได้แก่

a. Primary cell : ได้แก่เซลล์ Swine Kidney (SK), Calf Kidney (CK), Calf thyroid (CT) ฯลฯ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะเป็นเซลล์ที่เพาะแบบ monolayer cell culture จำนวนเพียง 2-3 passage หลังจากได้ cell จาก Organ นั้น ๆ มาแล้วจะไม่สามารถเพาะได้ใน passage ที่สูงขึ้นกว่านั้น

b. Cell lines : ซึ่งมีการเพาะทั้งแบบ monolayer cell culture และ suspension cell culture

- monolayer cells ได้แก่เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$, Hmlu, PK
- Suspension cells ได้แก่เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$, $IBRS_2$, $IFFA_3$ และ Hmlu-S ฯลฯ

เซลล์เหล่านี้สามารถใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้เป็นอย่างดี แต่จะตัดสินใจใช้เซลล์ใดและวิธีการใดในการผลิตต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

ก. ความต้องการปริมาณวัคซีน เช่น ในกรณีต้องการวัคซีนจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง จะต้องผลิตโดยวิธี suspension cell culture จะทำให้สามารถผลิตไวรัสได้มากตามความต้องการ หรืออาจจะผลิตโดยวิธี monolayer cell culture ได้ในกรณีที่มีความต้องการปริมาณวัคซีนน้อยและมีความจำกัดทางด้านอุปกรณ์และกำลังทรัพย์ เนื่องจากวิธีการนี้จะลงทุนน้อยกว่าวิธี suspension cell culture

ข. ความสามารถในการผลิตไวรัสของเซลล์แต่ละชนิด กล่าวคือ cell แต่ละชนิดสามารถผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ก็จริง แต่ผลผลิต (Yield) ที่ได้อาจจะแตกต่างกัน เช่น เซลล์ชนิดหนึ่งสามารถเพาะไวรัสไทป์หนึ่งได้ แต่ไม่สามารถเพาะไวรัสอีกไทป์หนึ่งได้ หรือเซลล์ชนิดเดียวกันสามารถเพาะไวรัสได้ แต่ได้ Yield ต่ำกว่าเซลล์อีกชนิดหนึ่ง นอกจากนั้นเซลล์แต่ละชนิดเมื่อผลิตไวรัสได้แล้ว จะทำให้ไวรัสหรือ Yield ที่ได้เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปหรือไม่เหล่านี้เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควรคำนึงอย่างมาก

ค. ความเหมาะสมของมีเดียที่ใช้ในการเพาะเซลล์แต่ละชนิดใช้มีเดียในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน ซึ่งค่าใช้จ่ายในการเพาะเซลล์ก็จะแตกต่างกันไปด้วย เช่น เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ใช้มีเดีย GMS (Growth medium for suspension) ส่วนเซลล์ $IFFA_3$ ใช้มีเดีย BME (Basal medium Eagle's) นอกจากนั้นยังมีเซลล์อื่น ๆ ที่ใช้มีเดียในการเพาะแตกต่างกันไป ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 (25) ซึ่งมีเดียชนิดต่าง ๆ ก็มีราคาแตกต่างกันออกไป

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี suspension cell culture โดยใช้ cells line ได้แก่เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ และเซลล์ $IFFA_3$ ซึ่งเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ เป็นเซลล์ที่ได้จากลูกหนู Hamster อายุ 1 วัน ส่วนเซลล์ $IFFA_3$ เป็นเซลล์ที่ได้จากลูกหนู Hamster ก่อนการคลอด (22) ซึ่งการที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์เลือกใช้เซลล์ 2 ตัวนี้ เนื่องจากเพื่อเป็นการเตรียมพร้อมสำหรับ

ตารางที่ 2 การใช้มีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ

เซลล์	มีเดีย	ซีรั่ม
Fibroblast	Eagle's MEM	Calf serum
Endothelium	DMEM, M199, MEM	Calf serum
Continuous cell lines	Eagle's MEM, DMEM	Calf serum
Glial cells	MEM, DMEM/F_{12}	Fetal bovine serum
Chick embryo fibroblast	Eagle's MEM	Calf serum

ทั้งแบบ Fuchs – Rodenthal และ Spencer bright line ซึ่งนำ slide นั้นมาใส่ cell แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Haemocytometer ทั้ง 2 ชนิดนี้จะแตกต่างกันที่ความลึกของร่องเส้นบน slide ซึ่งในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ Haemocytometer ชนิด Spencer bright line เท่านั้น โดยเส้นแต่ละเส้นของ Spencer Bright line จะมีความกว้างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ถูกขีดขั้นด้วยเส้นทึบ 3 เส้น แบ่งช่องใหญ่ ๆ ออกเป็น 9 ช่อง แต่ละช่องจะมีเส้นเล็กภายในช่องอีก โดยในช่องกลางจะมี 25 ช่องเล็ก ส่วนช่องขอบทั้ง 4 มุม จะมี 16 ช่องเล็ก โดยช่องขอบทั้ง 4 มุมนี้จะเป็นตัวสำคัญในการใช้นับเซลล์

ในช่องใหญ่ที่ขอบทั้ง 4 มุม แต่ละช่องจะมีความ กว้าง x ยาว = 1 mm x 1 mm และเมื่อนำ cover glass มากดทับลงเมื่อจะมีการนับเซลล์ก็จะทำให้ด้านลึกของช่องนั้นเป็น 0.1 mm นั่นคือ ปริมาตรของของเหลว หรือเซลล์ที่จะนับ เมื่อใส่เข้าไปบน slide นี้แล้ว จะมีปริมาตรเท่ากับ 10^{-4} ml นั่นคือ

$1 \times 1 \times 0.1 = 0.1\ mm^3$

$= 0.0001\ cm^3$

$= 0.0001\ ml$

$= \frac{1}{10,000}\ ml$

$= 10^{-4}\ ml$

การนับเซลล์นั้นจะต้องนำเซลล์ที่จะนับมาทำการย้อมสีด้วยสี Trypan blue โดยการทำ dilution ต่าง ๆ แล้วแต่จำนวนเซลล์ โดยให้ dilution ของเซลล์กับสีนั้นมีค่าเท่ากับ y เซลล์ที่นับได้จากช่องทั้ง 4 มุม แต่ละช่องมีค่าเท่ากับ n ดังนั้นเซลล์ที่นับได้ทั้งหมดเท่ากับ $\frac{n \times 10^4}{4}$ ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าที่เป็น dilution ยังไม่ใช่ค่าที่แท้จริง ดังนั้นต้องนำค่า dilution มาคูณ จึงจะได้ค่าของเซลล์ต่อ ml ที่แท้จริง คือ $\frac{ny \times 10^4}{4}$ ซึ่งจากการปฏิบัติจริงของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จะทำการย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue โดยการ dilute 1 เท่า คือ ใช้เซลล์ 0.5 ml และสี 0.5 ml นั่นคือคือการ dilute 2 เท่า ดังนั้นค่า y จึงเท่ากับ 2 สมมุติว่านับเซลล์ทั้ง 4 ช่องได้จำนวนเซลล์ 35, 42, 29, 38

ดังนั้น $n = \frac{(35+42+29+38) \times 10^4}{4}$ เซลล์/ml

$= \frac{144 \times 10^4}{4}$ เซลล์/ml

แต่เซลล์ถูก dilute 2 เท่า ดังนั้นค่า y จึง = 2

ค่าเซลล์ที่แท้จริง $= \frac{144 \times 2 \times 10^4}{4}$ เซลล์/ml

$= 72 \times 10^4$ เซลล์/ml

หรือ = 7.2×10^{5} เซลล์/ml

หรือ = $.72\times10^{6}$ เซลล์/ml เป็นต้น

การนับเซลล์นี้นิยมใช้กันมากเพราะสามารถสังเกตถึงสุขภาพ หรือความสมบูรณ์ของเซลล์ที่เพาะได้ในขณะเดียวกันกับที่นับเซลล์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ก็ใช้วิธีนี้ในการนับเซลล์ โดยเซลล์ที่เพาะแบบซัสเปนชั่นนั้น สามารถทำการนับได้โดยตรงเนื่องจากเซลล์แขวนลอยอยู่ในมีเดีย ส่วนวิธี Monolayer cell culture นั้น จะต้องย่อยเซลล์ออกมาจากพื้นผิวภาชนะก่อน จึงจะนำเซลล์มานับได้

การเพาะเซลล์ต่อเนื่อง (Subculture of the cell) (26) หมายถึงการเริ่ม start การเพาะเซลล์ใหม่หลังจากการเพาะในรุ่น (passage) ที่แล้วได้เซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว เช่น ในการเพาะเซลล์แบบ monolayer cells culture โดยปกติจะเพาะ 48 ชั่วโมง ก็จะได้เซลล์เต็มพื้นผิวภาชนะที่ใช้เพาะ (100% cell sheath) เมื่อจะทำการเพาะรุ่น (passage) ต่อไปจะต้องเทมีเดียเก่าทิ้ง แล้วล้างเซลล์ที่เกาะอยู่ที่พื้นผิวภาชนะด้วย PBS (phosphate buffer solution) ที่มี 1 mM EDTA แล้วเท solution ที่ล้างออกทิ้ง จากนั้นจึงย่อยเซลล์ให้หลุดจากผิวภาชนะด้วย 0.25% trypsin เป็นจำนวนพอท่วมผิวเซลล์ ทิ้งไว้ 30 วินาที จึงเททิ้ง แล้วนำไปบ่มในตู้ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เซลล์ก็จะลอกหลุดออกจากผิวภาชนะ หลังจากนั้นจึงล้างเซลล์ให้หลุดจากผิวภาชนะทั้งหมดด้วยมีเดียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเป็นการ stop action ของ trypsin ด้วย จากนั้นจึงดูดเซลล์ที่ได้มาเก็บไว้ในขวด หรือ tube หรือ flask ขนาดเล็ก จากนั้นจึงนับเซลล์เพื่อจะคำนวณเซลล์ที่จะ start ใน passage ต่อไป โดยการแบ่งเซลล์ที่ย่อยได้นั้นมาเพาะในภาชนะที่มีมีเดียที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เซลล์ start ขนาดไม่เกิน 3 - 5 x 10^{5} cell/ml ของการเพาะในแต่ละครั้ง ส่วนเซลล์ที่เหลือก็จะทำการเก็บใน deep freezer หรือใน liquid nitrogen เพื่อการใช้งานในครั้งต่อ ๆ ไป สำหรับการย่อยเซลล์แบบ monolayer cell culture ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จะปฏิบัติแตกต่างไปเล็กน้อย คือ จะใช้ 0.125% Versene-trypsin เป็นตัวย่อยเซลล์จากพื้นผิวภาชนะและไม่มีการเททิ้ง จะ incubate 37°C 15 นาที และ stop action ของ Versene-trypsin ด้วยมีเดียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม

ส่วนการ subculture เซลล์แบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์นั้น วิธีการจะไม่ยุ่งยากเท่ากับเซลล์แบบ monolayer cell culture เพราะเป็นเพียงการแบ่งเซลล์ซัสเปนชั่นมา dilute ด้วยมีเดียที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ โดยคำนวณให้เซลล์ start ได้ 5 x 10^{5} cell/ml ก็สามารถ start cell ใน passage ใหม่ได้

Growth curve (26)

การเจริญเติบโตของเซลล์โดยเฉพาะ cell lines จะมีการเจริญเติบโตอย่างมีมาตรฐาน ซึ่งสามารถเขียนเป็นกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตได้ (standard growth curve) โดยในการเติบโตระยะแรกของการ subculture จะใช้เวลา 2-24 ชั่วโมงในการหยุดนิ่งไม่เจริญเติบโตแล้วค่อย ๆ เจริญ

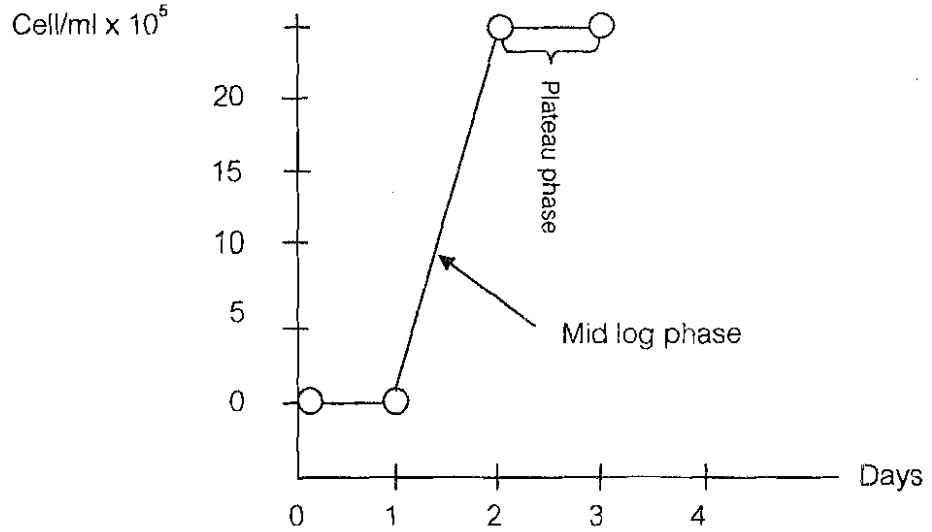
แบ่งตัวเป็น 2 เท่าในระยะกลาง ๆ จนกระทั่งเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งระยะนี้เรียกว่า "log phase" และระยะสุดท้ายเมื่อเซลล์เติบโตเต็มที่แล้วเซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต เมื่อเซลล์มารวมกันอยู่จำนวนมาก และเซลล์จะค่อย ๆ ตาย เรียกระยะนี้ว่า "plateau phase" ซึ่ง growth curve นี้จะมีประโยชน์ในการควบคุมและวางแผนการผลิตหรือเพาะเลี้ยงเซลล์แบบงานประจำต่อไป

2. มีเดีย (medium) (10)

Cell culture media จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการทดลอง หรือใน culture vessel อย่างไร และจะเพาะเลี้ยงให้ประสบผลสำเร็จได้อย่างไรนั้น จำเป็นที่จะต้องจำลองสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมือนกับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านั้นได้แก่ อุณหภูมิ, pH, Osmolarity และสารอาหาร (Nutrition) โดยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) จะเป็นตัวช่วยรักษาสภาวะแวดล้อม รวมทั้งให้สารอาหารและพลังงานที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต, การเจริญเติบโตของเซลล์ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มีองค์ประกอบต่าง ๆ ที่จำเป็น คือ กรดอะมิโน, วิตามิน, เกลือแร่ และแหล่งพลังงาน

เกลือที่ประกอบอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) จะทำหน้าที่เป็น physiological หรือ balanced salt solution ซึ่งมีหน้าที่ maintain pH, Osmotic pressure รวมทั้งเป็น enzyme cofactor ของแหล่งพลังให้แก่เซลล์ โดยทั่วไปใช้ sodium bicarbonate (HCO_3^-) โดยจะไปรวมกับ CO_2 ที่เซลล์ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต (metabolic by-product) อย่างไรก็ตามถ้าความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง log phase ก็จะผลิต CO_2 ได้ไม่เพียงพอที่จะรักษา pH ให้เหมาะสมได้ สามารถแก้ปัญหาได้โดยใช้ CO_2 mixture (O_2+CO_2) ประมาณ 5-10% เป็นตัวปรับระดับ pH ให้เหมาะได้

ภาพที่ 3 แสดง standard growth curve ของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$



Balanced salt solution แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1 ชนิดที่ใช้ปรับความสมดุลย์ด้วยอากาศอย่างเดียวในระบบการเพาะเลี้ยงแบบปิด และเป็นมีเดียชนิดที่ใช้ HCO_3^- ในความเข้มข้นระดับไม่สูงมาก เช่น Hank's balanced salt solution

2.2 ชนิดที่ปรับความสมดุลย์ด้วย O_2+CO_2 (5-10%) และเป็นมีเดียที่ใช้ HCO_3^- ในความเข้มข้นระดับสูง เช่น Earl's balanced salt solution

Earl's balanced salt solution เป็น solution ที่ดีที่สุดในการผสมมีเดียที่ใช้ในเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากจะมีความเข้มข้นของ Sodium bicarbonate ในระดับสูง แต่ในการใช้เพาะเซลล์จะมีความยุ่งยากเพิ่มขึ้นกว่าปกติเล็กน้อย กล่าวคือจะต้องใช้อากาศผสม CO_2 5% เป็นตัวปรับสมดุลย์ของ pH ในระหว่างเพาะเซลล์ ถ้าไม่มีการใช้จะทำให้ pH ของมีเดียที่กำลังเพาะเลี้ยงเซลล์มี pH เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้ pH ที่เพิ่มขึ้นนั้นไปขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์ได้

สูตรมีเดียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยพื้นฐาน ควรจะประกอบด้วย

a. Balanced salt solution (Earl's or Hank)
b. Carbohydrate source : glucose
c. Amino acids
d. Vitamins
e. Biological additive
f. Antibiotics
g. Serum
h. Indicator : phenol red
i. Water

Balance salt solution ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น กรณีของ Hank's และ Earl's balanced salt solution ถ้าหากใช้เดี่ยว ๆ จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะสั้น แต่ถ้าจะเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาวและต่อเนื่อง ต้องผสมกับส่วนประกอบอื่น ๆ ตามสูตรพื้นฐาน

นอกจากนี้ยังมี inorganic ion ที่จำเป็น ซึ่งผสมอยู่ในมีเดียเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้แก่

Sodium (Na^+)	Chloride (Cl^-)
Potassium (K^+)	Phosphate ($PO_4^=$)
Calcium (Ca^{++})	Carbonate ($CO_3^=$)
Magnesium (Mg^{++})	

โดย Potassium มีความสำคัญในการ maintain osmotic pressure, Calcium และ Magnesium มีความจำเป็นต่อการเกาะและยึดตัวของเซลล์ต่อพื้นผิวภาชนะที่เพาะเลี้ยง, bicarbonate มีคุณสมบัติเป็น buffering substance เช่นเดียวกับ phosphate และ phosphate ยังเป็นสารจำเป็นต่อ metabolism ของเซลล์ด้วย

Carbohydrate Source Carbohydrate เป็นตัวสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ที่เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปจะใช้ glucose แต่ก็มีอยู่บ้างในบางกรณีที่ใช้ lactate และ pyruvate แทน แต่พบน้อยมาก

Amino acids amino acid เป็นตัวสำคัญที่จำเป็นจะต้องใส่ในมีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ เพราะจะเป็นตัวสร้าง protein และ synthesis nucleic acid (DNA และ RNA) ของเซลล์ โดยปกติ cell จะสามารถสร้าง amino acid เองได้เป็นบางตัว แต่ก็มีหลายตัวที่ไม่สามารถสร้างได้ แต่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงต้องมีการเติมเข้าไปในมีเดียที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่ง amino acid เหล่านั้นได้แก่

