

เปรียบเทียบการใช้ sucrose density gradient 5-30% และ 15-45%
ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไชยา สง่าประโคน¹ สหวิทย์ อึ้งวนิชบรรณ¹

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบการใช้ sucrose density gradient 5-30% และ 15-45% ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า การใช้ sucrose density gradient 5-30% โดยใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เวลาในการปั่น 90 นาที วัด 146S peak ด้วยเครื่อง UV-monitor โดยใช้ sensitivity 0.05 จะให้ลักษณะของ 146S peak เหมือนกับการใช้ sucrose density gradient 15-45% และวิธีการทดสอบมีความเที่ยงตรงสูง ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้ง 2 วิธี ($P>0.05$)

ดังนั้นสามารถใช้ sucrose density gradient 5-30% แทนการใช้ sucrose density gradient 15-45% ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ ทำให้ช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการปั่น ลดการสึกหรอของเครื่องมือ ลดการใช้สารเคมี ลดการใช้พลังงาน และเพิ่มความสามารถในการทดสอบตัวอย่างได้รวดเร็วและมากขึ้น

คำสำคัญ : sucrose density gradient อนุภาค 146S ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

¹ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเป็นอนุภาคที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์และใช้ในการกำหนดปริมาณแอนติเจนต่อโด๊สของวัคซีน โดยการใช้เทคนิควิธี sucrose density gradient ultracentrifugation technique (Bartelling and Neloen, 1974; Doel et al., 1982; Doel and Nowat, 1985; Shirai et al., 1990; พิสมัย และคณะ, 2535; มนตรี และชาวฤทธิ์, 2535)

ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ใช้เทคนิควิธีนี้ ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (ไชยา และนพพร, 2543) โดยการใช้ sucrose density gradient 15-45% บั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm ใช้เวลาในการปั่นเป็นเวลา 210 นาที ซึ่งใช้เวลานาน ทำให้ทราบผลการตรวจสอบช้า การตรวจสอบตัวอย่างต่อวันทำได้น้อย ใช้ปริมาณ sucrose มาก เครื่อง ultracentrifuge เกิดการสึกหรอสูงและเปลืองพลังงานไฟฟ้า

จุดประสงค์ในการทดลองครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ระหว่างการใช้ gradient 5-30% และ 15-45% ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการปั่นตัวอย่าง (centrifugal time) ลดความสึกหรอของเครื่องมือ เช่น เครื่อง ultracentrifuge เครื่อง UV-monitor และ peristaltic pump เป็นต้น ลดปริมาณการใช้สารเคมี ลดการใช้พลังงานไฟฟ้า และเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบตัวอย่างต่อวันได้มากขึ้น ทราบผลการตรวจสอบได้เร็วขึ้น เช่น ต้องการทราบปริมาณแอนติเจนของวัคซีนในถังผสมก่อนที่ทำการบรรจุขวดและปิดฉลาก หรือการทดสอบเบื้องต้นในกรณีสงสัยว่าเป็นวัคซีนปลอม (ไชยา และนพพร, 2543) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ปฏิบัติต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม Sucrose density gradient

1. gradient 15-45% เตรียมโดยใช้สารละลาย sucrose¹ 15% และ 45% (อย่างละ 32 ml) เตรียมโดยการใช้เครื่อง continuous gradient former² ใส่ gradient ในหลอด centrifuge³ ที่มีขนาด 14 x 89 มม. (กว้างxสูง) ซึ่งการเตรียมต่อครั้งจะได้ gradient 6 หลอด เก็บที่อุณหภูมิ 4° C ช้ามคืนก่อนใช้ เพื่อให้ gradient มีการจัดเรียงตัวที่ดี

¹ Merck, Germany

² HBI, Sweden

³ Ultraclear™, Beckman, USA

2. gradient 5-30% เตรียมโดยใช้สารละลาย sucrose 5% และ 30% ด้วยเครื่องทำ gradient เช่นเดียวกับ gradient 15-45% เก็บที่อุณหภูมิ 4° C เช่นเดียวกับข้อ 1

ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

-ไวรัสบริสุทธิ์(purified virus) ชุด 46404 สำหรับทดสอบหาเส้นกราฟมาตรฐาน

-ไวรัสเข้มข้นชุด AF 471036 สำหรับทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีการทดสอบ

-ไวรัสเข้มข้นที่ inactivated แล้ว จำนวน 30 ตัวอย่าง สำหรับทดสอบเปรียบเทียบ 146S

การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์(purified virus)

โดยการใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพาะลงในเซลล์ (primary lamb kidney cells) เป็นเวลา 18-24 ชม. เมื่อเกิด CPE ระหว่าง 90-100% เก็บไวรัสไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาตกตะกอนไวรัสด้วย PEG 6000 ปริมาณ 7.5% w/v แล้วนำไปปั่น (agitate) ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบเวลานำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 90 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เก็บตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย Tris buffer ปริมาตร 1:100 ส่วนของปริมาตรไวรัสเริ่มต้น นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมา treat ด้วยสาร fluorocarbon อัตราส่วน 1:2 นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาใส่บน gradient 15-45% ในหลอด centrifuge ขนาด SW28 หลอดละ 8.5 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ด้วยความเร็วรอบ 22,000 rpm เป็นเวลา 9 ชม. แล้วนำมาวัด 146S peak ด้วยเครื่อง UV spectrometer เก็บไวรัสที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer⁴ ที่ wave length 239, 259 และ 280 nm แล้วคำนวณปริมาณอนุภาค 146S ต่อไป

การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S โดยการใช้ gradient 15-45%

โดยการนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 2.0 ml ใส่บน gradient 15-45% ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge⁵ ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เป็นเวลา 210 นาที หลังจากนั้นนำไปวัด 146S peak ของอนุภาค 146S โดยใช้ peristaltic pump⁶ ดูดตัวอย่างจากก้นหลอด ด้วยอัตราการไหลของตัวอย่าง 50 ml/hr ผ่าน flow cell ที่มี path length 3 mm ของเครื่อง UV monitor⁷ ที่ใช้ wave length 254 nm, paper speed 0.2 mm/sec, UV spectrometer sensitivity 0.1 (ABS range) และ recording amplification 100 mV แล้วคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานจากไวรัสบริสุทธิ์ (มนตรี และ เซาวฤทธิ, 2535; ไชยา และนพพร, 2543)

⁴Biotek® , Italy

⁵Beckman L8-60M ultracentrifugator, Beckman, USA

⁶Bio-Rad® , USA

⁷LKB-Bromma® , Sweden

การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับหาปริมาณอนุภาค 146S โดยการให้ gradient 5-30%

1. เวลาในการปั่น (ultracentrifugation time) และปริมาตรตัวอย่าง (sample load volume)

โดยใส่ไวรัสบริสุทธิ์ปริมาณ 0.5, 1.0 และ 2.0 ml บน gradient 5-30% ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เป็นเวลา 60, 80, 100 และ 120 นาที หลังจากนั้นนำไปวัด 146S peak โดยใช้พารามิเตอร์เช่นเดียวกับการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ที่ใช้ gradient 15-45% บันทึกผล

2. ความไวของเครื่องวัด (spectrometer sensitivity, ABS range) โดยการให้ไวรัสบริสุทธิ์ ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่วัด 146S peak โดยใช้ sensitivity ของเครื่อง UV monitor เท่ากับ 0.05

คัดเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสม ที่ให้ลักษณะและตำแหน่งของ 146S peak คล้ายคลึงกับการให้ gradient 15-45% มากที่สุด เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การเปรียบเทียบผลการหาปริมาณอนุภาค 146S จากการให้ gradient 5-30% และ 15-45%

- การเตรียมเส้นกราฟมาตรฐาน

ใช้ไวรัสบริสุทธิ์ชุด 46404 ที่เตรียมได้ ซึ่งมีอัตราส่วนความบริสุทธิ์ $OD_{259nm}/OD_{239nm} = 1.64$ และ $OD_{259nm}/OD_{239nm} = 1.38$ (อัตราส่วนมาตรฐาน $\approx 1.6-1.8$ และ 1.4 ตามลำดับ) และคำนวณปริมาณอนุภาค 146S จาก $E_{259nm, 1cm}^{1\%} = 76$ (มนตรี และเซวฤทธิ์, 2535) มีปริมาณอนุภาค 146S ประมาณ 320 $\mu\text{g/ml}$ นำมาเจือจางด้วย Van Bekkum medium ให้มีปริมาณอนุภาค 146S เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ นำไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจางแล้วไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่เกิดขึ้น โดยการให้ gradient 5-30% ตามพารามิเตอร์ที่เหมาะสม และ gradient 15-45% แล้วสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Linear regression, r) เปรียบเทียบผลที่ได้

- การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีการทดสอบ

นำตัวอย่างไวรัสเข้มข้นชุด AF 471036 ทำการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S โดยให้ gradient 5-30% ตามพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่คัดเลือกไว้ และโดยการให้ gradient 15-45% ทำการทดสอบซ้ำ 20 ครั้ง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (%Coefficient of Variations, %CVs)

- เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสเข้มข้น

ทำการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้นที่ inactivated จำนวน 30 ตัวอย่าง ทำการทดสอบตัวอย่างแบบ duplicate แล้วหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างจากการให้ gradient 5-30% และ 15-45%

ผล

พารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการใช้ sucrose density gradient 5-30%

1. เวลาในการปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge และปริมาตรตัวอย่าง

ระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นตัวอย่างด้วยเครื่อง ultracentrifuge เมื่อปั่นเป็นเวลา 60, 80, 100 และ 120 นาที พบว่า ตำแหน่งของ 146S peak ที่ได้จะอยู่ระหว่าง 1/5, 2/5, 3/5 และ 4/5 ส่วนจากปลายหลอดถึงกันหลอดตามลำดับ (รูปที่ 1 แสดงเฉพาะการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 และ 1.0 ml)

ลักษณะของ 146S peak ที่ได้จากการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5, 1.0 และ 2.0 ml วัดโดยใช้พารามิเตอร์เช่นเดียวกับการใช้ gradient 15-45% (sensitivity 0.1) พบว่าการใส่ตัวอย่าง 0.5 และ 1.0 ml ลักษณะของ 146S peak จะมีขนาดเล็กที่คล้ายคลึงกัน แต่ peak ของ 0.5 ml จะมีความแหลม (sharp) และฐานแคบกว่า 1.0 ml ขณะที่การใส่ตัวอย่าง 2.0 ml ลักษณะของ 146S peak มีฐานกว้างและขนาดใหญ่กว่าของ 0.5 และ 1.0 ml (รูปที่ 2)

2. ความไวของเครื่องวัด

การวัด 146S peak โดยใช้ sensitivity 0.05 พบว่าลักษณะของ 146S peak จากการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 และ 1.0 ml ที่ได้จะมีขนาดที่ใหญ่และชัดเจนกว่าการใช้ sensitivity 0.1 ประมาณ 2 เท่า ส่วนการใส่ตัวอย่างปริมาตร 2.0 ml ลักษณะของ 146S peak ไม่เหมาะสม มีขนาดใหญ่เกินกว่าความกว้างของกระดาษกราฟ (รูปที่ 3)

จากการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสม พบว่าการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml บน gradient 5-30% วัดโดยใช้ sensitivity 0.05 จะให้ลักษณะของ 146S peak ที่คล้ายคลึงกันกับการใช้ gradient 15-45% มากกว่าการใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 ml (รูปที่ 4) และระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นตัวอย่าง 80 และ 100 นาที จะให้ลักษณะของ peak ที่ชัดเจน คล้ายคลึงกันและตำแหน่งใกล้เคียงกัน ขณะที่การปั่นเป็นเวลา 60 นาที ตำแหน่งของ peak จะอยู่ที่ปลายหลอดเกินไป อาจทำให้อนุภาค 146S แยกออกจากอนุภาคอื่นไม่สมบูรณ์ ขณะที่การปั่นเป็นเวลา 120 นาที ตำแหน่งของ peak จะอยู่ใกล้กันหลอด อาจทำให้ตะกอนหรือกากเซลล์อื่นมีผลต่อการวัด ทำให้ 146S peak ไม่เรียบ ในกรณีที่ตัวอย่างไม่ใช่ไวรัสบริสุทธิ์และใช้เวลาในการปั่นนาน จึงพิจารณาเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการปั่นตัวอย่างเป็น 90 นาที ดังนั้นพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S จากการใช้ gradient 5-30% ได้ดังตารางที่ 1

การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S จากการใช้ gradient 5-30% และ 15-45%

- เปรียบเทียบเส้นกราฟมาตรฐาน

เมื่อมีปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสบริสุทธิ์เท่ากัน พบว่าการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml บน gradient 5-30% จะให้ peak area น้อยที่สุด การใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 ml จะมากที่สุด ขณะที่การใช้ gradient 15-45% จะมากกว่า 0.5 ml แต่น้อยกว่า 1.0 ml