Arginine	Methionine
Cystine	Phenylalanine
Histidine	Threonine
Isoleucine	Tryptophan
Leucine	Tyrosine
Lysine	Valine

นอกเหนือจาก amino acid ทั้ง 12 ตัวนี้แล้ว จะยังมี Glutamine อีกตัวหนึ่งที่จะขาดไม่ได้ และยังมีตัวอื่น ๆ อีกหลายตัวที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยง นอกจากนั้นโดยปกติ amino acid จะมี L และ D isomers แต่ในการเจริญเติบโตของเซลล์จะใช้ L-isomers ของ amino acid ในการเตรียมมีเดียเพาะเลี้ยง เพราะถ้าใช้ D-Isomers แล้วจะไปขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ใช้ L-Glutamine, L-Arginine, L-Isoleucine, L-Valine ฯลฯ

Vitamins วิตามินที่ใช้ผสมในมีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของวิตามิน B ซึ่งละลายในน้ำ และจะทำหน้าที่เป็น Coenzyme ในการ methabolism ของเซลล์ ซึ่งวิตามินเหล่านั้นได้แก่

Choline	Pyridoxal
Folic acid	Riboflavin
Nicotinamide	Thiamine
Pantothenic acid	Inositol

นอกจากนี้ยังมีวิตามินตัวอื่น ๆ ที่อาจจะเติมลงไปในบางครั้งสำหรับการเพาะเซลล์เฉพาะ เช่น Biotin, p-Aminobenzoic, Ascorbic acid ฯ และในมีเดียที่ไม่มีซีรั่มเป็นส่วนผสมจำเป็นจะต้องเติมวิตามินที่ละลายในน้ำมันลงไป เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย

Minimal Essential Medium (MEM) เป็นมีเดียที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยสารที่ใช้ในการดำรงชีวิตของเซลล์เป็นอย่างต่ำ ต้องประกอบด้วย Balanced salt solution (BSS), essential amino acids, vitamins และมีส่วนประกอบอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น amino acid หรือวิตามินที่จำเป็น, Co-enzyme, reducing agent, hormone และซีรั่มเป็นต้น

Maintenance medium (MM) เป็นมีเดียที่ดัดแปลงมาจาก MEM ใช้สำหรับการเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตอยู่ได้นาน (maintain) โดยเซลล์มี metabolism น้อย อาจจะเก็บไว้หลายวันหรือหลายสัปดาห์ โดยปกติจะไม่ผสมซีรั่มหรืออาจมีผสมแต่ไม่เกิน 2%

Growth medium (GM หรือ GMS = Growth medium for suspension) เป็นมีเดียที่ดัดแปลงมาจาก MEM เช่นกัน ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวอย่างเต็มที่ และเพื่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยปกติจะมีการผสมซีรั่มด้วย เช่น พยนต์ และคณะ (2534) ได้ทดลองเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบซัสเปนชั่นด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (5) แต่ก็มีบางเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในมีเดียที่ไม่ต้องผสมซีรั่ม

ซีรั่ม (Serum) โดยปกติจะมีซีรั่มจำนวนหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ผสมในมีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น ซีรั่มมนุษย์, ซีรั่มม้า, ซีรั่มกระต่าย, ซีรั่มโค-กระบือ ซึ่งซีรั่มเหล่านั้นจะนำมาจากคนหรือสัตว์ที่มีอายุน้อย เพราะจะช่วยให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีขึ้น

Serum ที่นำมาจากสัตว์โดยทั่วไปจะมีสารต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น inhibitors, toxin, antibodies, หรือ infectious agents ดังนั้นจึงนิยมใช้ซีรั่มจากสัตว์อายุน้อยเนื่องจากจะมีสารเหล่านี้น้อย แต่ถ้าหากจำเป็นจะต้องใช้ซีรั่มที่มีสารเหล่านี้ปนอยู่จะต้องทำการกำจัดออกเสียก่อน เพื่อป้องกันการมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น การใช้ PEG 8% (Polyethylene glycol 8%) treated ก่อนนำไปใช้ (5)

Other nutrients นอกจากสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีสารที่เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อีกหลายชนิดที่จำเป็นจะต้องผสมลงไปในมีเดียที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ Lactabumine hydrolysate, Tryptose phosphate broth (TPB), Meat extract, Yeast extract ฯ

Antibiotics ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ถ้าหากปฏิบัติการตามแบบ aseptic technique เป็นอย่างดี ก็ไม่จำเป็นจะต้องใช้ antibiotic แต่อย่างใด เพราะ antibiotic ที่ใช้เป็นเพียงเพื่อป้องกันการ contamination ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ไม่ได้จำเป็นต่อการ metabolism ของเซลล์เลย

ซึ่ง antibiotic ที่ใช้ก็มีหลายตัว เช่น Ampicillin, Erythromycin, Gentamycin, Ganamycin, Neomycin, Polymyxin B, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B, Nystatin และ Tetracycline ฯลฯ

สูตรมิเดียพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส เพื่อการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

(10 x Cons) Stock Earl's BSS without $NaHCO_3$ (1 L.)

NaCl	51.2	gm
$CaCl_2$	0.6	gm
KCl	3.2	gm
$MgSO_4 . 7H_2O$	1.6	gm
$NaH_2PO_4 . 7H_2O$ ($NaH_2PO_4 .2H_2O$)	1.0	gm (1.12 gm)
Glucose	36.0	gm
Phenol red	15	ml
0.1% $Fe(NO3)_3 . 9H_2O$	0.5	ml
Chloroform	2	ml
Keep at	4	°C

0.1% $Fe(NO_3)_3 . 9H_2O$

$Fe(NO_3)_3 . 9H_2O$	100	mg
Distilled water	100	ml

Distribute into 2.5 ml tubes and keep at -20°C

Hank's solution (10 L)

	GM		MM	
$Na_2 HPO_4$ (anhy.)	0.54	gm	0.6	gm
KH_2PO_4	0.54	gm	0.6	gm
KCl	3.6	gm	4.0	gm
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.9	gm	1.0	gm
$MgCl_4 . 6H_2O$	0.9	gm	1.0	gm
NaCl	72.0	gm	80.0	gm
$CaCl_2$ (anhy.)	1.26	gm	1.4	gm

(ต่อ)

Glucose	9.04	gm	10.04	gm
$NaHCO_3$	6.2	gm	13.89	gm
Lactalbumine hydrolysate	50.0	gm	55.5	gm
Yeast extract	5.0	gm	5.5	gm
Neomycin	1.0	gm	1.1	gm
Streptomycin	1.0	gm	1.1	gm
Phenol red 0.1%	50.9	ml	55.5	ml
Serum	1	L	-	-
Distilled water make up to	10	L	10	L
pH (adjust by 1N NaOH, or 1N HCL)	7.2		7.4	

(10 x Conc.) Concentrated amino acids solution (5 L)

L-Argenine	4.20	gm
L-Histidine	1.92	gm
L-Isoleucine	5.24	gm
L-Leucine	5.24	gm
L-Lysine HCl	7.31	gm
L-Cystine	2.40	gm
L-Phenylalamine	3.30	gm
L-Threonine	4.75	gm
L-Tryptophan	0.80	gm
L-Tyrosine	3.62	gm
L-Valine	4.68	gm
L-Methionine	1.50	gm
Inositol	0.35	gm
0.1% phenol red solution	4.0	ml

Remarks

- L-Cystine จะต้องละลายใน 1N NaOH Solution (25 ml) ก่อน จึงนำไปผสมกับตัวอื่น ๆ
- L-Tyrosine จะต้องละลายใน 1N NaOH (40 ml) ก่อนนำไปผสมกับตัวอื่น ๆ
- Inositol จะต้องละลายใน 1N NaOH (3 ml) ก่อนนำไปผสมกับตัวอื่น ๆ
- สารตัวอื่น ๆ นอกจาก 3 ตัวข้างบน ต้องละลายในน้ำกลั่น 2 ลิตร 60°C ก่อนผสมกับตัวอื่น ๆ

Make up to 5 L with distilled water and adjust pH to 7.1-7.2 by 1N HCl solution distributed to 1 L bottles and stored at -20°C

(125 x Conc.) Concentrated vitamin solution (2 L)

Choline chloride	1.0	gm	- Folicacid จะต้องละลายใน 1N NaOH
Folic acid	1.0	gm	(30 ml) ก่อนผสมตัวอื่น ๆ
Nicotinamide	1.0	gm	- Riboflavin ต้องละลายใน 1N NaOH
DL-pantothenic acid	1.0	gm	(10 ml) ก่อนผสมกับตัวอื่น ๆ
Pyridoxal HCl	1.0	gm	- ตัวอื่น ๆ ละลายในน้ำ 1.5 ลิตร ก่อนผสมรวม
Thiamine HCl	1.0	gm	กับตัวอื่น ๆ
Riboflavin	0.1	gm	

Make up to 2 L and adjust pH to 7.1-7.2 by 1N HCl, stored at -20°C

0.1% Phenol Red (300 ml)

Phenol red	300.0	mg
0.1N NaOH	8.40	mg

Distilled water make up to 300 ml and stored at 4°C

Complete growth media for $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell culture (GMS) (10 L)

10 x Conc. Stock Earl's BSS	1	L
125 x Conc. Vitamin solution	37.5	ml
10 x Conc. Amino acid solution	200.0	ml
L-Glutamine	2.4	gm
$NaHCO_3$	24.0	gm
Tryptose phosphate broth	20.0	gm
Lactalbumine hydrolysate	25.0	gm
Bacto peptone (Meat peptone)	10.0	gm
Kanamycin (Penicillin)	½ veal (0.62	gm)
Streptomycin	1	gm
Bovine serum	0.5	L
Distilled water make up to	10	L

Growth media for $IFFA_3$ suspension cell culture (BME) (10 L) (27)

Phase 1		
NaCl	68.0	gm
KCl	4.0	gm
$MgCl_2 . 6H_2O$	1.70	gm
$CaCl_2 . 2H_2O$	2.65	gm
D-glucose (anh.)	1.0	gm
L-Glutamine	0.30	gm
Penicillin G	1.20	gm
Dihydrostreptomycin	0.05	gm
Phase 2		
$NaH_2PO_4 . 2H_2O$	1.58	gm
Phase 3		
L-Arginine	0.2	gm
L-Cystine	0.12	gm
L-Histidine	0.08	gm
L-Isoleucine	0.06	gm
L-Leucine	0.26	gm
L-Lysine (HCl)	0.37	gm
L-Methionine	0.08	gm
L-Phenylalanine	0.17	gm
L-Threonine	0.24	gm
L-Tryptophan	0.04	gm
L-Tyrosine	0.18	gm
L-Valine	0.24	gm
Phase 4		
Folic acid	0.01	gm
D-Biotin	0.04	gm
Nicotinamide	0.01	gm
Calcium pantothenate	0.01	gm

- Phase 2 ละลาย ใน distilled water ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร มีน้ำ 200 ml แล้วปั่นด้วย Magnetic stirrer ก่อนกากรผสมกับตัวอื่น ๆ
- Phase 3 ละลายใน 1N HCl 200 ml ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ปั่นด้วย magnetic stirrer ก่อนการผสมกับตัวอื่น ๆ
- การผสมให้ผสมตั้งแต่ Phase 1-6 ตามลำดับ โดยผสมในขวด 20 ลิตร มี distilled water 7 ลิตร และปั่นด้วย magnetic stirrer เมื่อละลายหมดแล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 10 ลิตรด้วย distilled water ปรับ pH ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl เป็น 6.8 ± 0.5

(ต่อ)

Pyridoxal HCl	0.01	gm
Thiamine HCl	0.01	gm
Riboflavine	0.001	gm
Choline chloride	0.01	gm
Inositol	0.02	gm
Phase 5		
Meat peptone	20.0	gm
Yeast extract	10.0	gm
Phase 6		
$NaHCO_3$	20.50	gm

Maintenance medium for suspension cell culture (Van Bekkum medium) (10 L) (27)

Phase 1		
NaCl	74.80	gm
Phase 2		
KCl	1.90	gm
D-glucose (anh.)	18.80	gm
$NaH_2PO_4 . 2H_2O$	0.475	gm
$NaHCO_3$	16.80	gm
Methanesulphonate colymycin	0.375	gm
Phase 3		
$CaCl_2 . 2H_2O$	2.38	gm
$MgCl_2 . 6H_20$	0.95	gm
Phase 4		
Meat peptone	30.0	gm
Lactalbumin hydrolysate	40.0	gm
Phase 5		
Flumequine	0.50	gm

- Phase 3 จะต้องละลายด้วย distilled water 200 ml ในขวดแก้ว 1 ลิตร ปั่นด้วย Magnetic stirrer ก่อนการผสมกับตัวอื่น ๆ
- Phase 5 ต้องละลายใน 1N NaOH 200 ml ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ปั่นด้วย magnetic Stirrer ก่อนการผสมกับตัวอื่น ๆ
- การผสมให้ผสมตั้งแต่ Phase 1-5 ตามลำดับ ในขวดแก้ว 20 ลิตร ที่มี distilled water จำนวน 7 ลิตร และปั่นด้วย magnetic stirrer เมื่อละลายหมดแล้วจึงปรับปริมาตรด้วย Distilled water และปรับ pH ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl เป็น 7.3 ± 0.1

(10 x Conc.) PBS (Ca, Mg free)

Na_2HPO_4	11.4	gm
KH_2PO_4	2.0	gm
KCl	2.0	gm
NaCl	80.0	gm
Distilled water make up to	10.0	L

Distribute to 1 L bottle and sterilized by autoclave at 121°C for 15 minutes and keep at 4°C

1% Trypsin

Trypsin	1.0	gm
PBS	100.0	ml

Filtration 0.2 μ and keep at -20°C

1% Versine

Versine	1.0	gm
PBS	100.0	ml

Sterilized by autoclave 121°C 15 minutes and keep at 4°C

0.1% versine-Trypsin (VT)

1% Trypsin	12.5	ml
1% versine	2.5	ml
PBS	85.0	ml

รวม 100 ml ใช้ทันทีหลังการผสม

Trypan blue (stock solution)

Trypan blue	2.5	gm
PBS	100.0	ml

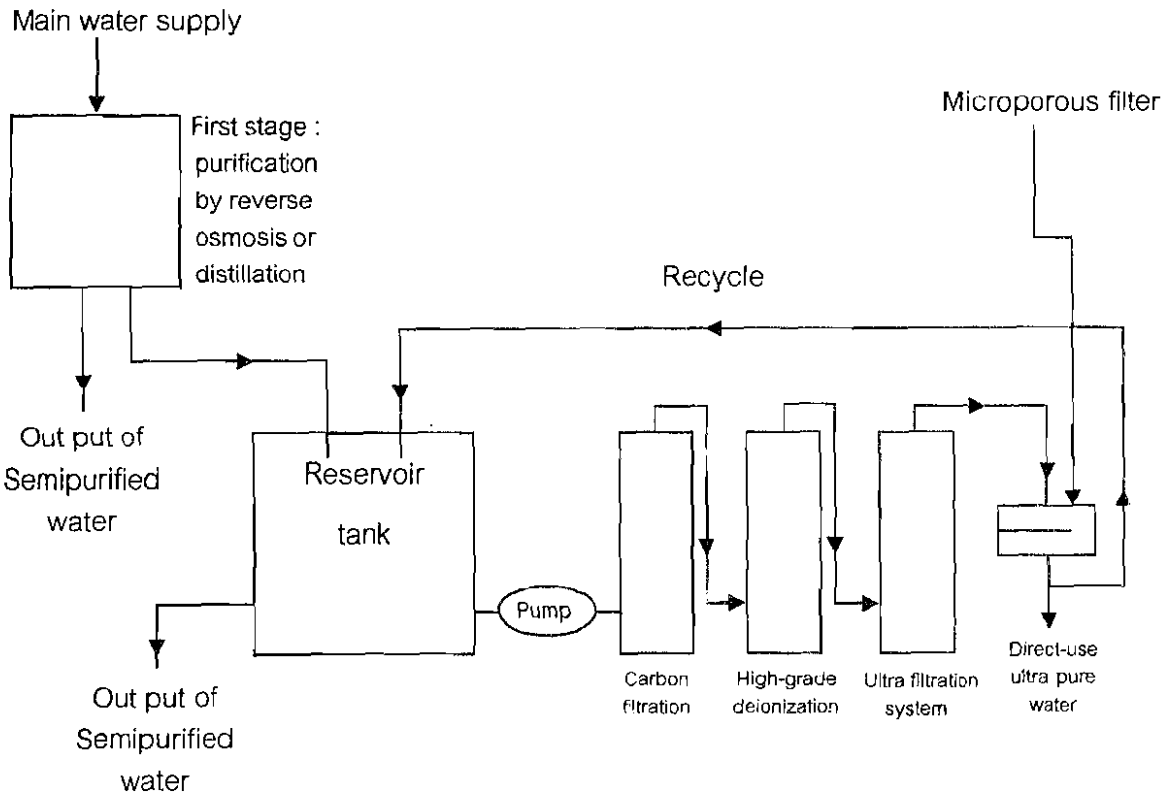
เมื่อจะใช้งานให้เจือจางด้วย PBS 20 เท่า

น้ำ (Water) สำหรับน้ำ Ultrapure water (UPW) ที่มีความบริสุทธิ์สูง จะต้องประกอบด้วยขั้นตอนของการผลิตน้ำบริสุทธิ์ทั้งหมดประกอบกัน จึงจะได้น้ำ Ultrapure water มาใช้ประโยชน์ในการเตรียมมีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป (25) น้ำที่ใช้ในการผสมมีเดียสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ จะต้องเป็นน้ำ

บริสุทธิ์ไม่มี toxin, endotoxin, ion ต่าง ๆ ปะปนอยู่ (Pyrogen free) ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำกลั่น, Deionized water (DW), Reverse Osmosis (RO) และ Ultrapure water (UPW) นอกจากนั้นระบบการส่งน้ำบริสุทธิ์ควรเป็นท่อที่ทำจากแก้ว Borosilicate หรือ silicone rubber และการเก็บน้ำบริสุทธิ์ไม่ควรเก็บในถังขนาดใหญ่ เนื่องจากมักเกิดการ contaminated ด้วย Psuedomonas species