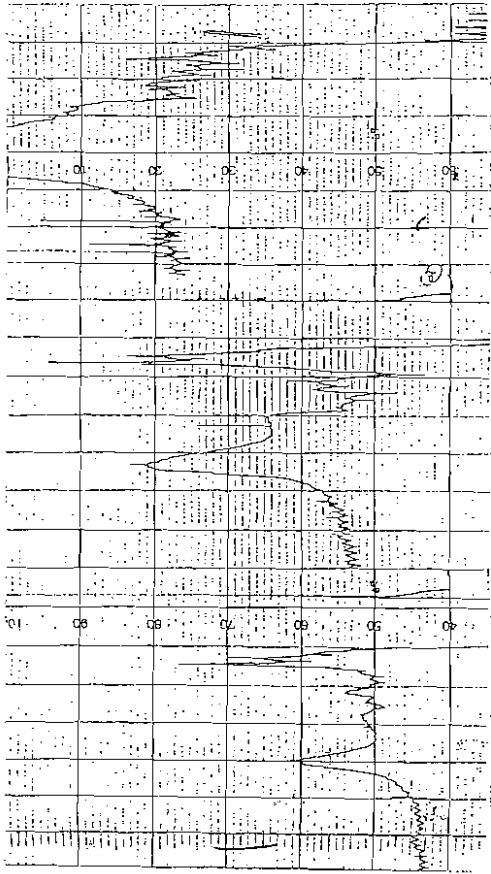
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear regression, r) จากการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml, 5-30%-1.0 ml และ 15-45% เท่ากับ 0.9989, 0.9930 และ 0.9976 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 5)

- เปรียบเทียบความเที่ยงตรงของวิธีการทดสอบ

พบว่าการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S จากการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml, 5-30%-1.0 ml และ 15-45% มีความเที่ยงตรงดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (%Coefficient of Variations, %CVs) เท่ากับ 2.70, 3.50 และ 3.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และจะเห็นว่ามี การกระจายอยู่ในช่วง $\bar{X} \pm 2SD$ ของการทดสอบแต่ละวิธี แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีพบว่าบางค่าของ 5-30%-1.0 ml กระจายตัวอยู่นอกช่วง $\bar{X} \pm 2SD$ ของ 15-45% (61.6-69.6 $\mu\text{g/ml}$) ขณะที่ทุกค่าของ 5-30%-0.5 ml กระจายตัวอยู่ในช่วง $\bar{X} \pm 2SD$ ของ 15-45% (รูปที่ 6)

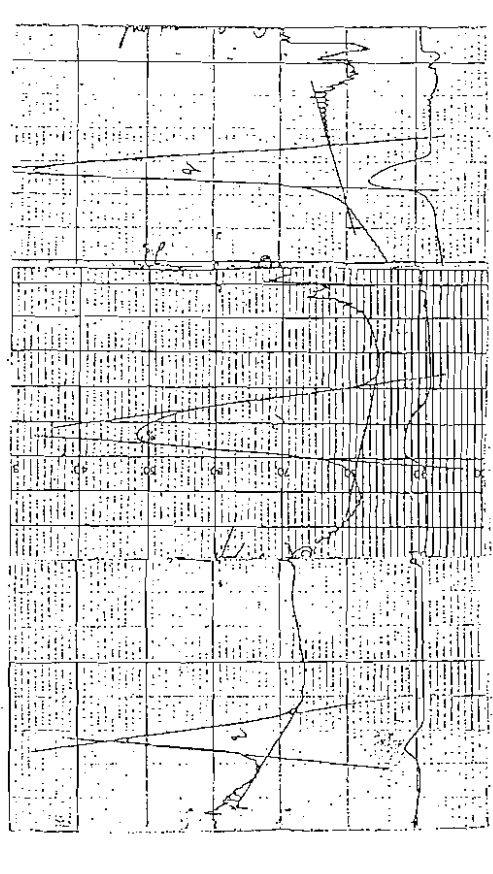
- เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น

เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้นจำนวน 30 ตัวอย่าง จากการใช้ gradient 5-30% โดยใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 และ 0.5 ml พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างจากการใช้ gradient 15-45% (Mean \pm SD) เท่ากับ 12.9 \pm 5.1% (ต่ำสุด 1.9%, สูงสุด 27.3%) และ 0.4 \pm 3.8% (ต่ำสุด 0.2%, สูงสุด 6.8%) ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 และ 0.5 ml พบว่าการใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 ml ปริมาณอนุภาค 146S ที่ได้จะน้อยกว่าการใส่ปริมาตรตัวอย่าง 0.5 ml เท่ากับ 14.7 \pm 6.8% (ต่ำสุด 0.7%, สูงสุด 30.7%) (ตารางที่ 4)



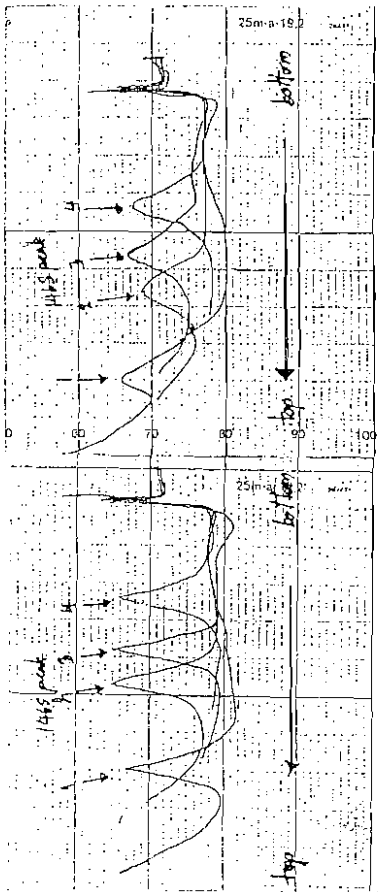
3a 3b 3c

รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ 146S peak จากการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5, 1.0 และ 2.0 ml/min gradient 5-30% (3a, 3b และ 3c ตามลำดับ) วัดโดยใช้ sensitivity 0.05



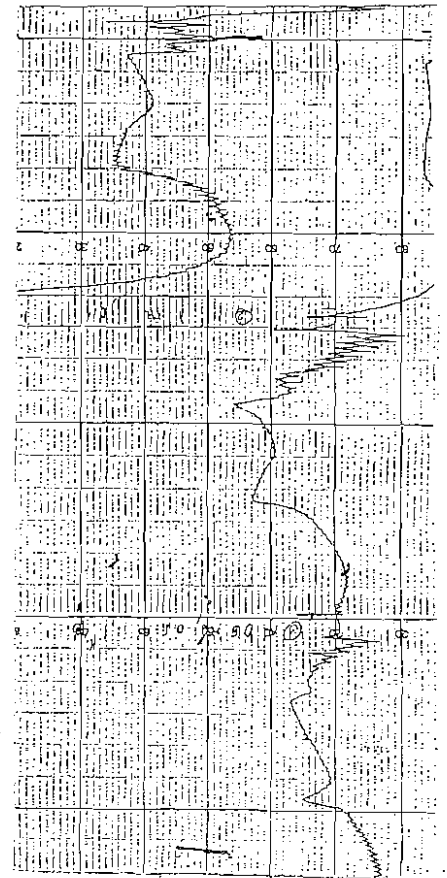
4a 4b 4c 4d

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ 146S peak ของไวรัสบริสุทธิ์ (purified virus) จากการใส่ตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 และ 1.0 ml/min gradient 5-30% (4a และ 4b ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับการใช้ gradient 15-45% (4c และ 4d)



1a 1b

รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของ 146S peak เมื่อป้อนตัวอย่างบน gradient 5-30% เป็นเวลา 60, 80, 100 และ 120 นาที (ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) จากการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml (1a) และ 1.0 ml (1b)



2a 2b 2c

รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ 146S peak จากการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5, 1.0 และ 2.0 ml/min gradient 5-30% (2a, 2b และ 2c ตามลำดับ) วัดโดยใช้ sensitivity 0.1

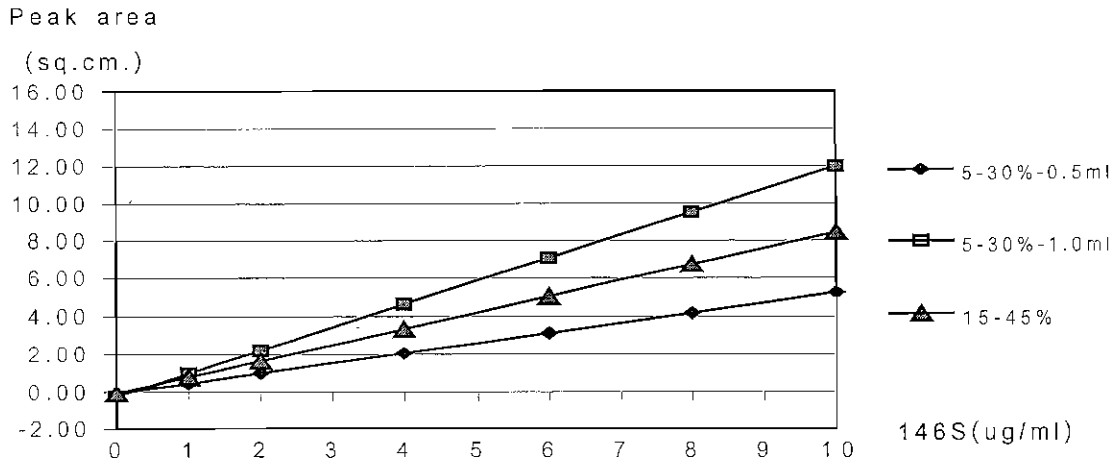
ตารางที่ 1 แสดงพารามิเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ sucrose density gradient 5-30% และ 15-45%

| Parameters | 15-45% | 5-30% |
|---|--------|------------|
| 1. Spectrophotometer sensitivity, ABS range | 0.1 | 0.05 |
| 2. Path length of flow cell, cm | 0.3 | 0.3 |
| 3. flow rate, ml/hr | 50 | 50 |
| 4. Chart speed, mm/sec | 0.2 | 0.2 |
| 5. Sample load volume, ml | 2.0 | 0.5 or 1.0 |
| 6. Ultracentrifugation speed, rpm | 36,000 | 36,000 |
| 7. Ultracentrifugation time, min | 210 | 90* |

* จากการปั่นตัวอย่างบน gradient เป็นเวลา 80 และ 100 นาที จะให้ลักษณะของ 146S peak ที่ใกล้เคียงกัน จึงพิจารณาเลือกระยะเวลาสำหรับการทดสอบเฉลี่ยที่ 90 นาที

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสบริสุทธีกับ peak area จากการปั่นตัวอย่างบน gradient 5-30% และ 15-45%

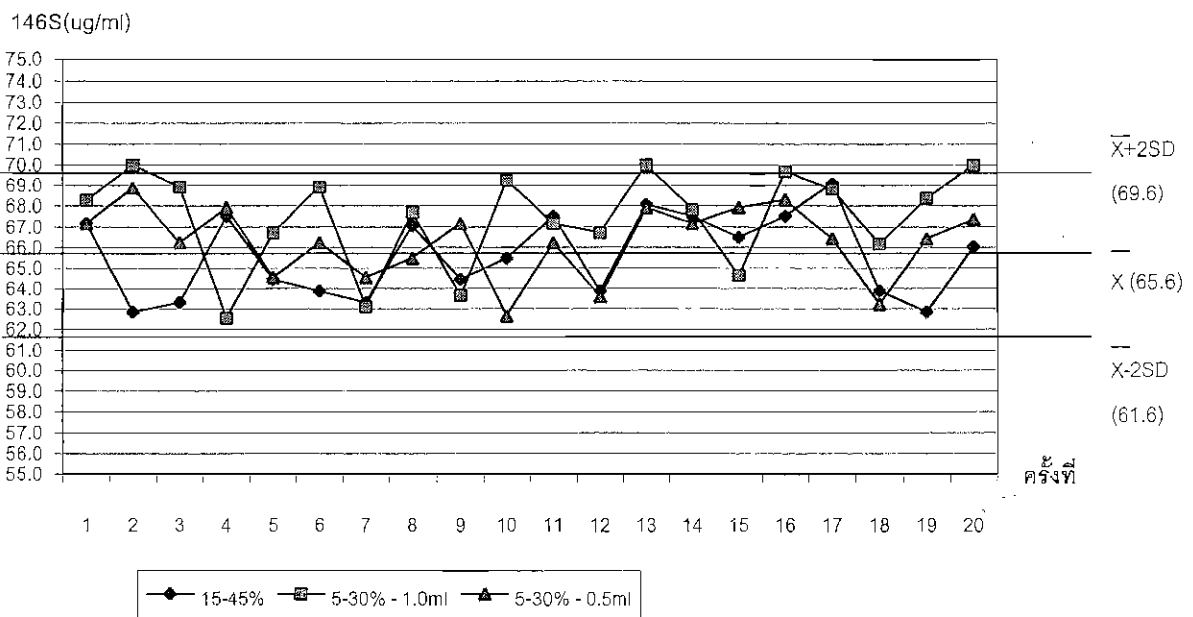
| ปริมาณอนุภาค 146S ($\mu\text{g/ml}$) | พื้นที่ใต้พีค (Area, cm^2) | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|---------------------|
| | 5-30% - 0.5 ml | 5-30% - 1.0 ml | 15-45% - 2.0 ml |
| 1 | 0.45 | 1.19 | 0.73 |
| 2 | 0.93 | 1.96 | 1.71 |
| 4 | 2.02 | 4.26 | 3.38 |
| 6 | 3.13 | 7.52 | 4.57 |
| 8 | 4.02 | 8.61 | 6.99 |
| 10 | 5.37 | 12.60 | 8.47 |
| $y = ax + b$ | $=0.5318X - 0.0816$ | $=1.220X - 0.2430$ | $=0.8508X - 0.0765$ |
| Linear regression, r | 0.9989 | 0.9930 | 0.9976 |



รูปที่ 5 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ของไวรัสบริสุทธิ์จากการใช้ gradient 5-30% และ 15-45%

ตารางที่ 3 แสดงความเที่ยงตรงของการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ชุด AF 471036 จากใช้ gradient 5-30% และ 15-45%

| Sucrose density gradient, ปริมาตรตัวอย่าง | ปริมาณอนุภาค 146S (µg/ml) | |
|--|---------------------------|------|
| | Mean ± SD | %CVs |
| 15-45% - 2.0 ml, n=20 | 65.6 ± 2.0 | 3.0 |
| 5-30% - 1.0 ml, n=20 | 67.4 ± 2.3 | 3.5 |
| 5-30% - 0.5 ml, n=20 | 66.3 ± 2.7 | 2.7 |



รูปที่ 6 แสดงความเที่ยงตรงของการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของแอนติเจนไวรัสชุด AF 471036 จากการทดสอบซ้ำ 20 ครั้ง ($\bar{X} \pm 2SD$) โดยใช้ gradient 5-30% และ 15-45%

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 30 ตัวอย่างจากการใช้ gradient 5-30% และ 15-45%

| Sample (Batch no.) | ปริมาณอนุภาค 146S ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง | | |
|-----------------------|---|----------------|----------------|------------------------|------|-------|
| | 15-45% | 5-30% - 1.0 ml | 5-30% - 0.5 ml | A-B | A-C | B-C |
| 1. AI 472002 | 192.6 | 159.5 | 205.8 | 17.2 | -6.8 | -29.0 |
| 2. AI 472004 | 223.9 | 177.6 | 222.2 | 20.6 | 0.7 | -25.1 |
| 3. AI 472005 | 289.8 | 258.1 | 284.0 | 10.9 | 2.0 | -10.0 |
| 4. AI 472006 | 180.5 | 160.0 | 184.7 | 11.3 | -2.3 | -15.4 |
| 5. AI 472007 | 153.2 | 136.5 | 149.9 | 10.9 | 2.1 | -9.8 |
| 6. AI 471008 | 239.2 | 234.7 | 236.3 | 1.9 | 1.2 | -0.7 |
| 7. AI 471009 | 168.9 | 153.9 | 172.0 | 8.9 | -1.8 | -11.8 |
| 8. AI 471010 | 160.5 | 142.2 | 160.7 | 11.4 | -0.2 | -13.0 |
| 9. AI 471011 | 290.3 | 259.3 | 286.4 | 10.7 | 1.4 | -10.4 |
| 10. AI 471012 | 186.9 | 136.0 | 177.8 | 27.3 | 4.9 | -30.7 |
| 11. AI 471013 | 292.6 | 268.5 | 292.0 | 8.2 | 0.2 | -8.7 |
| 12. AI 471015 | 343.2 | 308.1 | 331.5 | 10.2 | 3.4 | -7.6 |
| 13. AI 471016 | 138.2 | 124.6 | 139.1 | 9.8 | -0.7 | -11.6 |
| 14. AI 471017 | 179.3 | 146.4 | 169.2 | 18.3 | 5.6 | -15.6 |
| 15. AI 471018 | 128.6 | 111.5 | 122.7 | 13.3 | 4.6 | -10.1 |
| 16. AI 471019 | 51.1 | 43.2 | 54.3 | 15.5 | -6.2 | -25.7 |
| 17. AI 471020 | 101.4 | 86.4 | 102.0 | 14.7 | -0.7 | -18.0 |
| 18. AI 471021 | 118.2 | 106.9 | 125.0 | 9.6 | -5.8 | -17.0 |
| 19. AI 471022 | 38.5 | 31.6 | 39.0 | 18.0 | -1.4 | -23.6 |
| 20. AI 471023 | 138.2 | 124.2 | 132.5 | 10.1 | 4.1 | -6.7 |
| 21. AI 471024 | 259.8 | 231.6 | 246.9 | 10.8 | 4.9 | -6.6 |
| 22. AI 471025 | 268.6 | 231.6 | 266.7 | 13.8 | 0.7 | -15.1 |
| 23. AI 471026 | 237.5 | 188.1 | 222.2 | 20.8 | 6.4 | -18.2 |
| 24. AI 471027 | 338.2 | 296.3 | 339.9 | 12.4 | -0.5 | -14.8 |
| 25. AI 471028 | 230.7 | 196.3 | 224.6 | 14.9 | 2.7 | -14.4 |
| 26. AI 471029 | 311.4 | 259.5 | 306.7 | 16.7 | 1.5 | -18.2 |
| 27. AI 471030 | 149.1 | 129.0 | 150.9 | 13.5 | -1.2 | -16.9 |
| 28. AI 471034 | 86.6 | 81.0 | 92.3 | 6.5 | -6.6 | -14.0 |
| 29. AI 471035 | 126.3 | 108.0 | 120.0 | 14.5 | 4.9 | -11.1 |
| 30. AI 471037 | 258.5 | 244.1 | 271.5 | 5.6 | -5.0 | -11.2 |
| Mean | 196.1 | 171.2 | 192.2 | 12.9 | 0.4 | -14.7 |
| SD | 82.3 | 73.8 | 80.6 | 5.1 | 3.8 | 6.8 |

A = 15-45%, B = 5-30%-1.0 ml, C = 5-30%-0.5 ml

วิจารณ์

จากการทดลองพบว่าการใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml บน sucrose density gradient 5-30% ขึ้นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เป็นเวลา 90 นาที จัดด้วย sensitivity 0.05 จะให้ลักษณะของ 146S peak ที่มีความแหลมและฐานของ 146S peak ที่คล้ายคลึงกับการใช้ gradient 15-45% (รูปที่ 4) แต่จะมีขนาดเล็กกว่า ขณะที่การใส่ตัวอย่างปริมาตร 1.0 ml จะให้ลักษณะของ 146S peak ที่มีขนาดใหญ่และฐานกว้างกว่าทั้งของ gradient 5-30%-0.5 ml และ 15-45% ซึ่งการที่ฐานของ peak กว้างมาก ทำให้ไม่สะดวกในการหาพื้นที่ของ 146S peak และเปลืองกระดาษที่ใช้ในการคำนวณหาพื้นที่

การใช้ gradient 5-30% ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าการทดสอบมีความเที่ยงตรงของวิธีการทดสอบดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (%Coefficient of Variations,%CVs) จากการใช้ gradient 15-45%, 5-30%-1.0 ml และ 5-30%-0.5 ml เท่ากับ 3.0, 3.5 และ 2.7 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (%CVs ≤ 10) (พิพัฒน์, 2542) และปริมาณอนุภาค 146S ในการทดสอบความเที่ยงตรงของการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml ทุกค่ามีการกระจายตัวอยู่ในเกณฑ์ $\bar{X} \pm 2SD$ ของ 15-45% (61.6 - 69.6 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งตามหลักสถิติถือว่า 95% ของค่าที่ตรวจพบนั้นอยู่ในเกณฑ์ ถ้าไม่มีความแตกต่างกันและเป็นที่ยอมรับทั่วไป (ทัสสนี และ เตมศรี, 2541) ขณะที่การใช้ gradient 5-30%-1.0 ml มีบางค่าที่มีการกระจายตัวอยู่นอกเกณฑ์ $\bar{X} \pm 2SD$ ของ 15-45% (รูปที่ 6)

จากตารางที่ 4 พบว่าการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml ให้ผลการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ที่ใกล้เคียงกับการใช้ gradient 15-45% โดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างกันเฉลี่ย $0.4 \pm 3.8\%$ ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ขณะที่การใช้ gradient 5-30%-1.0 ml จะมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างกันเฉลี่ย $12.9 \pm 5.1\%$ ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ gradient 15-45% และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างจากการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml กับ 5-30%-1.0 ml จะมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างกันเฉลี่ย $14.7 \pm 6.8\%$ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการใช้ gradient 5-30%-1.0 ml ให้ผลการทดสอบที่แตกต่างจากการใช้ gradient 5-30%-0.5 ml และ 15-45% อาจเป็นผลมาจากการที่ 146S peak มีขนาดใหญ่ ฐานกว้าง ทำให้ไม่สะดวกและเกิดความคลาดเคลื่อนในการคำนวณหา peak area และจากการศึกษาของ Doel et al. (1982) ที่เป็นวิธีมาตรฐานที่ OIE รับรอง (OIE, 2000) พบว่าการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการใช้

gradient 5-30%, 5-40%, 10-40% และ 15-45% จะให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน เมื่อใช้พารามิเตอร์ที่เหมาะสม แต่การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สมบูรณ์เพราะยังขาดการทดสอบในเรื่องของ Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quatation (LOQ) ซึ่งจะได้ทำการทดลองต่อไป

สรุป

การใช้ sucrose density gradient 5-30% ใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml บั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เป็นเวลา 90 นาที วัดโดยใช้ sensitivity 0.05 ให้ผลในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ gradient 15-45% ซึ่งสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้แทนได้ เพื่อช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการบั่น ลดการสึกหรอของเครื่องมือ ลดการใช้สารเคมี ลดการใช้พลังงาน และเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบตัวอย่างได้รวดเร็วและมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือจนการทดสอบในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ไชยา สง่าประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์ 2543 การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 โทป์ โดยวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2) : 61-71.
- หัสสนี นุชประยูร และเดิมาศรี ชำนาญกิจ 2541 สถิติการวิจัยทางการแพทย์ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พิมพ์ครั้งที่ 2 หน้า 258-293.
- พิพัฒน์ ลักษณะมีจรัสกุล 2542 กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ หน้า 83.
- พิศมัย เลียมจรัสกุล เริงชาย จันทรัมย์ และเฉลิมศักดิ์ พิธีรัตน์ 2535 การปรับปรุงวิธีการหาปริมาณ 146S พาร์ทิเคิลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีซูโครสเดนซิตีเกรเดียน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 42-52.
- มนตรี มนต์รุฬพงษ์ และเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต 2535 การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 31-41.

- Bartelling, S.J. and Neloen, R.H. 1974. A Simple Method of Quantification 140S Particles of Foot and Mouth Disease Virus(FMDV). *Archiv fur die gesamite 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 gradient. *Dev. Biol. Stand.* 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. Biol. Standard.* 13: 335-344.
- OIE, 2000. Foot and Mouth Disease. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.* Fourth Edition. Office International Des Epizooties, Paris, France. p. 77-92.
- Shirai, J., Chatchawanchonteera, A., Sinsuwonkwat, 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.

Comparison of using 5-30% and 15-45% sucrose density gradients for quantification the amount of 146S particles of foot and mouth disease virus

Chaiya Sangapraakhon¹ Sahawatchara Ungvanijban¹

Abstract

The comparison of using 5-30% and 15-45% sucrose density gradients for the quantification of 146S particles of foot and mouth disease virus in 30 samples was done. The result showed that the loading of sample (0.5 ml) on 5-30% sucrose density gradient, centrifugation at 36,000 rpm for 90 minutes and detection by UV-monitor at the absorbance sensitivity of 0.05 gave the same 146S peak, high precision and had no significant difference ($P>0.05$) when compared with 15-45% sucrose density gradients.

Therefore using 5-30%-0.5 ml of sample can be used for the quantification of 146S particles of foot and mouth disease viruses in place of 15-45% gradient in order to reduce consuming cost, time, reagent and energy for testing.