การผลิตน้ำ Ultra pure water มีการผลิตเป็น 4 ระยะ โดยเริ่มต้นด้วยการผลิตน้ำบริสุทธิ์โดยระบบ Reverse Osmosis หรือ Distilled water แล้วแต่ความเหมาะสมและงบประมาณ เนื่องจากระบบ distilled water จะมีราคาแพงกว่าระบบ Reverse Osmosis เมื่อผลิตน้ำบริสุทธิ์ระยะแรกได้แล้วจะเก็บไว้ในถังเก็บขนาดใหญ่ เมื่อจะใช้งานจึงจะทำการผลิตในระยะที่ 2, ระยะที่ 3 และระยะที่ 4 เพื่อนำไปใช้งานทันที โดยในระยะที่ 2 จะผ่านระบบการกรองด้วย carbon filtration เพื่อขจัด organic และ inorganic colloid แล้วเข้าสู่ระยะที่ 3 เข้าสู่ระบบ High-grade mixed-bed deionization และในระยะสุดท้ายระยะที่ 4 จะผ่านเข้าสู่ระบบการกรองด้วย micropore filtration เพื่อขจัด microcrganism ต่าง ๆ ที่หลงเหลือมาจาก 3 ระยะแรก จากนั้นจึงนำน้ำที่ผลิตได้ในระยะที่ 4 (Ultrapure water) ไปใช้ทันที ส่วนในกรณีที่ไม่ได้ใช้ทันทีจะต้องมีการ circulate น้ำกลับไปเก็บยังถังเก็บ (Reservoir) เนื่องจากน้ำ ultrapure ที่ไม่ได้ใช้ทันทีจะทำให้ค่าความบริสุทธิ์ลดลง ส่วนน้ำในถัง purify water นั้นสามารถนำไปใช้งานได้ โดยใช้ประโยชน์เป็นน้ำล้างเครื่องอุปกรณ์

ภาพที่ 4 ระบบ Ultrapure water



จากไวรัสจากการเกิดการระบาดในท้องที่ และมีคุณสมบัติในการให้ความคุ้มต่อโรคได้กว้างขวางทั้งประเทศ หรือต้องเลือกหา seed virus ที่เป็น homologous ต่อเชื้อที่กำลังระบาดอยู่ในขณะนั้น ๆ ดังตัวอย่างของร่มพฤกษ์ อุดล และสมใจ กมลศิริพิชัยพร (6) ได้ทดลองหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี (r-value) ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ในการผลิตวัคซีน (ไทป์โอ) กับเชื้อไวรัสที่กำลังระบาดอยู่ในท้องที่ ว่ามีความสัมพันธ์กัน และให้ความคุ้มเมื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนหรือไม่

การนำเชื้อจากท้องที่มาใช้เป็น seed virus เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนนั้น จะต้องนำมา passage ลงในสัตว์ เช่น โค กระบือ หรือสุกร ก่อนที่จะนำมาเพาะในเซลล์ เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้ได้มาก ๆ แล้วจึงเก็บไว้เป็น stock ใน -80°C กรณีเก็บไม่เกิน 2 ปี หรือเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวกรณีเก็บไว้นานเกิน 2 ปี

ไวรัสที่ได้จากการ passage ในสัตว์แล้วจะต้องนำมา adapt ลงเซลล์ โดยคัดเลือกเซลล์ว่าจะใช้เซลล์ใดที่ให้ yield สูง และไวรัสที่ผลิตได้จากเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยา ซึ่งทั้งนี้ไวรัสที่จะนำมาใช้ในการผลิตเป็นวัคซีนนั้น ควรจะผ่านในเซลล์ใน passage ต่ำ ๆ เช่น ไม่เกิน 9-10 passage เพราะถ้า passage สูงกว่านี้ ไวรัสจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยามากจะไม่ให้ความคุ้มต่อโรคที่ระบาดอยู่ในขณะนั้น เมื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน

4. อุปกรณ์เครื่องมืออื่น ๆ ในการผลิต (equipments)

ในการเพาะเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น มีเครื่องมือ อุปกรณ์ (equipments) หลายชนิดที่ใช้ในการเพาะ เช่น แบบ monolayer cell culture ก็จะมี Roux flask, Roller bottle รวมกระทั่งถึง glass bead bioreactor (11) นอกจากนี้ยังมีขวดแก้วเพาะเซลล์ซัสเปนชั่นแบบต่าง ๆ เช่น ขวด Belco and wheaton spiner flask (11) รวมถึงถัง fermentor ขนาดต่าง ๆ ซึ่งสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์มีถัง fermentor ขนาดใหญ่ที่สุดปริมาณ 5,000 ลิตร

เครื่องมืออุปกรณ์สำหรับการเพาะเซลล์แบบ Roller

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์แต่เดิมก่อนมีการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์แบบซัสเปนชั่นนั้น มีการผลิตจากเซลล์แบบโรลเลอร์มาก่อน แต่ในปัจจุบันได้หยุดการผลิตแล้ว จะทำการผลิตเพียงเฉพาะเพื่อการทดสอบ หรือการ adapt seed virus เท่านั้น แต่จะกล่าวถึงในที่นี้พอเป็นสังเขป

ขวดแก้ว มีอยู่หลายชนิดทั้งชนิด soft glass เช่น Soda glass, flint glass และ hard glass ได้แก่แก้วที่ทำจาก borosilicate glass ขวดที่ทำจาก Soda glass จะมีราคาถูก จึงสามารถใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้งได้ ในขณะที่ขวดที่ทำจาก flint glass จะแข็งกว่า Soda glass เล็กน้อย จึงสามารถใช้ได้หลายครั้ง ส่วนขวดที่ผลิตจากแก้ว borosilicate จะแข็งที่สุดและใช้ได้ทนทานที่สุด

การ sterile เครื่องแก้วในการเพาะเซลล์นั้น sterile ด้วย autoclave ส่วนการ sterile ถัง fermentor นั้น sterile โดยการผ่านไอน้ำเข้าไปในถังและ jacket ของ fermentor นั้น ๆ ตามขบวนการ sterile ของ fermentor แต่ละยี่ห้อ ซึ่งโดยรวมแล้วคือการ sterile ด้วยไอน้ำที่ 121°C ความดัน 1.5 bar เป็นเวลา 40-60 นาที

ตารางที่ 3 วิธีการ sterilization เครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ

รายการ	วิธีการ sterilization
Ampoule for freezer, glass	dry heat
Ampoule for freezer, plastic	Autoclave
Filter, reusable	Autoclave
Glassware	Autoclave
Glass bottle with screw cap	Autoclave
Glass syringe	Autoclave
Instrument	dry heat
Magnetic stirrer bar	dry heat
Pasteur pipette, glass	dry heat
Pipette, glass	Autoclave
Polycarbonate, bottles, tubes	Autoclave
Screw cap	Autoclave
Silicone tubing	Autoclave
Stopper rubber and silicone	Autoclave
Test tube, glass	dry heat

ตารางที่ 4 วิธีการ sterilization มีเดียและน้ำ

Solution	Sterilization	Storage
Agar	Autoclave, Boil	Room temperature
Amino acid	Filter	4°C
Antibiotics	Filter	-20°C
Bacto-peptone	Autoclave	Room temperature
Bovine serum albumin	Filter	4°C, 20°C
Collaginase	Filter	-20°C
DMSO	Self-sterilizing	Dark room temperature

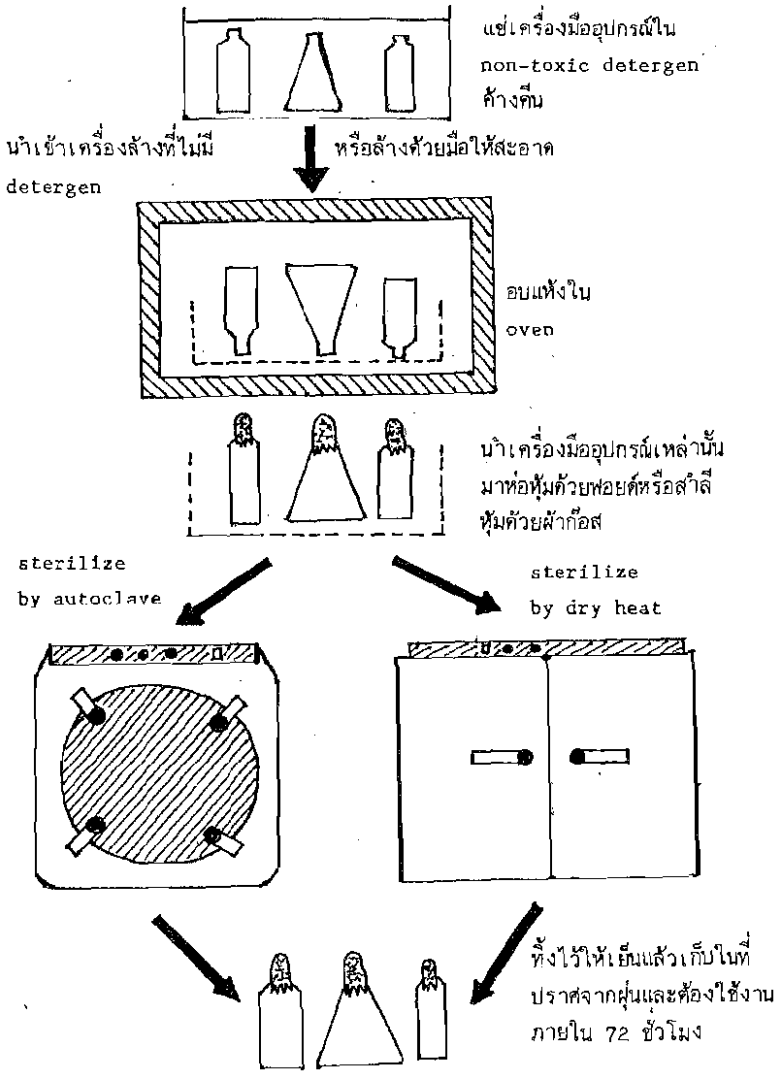
Solution	Sterilization	Storage
EDTA	Autoclave	Room temperature
Glucose 20%	Autoclave	Room temperature
Glucose 1-2%	Filter	Room temperature
Glutamine	Filter	-20°C
Glycocol	Autoclave	Room temperature
Growth factors	Filter	-20°C
1N HCl	Filter	Room temperature
Lactalbumin hydrolysate	Autoclave	Room temperature
1N NaOH	Filter	Room temperature
Phenol red	Autoclave	Room temperature
Salt solution (without glucose)	Autoclave	Room temperature
Serum	Filter	-20°C
Tryptose	Autoclave	Room temperature
Trypsin	Filter	-20°C
Vitamins	Filter	-20°C
Water	Autoclave	Room temperature

การ sterilization เครื่องมืออุปกรณ์ขนาดใหญ่

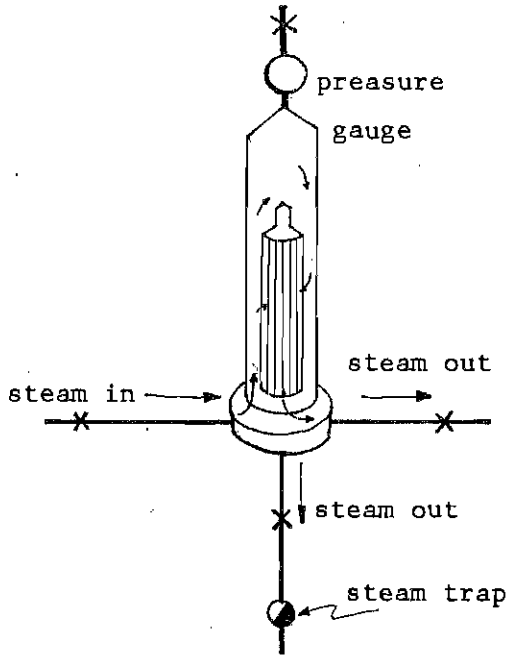
ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเกี่ยวกับการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilization) เครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น autoclave, dry heat และ filtration โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ autoclave และ dry heat นั้น จะเป็นการ sterilized เฉพาะเครื่องมืออุปกรณ์ขนาดเล็กที่สามารถนำเข้าไปทำการ sterilized ในเครื่อง autoclave หรือเครื่อง dry heat ได้เท่านั้น เช่น เครื่องแก้ว, เครื่องพลาสติก, ท่อยาง silicone, ท่อ stainless ขนาดเล็ก, เครื่องกรองขนาดเล็ก เช่น disc filter หรือกรองอากาศขนาดเล็ก เหล่านี้เป็นต้น (ภาพที่ 7) แต่การ sterilized เครื่องมืออุปกรณ์ขนาดใหญ่ เช่น sheet filter, Cartridge filter, fermentor ขนาดต่าง ๆ, เครื่องมือการ Clarify และ purify เช่น Continuous Centrifuge, Carbon Ceramic Ultrafiltration และถังต่าง ๆ ที่ใช้ในขบวนการผลิตเซลล์ไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ฯ ซึ่งเครื่องมืออุปกรณ์เหล่านี้จำเป็นต้อง sterile ด้วยการผ่าน Clean steam (ไอน้ำสะอาดที่ผลิตจากน้ำ deionized water) เข้าไปในเครื่องและสามารถควบคุมอุณหภูมิและความดันให้คงสภาพ

ได้ที่ 121°C และ 1.5 bar เป็นเวลาประมาณ 40-60 นาที ทั้งนี้ clean steam ที่ผ่านเข้าไปในเครื่อง (ถัง) จะต้องผ่านออกจากเครื่อง โดยไม่มีการกลายเป็นน้ำขังอยู่ภายในเครื่อง (ถัง) โดยการใช้ steam trap ช่วยป้องกันการ condense ของไอน้ำ ซึ่งจะทำให้สามารถรักษาอุณหภูมิและความดันให้คงที่ได้ตลอดเวลา ดังแสดงในภาพที่ 8 และภาพที่ 9

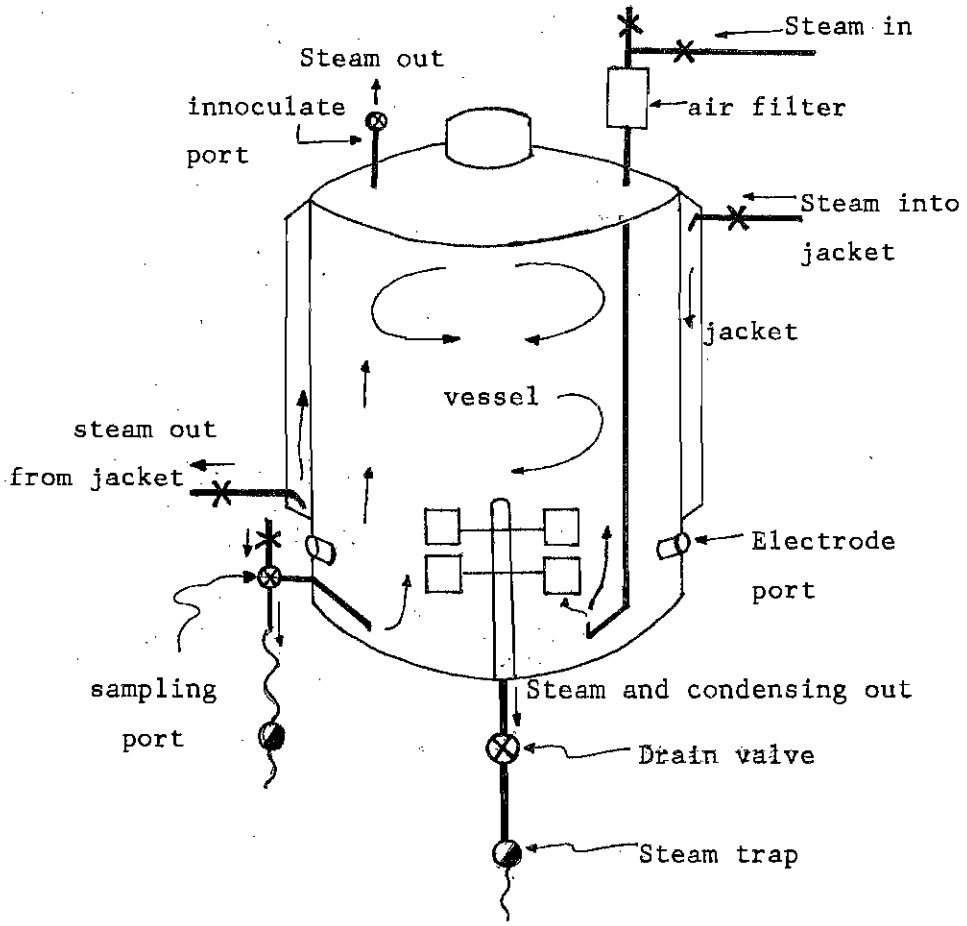
ภาพที่ 7 แสดงการล้างทำความสะอาดเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เป็นเครื่องแก้ว, Plastic, ท่อ silicone ท่อเหล็กขนาดเล็ก, Cap ฯลฯ ด้วย autoclave 121°C อย่างน้อย 20 นาที, dry heat 160°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง (25)



ภาพที่ 8 แสดงการผ่าน clean steam เข้าสู่เครื่องกรองแบบ Cartridge เพื่อ sterilize ก่อนการใช้กรองมีเดีย



ภาพที่ 9 แสดงการ sterilize ถัง fermentor



การกรอง (Filtration)

การกรองเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตวัคซีน เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับระบบการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซึ่งมีกลไก 3 แบบ ในการดักสิ่งปนเปื้อนที่มีขนาดใหญ่หรือเล็กกว่า pore size นอกจากนี้วัสดุที่ทำเป็นตัวกรองมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ หรือไม่ชอบน้ำ และตัวกรองยังแบ่งตามความหนาบางเป็น Depth หรือ Membrane Filter การทดสอบตัวกรองเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการกรอง

เทคโนโลยีการกรอง (Filtration Technology) เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับระบบการกำจัดสิ่งปนเปื้อน (contaminants) ด้วยวิธีการกรอง (filtration) ซึ่งถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภท โดยการกรองเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการผลิต อุตสาหกรรมที่ใช้เทคโนโลยีการกรองในการผลิตได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Food and Beverage Industry) อุตสาหกรรมอิเลคโทรนิค (Electronic Industry) อุตสาหกรรมเภสัช (Pharmaceutical Industry) รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนต่าง ๆ เป็นต้น การกรองในกระบวนการผลิตนี้เรียกว่า process filtration ซึ่งมีวัตถุประสงค์เหมือนกับการกรองอื่น ๆ ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนชนิดต่าง ๆ ออกจากของเหลว อากาศ หรือก๊าซชนิดต่าง ๆ ให้หมดไป หรือเหลือน้อยที่สุดเท่าที่สามารถทำได้ สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้อาจเป็นอนุภาค (particles) หรือโมเลกุลของสาร รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น ยีสต์ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และมัยโคพลาสม่า เป็นต้น ขนาดของสิ่งปนเปื้อนแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ดังนั้นในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้จึงต้องมีระบบการกรองที่แตกต่างกันหลายระดับเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ Clarification filtration, Microfiltration, Ultrafiltration และ Reverse osmosis สำหรับวัสดุที่ใช้ทำเป็นตัวกรอง (filter media) ของแผ่นกรอง (disc and sheet) และไส้กรอง (cartridge) นั้นมีหลายชนิด เช่น Nylon, Polysulfone, Polyethersulfone, Polyvinylidene Fluoride (PVDF), Polytetrafluoroethylene (PTFE), Cellulose ฯลฯ (11) วัสดุเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติเหมือนกัน คล้ายกันหรือแตกต่างกันในด้านต่าง ๆ เช่น charge, chemical compatibility, protein adsorption (protein binding), heat resistant และคุณสมบัติอื่น ๆ ดังนั้นผู้ใช้จึงควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับพื้นฐานการกรองเป็นอย่างดี จึงจะสามารถเลือกวัสดุและขนาดของตัวกรอง (sheet, disc or cartridge) ขนาด pore size และระบบการกรองได้เหมาะสมกับงาน ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามต้องการ