Key words: sucrose density gradients, 146S particle, foot and mouth disease viruses

¹Foot and Mouth Disease Vaccine Quality Control Section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

เปรียบเทียบวิธีการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไชยา สง่าประโคน¹ กฤษดา ลิ้มปานานนท์

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบวิธีการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธีหาค่าปริมาณอนุภาค 146S จากกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์ (purified virus) ที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยใช้ในปัจจุบันกับวิธีหาค่าปริมาณอนุภาค 146S โดยการแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ลงในสูตรตามวิธีของ Doel et al. (1982) ซึ่งเป็นวิธีที่ OIE (2000) รับรอง พบว่าวิธีการหาค่าปริมาณอนุภาค 146S จากกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์ให้ค่าปริมาณอนุภาค 146S สูงกว่าวิธีของ Doel et al. (1982) เฉลี่ย (Mean±SD) เท่ากับ $48.1\pm 0.3\%$ และสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (Coefficient of Variations) เท่ากับ 0.5% การที่ปริมาณอนุภาค 146S แตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไม่บริสุทธิ์จริง มีอนุภาคอื่นปนเปื้อน ทำให้ค่าปริมาณ 146S ที่ได้สูงกว่าความเป็นจริงและ/หรือเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ต่างกัน ทำให้มีความไวและความแม่นยำต่างกันด้วย

ดังนั้นเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน (OIE) จะได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ที่แน่นอนกับห้องปฏิบัติการอ้างอิง (World Reference Laboratory for FMD, Pirbright Laboratory) และรวมถึงศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนจากการใช้ค่าปริมาณอนุภาค 146S ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ต่อไป

คำสำคัญ : การทดสอบหาปริมาณ อนุภาค 146S ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย มาตรฐาน

¹ ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

บทนำ

ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเป็นอนุภาคที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์และใช้ในการกำหนดปริมาณแอนติเจนต่อโดสของวัคซีน โดยการใช้เทคนิควิธี sucrose density gradient ultracentrifugation technique (Bartelling and Neloen, 1974; Doel et al., 1982; Doel and Nowat, 1985; Shirai et al., 1990; พิสมัย และคณะ, 2535; มนตรี และชาวฤทธิ, 2535; ไชยา และนพพร, 2543)

ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ใช้เทคนิคนี้ในการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการใช้กราฟมาตรฐานความสัมพันธระหว่างปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยบริสุทธิ์ (purified virus) กับ peak area ที่เกิดขึ้น (มนตรี และชาวฤทธิ, 2535; ไชยา และนพพร, 2543) แต่ที่ OIE รับรอง (OIE, 2000) จะใช้วิธีการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ตามวิธีการของ Doel et al. (1982)

จุดประสงค์การทดลองในครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ได้จากวิธีในปัจจุบันที่ใช้เส้นกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์กับวิธีที่ OIE รับรอง หรือวิธีการของ Doel et al. (1982) ว่าปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสที่ได้แตกต่างกันหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการหาปริมาณอนุภาค 146S โดย sucrose density gradient ultracentrifugation technique

นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 2.0 ml ใส่บน sucrose density gradient 15-45% แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge¹ ที่ความเร็วรอบ 36,000 rpm เป็นเวลา 3.5 hrs หลังจากนั้นนำไปวัด 146S peak โดยใช้ peristaltic pump² ดูตัวอย่างจากกันหลอด ด้วยอัตราการไหลของตัวอย่าง 50 ml/hr ผ่าน flow cell ที่มี path length 3 mm ของเครื่อง UV monitor³ ที่ใช้ wave length 254 nm, UV spectrometer sensitivity 0.1 (ABS range) อัตราการหมุนของกระดาษกราฟ (paper speed) และ recording amplification ของเครื่องบันทึก (recorder)⁴ เท่ากับ 0.2 mm/sec และ 100 mV ตามลำดับ แล้วคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S โดย

¹Beckman® , model L8-60M, USA.

²Bio-Rad® , model EP-1 Econo pump, USA.

³LKB Bromma® , model 2138-uvicords, Sweden.

⁴LKB Bromma® , model 2210 2-channels recorder, Sweden.

1. การคำนวณปริมาณอนุภาค 146S โดยใช้กราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์

การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ (purified virus) และกราฟมาตรฐาน (standard curve)

โดยการใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพาะลงในเซลล์ (primary lamb kidney cells) เป็นเวลา 18-24 ชม. เมื่อเกิด CPE 90-100% เก็บไวรัสไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาตกตะกอนไวรัสด้วย PEG 6000 ปริมาณ 7.5% w/v แล้วนำไปปั่น (agitate) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบเวลานำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 90 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เก็บตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย Tris buffer (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.6) ปริมาตร 1:100 ส่วนของปริมาตรไวรัสเริ่มต้น นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมา treat ด้วยสาร fluorocarbon อัตราส่วน 1:2 นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาใส่บน sucrose density gradient 15-45% ในหลอด centrifuge ขนาด SW28 หลอดละ 8.5 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ด้วยความเร็วรอบ 22,000 rpm เป็นเวลา 9 ชม. แล้วนำมาวัด 146S peak ด้วยเครื่อง UV monitor เพื่อเก็บไวรัส แล้วนำไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer⁵ ที่ wave length 239, 259 และ 280 nm เพื่อหาอัตราส่วนความบริสุทธิ์ โดยเทียบอัตราส่วนที่ OD_{259nm}/OD_{280nm} และ OD_{259nm}/OD_{239nm} ซึ่งมีอัตราส่วนมาตรฐาน $\approx 1.6-1.8$ และ 1.4 ตามลำดับ และคำนวณปริมาณอนุภาค 146S จาก $E^{1\%}_{259nm, 1cm} = 76$ หมายความว่าอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยบริสุทธิ์เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ จะมีค่า absorbance (OD) = 0.76 ที่ wave length 259 nm ดังนั้นปริมาณอนุภาค 146S ($\mu\text{g/ml}$) = $(OD_{259nm} \times 100) / 0.76$ (มนตรี และชาวฤทธิ, 2535) แล้วนำไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้มาเจือจางให้มีปริมาณอนุภาค 146S เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ นำไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่เกิดขึ้น จะได้สมการเส้นตรง $y = bx + a$ สำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S ต่อไป

2. การหาปริมาณอนุภาค 146S โดยวิธีการของ Doel et al. (1982)

โดยทำการคำนวณค่าปริมาณอนุภาค 146S จากการแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามสูตรดังนี้

$$146S (\mu\text{g/ml}) = \frac{FR \times PA \times FSD \times 1000}{S \times PL \times E \times W}$$

⁵Biotek®, model Uv-lite, Italy.

- เมื่อ FR = อัตราการไหลของตัวอย่างผ่าน flow cell (ml/min)
 PA = 146S peak area (square inch)
 FSD = the full scale absorbance sensitivity setting
 S = chart speed (inch/min)
 PL = path length of flow cell (cm)
 $E = E_{254\text{ nm}, 1\text{ cm}}^{1\%}$
 W = weight or volume of sample applied to the gradients
 (gm or ml)

ตัวอย่างไวรัส

-ไวรัสบริสุทธิ์ (purified virus) ชุด 46404 สำหรับทดสอบหากราฟมาตรฐาน

-ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 30 ตัวอย่าง สำหรับเปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S

วิธีการเปรียบเทียบการหาปริมาณอนุภาค 146S

ก. กราฟมาตรฐานจากไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982)

- กราฟมาตรฐานจากไวรัสบริสุทธิ์ โดยใช้ไวรัสบริสุทธิ์ชุด 46404 ที่เตรียมได้ ซึ่งมีอัตราส่วนความบริสุทธิ์ $OD_{259\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} = 1.64$ และ $OD_{259\text{ nm}}/OD_{239\text{ nm}} = 1.38$ และคำนวณปริมาณอนุภาค 146S จาก $E_{259\text{ nm}, 1\text{ cm}}^{1\%} = 76$ มีปริมาณอนุภาค 146S ประมาณ 320 $\mu\text{g/ml}$ นำมาเจือจางด้วย Van Bekkum medium ให้มีปริมาณอนุภาค 146S เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ นำไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจางแล้วใส่บน sucrose density gradient 15-45% ตามวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation technique เพื่อทดสอบหาสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S ต่อไป

- กราฟมาตรฐานตามวิธี Doel et al. (1982) โดยการแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดย FR = 0.84 ml/min (50 ml/hr), FSD = 0.1, S = 0.48 inch/min (0.2 mm/sec), PL = 0.3 cm (3 mm), E = 74.5 (Doel et al., 1985) และ W = 2.0 ml จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่ได้ตามทฤษฎี

ข. กราฟมาตรฐานที่ได้จากตัวอย่างไวรัส

โดยการใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 5 ตัวอย่าง ทดสอบหาค่าเฉลี่ยของ 146S peak area จากการทดสอบซ้ำ 6 ครั้งต่อตัวอย่าง นำค่าเฉลี่ยของ peak area ของแต่ละตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S ตามวิธีที่ 1 และ 2 แล้วนำตัวอย่างไวรัสไปเจือจางด้วย Van Bekkum medium ให้มีปริมาณอนุภาค 146S เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ นำไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่เกิดขึ้นตามวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation technique เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานจากการใช้ตัวอย่างไวรัสกับ

กราฟมาตรฐานที่ได้จากไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982) เพื่อทดสอบความถูกต้องของสูตรที่ใช้ในการคำนวณตามข้อ ก.

ค. เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

โดยการใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 30 ตัวอย่าง นำไปทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ตามวิธีที่ 1 และ 2 โดยการทดสอบแบบ duplicate ต่อตัวอย่าง หาค่าเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของปริมาณอนุภาค 146S จากทั้ง 2 วิธี

ผล

กราฟมาตรฐาน(standard curve)ของไวรัสบริสุทธิ์และวิธีการของ Doel et al.(1982)

จากการเจือจางไวรัสบริสุทธิ์ให้มีปริมาณอนุภาค 146S เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ แล้วนำไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจางไปทดสอบหา 146S peak area ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.77, 1.63, 3.33, 5.03, 6.73 และ 8.43 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่กราฟมาตรฐานตามวิธีของ Doel et al. (1982) จากการแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในสูตรการคำนวณจะได้ 146S peak area เท่ากับ 1.61, 3.22, 6.44, 9.66, 12.88 และ 16.10 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะได้สมการที่ใช้ในการคำนวณดังตารางที่ 1

กราฟมาตรฐานของตัวอย่างไวรัส

เมื่อนำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 5 ตัวอย่าง ไปทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณอนุภาค 146S ตามวิธีการในการคำนวณที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 2) และเมื่อนำตัวอย่างไวรัสดังกล่าวไปทดสอบหากราฟมาตรฐาน จะได้ 146S peak area ตามวิธีที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70, 1.58, 3.33, 5.07, 6.82 และ 8.57 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่ค่าเฉลี่ย 146S peak area จากการคำนวณตามวิธีที่ 2 ได้เท่ากับ 1.41, 3.05, 6.33, 9.60, 12.88 และ 16.16 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเส้นกราฟมาตรฐานจากการใช้ตัวอย่างไวรัสกับเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้ไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982) พบว่าเป็นเส้นตรงเดียวกัน (ตารางที่ 3, รูปที่ 1) แสดงว่าสมการที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S ถูกต้อง

เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

จากการทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า การทดสอบตามวิธีที่ 1 ปริมาณอนุภาค 146S ที่ได้จะมากกว่าวิธีที่ 2 เฉลี่ย (Mean \pm SD) เท่ากับ $48.1 \pm 0.3\%$ (0.5% CVs) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการใช้กราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982)

| Purified virus | Doel et al. 1982 |
|--|--|
| สูตร = สมการเส้นตรงจากการเปรียบเทียบ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสบริสุทธิ์ กับ 146S peak area | สูตร 146S ($\mu\text{g/ml}$) = $\frac{\text{FR} \times \text{PA} \times \text{FSD} \times 1000}{\text{S} \times \text{PL} \times \text{Ex} \times \text{W}}$ |
| $146\text{S } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{PA} - a}{b}$ | เมื่อ FR = Flow rate (ml/min) = 0.84 PA = Peak area (sq.inch) FSD = Full scale sensitivity setting = 0.1 S = Chart speed (inch/min) = 0.48 PL = Path length of flow cell (cm) = 0.3 E = $E^{1\%}_{254\text{nm}, 1\text{cm}}$ = 74.5 W = Weight or volume of sample applied to the gradient (ml) = 2.0 146S ($\mu\text{g/ml}$) = $4.0 \times \text{PA}(\text{inch}^2)$ |
| เมื่อ PA = Peak area (cm^2) a = y - intercept = 0.0765 b = slope = 0.8508 | หรือ 146S ($\mu\text{g/ml}$) = $0.62 \times \text{PA}(\text{cm}^2)$ |
| $146\text{S } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{PA} - 0.0765}{0.8508}$ | |