กลไกในการกรอง (Filtration Mechanisms) สิ่งแรกเกี่ยวกับการกรองที่ทุกคนควรทราบคือ ขนาดของสิ่งปนเปื้อน (contaminants size) ชนิดต่าง ๆ ว่ามีขนาดเล็กใหญ่เพียงใด เพื่อที่จะได้เลือกระบบการกรองได้ถูกต้อง ขนาดของสิ่งปนเปื้อนมีหน่วยเป็น micron (micrometer or μm) 1 micron = 1×10^{-6} m หรือ 1 micron = 0.39×10^{-4} inch ดังนั้นขนาด pore size ของตัวกรองจึงมีหน่วยเป็น

ภาพที่ 10 Filtration mechanisms, A : Sieving mechanism, B : Entrapment mechanism, C : Adsorption mechanism (Diffusional interception)

A B C

Hydrophobic filter ที่ไม่ชอบน้ำ (Water hating) หากต้องการให้เปียกน้ำจะต้องใช้สารเคมีช่วยให้เปียกน้ำ ตัวอย่างเช่นแอลกอฮอล์ เรียกว่า prewetting ตัวอย่างของวัสดุที่ใช้ทำตัวกรองชนิด Hydrophilic filter ได้แก่ regenerated cellulose, modified PVDF, nylon, Glassfiber, modified Polysulfone, mixed Cellulose ester เป็นต้น ตัวกรองที่ทำจากวัสดุเหล่านี้ใช้ในการกรองของเหลวประเภท aqueous solution สำหรับวัสดุที่ใช้ทำตัวกรองชนิด Hydrophobic filter ได้แก่ PVDF, PTFE, Polypropylene, Polycarbonate, Polysulfone เป็นต้น ตัวกรองเหล่านี้ใช้การกรอง gases, alcohol, acid, base, solvent และสารเคมีอื่น ๆ

การแบ่งชนิดของการกรอง ตัวกรองโดยทั่วไปสามารถแบ่งตามความหนาบาง, ลักษณะวัสดุที่ใช้ทำ และรูปแบบของการกรองได้เป็นประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ คือ

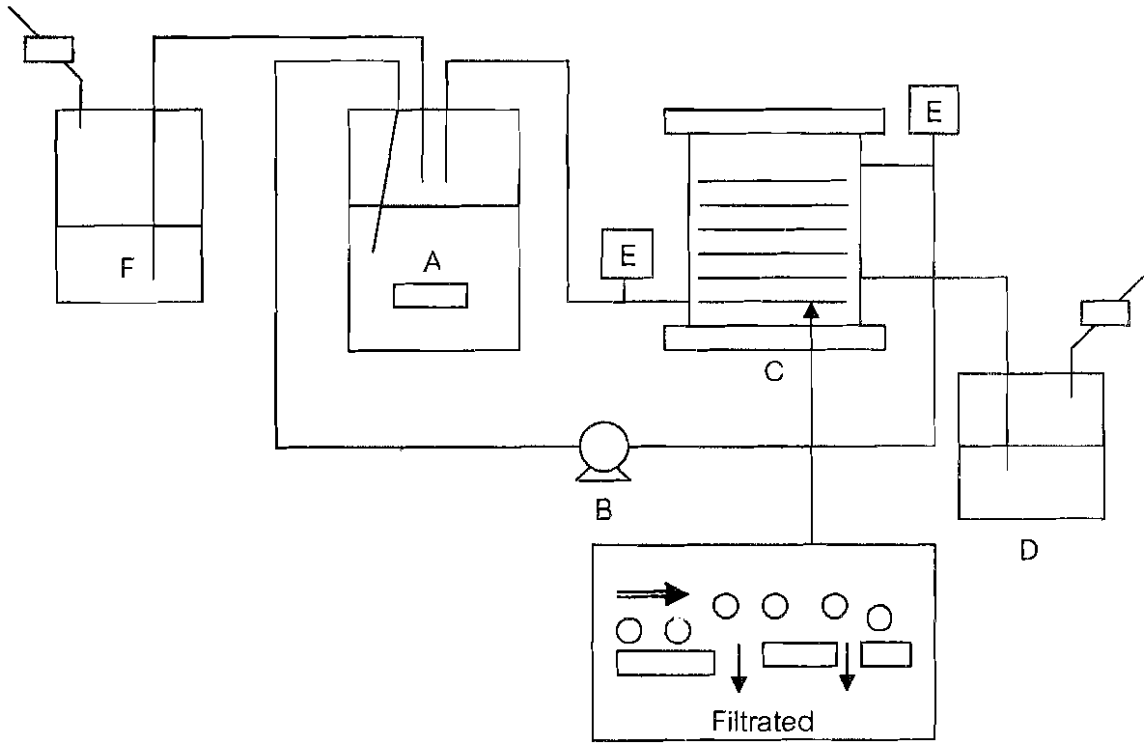
a. Depth or Media Filter เป็นตัวกรองที่ส่วนใหญ่ทำมาจากวัสดุที่เป็นเส้นใยอัดแน่น หรือเชื่อมติดกันด้วย organic resin มีความหนาค่อนข้างมากประมาณ 3-20 มม. เช่น asbestos, glass fibers, cellulose (12) เป็นต้น (ภาพที่ 11 B) โครงสร้างของตัวกรองและขนาดของ pore size ไม่แน่นอนและไม่สม่ำเสมอ สิ่งปนเปื้อนขนาดใหญ่จะติดอยู่ผิวหน้าของตัวกรอง ส่วนที่ปนเปื้อนขนาดเล็กจะติดอยู่ภาย ในเนื้อตัวกรองจึงทำให้สามารถรองรับสิ่งปนเปื้อนได้มาก (high dirt holding capacity) ซึ่งเป็นข้อดีของตัวกรองประเภทนี้ ข้อดีอีกประการหนึ่งคือราคาถูกกว่า membrane filter ข้อเสียได้แก่ ดูดซับผลผลิตที่กรองไว้มาก (high hold-up volume) ทำให้เกิดการสูญเสีย เส้นใยตัวกรองหลุด (media migration) ได้ง่ายและปะปนไปกับผลผลิตที่กรองได้ อัตราการดักสิ่งปนเปื้อนเป็นแบบ nominal rating เนื่องจากมีขนาด pore size ไม่แน่นอน จึงไม่สามารถทำการทดสอบได้ Depth filter ใช้สำหรับกรองหยาบ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนส่วนใหญ่ออกไปก่อนที่จะกรองด้วยตัวกรองที่ละเอียดขึ้น ตัวอย่างของตัวกรองประเภทนี้ได้แก่ String wound cartridges(Cotton, Polypropylene, Polyolefins),

ง่าย และมีราคาแพง Membrane filter ใช้ในการกรองขั้นสุดท้าย (final filtration) หรือใช้ในการกรองปลอดเชื้อ (sterilizing filtration)

c. filter aids เป็นตัวช่วยการกรองซึ่งจะมีวัสดุต่าง ๆ ที่เป็นตัวช่วยกรอง คือ Activated carbon, diatomaceous earth, pearlite (natural volumatic mineral) และ cellulose fiber โดยวัสดุเหล่านั้นถูกใส่เข้าไปในมีเดียที่จะกรองให้แขวนลอยอยู่ในมีเดียแล้วทำการกรองผ่านตัวกรองที่มีอยู่แล้ว ซึ่ง filter aid จะไป form เป็น Cake บนหน้าตัวกรองเดิม ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของตัวกรอง เช่น เพิ่มรูกรอง (porosity), เพิ่มพื้นที่การกรองและคงสภาพ permeability ของตัวกรองเดิม (12) ดังภาพที่ 12

d. Tangential Flow system ชนิดของการกรองในข้อ a., b. และ c. เรียกชื่ออีกอย่างหนึ่งเป็น dead-end flow system ซึ่งวิธีการกรองตาม 3 ข้อนั้นจะมีข้อเสียคือ ประสิทธิภาพของการกรองจะลดลงไปเรื่อย ๆ จนเกิดการอุดตัน เมื่อมีการ formed cake ของสิ่งปนเปื้อนบนผิวหน้าของตัวกรองหรือบน filter aids สำหรับ Tangential cross-flow filtration (ภาพที่ 13)นั้นจะไม่ทำให้เกิดปัญหาเหล่านี้ เนื่องมีการเคลื่อนไหวอย่างต่อเนื่องของ Unfiltered fluid ไปตามทางยาวผ่านผิวหน้าของตัวกรองไป

ภาพที่ 13 ภาพแสดง flow diagram ของ tangential cross-flow system A = Unfiltered fluid, B = Pump, C = Multiplate tangential flow filter, D = Vented filtrated vessels, E = Pressure gauge, F = Vented vessel closed circuit to A



ผิดกับแบบ dead-end flow system จะเป็นการกรองผ่านตัวกรองตามแนวตั้ง ดังนั้นจึงทำให้สิ่งปนเปื้อนในUnfiltered fluid ไม่เกาะบนผิวของตัวกรอง แต่ filtered fluid สามารถผ่านตัวกรองออกมาได้ตามสภาพแรงดันและความเร็วของ Unfiltered fluid (12) ส่วนวัสดุในการทำตัวกรองก็จะเช่นเดียวกับ Membrane filter

Integrity Test การทดสอบตัวกรองว่ามีคุณภาพ คุณสมบัติสมบูรณ์ถูกต้องและเหมาะสมในการกรองหรือไม่ เรียก Integrity Test เป็นส่วนหนึ่งของมาตรฐานปฏิบัติในการกรอง ผลการทดสอบจะช่วยให้ทราบว่าตัวกรองดังกล่าวมี pore size ถูกต้องหรือไม่ และยังแสดงให้ทราบว่ามีการรั่ว (leak) ในระบบหรือไม่ด้วย ช่วยให้เกิดความมั่นใจในการกรองแต่ละครั้ง โดยผลการทดสอบจะเป็นหลักประกันในการรับรองคุณภาพของไส้กรอง และระบบการกรองมีความสมบูรณ์ ถูกต้องตามมาตรฐานการผลิต การทดสอบจะทำก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ และหลังจากใช้งาน วิธีการทดสอบแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

1. Destructive Test เป็นวิธีการทดสอบโดยตรงโดยใช้สิ่งปนเปื้อนอ้างอิงเป็นตัวทดสอบ เช่น อนุภาค (Particulate Challenge Test) ตัวอย่างได้แก่ silica bead, latex bead และ polystyrene bead เป็นต้น หรือใช้เชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Challenge Test) ตัวอย่างได้แก่ Pseudomonas diminuta, Serratia marcescens, Acholeplasma laidlawii และ Saccharomyces cerevisiae เป็นต้น การทดสอบแบบนี้ใช้ทดสอบระหว่างการผลิตตัวกรองในโรงงาน หรือในโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภทเพื่อควบคุมคุณภาพให้ได้ตามมาตรฐาน ซึ่งผลการทดสอบต้องสัมพันธ์กันกับการทดสอบแบบ Non-destructive Test ตัวกรองที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก เนื่องจากอุดตันหรือปนเปื้อนจากสิ่งปนเปื้อนที่ใช้ทดสอบ

2. Non-destructive Test เป็นวิธีการทดสอบที่สะดวกและง่ายกว่าวิธีที่ 1 สามารถทดสอบในระหว่างกระบวนการผลิต (in-process test) ได้โดยไม่ทำให้ตัวกรองเสียหาย วิธีการทดสอบแบบนี้อาศัยหลักการทางด้านฟิสิกส์ ได้แก่ surface tension, capillary force, gas solubility, gas diffusivity และ porosity เป็นต้น การทดสอบแบบนี้มีอยู่ 4 วิธี ดังต่อไปนี้

2.1 Bubble Point Test เป็นวิธีการทดสอบตัวกรองที่อาศัยหลักการของ surface tension และ capillary force (12) ตัวกรองที่เปียกน้ำจะมีน้ำบรรจุอยู่ภายใน pore ด้วยแรงทั้งสองชนิดข้างต้น pore ที่มีขนาดใหญ่สุดจะมีแรง capillary force น้อยกว่า pore ที่เล็กกว่า การที่จะผลักดันให้ของเหลวออกไปจาก pore ใหญ่จึงง่ายกว่า ดังนั้นหากทำให้ตัวกรองเปียกอย่างสม่ำเสมอแล้วเพิ่ม pore size ที่ใหญ่ที่สุดของตัวกรองดังกล่าว วิธีการทดสอบนี้จึงใช้ในการทดสอบขนาด pore size ของตัวกรองว่าถูกต้องตรงตาม specification หรือไม่ ค่าความดัน Bubble point จะตรงกันข้ามกับขนาดของ pore size และขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุ (type of polymer) โครงสร้างของตัวกรอง (membrane

structure) ชนิดของของเหลวที่ใช้ทดสอบ และอุณหภูมิ เพราะฉะนั้นถึงแม้ว่าขนาด pore size จะเท่ากันก็ไม่จำเป็นที่จะต้องมีค่า Bubble point เท่ากัน ถ้าเป็นตัวกรองที่ต่างกันหรือเงื่อนไข (condition) ในการทดสอบไม่เหมือนกัน นอกจากนี้ค่า Bubble point ที่แตกต่างกันของตัวกรองต่างชนิดกันก็ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพที่ดีกว่า หรือด้อยกว่าของตัวกรองเหล่านั้นแต่อย่างใด

2.2 Diffusional or Forward Flow Test เป็นวิธีการทดสอบตัวกรองที่อาศัยหลักการของ gas solubility และ gas diffusivity (12) เนื่องจากก๊าซต่าง ๆ สามารถละลายในของเหลวภายใน pore ของตัวกรองได้ และในสภาพความดันที่แตกต่างกันระหว่างด้านที่มีแรงดันสูง (up steam side) ซึ่งมีความเข้มข้นของโมเลกุลก๊าซมาก ก๊าซก็จะแพร่กระจายไปยังด้านที่มีแรงดันต่ำกว่า(down steam side) เพื่อให้เกิดการสมดุลย์ตามธรรมชาติของก๊าซ ปริมาตรของก๊าซที่เกิดจากการละลายในของเหลวภายใน pore แล้วแพร่กระจายออกมาทางด้านตรงข้ามนี้เป็นผลของการทดสอบนี้มีหน่วยเป็น มล/นาที การทดสอบวิธีนี้ต้องทำในสภาพอุณหภูมิและความดันคงที่ ความดันที่ใช้จะต่ำกว่าการทดสอบ Bubble point เนื่องจากต้องการให้ของเหลวยังคงอยู่ภายใน pore เพราะฉะนั้นจึงไม่สามารถใช้ค่า Diffusion flow บอกขนาดของ pore size ของตัวกรองได้ สำหรับปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทดสอบวิธีนี้ได้แก่ โครงสร้างของตัวกรอง (membrane structure, porosity, thickness) ชนิดของก๊าซ ชนิดของของเหลว ความดันที่แตกต่างกัน (differential pressures) และอุณหภูมิ การทดสอบด้วยวิธีนี้ใช้ตรวจสอบพื้นที่ผิวในการกรอง และ membrane porosity ของตัวกรอง ดังนั้นตัวกรองชนิดเดียวกันที่มีขนาด pore size เท่ากัน แต่มีพื้นที่กรองมากเป็น 2 เท่า จะมีค่า Diffusion flow มากเป็น 2 เท่าด้วย

2.3 Pressure Decay or Pressure Hold Test เป็นวิธีการทดสอบที่เหมือนกันกับการทดสอบในข้อ 2.2 ทุกประการ เว้นแต่ผลการทดสอบจะวัดค่าความดันทางด้าน up steam side ที่ลดลงโดยปล่อยให้ความดันคงที่แล้วปิด gas supply จับเวลาตามที่กำหนด นอกจากนี้อาจใช้วิธีวัด gas flow rate ได้เช่นกัน ข้อสำคัญของวิธีการนี้คือจะต้องมีมาตรวัดแรงดัน หรือ gas flow meter ที่ละเอียดพอที่จะใช้วัดได้ มิฉะนั้นค่าที่ได้จะไม่ถูกต้อง

2.4 DOP/Aerosol Challenge Test เป็นวิธีการทดสอบที่ใช้เฉพาะสำหรับการทดสอบตัวกรองอากาศเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจาก 3 วิธีแรกโดยสิ้นเชิง คือทดสอบตัวกรองในสภาพที่แห้งโดยมีแหล่งกำเนิดอนุภาคฟุ้งกระจาย (Aerosol) ที่ผลิตจาก oil บางชนิด แล้ววัดจำนวนอนุภาคที่ผ่านออกมาทาง down steam side วิธีการทดสอบนี้ค่อนข้างยุ่งยากต้องมีเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ดีพอการทดสอบจึงจะสัมฤทธิ์ผล ในปัจจุบันจึงมีบริษัทผู้ผลิตหลายรายได้พัฒนาเครื่องทดสอบอัตโนมัติที่ง่ายต่อการใช้งานขึ้นมาทั้งแบบที่เป็น Aerosol Challenge Test และ Water Intrusion Test ซึ่งแบบหลังนี้เป็นแบบใหม่ที่สามารถใช้น้ำเป็นสารทดสอบตัวกรองอากาศได้

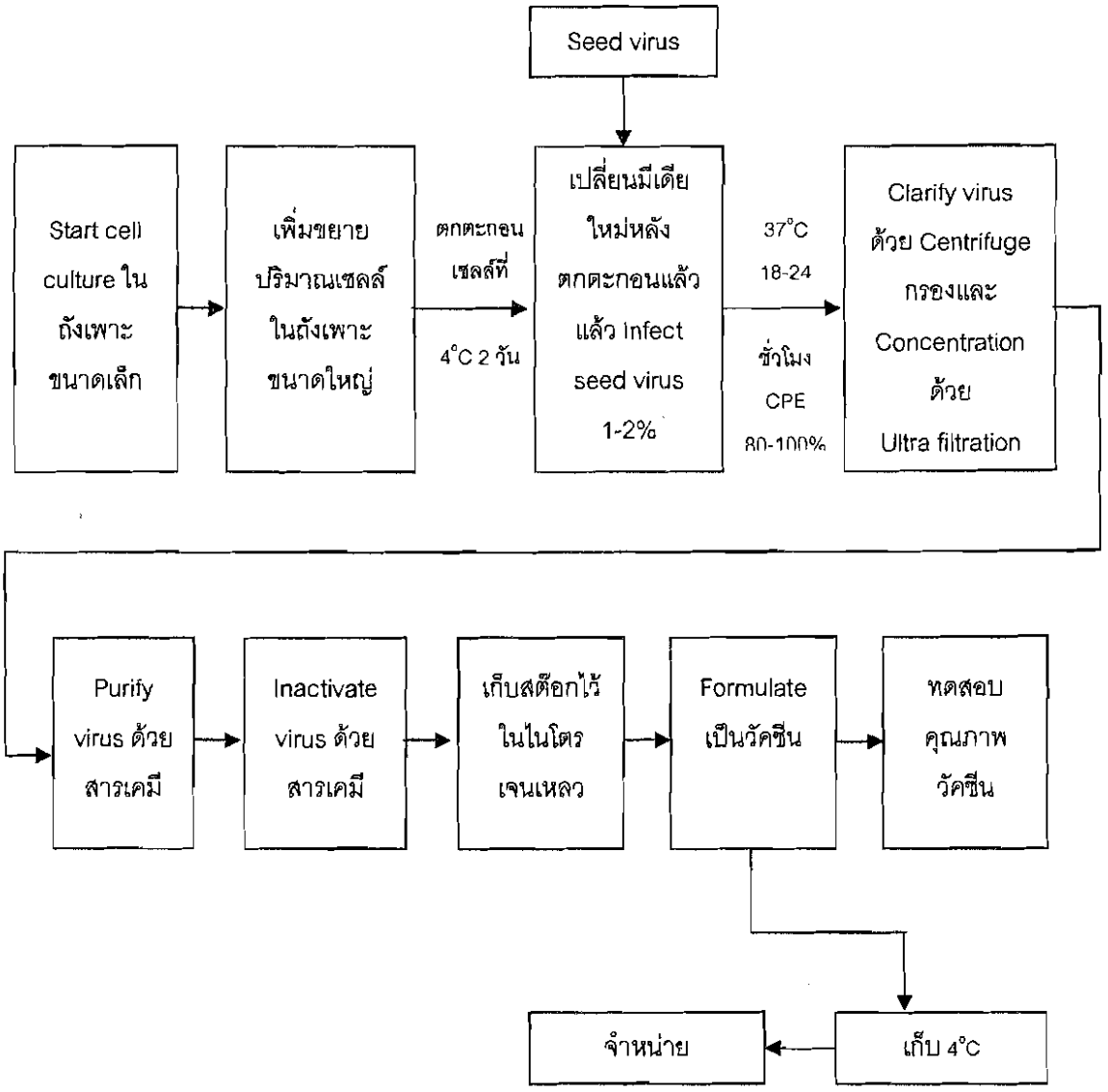
Chemical Compatibility คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการกรอง คือ Chemical Compatibility หมายถึงการเข้ากันได้หรือไม่ได้ของตัวกรองและองค์ประกอบอื่น ๆ ของตัวกรองกับสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการปฏิบัติงานกรอง หากเกิดการผิดพลาดการกรองจะไม่ประสบความสำเร็จ และทำให้ผลผลิตเสียหาย หรือไม่ได้คุณภาพตามที่ต้องการ ดังนั้นก่อนใช้ตัวกรองชนิดใดก็ตาม ผู้ใช้ควรศึกษาคุณสมบัติในข้อนี้ให้ดีเสียก่อนว่าสิ่งที่ต้องการจะกรอง หรือต้องสัมผัสกับตัวกรองและองค์ประกอบอื่น ๆ ของตัวกรองนั้นมีผลกระทบอย่างไรหรือไม่ ข้อมูลเหล่านี้สามารถดูได้จากหนังสือรายการสินค้า (catalog) ของบริษัทผู้ผลิตต่าง ๆ ซึ่งจะมีข้อแนะนำเกี่ยวกับเรื่องนี้ครบทุกรายการสินค้า เราสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวในทางปฏิบัติได้แต่ต้องอยู่ในเงื่อนไข (condition) เดียวกัน หากเงื่อนไขเปลี่ยนไปต้องขอข้อมูลเพิ่มเติมจากบริษัทผู้ผลิต หรือทำการทดลองก่อนใช้จริง ถ้าสารเคมีที่ทดสอบสามารถเข้ากันได้ โดยไม่ทำให้เกิดการเสียหายต่อโครงสร้างของตัวกรองและองค์ประกอบอื่น ๆ ทั้งทางด้านเคมีและฟิสิกส์ก็สามารถนำตัวกรองดังกล่าวไปใช้งานได้ (12)

บทที่ 5
วิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย
(Methods of Foot and Mouth Disease vaccine production)

ดังได้กล่าวมาในบทต้น ๆ แล้วว่า การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น ผลิตจากไวรัส (แอนติเจน) โรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งการผลิตไวรัส (แอนติเจน) โรคปากและเท้าเปื่อยนั้น ก็ผลิตจาก cell line 2 ชนิด คือ เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ และเซลล์ $IFFA_3$ โดยในการผลิตแบบ Rolling bottle cell culture จะใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ซึ่งเป็น cell line แบบ monolayer แต่เนื่องจากความต้องการปริมาณวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีมาก Capstic และคณะ (1962) จึงได้ทำการ adapt cell line $BHK_{21}C_{13}$ แบบ monolayer cell culture เป็น suspension cell culture เป็นผลสำเร็จและสามารถใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ (13) และใช้เป็นเซลล์ที่ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ในแบบอุตสาหกรรมมาจนถึงปัจจุบัน นอกจากนั้นโดยการผลิตด้วยวิธี suspension cell culture ยังมีเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแบบอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี คือ เซลล์ $IFFA_3$ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มาจากไตของหนู Hamster ก่อนการคลอด (Hamster embryo) โดยการนำเซลล์จากไตหนู Hamster ก่อนการคลอดมาทำเป็น cell line NIL-2 ก่อน จากนั้นจึงนำเซลล์ NIL-2 ไป adapt เป็นเซลล์ $IFFA_3$ แบบ suspension cell line (22)

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีการผลิตหลายวิธี แต่ที่ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์เคยผลิตโดยแบบ Rolling bottle cell culture และในปัจจุบันผลิตแบบ suspension cell culture ซึ่งจะกล่าวถึงวิธีการผลิตทั้ง 2 แบบ โดยหลักในการผลิต คือ การเพาะขยายเซลล์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอเสียก่อน จึงทำการเปลี่ยนมีเดียใหม่ แล้ว inoculation ด้วย seed virus ในปริมาณน้อย ๆ เพื่อเพิ่มขยายปริมาณไวรัสจากเซลล์ที่เพาะขยายได้ เมื่อได้ไวรัสแล้ว จึงนำไป

ภาพที่ 14 ขบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี suspension cell culture (7)



ผ่านขั้นตอนหรือขบวนการ clarify, concentration, purification, inactivation, formulation และขบวนการ Quality control ก่อนการนำออกจำหน่าย ซึ่งจะได้กล่าวถึงเป็นข้อ ๆ ไป

I. **การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี** Rolling bottle cell culture method

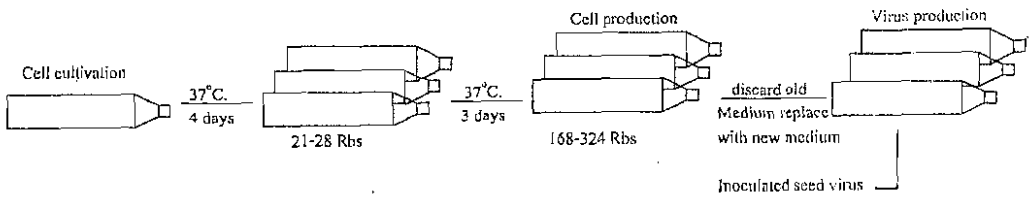
ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เคยผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Rolling bottle cell culture method แต่ปัจจุบันนี้หยุดผลิตโดยวิธีนี้มาเป็นเวลานานแล้ว เนื่องจากการผลิตต้องใช้พื้นที่มากทำให้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้น้อยไม่เพียงพอต่อการใช้งาน แต่อย่างไรก็ดีจำเป็นจะต้องกล่าวถึงสักเล็กน้อย เพื่อเป็นพื้นฐานในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยอีกวิธีหนึ่ง

จากภาพที่ 15 เป็น flow chart แสดงการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Rolling bottle cell culture ทำการเพาะขยายเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในขวด Roller ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มม. สูง 500 มม. โดยเพาะขยายในปริมาณ 1 ขวด ต่อ 8 ขวด ในน้ำยา Growth medium (GM) ที่มีซีรั่ม 10% ขวดละ 500 มล. เพาะที่ 37°C โดยใน passage แรกจะเพาะเป็นเวลา 4 วัน พอ passage ที่ 2-3 จะใช้เวลาเพาะเพียง 3 วัน เนื่องจากปริมาณเซลล์ใน passage แรกจะมีน้อยเพราะพึ่ง adapt เซลล์มาจาก -80°C เมื่อได้เซลล์ใน passage ที่ 3 ประมาณ 168-324 ขวดแล้ว จะถ่ายมีเดียเก่าทิ้ง แล้วใส่มีเดียใหม่ที่ไม่มีซีรั่ม (Maintenance medium) จำนวน 1,000 มล. แล้วจึง inoculate seed virus แล้วเพาะต่ออีก 18-24 ชั่วโมง จะเกิด CPE 90-100% (Cytopathic effect) จึง harvest โดยการนำไวรัสที่ได้ไปทำการ clarify, inactivation และ formulate เป็นวัคซีนต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อก่อนเมื่อได้ไวรัสแล้วจะผลิตเป็นวัคซีนเลยไม่มีการเก็บไวรัสไว้รอการ formulation เนื่องจากเป็นการผลิตวัคซีนแบบ monovalent (ไทป์เดียว)

การย่อยเซลล์ (trypsinization) ในการเพาะขยายเซลล์ แบบ monolayer cell culture จาก passage หนึ่งไปยัง passage หนึ่งนั้น จะต้องทำการ trypsinized cell เพื่อให้ cell ลอกหลุดจากพื้นขวดเสียก่อน โดยการใช้ 0.125% versine trypsin เป็นตัวย่อย เมื่อย่อยแล้วจึงนำมา suspend ใน growth media เพื่อแบ่งไปเพาะขยายต่อใน passage ต่อไป

Cytopathic Effect หมายถึงการเปลี่ยนแปลงใน cytoplasm ของเซลล์ เนื่องมาจากถูก infected ด้วยไวรัส เซลล์เหล่านี้จะมีลักษณะเหนียวเป็นยางไม่คงรูป และจะติดสีเมื่อนำมาย้อมด้วยสี tryphan blue โดยเซลล์ปกติจะไม่ติดสี

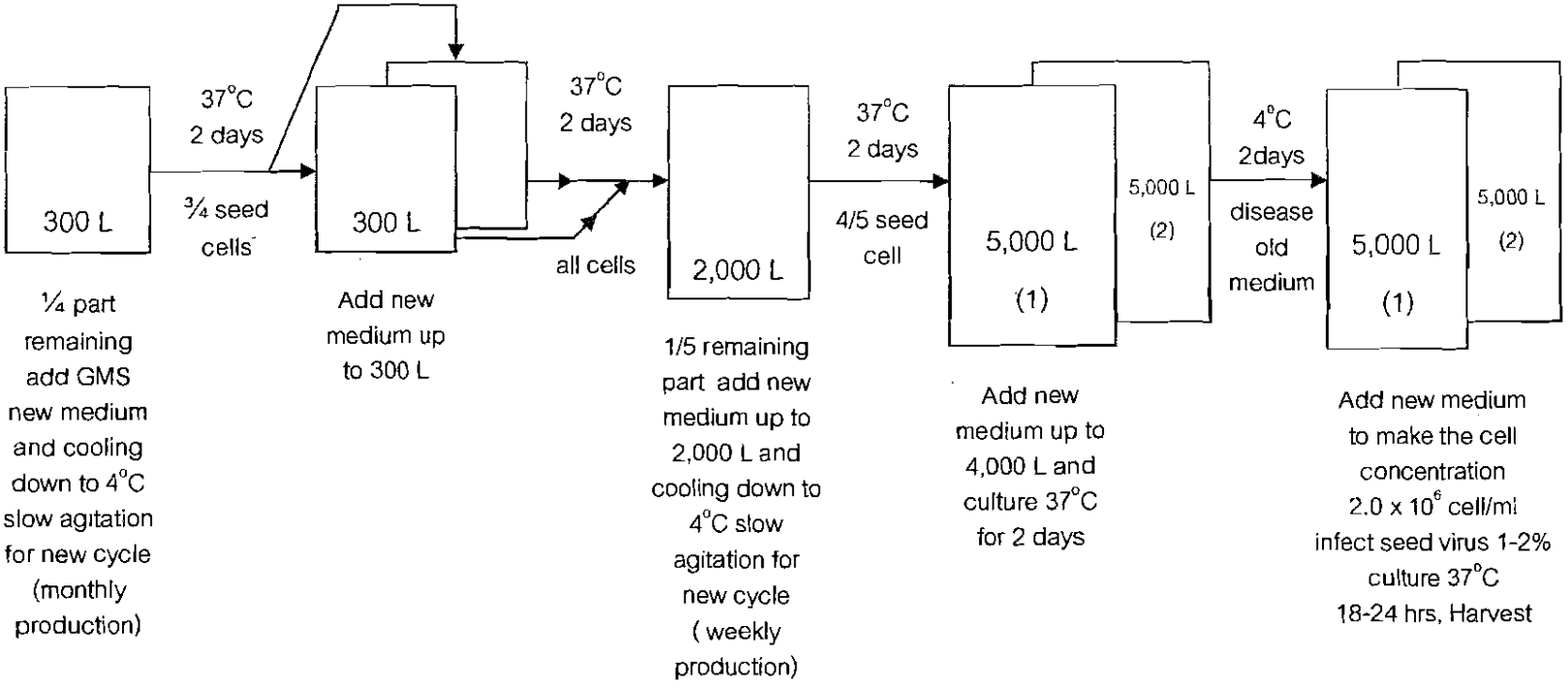
ภาพที่ 15 flow chart ของการเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Rolling bottle cell culture



Required medium	500 cc/bot.	500 cc/bot.	1000 cc/bot.
Serum (%)	10% (GM)	10% (GM)	0% (MM)

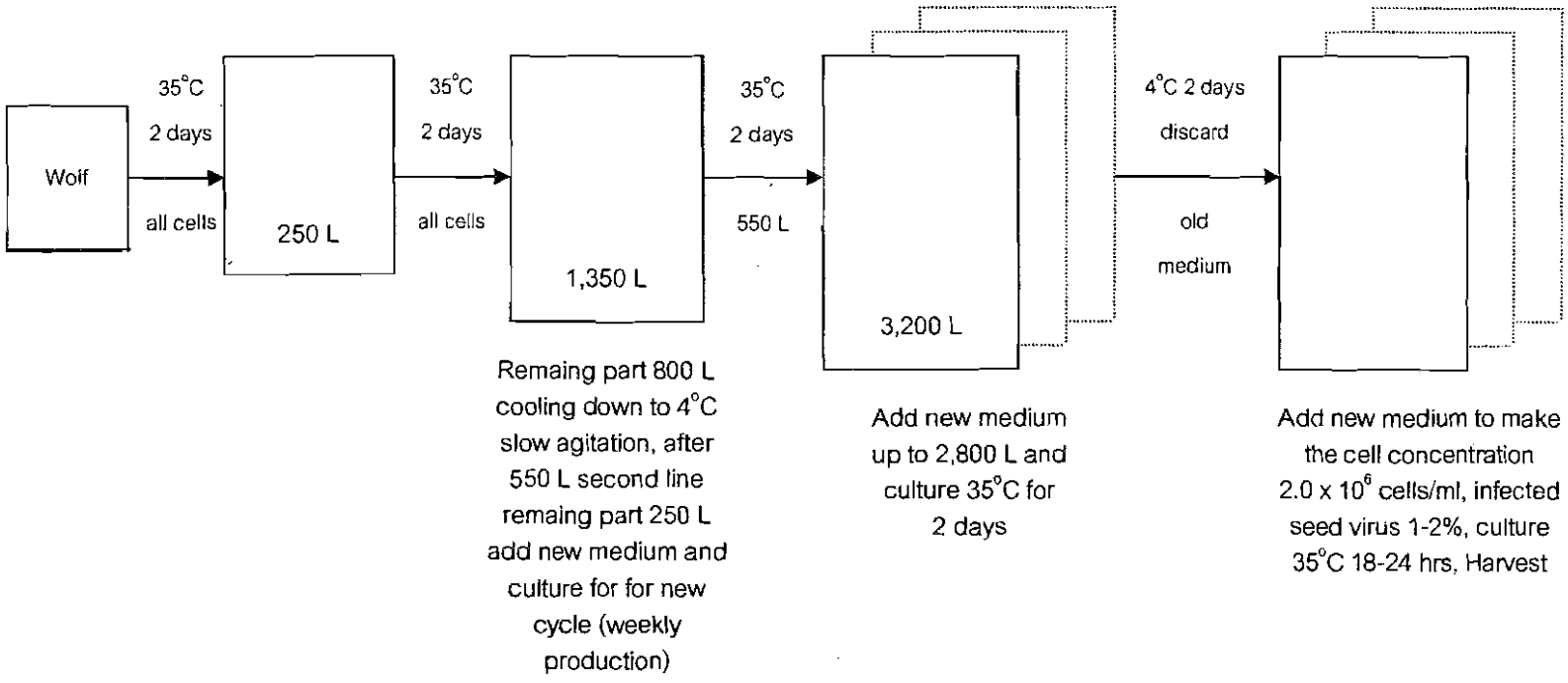
Medium : Growth medium (Hank's BSS)
Serum : Mixed bovine and buffalo serum (from slaughter house), treated with 8% PEG, non heated for production culture

ภาพที่ 16 แสดงขบวนการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ของโรงงานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โรงงานที่ 1



Medium	GMS	GMS	GMS	GMS	Van Bekkum
Serum	5%	5%	5%	5%	0%

ภาพที่ 17 แสดงขบวนการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเซลล์ IFFA$_3$ ของโรงงานผลิตวัคซีนโรคปากและท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โรงงานที่ 2