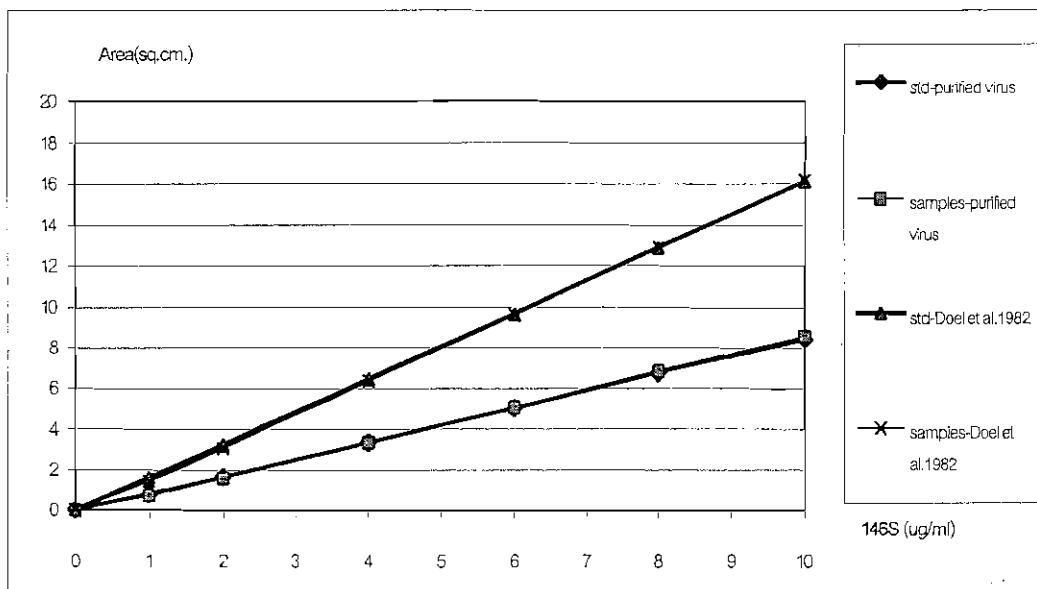
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 5 ตัวอย่าง จากการคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982) สำหรับใช้ในการทดสอบหากกราฟมาตรฐานจากตัวอย่างไวรัส

| Batch no. | Dilution | Area (cm^2) | | 146S ($\mu\text{g/ml}$) | |
|-----------|----------|------------------------|------|---------------------------|-------------------|
| | | Mean \pm SD | %CVs | Purified virus | Doel et al., 1982 |
| AI 471025 | 1/50 | 5.69 \pm 0.5658 | 9.94 | 339.0 | 176.5 |
| AI 471026 | 1/50 | 4.06 \pm 0.3283 | 8.09 | 243.0 | 126.0 |
| AI 471027 | 1/50 | 5.24 \pm 0.4050 | 7.73 | 312.5 | 162.5 |
| AI 471028 | 1/50 | 3.77 \pm 0.2283 | 6.06 | 226.0 | 117.0 |
| AI 471029 | 1/50 | 4.96 \pm 0.4171 | 8.42 | 296.0 | 154.0 |

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่ได้ในการทดสอบหากราฟมาตรฐานของตัวอย่างไวรัสกับกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์และวิธีของ Doel et al. (1982)

| 146S ($\mu\text{g/ml}$) | Area (cm^2) | | | | | |
|------------------------------|------------------------|-------------------|-------|--------------------|--------------------|------|
| | Purified virus | | | Doel et al. (1982) | | |
| | Standard * | Mean \pm SD | %CVs | Standard * | Mean \pm SD | %CVs |
| 1 | 0.77 | 0.70 \pm 0.0874 | 12.49 | 1.61 | 1.41 \pm 0.0922 | 6.54 |
| 2 | 1.63 | 1.58 \pm 0.0997 | 6.31 | 3.22 | 3.05 \pm 0.1533 | 5.03 |
| 4 | 3.33 | 3.33 \pm 0.1920 | 5.79 | 6.44 | 6.33 \pm 0.3282 | 5.18 |
| 6 | 5.03 | 5.07 \pm 0.3076 | 6.07 | 9.66 | 9.60 \pm 0.5141 | 5.36 |
| 8 | 6.73 | 6.82 \pm 0.4296 | 6.26 | 12.88 | 12.88 \pm 0.7022 | 5.45 |
| 10 | 8.43 | 8.57 \pm 0.5478 | 6.39 | 16.10 | 16.16 \pm 0.8913 | 5.52 |
| mean | - | - | 7.22 | - | - | 5.51 |

* standard = peak area ที่ได้จากไวรัสบริสุทธิ์และการคำนวณตามวิธี Doel et al. (1982)



รูปที่ 1 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่ได้จากการทดสอบกลับโดยใช้ตัวอย่างไวรัส เปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้จากไวรัสบริสุทธิ์และตามวิธีของ Doel et al. (1982)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 30 ตัวอย่าง จากการคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธ์และวิธีของ Doel et al. (1982)

| Sample (Batch no.) | ปริมาณอนุภาค 146S ($\mu\text{g/ml}$) | | เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง A-B |
|-----------------------|--|-------|-------------------------------|
| | A | B | |
| 1. AI 472002 | 179.6 | 92.4 | 48.6 |
| 2. AI 472004 | 211.9 | 109.4 | 48.4 |
| 3. AI 472005 | 288.0 | 150.5 | 47.7 |
| 4. AI 472006 | 178.8 | 93.4 | 47.8 |
| 5. AI 472007 | 150.6 | 78.5 | 47.9 |
| 6. AI 471008 | 227.8 | 117.8 | 48.3 |
| 7. AI 471009 | 166.8 | 87.0 | 47.8 |
| 8. AI 471010 | 158.1 | 82.5 | 47.9 |
| 9. AI 471011 | 280.7 | 145.7 | 48.1 |
| 10. AI 471012 | 173.7 | 89.3 | 48.6 |
| 11. AI 471013 | 283.1 | 146.9 | 48.1 |
| 12. AI 471015 | 335.4 | 174.5 | 48.0 |
| 13. AI 471016 | 135.1 | 70.3 | 48.0 |
| 14. AI 471017 | 173.7 | 90.2 | 48.1 |
| 15. AI 471018 | 125.2 | 65.1 | 48.0 |
| 16. AI 471019 | 49.0 | 25.4 | 48.2 |
| 17. AI 471020 | 97.0 | 50.2 | 48.2 |
| 18. AI 471021 | 114.4 | 59.4 | 48.1 |
| 19. AI 471022 | 35.9 | 18.5 | 48.6 |
| 20. AI 471023 | 135.1 | 70.3 | 48.0 |
| 21. AI 471024 | 245.2 | 126.5 | 48.4 |
| 22. AI 471025 | 254.3 | 131.3 | 48.4 |
| 23. AI 471026 | 226.1 | 116.9 | 48.3 |
| 24. AI 471027 | 326.3 | 169.3 | 48.1 |
| 25. AI 471028 | 219.0 | 113.2 | 48.3 |
| 26. AI 471029 | 302.5 | 157.2 | 48.0 |
| 27. AI 471030 | 146.4 | 76.3 | 47.9 |
| 28. AI 471034 | 85.6 | 44.7 | 47.8 |
| 29. AI 471035 | 126.7 | 66.3 | 47.6 |
| 30. AI 471037 | 247.8 | 128.3 | 48.2 |
| Mean | 189.3 | 98.2 | 48.1 |
| SD | 79.3 | 41.1 | 0.3 |
| %CVs | 41.9 | 41.9 | 0.5 |

วิจารณ์และสรุป

การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation technique เป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและโรงงานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย และตามมาตรฐานที่ OIE (2000) รับรอง การคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S จะใช้วิธีการของ Doel et al. (1982) ที่จะใช้การแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น flow rate, absorbance sensitivity, chart speed, path length of flow cell, E และปริมาตรตัวอย่าง ลงในสูตรการคำนวณ (ตารางที่ 1) จะได้ค่าคงที่คูณกับ peak area โดยตรง ไม่มีการเทียบกับตัวอ้างอิงอื่น แต่ที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตวฯ จะทำการคำนวณหาปริมาณอนุภาค 146S โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยบริสุทธิ์ (purified virus) ซึ่งต้องกระทำหลายขั้นตอน เช่นการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ การทดสอบความบริสุทธิ์ของไวรัสด้วยเครื่อง spectrophotometer และการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาค 146S กับ peak area ที่เกิดขึ้น ซึ่งเครื่องมือที่ใช้จะต้องมีความถูกต้อง แม่นยำและเที่ยงตรง

จากการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 30 ตัวอย่าง พบวิธีที่คำนวณปริมาณอนุภาค 146S จากกราฟมาตรฐานของไวรัสบริสุทธิ์จะสูงกว่าวิธี Doel et al. (1982) เฉลี่ย (Mean±SD) เท่ากับ $48.1 \pm 0.3\%$ (0.5% CVs) อาจเนื่องมาจาก 1) ไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไม่บริสุทธิ์จริงๆ มีอนุภาคอื่นปนเปื้อนถึงแม้ว่า purity ratio ที่เปรียบเทียบระหว่างค่า absorbance ที่ 239, 259 และ 280 nm จะได้ตามมาตรฐานก็ตาม ทำให้ค่าปริมาณ 146S ที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง 2) เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ตามวิธีของ Doel et al. (1982) กับที่ฝ่ายฯ ใช้มีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะเครื่อง UV monitor และ recorder ที่อาจมีความไวและความแม่นยำเที่ยงตรงต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ 146S peak area ที่เกิดขึ้นโดยตรง

จากข้อกำหนดทางวิชาการข้อ 5.4 ข้อย่อย 5.4.5 ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025-1999 (มอก. 17025-2543) เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีการ (method validation) ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบต้องกระทำเพื่อให้การทดสอบนั้นมีความแม่นยำ (accuracy) และน่าเชื่อถือ (reliability) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการ validate จะใช้หนึ่งเทคนิคหรือหลายเทคนิคต่อไปนี้ เช่น การสอบเทียบด้วย reference standards/reference materials การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เปรียบเทียบผลจากวิธีการทดสอบที่ต่างกัน การประเมินปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทดสอบ และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของผล (uncertainty) เป็นต้น ซึ่งการทดสอบที่จะกระทำได้คือการนำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ทราบปริมาณอนุภาค 146S แน่นนอนแล้ว เช่นจาก World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease (Pirbright Laboratory) มาทดสอบและเปรียบเทียบกับห้องปฏิบัติการของฝ่ายฯ เพื่อคัดเลือกวิธีที่ถูกต้องเหมาะสมและใช้เป็น

มาตรฐานต่อไป ซึ่งจะเกิดประโยชน์ในกรณีที่มีการซื้อ-ขายแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากสถานที่หนึ่งไปผลิตวัคซีนยังอีกสถานที่หนึ่ง

ดังนั้นแม้ว่าปริมาณอนุภาค 146S ที่ได้จากการทดสอบจากทั้ง 2 วิธีจะมีความแตกต่างกัน แต่ยังไม่ได้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของวัคซีนซึ่งจะต้องศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากการใช้ค่าปริมาณอนุภาค 146S จากทั้ง 2 วิธี เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน (OIE, 2000) และคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับปฏิบัติต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (ห้องปฏิบัติการ) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือ ทำให้งานทดสอบดังกล่าวสำเร็จบรรลุจุดประสงค์ด้วยดี และมีคุณภาพ

เอกสารอ้างอิง

- ไชยา สง่าประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์ 2543 การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2) : 61-71.
- พิศมัย เลียมจรัสกุล เขิงชาย จันทร์ศมี และเฉลิมศักดิ์ พิธรัตน์ 2535 การปรับปรุงวิธีการหาปริมาณ 146S พาร์ทิเคิลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีซูโครสเดนซิทีเกรเดียน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 42-52.
- มนตรี มนต์ธูรพจน์ และชาวฤทธิ์ บุญมาทิต 2535 การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 31-41.
- มอก. 17025-2543 (ISO/IEC 17025:1999) ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ (General requirements for the competence of testings and calibration laboratories) สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.
- Bartelling, S.J. and Neloen, R.H. 1974. A Simple Method of Quantification 140S Particles of Foot and Mouth Disease Virus(FMDV). Archiv fur die gesamte virusforschung. 45: 362-364.
- Doel, T.R., Flettom, B.W. and Steppe, R.F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradient. 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. Biol. Standard.* 13: 335-344.
- OIE. 2000. Foot and Mouth Disease. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Fourth Edition.* Office International Des Epizooties, Paris, France. p. 77-92.
- Shirai, J., Chatchawanchonteera, A., Sinsuwonkwat, 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.

Comparison of the method for quantification
the amount of 146S particles of foot and mouth disease virus

Chaiya Sangaprakhon¹ Kritsada Limpananont¹

Abstract

Comparison of the method for quantification the amount of 146S particles of foot and mouth disease virus (FMDV) between using the standard curve from purified FMDV and the method described by Doel et al. (1982) which accepted by OIE (2000) in 30 samples was done. It was found that the amount of 146S particles quantified by the method using the standard curve from purified FMDV was $48.1 \pm 0.3\%$ (0.5% CVs) higher than that using the other method. The difference might be due to the impurity of virus samples and/or the different sensitivity and accuracy of the instruments.

Therefore, further confirmation by comparing the quantity of 146S particles with the one determined at World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease, Pirbright Laboratory, including the potency test of vaccine are needed.