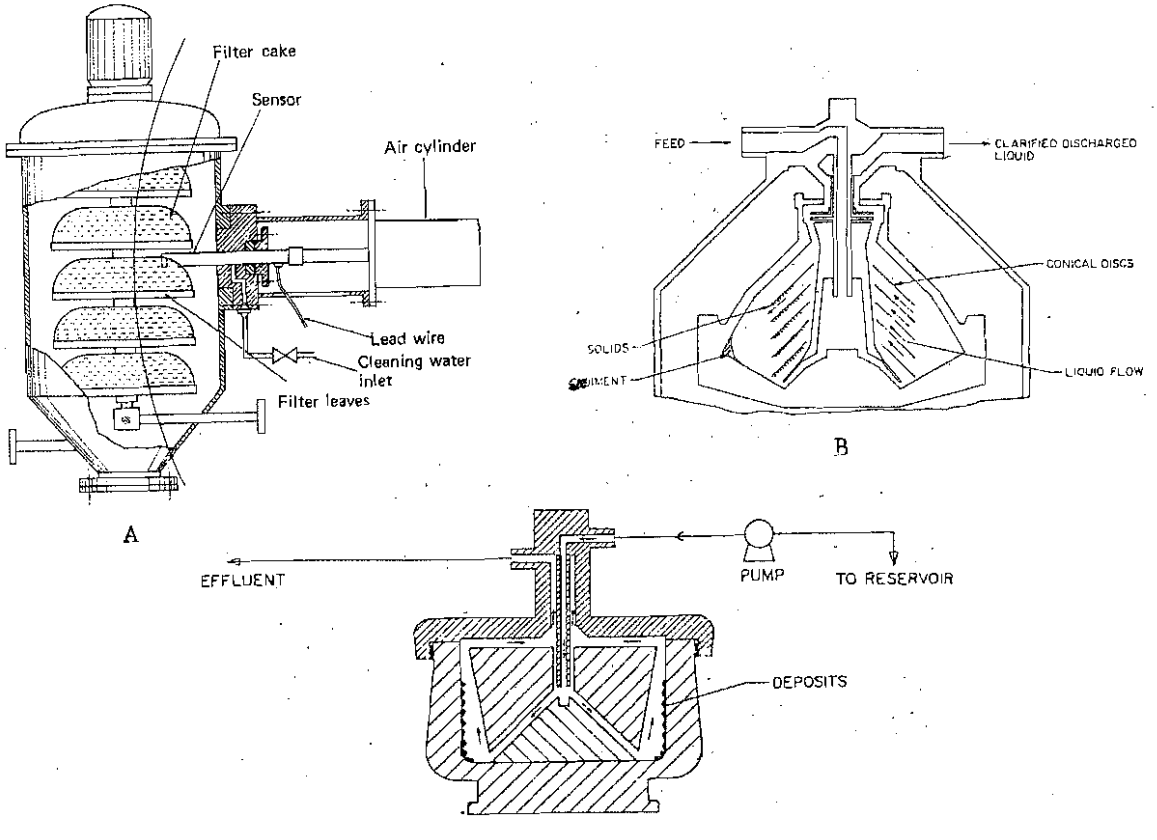
Medium	BME	BME	BME	BME	Van Bekkum
Serum	3%	3%	3%	3%	0%

II. การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Suspension cell culture methods

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ในปัจจุบันนี้ผลิตโดยวิธี suspension cell culture method โดยใช้เซลล์ 2 ชนิด คือ $BHK_{21}C_{13}$ และเซลล์ $IFFA_3$ ซึ่งเป็น Cell line ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบอุตสาหกรรม ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ใช้เซลล์ในการผลิตถึง 2 ชนิด เนื่องจากเพื่อความรวดเร็วในการ adapt virus ลงเซลล์ ในกรณีที่เชื้อที่เกิดการระบาดในท้องที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปก็สามารถ adapt ลงเซลล์ใดเซลล์หนึ่งได้ทันที และคัดเลือกเซลล์ที่ให้ Yield virus ที่สูงได้ ดังภาพที่ 16 และภาพที่ 17 แสดงการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด

การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนั้น จะคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันแต่เพียงมีเดียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ขนาดของถัง fermentor ที่แตกต่างกันออกไปของแต่ละโรงงานที่มีอยู่ 2 โรงงาน ซึ่งกล่าวโดยรวมตามภาพที่ 14 แสดงขบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี suspension cell culture method โดยการเพาะขยายเซลล์ที่ 35-37°C ให้ได้เซลล์จำนวนมากเพียงพอในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดใหญ่ โดยการเพาะจะใช้ GMS+5%serum สำหรับเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ และ BME+3% serum สำหรับเซลล์ $IFFA_3$ ทั้งนี้ในแต่ละ passage จะเริ่ม start cell ที่ 0.5×10^6 เซลล์/ml

ภาพที่18 A = Funda Filter B = Industrial separating centrifuge bowl
C = Cotineous flow rotor centrifuge



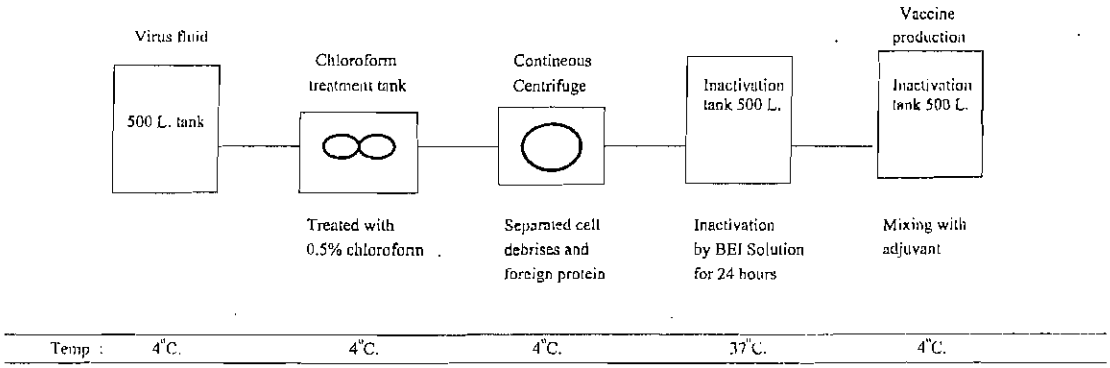
แล้วเพาะต่ออีก 48 ชั่วโมง จะได้เซลล์ประมาณ 2.0 x 10^6 – 2.8 x 10^6 เซลล์/ml รวมในแต่ละ passage จะใช้เวลาเพาะ 3 วัน โดยจะต้องเก็บตัวอย่างเซลล์ออกมานับทุกวัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตได้ปริมาณมากและมีคุณภาพดีแล้ว จึงทำการตกตะกอนเซลล์ที่ 4°C เป็นเวลา 2 วัน จึงเปลี่ยนถ่ายมีเดียเก่าทิ้งแล้วเติมมีเดียใหม่ที่ไม่มีซีรั่ม ซึ่งมีเดียที่ใช้คือ Van Bekkum medium การที่จะเติมมีเดียนี้จำนวนเท่าใดให้คำนวณปริมาณเซลล์ว่าเมื่อเซลล์แขวนลอยในมีเดีย แล้วจะต้องได้ปริมาณ 2.0 x 10^6 เซลล์/ml เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการเติมมีเดียใหม่แล้ว จึง innoculate ด้วย seed virus ขนาด 1-2% แล้วเพาะที่ 35-37°C ต่อ อีกเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เซลล์เกิด CPE 80-100% (โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์จากถังเฟอร์เมนเตอร์ออกมาตรวจนับเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10-20 เท่า) จากนั้นจึงทำการ Harvest โดยการทำเย็นที่ 4°C และปั่นช้า ๆ เพื่อให้ความเย็นกระจายทั่วถึงโดยไวรัสจะลอยอยู่ในมีเดียในเฟอร์เมนเตอร์ (virus fluid) เมื่ออุณหภูมิได้ 4-8°C แล้วจะเข้าสู่ขบวนการ clarify, concentration, purification, inactivation, formulation เป็นวัคซีน ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

III. การ clarify, concentration และ purification ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

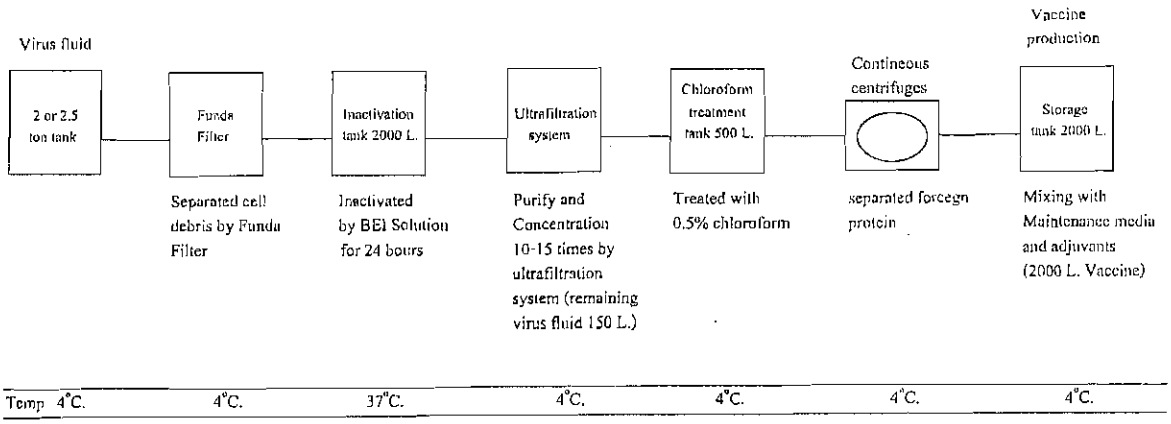
ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อ harvest virus แล้ว จะทำการ clarify, concentrate และ purify virus ด้วยวิธีการแบบเดียวกันทั้ง 2 โรงงาน ดังจะได้กล่าวเป็นขั้นตอนไป ส่วนการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Rolling bottle cell culture method ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เมื่อก่อนนั้นส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ฉีดในสุกรชนิด Monovalent vaccine เป็นวัคซีนแบบ Conventional vaccine ไม่มีการ concentrate และ purify จึงมีการ clarify เพียง treated ด้วย 0.5% chloroform เพื่อแยก foreign protein ที่ทำให้เกิดอาการแพ้ในสัตว์ออกจาก virus fluid แล้วจึงนำ virus fluid นั้นไปปั่นแยกตะกอน foreign protein และกากเซลล์ออกด้วย Continuous flow rotor centrifuge ดังภาพที่ 18 แล้วจึงนำ virus fluid ไป inactivated ที่ 37°C 24 ชั่วโมง และ formulate เป็นวัคซีนใช้งานต่อไป ดังภาพที่ 19 แสดงขั้นตอนการ clarify, inactivate และการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจาก Roller bottle cell culture method

ส่วนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Suspension cell culture method นั้นส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ฉีดใน โค กระบือ และเป็น Semi-conventional vaccine กล่าวคือจะมีการกรองกากเซลล์ออกจาก Virus fluid ด้วยเครื่องกรองฟุนด้า ดังที่ เชิงชาย และคณะ (2533) ได้บรรยายถึงการใช้เครื่องกรองฟุนด้าในการ clarify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน (1) ซึ่งวิธีการนี้เป็นการกรองโดยใช้ diatomaceous earth เป็น filter aids โดยทำเป็น Cake บนแผ่นกรองอีกชั้นหนึ่ง แล้วจึงดำเนินการกรอง เมื่อได้virus fluid ที่ปราศจาก cell debris

ภาพที่ 19 flow chart แสดงขั้นตอนการ clarify, inactivate และการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จาก Roller bottle cell culture method ของฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีว-ภัณฑ์สัตว์ ก่อนเข้าสู่ยุคปัจจุบัน



ภาพที่ 20 flow chart แสดงขั้นตอนการ clarify, inactivate, concentration และการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจาก Suspension cell culture method ของฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ก่อนเข้าสู่ยุคปัจจุบัน



แล้วจึงนำไปทำการ inactivated ที่ 37°C, 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วย ultrafiltration ชนิด Hollow fiber ให้มีความเข้มข้นขึ้น 10-15 เท่า จากนั้นนำไวรัสเข้มข้นนั้นไป treated ด้วย 0.5% chloroform เพื่อแยก foreign protein ออกจาก virus fluid และนำไปปั่นแยกตะกอน foreign protein ออกด้วย continuous flow rotor centrifuge ไวรัสที่ได้จะถูกผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยการผสมกับ maintenance medium และ adjuvant ต่าง ๆ เป็นวัคซีนออกใช้งานต่อไป ดังภาพที่ 20 แสดงขั้นตอนการ clarify, inactivation, concentration และการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจาก Suspension cell culture method

อย่างไรก็ดี virus fluid ที่ได้จากทั้ง Roller bottle cell culture method และ Suspension cell culture method สามารถนำมาเข้าขบวนการแบบเดียวกันได้ไม่จำเป็นต้องแยกว่าเป็น virus fluid มาจากวิธีการใด ขึ้นอยู่กับปริมาณของ virus fluid ที่ผลิตได้และขนาดของเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ให้เหมาะสมกับปริมาณของ virus fluid เท่านั้น ซึ่งขบวนการทั้งหมดที่บรรยายมาข้างต้นนั้นเป็นขบวนการพื้นฐานในการผลิตและพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

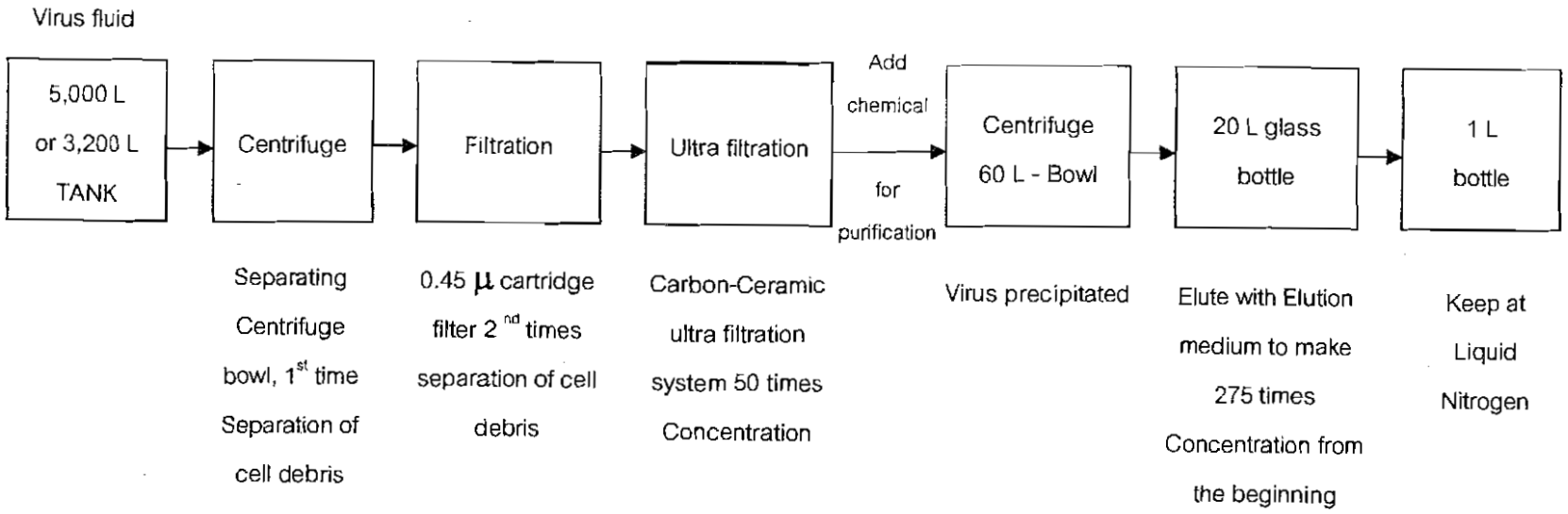
ในปัจจุบันนี้การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้งของ โค กระบือ แพะ แกะ และของสุกร จะผลิตโดยวิธี Suspension cell culture ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดย virus fluid ที่ผลิตได้จะถูกนำมาเข้าขบวนการ clarify, concentrate และมีการ purify virus ก่อนการ inactivated แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอการ formulate เป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้งที่ใช้ใน โค กระบือ แพะ แกะ และในสุกร โดยวิธีการ clarify นั้นจะใช้การปั่นแยกกากเซลล์ด้วย Industrial separating centrifuge bowl (ภาพที่ 18) จากนั้นจึงผ่าน virus fluid ไปกรองด้วย 2.0 μ cartridge filter ที่ทำจากวัสดุที่ไม่ adsorp ไวรัสไว้ในตัวกรอง

เมื่อกรองเสร็จแล้ว virus fluid ที่ได้จะถูกนำไป concentrated ด้วย ultrafiltration ชนิด Carbon Ceramic ประมาณ 50 เท่า แล้วจึงนำ concentrated virus ที่ได้นั้นไป purify ด้วยสารเคมีจะได้ตะกอนไวรัส จึงนำตะกอนที่ได้ไป eluted ด้วย elution medium ให้ความเข้มข้นครั้งสุดท้ายเป็น 275 เท่า จาก virus fluid ครั้งแรก แล้วจึงนำไวรัสนั้นไป inactivate ด้วยสารเคมีที่ 26°C, 18 ชั่วโมง ซึ่งไวรัสหลังการ inactivated แล้วจะถูกเรียกว่า "แอนติเจน" แอนติเจนที่ได้จะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการ formulate เป็นวัคซีนต่อไป ดังภาพที่ 21 แสดงขั้นตอนการ clarify, concentration, purify และการเก็บแอนติเจนเพื่อรอการผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ และสำหรับสุกร ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในปัจจุบัน

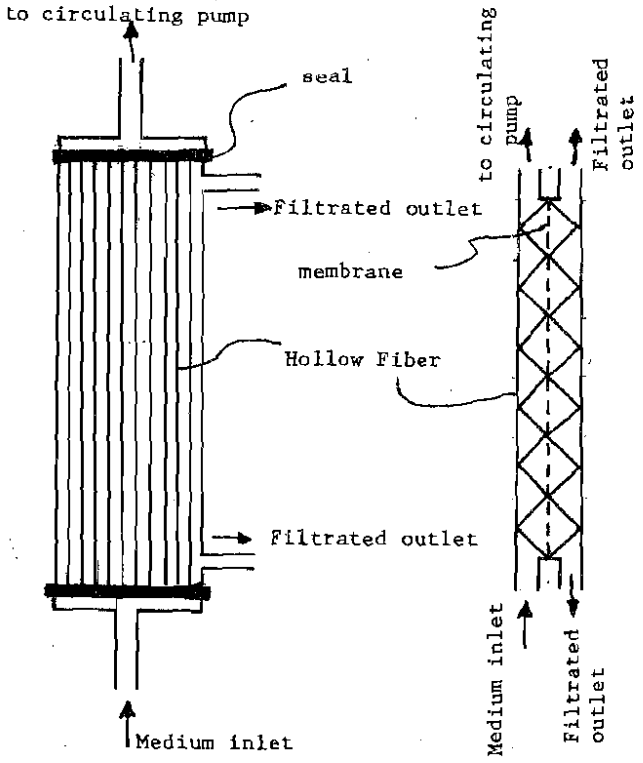
Clarify virus หมายถึงการทำ virus fluid ให้สะอาดปราศจากตะกอนหรือกากเซลล์ (cell debris) ซึ่งมีวิธีการทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนเซลล์ที่ 4°C การปั่นแยกกากเซลล์ด้วย Continuous centrifuge bowl หรือ Industrial separating centrifuge bowl, การกรองด้วย filter ที่ตัวกรองไม่ adsorb ไวรัส เช่น Funda filter ดังในภาพ 18 ฯลฯ

Concentration และ purification หมายถึงการทำ virus fluid ให้เข้มข้นและบริสุทธิ์มีหลายวิธีการ ทั้งทำไวรัสให้บริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว, ทำไวรัสให้เข้มข้นเพียงอย่างเดียว และวิธีการทั้งทำให้ไวรัสเข้มข้นและบริสุทธิ์ไปพร้อม ๆ กัน เช่น การ Extraction ของ foreign proteins ออกจาก virus fluid ด้วย enzyme หรือสารเคมีต่าง ๆ เช่น chloroform, PEG, (Polyethylene Glycol เป็นต้น), Chromatography Methods โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Density Gradient, Centrifugation, Ultrafiltration (14, 24) ฯลฯ แต่วิธีการใน

ภาพที่ 21 flow chart แสดงขั้นตอนการ clarify, concentrate, purify และการเก็บ antigen ในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอการผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ และสำหรับ สุกร ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในปัจจุบัน



ภาพที่ 22 แสดงลักษณะและทิศทางการกรองด้วย Ultrafiltration ชนิด hollow fiber



การ concentrate และ purify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จะทำเป็น 2 ขั้นตอนต่อจากการปั่นแยกกากเซลล์ และกรองด้วยเครื่องกรอง Cartridge 2.0 μ คือ

a. **Ultrafiltration** เป็นขั้นตอนแรกของการทำให้ virus fluid เข้มข้นและบริสุทธิ์ ซึ่งจะทำให้ปริมาณ virus fluid ลดปริมาณลง แต่ particle ของไวรัสยังคงเดิมอยู่ใน virus fluid ที่เข้มข้นนั้น และจะมีผลทำให้การทำไวรัสให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนต่อไปลดการใช้ปริมาณสารเคมีลงด้วย

Ultrafiltration เป็นการกรองที่ตัวกรองมีขนาดรู (pore size) ในการกรองเล็กมากจนไม่สามารถระบุเป็นไมครอนได้ เป็นตัวกรองที่ใช้ในการกรองในระดับโมเลกุลตั้งแต่ 500-10^6 daltons ซึ่งการกรองนี้จะเรียกว่า molecular weight "cut off" (24) และการกรองจะเป็นในแบบ tangential flow system เช่น การกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 nm (17) หรือ molecular weight 8.08 x 10^6 daltons (20) เมื่อกรองด้วย Ultrafiltration ที่มีขนาด molecular weight cut off 100,000 daltons ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะไม่สามารถผ่านตัวกรองได้ จะผ่านได้เฉพาะ fluid และ molecule ที่มี molecular weight ต่ำกว่า 100,000 daltons จึงทำให้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย accumulate และ concentrate อยู่ภายใน fluid เดิมไม่หายไปพร้อมกับ filtrated fluid

ดังภาพที่ 22 เป็นการแสดงลักษณะและทิศทางการกรองของ ultrafiltration ชนิด Hollow fiber ดังนั้น การใช้ ultrafiltration จึงเป็นทั้งการทำ virus fluid ให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ไปในขณะเดียวกัน

b. purification by chemical หมายถึงการทำให้ virus โรคปากและเท้าเปื่อยบริสุทธิ์ด้วยสารเคมี นอกเหนือจากการทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งการ purify ด้วยสารเคมีนี้จะได้ไวรัสที่บริสุทธิ์กว่าวิธีต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว และสะดวกต่อการปฏิบัติงานมากกว่า

สารเคมีที่ใช้ในการ purify virus โรคปากและเท้าเปื่อยมีหลายชนิด เช่น การตกตะกอนด้วยโซเดียม ซัลเฟต, การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต, การตกตะกอนด้วย PEG (Polyethylene Glycol) 2,000-6,000 daltons (24) การ purify virus โรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จะใช้ derivative ของ PEG, เป็นตัวทำให้ตกตะกอน ซึ่งจะมีคุณสมบัติทำให้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตกตะกอนได้ดีกว่า PEG

IV. การ Inactivation of Foot and Mouth Disease virus

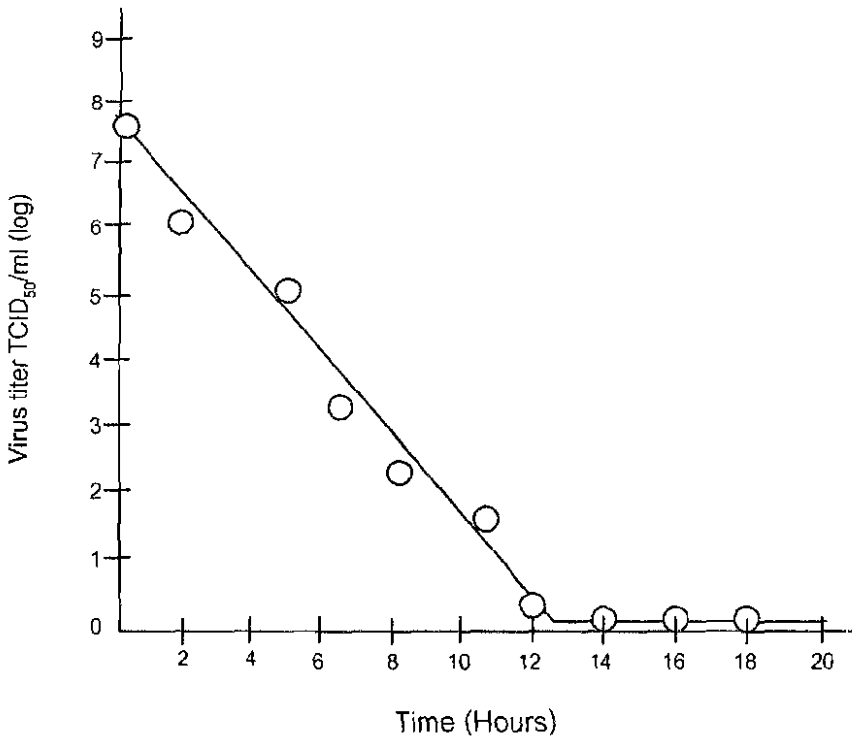
คือการฆ่าเชื้อไวรัสให้ตายแต่ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันโรคได้ ซึ่งสิ่งที่ใช้ในการ Inactivate virus นั้นมีทั้ง physical และ chemical เช่น ความร้อน, แสงอุลตราไวโอเล็ท, รังสี x และรังสีแกรมม่า, low concentration formaldehyde solution, AEI(Acetyleneimine), Beta-Propiolactone (BPL) (15) แต่วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ inactivate ด้วย BEI (binary-ethyleneimine) (19) ซึ่งก็คือ BEA salt ใน Alkaline Condition (BEA salt = 2-bromoethilamine hydrobromide มีสูตรทางเคมีเป็น $C_2H_7Br_2N$)

Kinetic inactivation คือ อัตราการลดลงของไวรัสที่มีชีวิตหลังจากการ inactivate ด้วย inactivant ต่าง ๆ เทียบกับเวลาที่ใช้ในการ inactivate (15) เช่นเดียวกับที่ สมใจ และคณะ (2533) พบว่าการใช้ BEI solution ที่เตรียมขึ้นใหม่ใช้ทันที จะใช้ Inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมง (8) ดังภาพที่ 23 เป็นการแสดงกราฟของ kinetic inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่ง Inactivate ที่ 26°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

V. การเก็บแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อยในไนโตรเจนเหลว

ไวรัสหลังการ inactivated แล้วซึ่งต่อไปนี้จะถูกเรียกว่า "แอนติเจน" ดังได้กล่าวมาแล้วว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เมื่อผ่านขบวนการ clarify, concentration, purification และ inactivate แล้วจะเป็นไวรัสเข้มข้น 275 เท่า จะถูกแบ่งใส่ในขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร บรรจุขวดละ 800 ml แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอการ formulate เป็นวัคซีนต่อไป

ภาพที่ 23 แสดง Kinetic inactivation curve ของ BEI ที่ใช้ในการ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย



บทที่ 6
การเตรียมวัคซีน
(Vaccine formulation)

I. Adjuvants

เป็นสารเคมีที่ใช้ในการผสมวัคซีนเพื่อเป็นตัวจับแอนติเจน แล้วค่อย ๆ ปล่อย (slowly released) แอนติเจนออกมากระตุ้นร่างกายให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนั้น ๆ เช่น Bomford., R. (1985) ได้กล่าวไว้ว่า Glenny and Co workers ได้ค้นพบว่า การผสม diptheric toxoid กับ precipitate ของ Alum จะทำให้ toxoid ให้ความคุ้มต่อโรค diphtheria ได้นานกว่าการใช้ toxoid เพียงอย่างเดียว (9)

Adjuvant ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนมีอยู่หลายตัว เช่น Aluminium hydroxide gel {$Al(OH)_3$} ซึ่งใช้ในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กันไป, oil emulsion, saponin ฯ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

Mechanism of action ของ adjuvant จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยจะจับกับแอนติเจนด้วย ion interaction เมื่อถูกฉีดเข้าสู่ร่างกายก็จะถูกจับด้วย macrophages แล้วส่งสัญญาณไปยัง lymphocytes (helper-T-Cells) ที่ผลิตจาก thymus หรือเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ซึ่ง T-lymphocytes นี้จะทำงานร่วมกับ lymphocytes ที่ผลิตจาก bone marrow หลั่ง antibody นั้น ๆ ทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันต่อ แอนติเจน ตัวที่ฉีดเข้าไปนั้น ในขณะเดียวกันก็จะเกิดการ accumulated ของ lymphocytes ที่ lymph node ใกล้ ๆ บริเวณที่ฉีด ซึ่งจะเป็นผลทางอ้อมในการมีคุณสมบัติเป็น adjuvant ต่อ macrophages ที่จะไปกระตุ้น T-lymphocyte และ lymphocyte ใน lymph node ร่วมกันสร้าง antibody ได้ยาวนานขึ้น (9)

แต่อย่างไรก็ดี Robert Edelman, (1980) ได้กล่าวว่า การทำงานของ adjuvant แต่ละตัวจะทำงานแตกต่างกันออกไป และยากต่อการอธิบาย โดยแอนติเจนจะเกาะกับ adjuvant แล้วไปต่อเชื่อมกับเซลล์ที่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มโรคที่ membrane แต่บางชนิดแอนติเจนกับ adjuvant จะแทรกเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ แล้วไปควบคุมการสร้างภูมิคุ้มกันโรคของเซลล์ที่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มโรค (16)

Aluminium hydroxide gel {$Al(OH)_3$} เป็นสารตัวหนึ่งที่ใช้ในการผสมวัคซีนโดยทั่วไป สามารถผลิตได้จากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย alum กับ NaOH ก็จะได้ $Al(OH)_3$ ตามสมการ (9)

$$2KAl(SO_4)_2 + 6NaOH \longrightarrow 2Al(OH)_3 + 3Na_2SO_4 + K_2SO_4$$

ซึ่งก่อนจะนำ aluminium hydroxide ที่ได้ไปใช้งานต้องผ่านขบวนการล้างทำความสะอาดและผสมปรับความเข้มข้นให้ได้ตามต้องการก่อนจึงจะนำไปใช้งานได้

Oil Emulsion การทำงานของ oil adjuvant จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับ $Al(OH)_3$ โดยการค่อย ๆ ปล่อยแอนติเจนไปกระตุ้น immune system ของคนหรือสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน Oil emulsion แบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1. oil in water (O/W) ซึ่งแอนติเจนจะอยู่ใน aqueous phase และ oil จะลอยอยู่ใน aqueous phase (ภาพที่ 24 A)

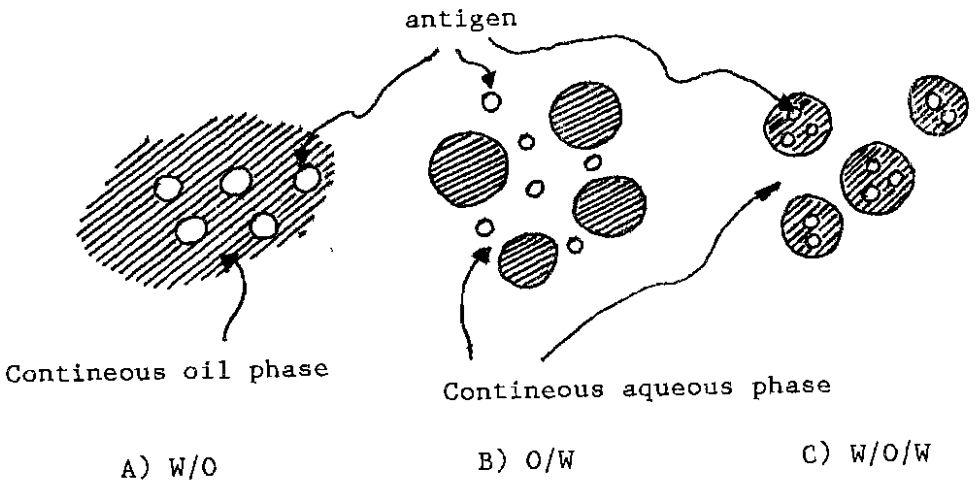
2. water in oil (W/O) ซึ่งแอนติเจนและ water droplets จะอยู่ใน oil phase(ภาพที่ 24 B)

3. water in oil in water (W/O/W) ซึ่งแอนติเจนและ water droplet จะอยู่ใน oil droplet และอยู่ใน aqueous phase อีกชั้นหนึ่ง(ภาพที่ 24 C)

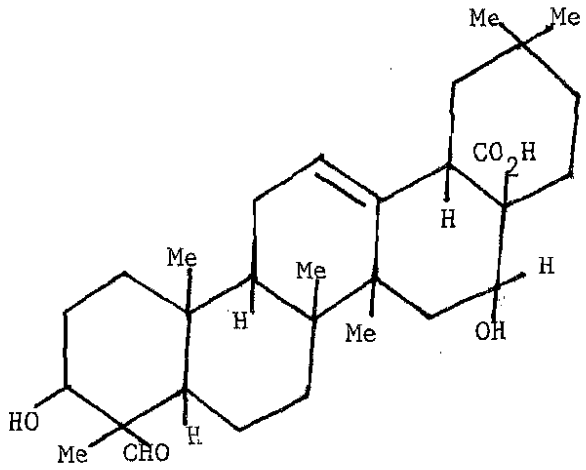
R. Bomford (1985) ได้กล่าวว่า W/O emulsion ซึ่งแอนติเจนอยู่ใน oil phase จะให้ผลดีต่อการใช้งานมากกว่า O/W emulsion ซึ่ง antigen อยู่ใน aqueous phase นอก oil phase (9) ส่วน Robert Elderman, 1980, ได้กล่าวไว้ว่า W/O emulsion จะใช้เวลาในการ release แอนติเจนยาวนานกว่า aluminium gel (28)

Saponin เป็น glycoside ชนิดหนึ่ง พบในเปลือกของต้น Quillaia Saponaria พบมากในอเมริกาใต้ (มีสูตรเคมีของกรด Quillaic ดังภาพที่ 25) มีคุณสมบัติเป็น adjuvant ใช้ในการผสมวัคซีน โดยเฉพาะการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ต้องใช้ควบคู่กับ Aluminium hydroxide ที่ adsorb แอนติเจนแล้ว จะให้ผลดีต่อความคุ้มโรค (9)

ภาพที่ 24 A. water in oil emulsion B. oil in water emulsion C. water in oil in water emulsion



ภาพที่ 25 สูตรเคมีของกรด Quillaic ใน saponin (triterpene part)



II. การ formulate วัคซีนสำหรับสุกร

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่า การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตจากแอนติเจนที่ได้จากวิธีการผลิตแบบ Rolling bottle cell culture และ formulate vaccine เป็นแบบ Aluminium hydroxide-saponin aqueous vaccine และในปัจจุบันไม่ได้ผลิตวัคซีนสำหรับสุกร โดยวิธีนี้แล้ว ซึ่งมีสูตรที่ควรจะทราบดังนี้

Virus fluid	76.0	parts
BEI solution	0.76	parts
Glycocol buffer	0.24	parts
Glycerin	1.0	parts
Saponin (10% solution)	2.0	parts
Aluminium hydroxide gel	20.0	parts
Total	100.0	parts

Virus is inactivated at 37°C for 24 hours before mixing with adjuvants

ในปัจจุบันนี้การผลิตวัคซีนสุกรผลิตจากแอนติเจนที่ได้จากวิธีการผลิตแบบ suspension cell culture methods และเก็บแอนติเจนไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอการ formulate เป็นวัคซีน ซึ่งวิธีการ formulate เป็นวัคซีนพอจะบรรยายดังภาพที่ 26 ได้ดังนี้ เช่น ผสมวัคซีน 1,650 ลิตร จะทำการผสม 3 ครั้ง ๆ ละ 650 ลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 phase คือ

1. Liquid phase จะประกอบด้วย Van Bekkum medium และแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อย 3 ไทป์ (กรณีผลิต trivalent vaccine) รวมทั้งสิ้น 275 ลิตร

2. Oily phase จะประกอบด้วยน้ำมันจำนวน 275 ลิตร

ปรับอุณหภูมิทั้ง 2 phase ให้ได้ 25°C เท่ากัน แล้วถ่าย liquid phase มาผสมกับ oily phase โดยการถ่ายและปั่นให้เสร็จภายใน 2 นาที แล้วถ่ายวัคซีนที่ได้ไปเก็บยังถังเก็บวัคซีนขนาด 2,000 ลิตร แล้วทำแบบเดิมอีก 2 ครั้ง จะได้วัคซีนรวมทั้งสิ้น 1,650 ลิตร ปล่อยวัคซีนไว้ในถังเก็บที่ 4°C ค้างคืนโดยไม่ต้องปั่น (เพื่อให้วัคซีนกลับ phase จาก W/O เป็น O/W) แต่จะทำการปั่น 1 ชั่วโมงก่อนการบรรจุลงขวด ซึ่งวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จะเป็นวัคซีนน้ำมันชนิด O/W (oil in water vaccine) (3)