Key words: quantification, 146S particles, foot and mouth disease virus, standard

¹Foot and Mouth Disease Vaccine Quality Control Section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

เปรียบเทียบวิธีการทดสอบหาปริมาณโปรตีน ในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

จาตุรนต์ พลราช¹ ไชยา ส่งาประโคน¹ กฤษดา ลิ้มปนานนท์¹

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบวิธีทดสอบหาปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 2 ชุดวัคซีน โดยการทดสอบซ้ำๆ กัน จำนวน 20 ครั้ง พบว่า แอนติเจนวัคซีนชุด HT47T และ HT47U มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย (Mean±SD) และค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (%CVs) จากการทดสอบโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method เท่ากับ 820 ± 0.12 (14.4%) และ 570 ± 0.07 (12.0%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ, วิธี Folin (Lowry) method เท่ากับ $1,700\pm 0.17$ (10.0%) และ $1,360\pm 0.05$ (4.0%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) เท่ากับ 820 ± 0.03 (4.0%) และ 610 ± 0.04 (7.1%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ดังนั้นวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและเที่ยงตรงดีที่สุดใน การทดสอบหาปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จากการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (%CVs) รองลงไปคือวิธี Folin (Lowry) method ซึ่งมีความแม่นยำและเที่ยงตรงดีแต่ต่ำกว่าวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) ขณะที่วิธี Modified Folin (Lowry) method ที่ใช้ทดสอบในปัจจุบันมีความแม่นยำและเที่ยงตรงต่ำ แต่วิธี Folin (Lowry) method ให้ค่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างแอนติเจนสูงกว่าวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) และวิธี Modified Folin (Lowry) method ประมาณ 2 เท่า อาจเป็นเพราะในตัวอย่างมี Interfering substances ซึ่งจะได้ศึกษาต่อไป

คำสำคัญ : ปริมาณโปรตีน วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

¹ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

การทดสอบหาปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นการควบคุมคุณภาพ ในกระบวนการผลิต (Inprocess quality control) กระบวนการหนึ่งในหลายกระบวนการที่จำเป็นต้อง ทดสอบ เช่น การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Inactivation test การทดสอบความรุนแรงของเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (Infectious titer test, TCID₅₀) การทดสอบความปลอดภัย (Safety test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency test) เป็นต้น ซึ่งปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในวัคซีนหากมีมากเกินไปอาจทำให้สัตว์ที่ได้รับวัคซีนเกิดอาการแพ้ได้

ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำการตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Modified Folin (Lowry) method (Rhone merieux, section 6, 1988) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี Folin (Lowry) method (Lowry et al., 1951) โดยจะมีการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างด้วยกรดเปอร์คลอริกก่อน เพื่อลด Interfering substances แล้วจึงจะนำไปทดสอบหาโปรตีนในขั้นตอนต่อไป ซึ่งมีหลักการทดสอบดังนี้ เมื่อโปรตีน ผสมกับสารละลายทองแดงในด่าง คิวปริกไอออนจะดึงดูดหมู่อะมิโนของสารเปปไทด์ของโปรตีนด้วย ไฮโดรเจนบอนด์ในรูปไบยูเรตคอมเพล็กซ์ เมื่อทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้วเติมสาร Folin-Ciocalteu phenol reagent อนุมูลฟอสโฟโมลิบเดต-ฟอสโฟทังสเตตในสารละลายนี้จะถูกรีดิวส์ให้สี น้ำเงิน ซึ่งจะมีความเข้มเป็นสัดส่วนกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ (Lowry et al., 1951 ; นิคม, 2524)

การทดสอบหาปริมาณโปรตีนสามารถกระทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การหาปริมาณไนโตรเจน ของโปรตีนของ Kjeldahl และ Dumas, Biuret test (วิธี Lowry method หรือวิธีอื่นที่ดัดแปลงไป) การวัด refractive index, การวัดความถ่วงจำเพาะ (Flotation), Turbidimetric method, Fluorometric method, Dye inding และการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นต้น ซึ่งแล้วแต่วัตถุประสงค์ ในการนำไปใช้ โดยมากแล้วนิยมใช้วิธีการของ Lowry หรือวิธีอื่นที่ดัดแปลงไปจากนี้ เนื่องจากง่าย และสะดวก ใช้เวลาน้อย

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบวิธีการในการทดสอบหาปริมาณโปรตีน ในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Modified Folin (Lowry) method, วิธี Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad Protein assay) (Bio-Rad Laboratories, commercial kits: Bradford, 1976) ว่าวิธีการใดมีความแม่นยำ เทียบตรง น่าเชื่อถือและสะดวกรวดเร็ว เพื่อนำไป ใช้ปฏิบัติงานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองแก้วขนาด 13 x 100 mm และ 18 x 90 mm
2. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์¹
3. เครื่องเซนตริฟิวส์²
4. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)
5. ไมโครไปเปต (Micropipette)
6. ตัวอย่างแอนติเจนชนิดรวม 3 ไทป์สำหรับผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกร (ก่อนผสม Emulsifier และ Oil) ชุด HT 47 T และ HT 47U จำนวน 2 ชุดวัคซีน

สารเคมี

1. Reagent-C หรือ Lowry reagent ซึ่งเตรียมจาก
 - 1.1. สารละลาย 2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH
เตรียมโดยการใส่ Anhydrous sodium carbonate 20 g ละลายด้วย 0.1 N NaOH ประมาณ 1 L ซึ่ง 0.1 N NaOH เตรียมโดยใช้ 1N NaOH 100 ml เจือจางด้วยน้ำ DW (Deionized water) ให้ได้ 1 L
 - 1.2. สารละลาย 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
เตรียมโดยการละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 g ด้วยน้ำ DW ให้ได้ 100 ml เก็บไม่ให้ถูกแสง
 - 1.3. สารละลาย 2% Sodium tartrate
เตรียมโดยการละลาย Sodium tartrate.2 H_2O 2 g ด้วยน้ำ DW ให้ได้ 100 ml เก็บไม่ให้ถูกแสง
 - 1.4. ผสมสารละลาย 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 ml และสารละลาย 2% Sodium tartrate 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆ เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH ให้ได้ 100 ml เตรียมก่อนการใช้
2. การเตรียมกรดเพื่อตกตะกอนโปรตีนตามวิธี Modified Folin (Lowry) method
 - 2.1. 20% Perchloric acid
เตรียมโดยการใส่ 70% Perchloric acid เจือจางด้วยน้ำ DW ในอัตราส่วน 1: 3.5
 - 2.2. 10% Perchloric acid
เตรียมโดยการใส่ 70% Perchloric acid เจือจางด้วยน้ำ DW ในอัตราส่วน 1: 7

¹ Biotek® รุ่น Uviline, Italy

² Jouan รุ่น k-110, France

3. 1N Folin-Ciocalteu phenol reagent³

เตรียมโดยการใช้น้ำ 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 1 ส่วน เจือจางด้วยน้ำ DW 1 ส่วน เตรียมก่อนการใช้

4. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)⁴

เตรียมโดยการละลาย purified bovine serum albumin 100 ml ด้วยน้ำ DW ให้ได้ 100 ml (ความเข้มข้น 1 mg/ml) เก็บใส่หลอดแช่แข็ง (cryotube) หลอดละ 1.5 ml แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C

5. นํายาสี้อมตามวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay)⁵

เตรียมโดยใช้นํายาสี้อมเข้มข้น 1 ส่วน ค่อน้ำ DW 4 ส่วน เตรียมก่อนการใช้ตามจำนวนตัวอย่าง หรือเมื่อเตรียมแล้วสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ หลังจากเตรียมเรียบร้อยแล้ว

วิธีการทดสอบหาปริมาณโปรตีน

ก. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 mm ตกตะกอนโปรตีนด้วย 20% Perchloric acid หลอดละ 0.5 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติม 10% Perchloric acid หลอดละ 2.0 ml ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 20 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใส (Supernatant) ที่ทิ้ง นำตะกอนที่เหลือไปละลายด้วย 0.1 N NaOH หลอดละ 0.5 ml เขย่าให้ตะกอนละลายเติมสาร Reagent C หลอดละ 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent หลอดละ 0.25 ml ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 635 nm คำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

ข. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Folin (Lowry) method

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.1 ml ลงในหลอดทดลอง 13x100 mm แล้วเติมสารละลาย Reagent-C หลอดละ 3.0 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent หลอดละ 0.3 ml เขย่าทันที ทิ้งไว้ในที่มืด ให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 650 nm คำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

³ Sigma Lot. F-9252, Sigma Co Ltd., USA

⁴ Sigma Lot. 11H9312, Sigma Co Ltd., USA

⁵ Bio-Rad Laboratories, USA.

ค. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay)

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.1 ml ลงในหลอดทดลอง 18 x 90 mm แล้วเติมน้ำยาสีข้อมที่เจือจางแล้ว หลอดละ 5.0 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 nm คำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

การทดสอบเปรียบเทียบวิธีการ

1. เปรียบเทียบเส้นกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

ใช้สารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่เตรียมไว้ มาเจือจางด้วยน้ำ DW ให้มีความเข้มข้น 100-1,000 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 1) และน้ำ DW เป็น blank แล้วทำการทดสอบหาปริมาณโปรตีนตามวิธีที่ได้จาก ก, ข และ ค เปรียบเทียบเส้นกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear regression, r)ของการทดสอบทั้ง 3 วิธี

2. เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

นำตัวอย่างแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชุด HT47T และ HT47U ไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนตามวิธี ก, ข และ ค โดยการทดสอบซ้ำๆ ตัวอย่างละ 20 ครั้ง (โดยทำการทดสอบ 1 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 20 วัน) บันทึกผล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (Coefficient of variations, CVs= (SD/Mean) \times 100) เพื่อทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงของการทดสอบ

ผล

1. เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง จากการทดสอบโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method วิธี Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) จะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear regression, r) เท่ากับ 0.9940, 0.9983 และ 0.9974 ตามลำดับ ซึ่งการทดสอบโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method และ Bradford method (Bio-Rad protein assay) ค่า absorbance ของ standard BSA จะใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน โดยเฉพาะเมื่อปริมาณ BSA ต่ำกว่า 200 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 1)

2. ปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

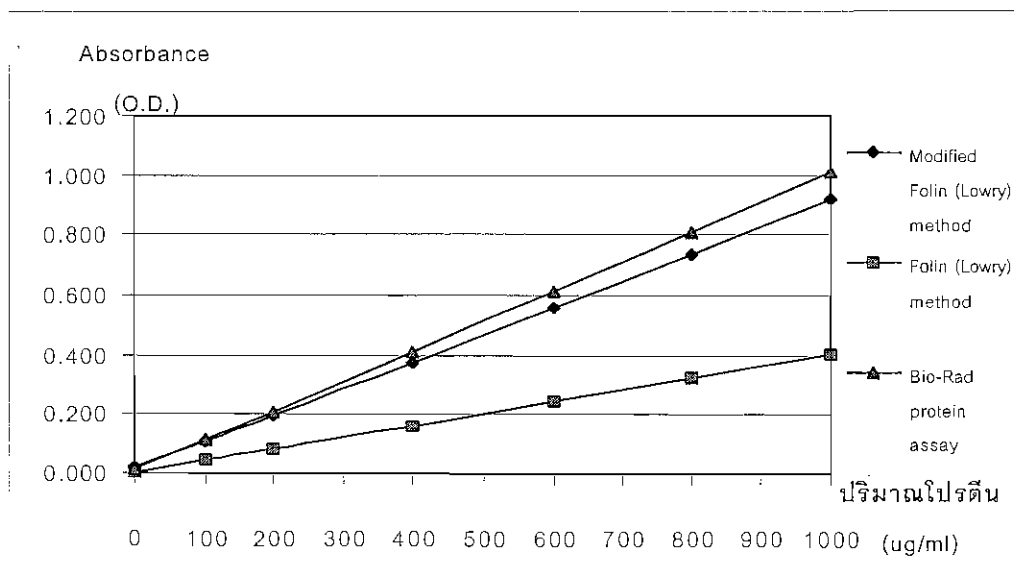
จากการทดสอบหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชุด HT47T และ HT47U พบว่ามีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยและค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (Mean \pm SD, %CVs) จากการทดสอบโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method เท่ากับ 820 \pm 0.12 (14.4%) และ 570 \pm 0.07

(12.0%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ วิธี Folin (Lowry) method เท่ากับ $1,700 \pm 0.17$ (10%) และ $1,360 \pm 0.05$ (4.0%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่การทดสอบโดยวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) เท่ากับ 820 ± 0.03 (4.0%) และ 610 ± 0.04 (7.1%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, BSA สำหรับทดสอบหาเส้นกราฟมาตรฐานตามวิธี Modified Folin (Lowry) method, Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay)

| ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ($\mu\text{g/ml}$) | ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น $1,000 \mu\text{g/ml}$ (ml) | น้ำ DW (ml) |
|--|---|-------------|
| 100 | 1 | 9 |
| 200 | 2 | 8 |
| 400 | 4 | 6 |
| 600 | 6 | 4 |
| 800 | 8 | 2 |
| 1,000 | 10 | - |

รูปที่ 1 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, BSA จากการทดสอบตามวิธี Modified Folin (Lowry) method วิธี Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay)



ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ชุด HT 47 T และ HT 47U จากการทดสอบโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method, Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) จากการทดสอบซ้ำ 20 ครั้ง

| ตัวอย่าง | ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------|----------------------|------|---|------|
| | Modified Folin (Lowry) method | | Folin (Lowry) method | | Bradford method (Bio-Rad protein assay) | |
| | Mean \pm SD | %CVs | Mean \pm SD | %CVs | Mean \pm SD | %CVs |
| HT 47T | 820 \pm 0.12 | 14.4 | 1,700 \pm 0.17 | 10.0 | 820 \pm 0.03 | 4.0 |
| HT 47U | 570 \pm 0.07 | 12.0 | 1,360 \pm 0.05 | 4.0 | 610 \pm 0.04 | 7.1 |
| Control BSA (200 $\mu\text{g/ml}$) | 178 \pm 0.01 | 6.9 | 195 \pm 0.01 | 3.1 | 205 \pm 0.01 | 3.8 |