III. การ formulate วัคซีนสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ เป็นแบบ Aluminium-saponin aqueous vaccine เช่น การผสมวัคซีนชนิดรวม 3 ไทป์ จำนวน 2,000 ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 27 ซึ่งจะผสมวัคซีนในถังผสมวัคซีน 2,000 ลิตร ซึ่งจะประกอบด้วย sterile Van Bekkum medium ประมาณ 1,350 ลิตร, แอนติเจน 3 ไทป์ ปั่นผสมที่ 4°C จากนั้น จึงผสมด้วย sterile aluminium hydroxide gel จำนวน 430 ลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันที่ 4°C ประมาณ 1 ชั่วโมง จึงทำการเติมสารเคมีตัวอื่น ๆ ลงไป เช่น 4% Formaldehyde solution 6 ลิตร, Antifoam 2 ลิตร, แล้วจึงตัน 10% Saponin 50 ลิตร ลงไปเป็นอันดับสุดท้าย ก่อนทำการปรับปริมาตรวัคซีนให้เป็น 2,000 ลิตร ด้วย sterile Van Bekkum medium และปรับ pH วัคซีนให้เป็น 8.2 ด้วย glycocol buffer ประมาณ 2 ลิตร ปั่นที่ 4°C ข้ามคืน แล้วจึงทำการบรรจุลงขวดในตอนเช้า

IV. **การเก็บวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย** การเก็บและการขนส่งวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จะต้องเก็บและขนส่งที่อุณหภูมิ 4-8°C และระวังไม่ให้ถูกแสงแดดโดยตรง ตลอดจนต้องเขย่าขวดก่อนการใช้งาน

V. การทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเมื่อผลิตเสร็จแล้วก่อนจะนำออกจำหน่ายจะต้องผ่านการทดสอบคุณภาพเสียก่อน โดยการทดสอบที่จะต้องผ่าน คือ

1. Potency test
2. Safety test
3. Purity test

Potency test คือการทดสอบความคุ้มโรคว่าสามารถให้ความคุ้มต่อโรคหรือไม่ โดยการทดสอบจะทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยการฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ทดลองเป็นเวลา 21 วันแล้ว จึงนำสัตว์นั้นไปฉีดพิษทับ (challenge) ด้วยเชื้อไวรัสที่กำหนด แล้วอ่านผลว่าสัตว์ที่ฉีดวัคซีนแล้วฉีดพิษทับนั้นเกิดโรคหรือไม่ โดยเกณฑ์การตัดสิน คือ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรจะต้องให้ความคุ้ม

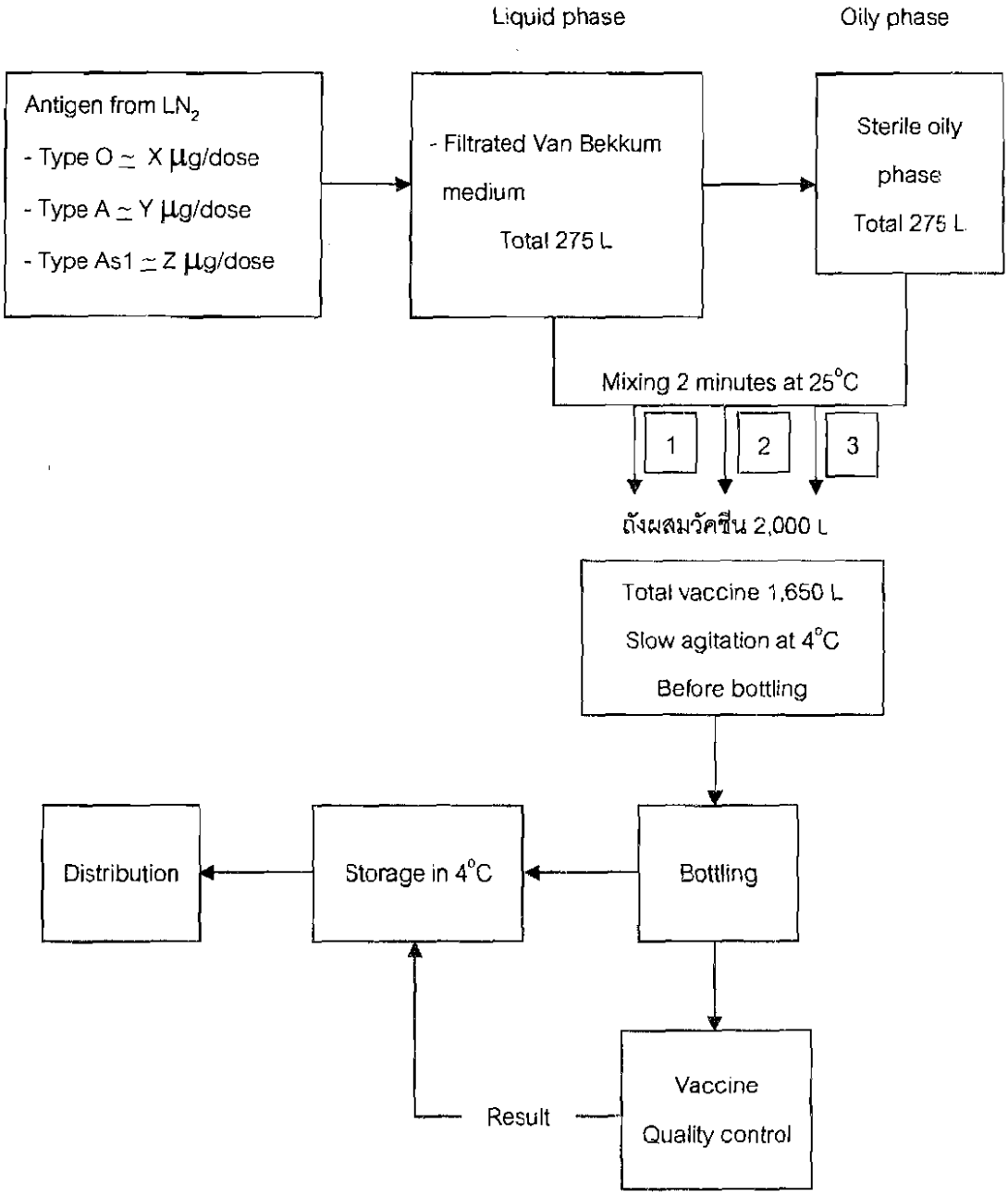
60% ขึ้นไป (แต่ละไทป์) จึงจะผ่านการทดสอบและอนุมัติให้ออกจำหน่ายได้ ส่วนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ จะต้องเท่ากับหรือมากกว่า 3 PD_{50}/dose ของแต่ละไทป์ จึงจะผ่านการทดสอบและอนุมัติให้ออกจำหน่ายได้

Safety test คือความปลอดภัยในการฉีดวัคซีน เช่น เมื่อฉีดแล้วไม่มีการแพ้วัคซีน, ไม่เกิดการระบาดของโรคเนื่องจากการฉีดวัคซีน นอกจากนี้วัคซีนยังกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิที่สามารถตรวจจากเลือดได้ (SN-titer) โดยการนำวัคซีนฉีดเข้าสัตว์ทดลองในขนาด 2 dose/ตัว สำหรับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร และ 3 dose/ตัว สำหรับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ

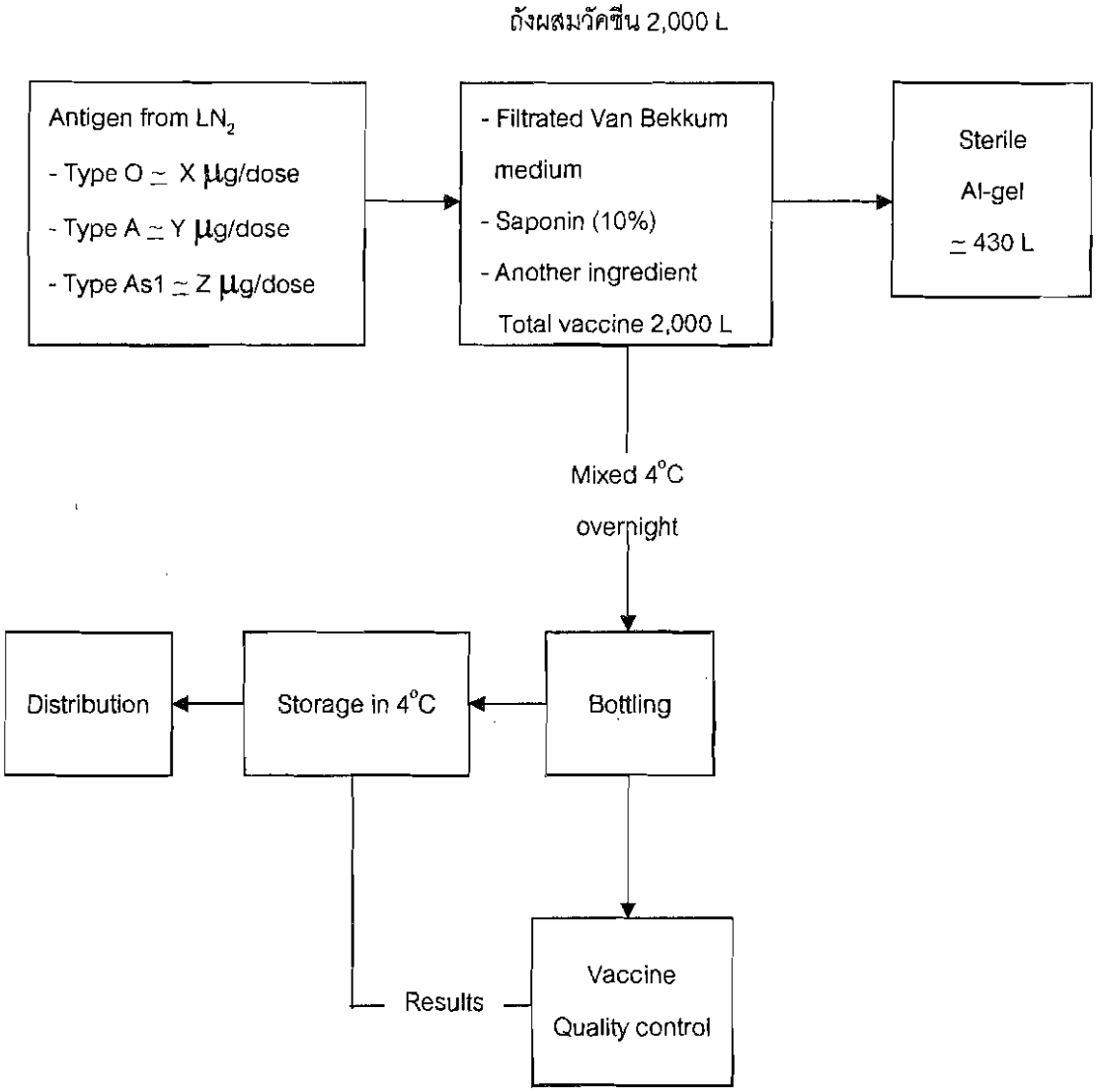
Purity test หมายถึงการทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีนว่าไม่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคตัวอื่น ๆ โดยการสุ่มตัวอย่างวัคซีนไปทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ ถ้าไม่มีการปนเปื้อน จึงให้ผ่านและอนุมัติให้จำหน่ายให้

นอกจากการทดสอบทั้ง 3 ข้อ แล้วยังมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการอีกเป็นจำนวนมาก เช่น การทดสอบหา EI-residue, foreign protein content, inactivation test ฯลฯ ซึ่งรายละเอียดปลีกย่อยของการทดสอบทั้งหมดสามารถเขียนได้เป็นหัวข้อวิชาเกี่ยวกับการทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยอีกเล่มหนึ่ง ดังนั้นงานทดสอบนี้จึงควรจะเป็นอีกหัวข้อหนึ่งแยกต่างหากจากวิธีและขบวนการผลิต

ภาพที่ 26 ขั้นตอนการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร



ภาพที่ 27 ขั้นตอนการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ



เอกสารอ้างอิง

1. เชิงชาย จันทรัศมี, พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์, 2533, การใช้เครื่องกรองฟุนด้าในการ clarify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน, วารสารชีวผลิตภัณฑ์, ปีที่ 1 เล่มที่ 1, หน้า 27-30
2. เชื้อ ว่องส่งสาร ; 2533, โรคสัตว์, ในประมวลวิชาการสัตวแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 5, ISBN 974-450-024-9., หน้า 113-275
3. นริศ ว่องวัฒนากูล, สินสมุทร นิลฉวี, สหวัชร์ อึ้งวณิชบรรณ, 2543, ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกร ชนิดน้ำมันแบบ รวม 3 ไทป์, วารสารชีวผลิตภัณฑ์, ปีที่ 10, ฉบับที่ 1-2, หน้า 51-60
4. พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ; 2539, ปัญหาในการบริหารงานของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ; เอกสารบทความเชิงบริหาร หลักสูตรนักบริหารการพัฒนาการเกษตรและสหกรณ์ระดับสูง รุ่นที่ 16 ภายใต้ความร่วมมือระหว่างกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กับสถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์, 32 หน้า
5. พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์, เชิงชาย จันทรัศมี, 2534, การเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK21C13 แบบซัสเปนชั่นด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย, วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย) ปีที่ 25 ฉบับที่ 2, หน้า 200-205
6. ร่มพฤกษ์ อุดล, สมใจ กมลศิริพิชัยพร ; 2544, การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ในประเทศไทย โดยวิธีลิขวิดเฟสนิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า, วารสารชีวผลิตภัณฑ์ปีที่ 14 ฉบับที่ 1-2, หน้า 37-44
7. วัชระ กสินฤกษ์ ; 2544 DNA vaccine ; เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ; 7 หน้า
8. สมใจ กมลศิริพิชัยพร, นงลักษณ์ ชลสินธุ์, วิไล ลินจงสุบงกช, 2533, อิทธิพลของการเก็บและการเตรียมสาร Binary Ethylene Imine (BEI) ต่อการเป็นพิษและคุณสมบัติในการ Inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย, วารสารชีวผลิตภัณฑ์, ปีที่ 1, เล่มที่ 1, หน้า 47-52
9. Bomford, R., 1985, Adjuvants, In "Animal cell Biotechnology volume 2", Academic Press, UK, P.235-250
10. Billie Ruth Bird, B.A., Francis, T. Forester, Ph. D; 1981, Basic Laboratory Techniques in cell culture ; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories, Laboratories Training and Consultation Division., 135 p

11. Bryan Griffiths., 1992, Scaling up of animal cell cultures, In "Animal cell culture, A practical Approach second Edition", Oxford University press, Oxford, New York, Tokyo, P 47-93
12. Ball, G.D., 1985, clarification and sterilization, In "Animal cell Biotechnology volume 2", Academic press, UK, P. 87-127
13. Capstic, P.B., Telling, R.C., Chapman, W.G., Stewart, L.D. 1962, Growth of cloned stain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. Nature. (Lond) 195., 1163-1164
14. Cartwright. Terence., Duchesne. M., 1985, Purification of products from Cultured Animal cells, In "Animal Cell Biotechnology volume 2", Academic press, UK, P. 151-184
15. DOEL., T.R., 1985, Inactivation of Virus Produces in Aminal Cell Cultures, In "Animal cell Biotechnology volume 2". Academic Press, UK, P. 129-149
16. Edel man, R., 1980, Vaccine Adjuvants, Review of Infectious Disease, Vol. 2, No. 3, p 370-383
17. HEDGER., R.S., 1981, Foot and Mouth Disease, In "Infectious Disease of Wild Mammals second edition", (John W. Davis, Lars H. Karstad, Daniel. O. Trainers, eds), The Iowa State Universty Press, AMES, IOWA, USA., P. 87-96
18. Inoue, T., Yamaguchi, S., Saeki, T., Sekikuchi, K., 1990, Production of infectious swine vesicular disease virus from cloned cDNA in mammalian cells., Journal of General Virology 71, P. 1835-1838
19. Makarasen. P., Sinsuwonkwat. P., Tancchareonwatch. P., 1985, Binary Ethyleneimine and Foot-and-mouth Disease Vaccine Production in Thailand, In "Veterinary Viral Disease, Their Significance in South-East Asia and the Western Pacific (Antony J. Delta-Porta), Acadenic Press, Sydney, P. 308-309
20. Motohashi, T., 1983, Some Aspects of FMD vaccine, In "Report of third Country training programme on Foot and Mouth Disease Control (Group Training Course), Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives Thailand and the Japan International Cooperation Agency., P. 117-147

21. Makarasen, P., Sinsuwontkwat, R, 1986, Vaccine and Vaccine Production, In "Third Country training programme on Foot and Mouth Disease Control (Group Training Course)" Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives,Thailand and the Japan International Cooperation Agency., P. 180-201
22. Nardelli. L, Panina, G.F., 1977, The use of suspension culture for FMD vaccine production.Criteria for the evaluation of cells, virus and vaccine, Biol. Standard., Vol. 35. P. 9-25
23. Ozawa, Y. 1979. Common problems in tissues culture. In "Practiced Tissue Culture Application". (K. Mamoroch and H. Hirumi. eds), Acadamic press, New York., P. 67-75
24. Pieter Van der Marel., 1985, concentration, In "Animal cell Biotechnology volume 2", Academic press, UK, P. 185-216
25. R. Lan Freshney ; 2000. Culture of animal cells, A manual of basic technique Fourth Edition, A JOHN WILLEY & SONS, INC., Publication, 577 P.
26. R.I. Freshney ; 1992, A practical approach second edition, CRC Department of Medical Oncology, University of Glasgow, Oxford University Press, Oxford, New York,Tokyo., 323P.
27. Rhone Merieux., 1988. Technique for production of Foot and Mouth Disease vaccine, section 1, culture media (ลิขสิทธิ์), 178P.
28. Rweyemamu, Mark M., 1984, Antigenic variation in Foot-and-Mouth Disease : studies based on the virus neutralization reaction, Journal of Biological Standardization, 12, P. 323-337
29. Spier, R.E. ; 1983. Opportunities for animal cell biotechnology. In "Proceedings of Biotechnology", Online publication Ltd., Northwood Hills, UK ; P 317-335
30. Wang, C.Y., Chang, T.Y., Walfield, A.M., Ye, J., Shen, M., Chen, S.P., Li, M.C., Len, L.Y., Jong, M.H., Yang, P.C., Chyr, N., Kramer, E., Brown, F.; 2000, Effective syntheticpeptide vaccine for foot and mouth disease in swine ; vaccine 3175, P 1-8