วิจารณ์และสรุป

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าการทดสอบความแม่นยำโดยการใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin, BSA) เข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งทดสอบไปพร้อมกับวัคซีนตัวอย่าง พบว่า การทดสอบโดยวิธี Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) จะมีความแม่นยำและความเที่ยงตรงดีใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนและค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายเท่ากับ 195 \pm 0.01 (3.1%) และ 205 \pm 0.01 (3.8%) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่วิธี Modified Folin (Lowry) method จะมีความแม่นยำและความเที่ยงตรงต่ำกว่า โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนและค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายของสารละลายโปรตีนมาตรฐานเท่ากับ 178 \pm 0.01 (6.9%) $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ว่ามีความเที่ยงตรงของวิธีการทดสอบดี (%CVs <10) ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (พิพัฒน์, 2542) แต่ยังคงขาดความแม่นยำในการทดสอบ

การที่วิธี Folin (Lowry) method ให้ค่าปริมาณโปรตีนสูงกว่าวิธี Modified Folin (Lowry) method และวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) ประมาณ 2 เท่า อาจเป็นผลมาจากในตัวอย่างแอนติเจนที่นำมาทดสอบมี Interfering substances ที่สามารถรบกวนโมลโฟสโฟโมลิบเดต-โฟลโฟทั้งสเตรตในสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ให้สีน้ำเงินมากขึ้น ซึ่ง Interfering substances ที่มีผลต่อวิธีนี้เช่น สาร detergents, Carbohydrates (eg. Sucrose, glucose, glycerol), Buffers (eg. Tris, HEPES, glycine, histidine, citrate), gradient forming materials

(Ficoll, metrizamide, polyvinyl pyrrolidone), thiol compounds, potassium compounds, sulfhydryl compounds, disulfide compounds, magnesium, calcium, EDTA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Triton X-100 เป็นต้น (Bensadoun and Weinstein, 1976; Dunn, 1992) ซึ่งจากการทดสอบเพิ่มเติมโดยนำ Supernatant ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนแล้ว ปรับสภาพให้เป็นกลางด้วย 0.1N NaOH แล้วนำไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนตามวิธี Folin (Lowry) method พบว่าไม่มีปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ แสดงว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดเกิดอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นแสดงว่าในตัวอย่างแอนติเจนมีสาร Interfering substances ที่ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ทดสอบได้จากวิธี Folin (Lowry) method สูงขึ้น และการที่วิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) ได้ผลใกล้เคียงกับวิธี Modified Folin (Lowry) method เนื่องจาก Interfering substances ในตัวอย่างแอนติเจนไม่มีผลต่อการทดสอบนี้ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาหา Interfering substances ดังกล่าวต่อไป

ทั้งนี้การทดสอบหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Folin (Lowry) method และ Folin (Lowry) method จะคล้ายคลึงกัน โดยมีการใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เหมือนกัน (เป็นสารที่ประกอบด้วย Phosphomolybdic acid และ Phosphotungstic acid) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทดสอบ phenolic derivatives เช่น tyrosine และ enolic derivatives เช่น tryptophan และ cystine เป็นต้น แต่วิธี Modified Folin (Lowry) method ต้องมีการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดก่อน ซึ่งช่วยลดสาร Interfering substances ในตัวอย่างแอนติเจนลงไปด้วย ขณะที่การทดสอบโดยวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) ที่ใช้น้ำยาข้อมสีสำเร็จรูป (ประกอบด้วย Coomassie® Brilliant Blue G-250 dye, Phosphoric acid และ methanol) ที่ใช้หลักการทดสอบหาปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford's method (Bradford, 1976) ซึ่งน้ำยาข้อมสีดังกล่าวจะจับกับ primary basic and aromatic amino acid residue เช่น arginine เป็นต้น (Compton and Jones, 1985)

ดังนั้นการทดสอบหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford method (Bio-Rad protein assay) จะให้ผลการทดสอบที่มีความแม่นยำ ความเที่ยงตรงและความรวดเร็วของวิธีการทดสอบดีที่สุดจากผลการทดสอบทั้งในตัวอย่างแอนติเจนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน รองลงไปคือวิธี Folin (Lowry) method และวิธี Modified Folin (Lowry) method ตามลำดับ แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้จากวิธี Folin (Lowry) method จะสูงกว่าอีก 2 วิธี ประมาณ 2 เท่า ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงค่าปริมาณโปรตีนที่แท้จริงโดยการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการและ/หรือการทดสอบโดยวิธีอื่นเช่น HPLC (High Performance Liquid Chromatography) หรือ Electrophoresis เพื่อยืนยันความถูกต้องและรวมถึงทดสอบหา Interfering substances ที่มีอิทธิพลต่อการทดสอบโดยวิธี Folin (Lowry) method ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่านที่ช่วยเหลือในการทดสอบ และคณะกรรมการตรวจสอบผลงานวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ที่ได้ช่วยตรวจสอบแก้ไขและให้คำแนะนำ จนผลงานสำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิคม ชัยศิริ 2524 การหาปริมาณโปรตีน ซีวเคมี II (ปฏิบัติการ) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 33 - 57.
- พิพัฒน์ ลักษณะมีจรัลกุล 2542 กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 83.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. 1976. Anal. Biochem. 70: 241.
- Bradford, M. 1976. Anal. Biochem. 72 : 248.
- Compton, S.J. and Jones, C.G. 1985. Anal. Biochem. 151 : 369.
- Dunn, M.J. 1992. Protein determination of total protein concentration. Harris, E.L.V., Angal, S.,(Eds), Protein Purification Methods, Oxford: IRL Press.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.A. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275.
- Rhone Merieux. 1988. Protein content. In : Technique for Production of Foot and Mouth Disease Vaccine. Section 6 Laboratories tests (ลิขสิทธิ์) p. 87-90.

Comparison of the method for determination of protein content in the antigen of foot and mouth disease vaccine

Jaturon Polrach¹ Chaiya Sangaprakhon¹ Kritsada Limpananont¹

Abstract

The determination of protein content in the antigen of foot and mouth disease vaccine with the Modified Folin (Lowry) method, the Folin (Lowry) method and the Bradford method were compared by analysis of two lots of vaccines, no. HT 47T and HT 47U. Each method was tested 20 times in each sample for repeatability. The mean values \pm SD (%CVs) of the protein content in sample no. HT 47T analyzed by the Modified Folin (Lowry) method, the Folin (Lowry) method and the Bradford method were 820 ± 0.12 (14.4%), $1,700\pm 0.17$ (10.0%) and 820 ± 0.03 (4.0%) $\mu\text{g/ml}$, respectively; for sample no. HT 47U, they were 570 ± 0.07 (12.0%), $1,360\pm 0.05$ (4.0%) and 610 ± 0.04 (7.1%) $\mu\text{g/ml}$, respectively.

The result showed that the Bradford method had higher precision and accuracy than the Modified Folin (Lowry) method and the Folin (Lowry) method. Therefore it is suitable for determination of protein content in the antigen of FMD vaccine. However, using the Folin (Lowry) method, the resulted of protein content values were approximately 2 times higher than those determined by the other two methods. It is probably due to interfering substances in samples which further experiments are needed.

Key words: protein content, foot and mouth disease vaccine

¹Foot and Mouth Disease Vaccine Quality Control Section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัดภาคกับปริมาณความเข้มข้นของ Arlacet A ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน

สหวัชร อึ้งวนิชบรรณ¹ อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์

บทคัดย่อ

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัดภาค (phase inversion temperature, PIT) ของตัวทำอิมัลชันในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน โดยแปรผันเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน Arlacet A ตั้งแต่ 3.0% - 10.0% ร่วมกับตัวทำอิมัลชัน Eumulgin M8 ปริมาณคงที่ 4% w/v พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของ Arlacet A ที่ใช้ได้อยู่ระหว่าง 4.6% - 8.0% โดยแปรผกผันกับอุณหภูมิกลับวัดภาคตั้งแต่ 24°C - 5°C และเมื่อทดสอบ centrifugation test ได้อิมัลชันที่คงตัวดี

คำสำคัญ : อุณหภูมิกลับวัดภาค Arlacet A วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์มีคุณลักษณะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ที่อุณหภูมิ 4°C การผสมวัคซีนใช้เทคนิคการกลับวัตภาค (phase inversion technique) ซึ่งจะให้อิมัลชันที่มีความคงตัวดีกว่าการผสมด้วยวิธีอื่น (พิมพร, 2534) โดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุและมีค่า hydrophilic-lipophilic balance number (HLB number) ต่างกัน ชนิดแรกเป็นสารในกลุ่ม polyoxyethylene ที่มีค่า HLB number สูงทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) (นวลจิรา, 2527) และชนิดที่สองเป็นสาร mannide monooleate ที่มีค่า HLB number ต่ำทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) (นวลจิรา, 2527) อุณหภูมิขณะผสมต้องสูงกว่าอุณหภูมิกลับวัตภาค (phase inversion temperature, PIT) หรือ hydrophilic-lipophilic balance temperature หลังจากผสมแล้วในขั้นแรกจะได้อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่มีความหนืดสูงเมื่อทำให้อิมัลชันเย็นลง อุณหภูมิที่อิมัลชันนั้นกลับวัตภาคจากชนิดน้ำในน้ำมันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำเรียกว่าอุณหภูมิกลับวัตภาคหรืออุณหภูมิที่คุณสมบัติในการชอบน้ำและชอบน้ำมันของตัวทำอิมัลชันมีความสมดุลย์กัน (นวลจิรา, 2527, พิมพร, 2534) ซึ่งอิมัลชันที่ได้มีความหนืดต่ำ จากการศึกษาของนริศและคณะ (2543) พบว่าอุณหภูมิกการกลับวัตภาคจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของ Montanide 80¹ (mannide monooleate) ร่วมกับสาร Eumulgin M8 ปริมาณคงที่ 4% สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ใช้สาร Arlacel A² ที่เป็นสารชนิดเดียวกันกับ Montanide 80 แต่มีค่า HLB number สูงกว่า มาใช้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคกับความคงตัวของวัคซีนอิมัลชันที่เกิดจากการใช้ปริมาณของ Arlacel A ที่แตกต่างกัน ร่วมกับสาร Eumulgin M8³ ปริมาณคงที่ 4% เพื่อประโยชน์ในการคาดคะเนชนิดของอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชันระหว่างการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของวัคซีนที่ผลิตได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมวัคซีน

1. วัตภาคน้ำประกอบด้วย chloroform Van Bakkum medium และแอนติเจน(inactivated

¹ Seppic, France

² ICI, USA

³ Henkel, Germany

concentrated FMD virus) ตามคู่มือการผลิตวัคซีน (นริศ ว่องวัฒนากุล, ติดต่อบุคคล) แบ่ง
วัดภาคน้ำเป็น 36 ตัวอย่าง ๆ ละ 400 มล.

2. วัดภาคน้ำมันประกอบด้วย mineral oil⁴ และตัวทำอิมัลชันที่เป็นสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด
ได้แก่ชนิดที่มี HLB number ต่ำคือ Arlacel A (mannide monooleate) โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่
3.0% - 10.0% w/v ร่วมกับชนิดที่มี HLB number สูง คือ Eumulgin M8 (oleyl cetyl alcohol with
7-8 molecule ethylene oxide) ที่มีความเข้มข้นคงที่ 4.0% w/v จำนวน 36 ตัวอย่าง ๆ ละ 400 มล.
ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่ 121°C นาน 90 นาที ปั่นและทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

3. การผสมวัคซีน ผสมวัดภาคทั้งสองโดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากัน ปรับอุณหภูมิให้เท่ากันที่
25°C เทวัดภาคน้ำลงในวัดภาคน้ำมันอย่างช้าๆ จนหมดพร้อมปั่นด้วย homogenizer⁵ นาน 4
นาที แบ่งวัคซีนอิมัลชันที่ 25°C ที่ได้เป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งนำมาหาอุณหภูมิกลับวัดภาค ส่วนที่
สองเก็บที่ห้องเย็น 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืนจนวัคซีนอิมัลชันมีอุณหภูมิ 4°C นำมาหาชนิดของอิมัลชัน
ทดสอบหาความคงตัวของอิมัลชัน

การทดสอบอิมัลชัน

Dilution test

1. วัคซีนส่วนที่หนึ่งทดสอบหาอุณหภูมิกลับวัดภาคของอิมัลชัน

ใส่วัคซีนอิมัลชันอุณหภูมิ 25°C จำนวน 4 มล. ในหลอดทดลองขนาด 12/13 มม.
จุ่มเทอร์โมมิเตอร์แบบปรอทที่มีขีดบอกระดับอุณหภูมิ 0°C - 100°C ลงในอิมัลชัน แล้วจึงจุ่มหลอด
ทดลองลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำอุณหภูมิห้องอยู่ ค่อยๆ เติมน้ำแข็งในบีกเกอร์ ขณะที่อุณหภูมิของ
อิมัลชันค่อยๆ ลดลงทุกๆ 1 °C นำอิมัลชันไปทดสอบการกระจายตัวในน้ำ โดยหยดอิมัลชันจากระดับ
ความสูงไม่เกิน 1 นิ้ว เหนือผิวน้ำในบีกเกอร์อีกอันหนึ่ง ถ้าอิมัลชันจับตัวเป็นหยดน้ำมันลอยอยู่แสดง
ว่าเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ถ้าอิมัลชันกระจายตัวละลายในน้ำเป็นสีนํ้านมแสดงว่าเป็นชนิดน้ำมัน
ในน้ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการกลับวัดภาคแล้ว ทำการบันทึกอุณหภูมิการกลับวัดภาคที่ได้

2. วัคซีนส่วนที่สองหาชนิดของอิมัลชัน

นำวัคซีนอิมัลชันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มาหยดเหนือผิวน้ำ ถ้าอิมัลชันจับตัวเป็น
หยดน้ำมันลอยอยู่แสดงว่าเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน แต่ถ้ากระจายตัวละลายในน้ำเป็นสีนํ้านมแสดงว่า
เป็นชนิดน้ำมันในน้ำ

⁴ Marcol 82[®], Exxon, USA

⁵ Ultra Turrax[®], IKA-Labortechnik, Germany

Centrifugation test

เพื่อทดสอบหาความคงตัวของวัคซีนอีมีลชันโดยปั่นที่ 1,400 g นาน 30 นาที. การแยกชั้นต้องไม่แยกชั้นมากกว่า 5% (McKercher, 1986)

ผล

จากการทดลองวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันจำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง มีวัคซีนจำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่งใช้ Arlacel A 3.0% - 4.4% w/v ไม่เกิดอีมีลชัน วัคซีนจำนวน 18 ตัวอย่าง ซึ่งใช้ Arlacel A 4.6% - 8.0% จะให้อีมีลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยทำ centrifugation test แล้วพบว่าไม่แยกชั้น ส่วนวัคซีนจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ใช้ Arlacel A 8.2% - 10.0% ให้อีมีลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งไม่ตรงตามวัตถุประสงค์ และอุณหภูมิกลับวัดภาคที่ให้อีมีลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะอยู่ระหว่าง 24°C - 5°C โดยแปรผกผันกับปริมาณของ Arlacel A ตั้งแต่ 4.6% - 8.0% w/v ร่วมกับ Eumulgin M8 คงที่ 4% w/v ดังแสดงใน Table 1 และ Figure 1

วิจารณ์

จากผลการทดลองเมื่อทราบค่า PIT ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่คุณสมบัติในการชอบน้ำและชอบน้ำมันของตัวทำอีมีลชันมีความสมดุลย์กัน หรือ HLB temperature จะทำให้ทราบว่าอีมีลชันนั้นอยู่ในสถานะแบบใด ดังนั้นในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมควรระมัดระวังในการเลือกอัตราส่วนของตัวทำอีมีลชัน การใช้ Arlacel A ปริมาณสูงเกินไปจะทำให้ค่า PIT ลดต่ำลง อีมีลชันที่ได้จะมีความหนืดมากเกินไปจนไม่สามารถกลับวัดภาคได้ ทำให้เกิดปัญหาในขบวนการผลิตและบรรจุวัคซีน หรือถ้าใช้ปริมาณ Arlacel A น้อยเกินไป PIT จะมีค่าสูงขึ้น อีมีลชันที่ได้จะมีความหนืดน้อยลง และอาจทำให้ปริมาณตัวทำอีมีลชันไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอีมีลชันได้ จากผลการทดลองพบว่าค่า PIT อยู่ระหว่าง 24°C - 5°C และสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้เลือกใช้ค่า PIT ที่ 17°C - 18°C เพื่อการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันที่ประหยัด และให้ผลประโยชน์คุ้มค่า

การใช้ปริมาณ Arlacel A ตั้งแต่ 3.0% - 4.4% ร่วมกับ Eumulgin M8 คงที่ 4% จะได้อีมีลชันไม่คงตัวเนื่องจากปริมาณของตัวทำอีมีลชันไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอีมีลชัน แต่ถ้าใช้ปริมาณ Arlacel A 8.2% - 10.0% จะได้อีมีลชันชนิดน้ำมันในน้ำมัน เนื่องจากตัวทำอีมีลชัน Eumulgin M8 ที่ทำให้เกิดอีมีลชันชนิดน้ำมันในน้ำมีปริมาณไม่เพียงพอ

ส่วนการแปรผันปริมาณของ Arlacel A ตั้งแต่ 4.6% - 8.0% พบว่าเมื่อใช้ปริมาณ Arlacel A มากขึ้น PIT จะลดต่ำลงเนื่องจากสาร Eumulgin M8 ที่เป็นกลุ่ม polyoxyethylene และมีผลทำให้เกิด

การกลับวัตภาค ซึ่งละลายได้ในวัตภาคน้ำมัน เมื่อทำการผสมวัคซีนจะได้วัคซีนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมัน แต่เมื่อลดอุณหภูมิของวัคซีนลงจนมาถึงอุณหภูมิกลับวัตภาคที่ Eumulgin M8 จะละลายในวัตภาคน้ำได้มากขึ้น อิมัลชันจะกลับวัตภาคกลายเป็นวัคซีนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิส่วนที่ขอบน้ำและขอบน้ำมันของตัวทำอิมัลชันมีความสมดุลย์กัน ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณ Arlachel A มากขึ้นจะทำให้จุดสมดุลย์ของส่วนที่ขอบน้ำและน้ำมันของสารที่ทำอิมัลชันเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนริศ และคณะ (2543) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณของ Arlachel A ที่ใช้มากกว่าปริมาณของ Montanide 80 ทั้งที่เป็นตัวทำอิมัลชันชนิดเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากค่า HLB number ของ Arlachel A ที่มีค่า 4.3 (ICI,1985) มากกว่า Montanide 80 ที่มีค่าเพียง 2.6 (Seppic, 1987) ทำให้จุดสมดุลย์ของส่วนที่ขอบน้ำและขอบน้ำมันของตัวทำอิมัลชันเปลี่ยนแปลง

สรุป

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันสามารถใช้ Arlachel A ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 4.6% - 8.0% w/v ร่วมกับ Eumulgin M8 ปริมาณคงที่ 4% w/v ได้ และจะให้อุณหภูมิกลับวัตภาคแปรผกผันตั้งแต่ 24°C - 5 °C โดยเมื่อผสมวัคซีนจะได้วัคซีนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งคงตัวดีที่ 4°C

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยเตรียมและบรรจุวัคซีนโครงการ 2 ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่านที่ช่วยให้การทดลองนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และคณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ช่วยให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- นริศ ว่องวัฒนากุล สีนสมุทร นิลฉวี และสหวัชร อึ้งวนิชบรรณ 2543 ความสัมพันธ์ระหว่าง
อุณหภูมิกับอัตราการและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรค
ปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน แบบรวม 3 ไทป์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2) : 51-60.
- นวลจิรา อุนสุพรรณิตินสาร 2527 เกสัชกรรมเทคโนโลยีของยาน้ำกระจายตัวและยาแก้มแข็ง
ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กราฟฟิคอาร์ท กทม.
หน้า 50-125.
- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ 2534 อิมัลชันทางเครื่องสำอางค์ (Cosmetic emulsions) ภาควิชาเทคโนโลยี
เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 1-208.
- ICI. 1985. Surfactant Product Data 54418c.0285. Imperial Chemical Industries PLC.
Americas Inc. p. 1-3.
- McKercher, P.D. 1986. Oil adjuvants : Their use in veterinary biologics. In : Advance in
carriers and adjuvants for veterinary biologics. The Iowa State University Press.
Iowa. p. 1-6.
- Seppic. 1987. Montanide 80. Division Cosmetique-Pharmacie, Paris cedex 07, France.
p. 1-8.

Table 1: Phase inversion temperature and characteristics of the emulsion using various concentrations of Arlacel A (3.0% - 10.0% w/v) and Eumulgin M8 at 4% w/v in swine foot and mouth disease emulsion vaccine

| Vaccine No. | Arlacel A % w/v | Phase inversion temperature (°C) | Emulsion characteristics | |
|-------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | Dilution test | Centrifugation test |
| 1 | 3.0 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 2 | 3.2 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 3 | 3.4 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 4 | 3.6 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 5 | 3.8 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 6 | 4.0 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 7 | 4.2 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 8 | 4.4 | ND | No emulsion formed | Separation |
| 9 | 4.6 | 24 | O/W | No separation |
| 10 | 4.8 | 24 | O/W | No separation |
| 11 | 5.0 | 24 | O/W | No separation |
| 12 | 5.2 | 24 | O/W | No separation |
| 13 | 5.4 | 24 | O/W | No separation |
| 14 | 5.6 | 23 | O/W | No separation |
| 15 | 5.8 | 23 | O/W | No separation |
| 16 | 6.0 | 23 | O/W | No separation |
| 17 | 6.2 | 22 | O/W | No separation |
| 18 | 6.4 | 22 | O/W | No separation |
| 19 | 6.6 | 20 | O/W | No separation |
| 20 | 6.8 | 18 | O/W | No separation |
| 21 | 7.0 | 15 | O/W | No separation |
| 22 | 7.2 | 14 | O/W | No separation |
| 23 | 7.4 | 13 | O/W | No separation |
| 24 | 7.6 | 11 | O/W | No separation |
| 25 | 7.8 | 8 | O/W | No separation |
| 26 | 8.0 | 5 | O/W | No separation |

Table 1: (Continued)

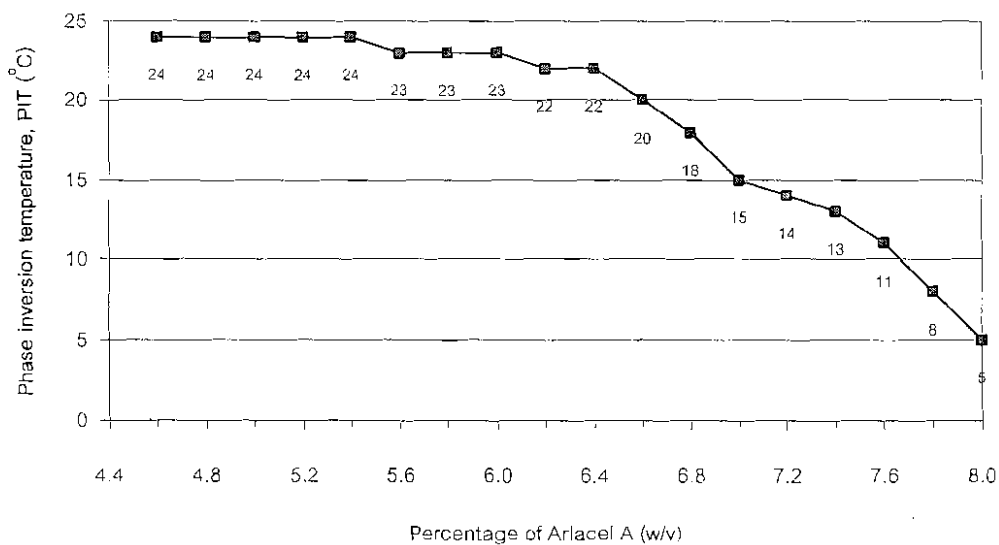
| Vaccine No. | Arlacel A % w/v | Phase inversion temperature (°C) | Emulsion characteristics | |
|-------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | Dilution test | Centrifugation test |
| 27 | 8.2 | ND | W/O | No separation |
| 28 | 8.4 | ND | W/O | No separation |
| 29 | 8.6 | ND | W/O | No separation |
| 30 | 8.8 | ND | W/O | No separation |
| 31 | 9.0 | ND | W/O | No separation |
| 32 | 9.2 | ND | W/O | No separation |
| 33 | 9.4 | ND | W/O | No separation |
| 34 | 9.6 | ND | W/O | No separation |
| 35 | 9.8 | ND | W/O | No separation |
| 36 | 10.0 | ND | W/O | No separation |

ND = Not done

O/W = Oil in water emulsion

W/O = Water in oil emulsion

Figure 1: Relation between phase inversion temperature and various concentrations of Arlacel A (4.6% - 8.0% w/v) in swine foot and mouth disease emulsion vaccine production



Relation between phase inversion temperature and various concentrations of Arlacel A in swine foot and mouth disease emulsion vaccine production

Sahawatchara Ungvanijban¹ Aree Katsuwonawong¹

Abstract

A study of the relation between phase inversion temperature (PIT) and Arlacel A concentration in swine foot and mouth disease emulsion vaccine production was carried out. The concentration of Arlacel A was varied from 3.0% to 10.0% w/v whereas Eumulgin M8 was fixed 4% w/v. The results showed that the optimal range of Arlacel A to obtain emulsion preparation was 4.6% - 8.0% w/v and its concentration had inverse relationship on PIT (24°C - 5°C, respectively). These emulsion vaccines had good stability according to centrifugation test.

Key words : phase inversion temperature, Arlacel A, swine foot and mouth disease emulsion vaccine

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130