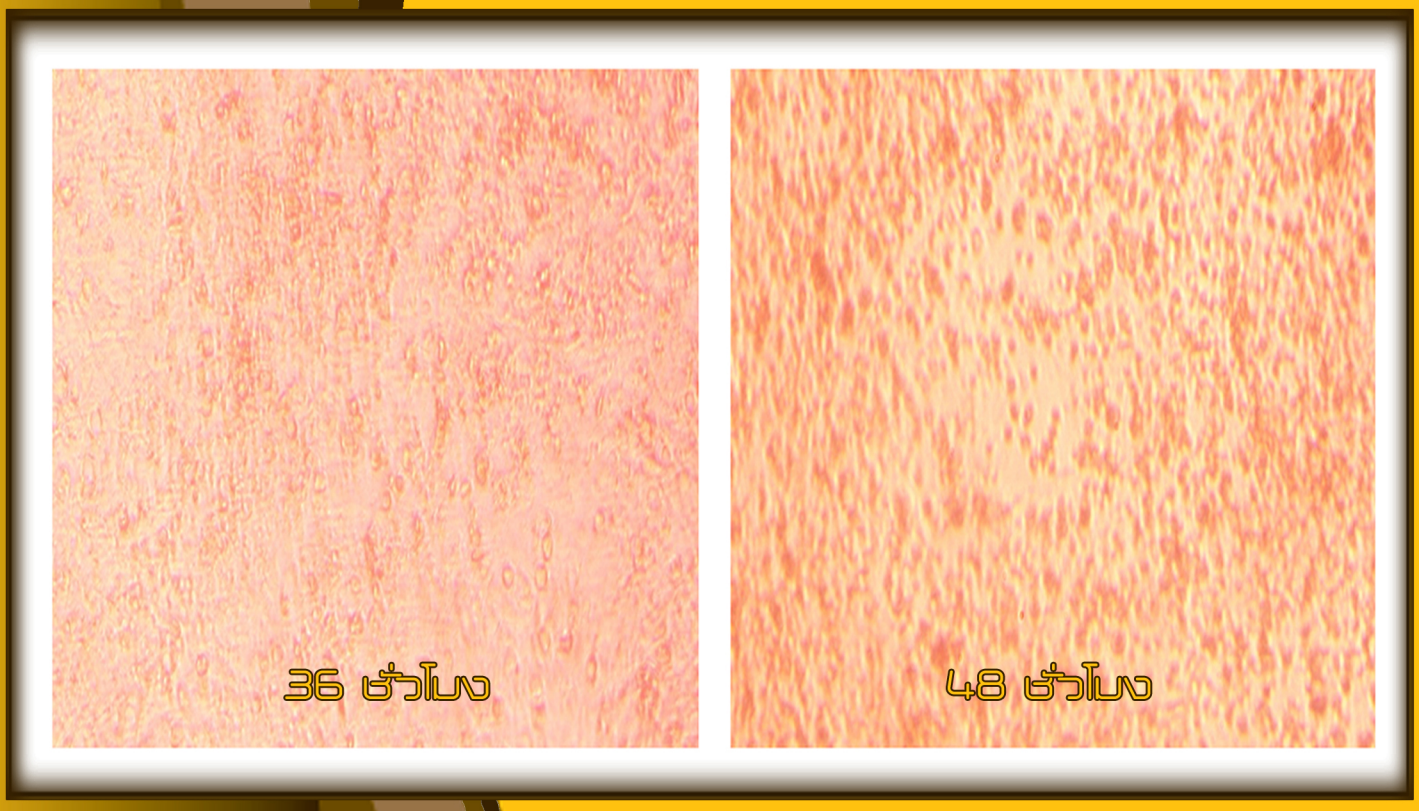
วารสาร ชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 20 ฉบับที่ 1-2 มี.ค.-ก.ย.2554 Vol.20 No.1-2 Mar-Sep 2011
ปีที่ 21 ฉบับที่ 1-2 มี.ค.-ก.ย.2555 Vol.21 No.1-2 Mar-Sep 2012



การเกิด CPE ของเซลล์ 1° CEF หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด
เป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง ที่ใช้ค่า MOI เท่ากับ 0.05 (ภาพขยาย 40X)

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 20 ฉบับที่ 1-2 และ ปีที่ 21 ฉบับที่ 1-2 มี.ค.-ก.ย. 2554 และ มี.ค.-ก.ย. 2555

สารบัญ

- **จากกองบรรณาธิการ** **6**
- **การใช้วิธีทางอิมมูนในการตรวจหา 12S ซับยูนิต ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย** **7**

  กฤษดา ลิมปนานนท์ เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ วิไล ลินจงสุบงกช
  ไชยา สง่าประโคน วิมลมาศ ลิปีพัน
- **ประสิทธิภาพและอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในถังจุ่มฆ่าเชื้อในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย** **20**

  วิไล ลินจงสุบงกช ชาลินี ดีแปลง จรรยา สมานิตย์ สุรเชษฐ์ คุณแก้ว
  รัตนีย์ ทองทา ปิยภรณ์ เจริญผล
- **ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด** **31**

  ธวัชชัย ปัจฉานุกูล ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน
- **การสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนแช่แข็งและทำแห้งของการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด** **40**

  ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน ธวัชชัย ปัจฉานุกูล
- **การศึกษาการปนเปื้อนนอนสตรัคเจอรัลโปรตีนในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย** **48**

  ไชยา สง่าประโคน ดิลก อ้วนพรมมา กาณต์ กีเนีย

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 20 No. 1-2 and Volume 21 No. 1-2 Mar. - Sep. 2011 and Mar.-Sep. 2012

Contents

- **The editorial** 6

- **Immuno-detection of 12S subunits as the degradation products of foot and mouth disease virus** 7

  Kritsada Limpananont Phensri Thongnopnua Wilai Linchongsubongkoch Chaiya Sangaprakhon Vimolmas Lipipun

- **The efficacy and expiry time of 1% glutaraldehyde as a disinfectant in dunk tank for killing foot and mouth disease virus** 20

  Wilai Linchongsubongkoch Chalinee Deepang Janya Samanit Surached Khunkeaw Rattanee Thongtha Piyaporn Chareonpol

- **Optimum multiplicity of infection for duck plague viral culture** 31

  Tawatchai Patchanukool Ritluechai Poosungnuen

- **The loss of virus titer on freezing storage and lyophilization of duck plaque vaccine production** 40

  Ritluechai Poosungnuen Tawatchai Patchanukool

- **A study on non-structural protein contamination in foot and mouth disease vaccine** 48

  Chaiya Sangaprakhon Dilok Auonpromma Kan Keenia

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

---

http://www.dld.go.th/biologic

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านชีวผลิตภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ชีวผลิตภัณฑ์
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	นิเทศ	เลิศลิมชลาลัย	**Advisory board**	Niteth	Lertlimchalalai
บรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ	**Editor**	Ratchanee	Atthi
หัวหน้ากองบรรณาธิการ	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ	**Editorial director**	Sahawatchara	Ungvanijban
กองบรรณาธิการ	วิไล	ลินจงสุบงกช	**Editorial board**	Wilai	Linchongsubongkoch
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	นพพร	พัฒนประสิทธิ์		Nopporn	Patanaprasit
	กมลทิพย์	ธัญพิมล		Kamonthip	Thunpimon
	วรพร	อ่ำเงิน		Woraporn	Amngoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	**Manager**	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 123
โทรสาร. 0-4427-9794

กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน

Office: Bureau of Veterinary Biologics,
Pakchong, Nakhonratchasima,
Thailand 30130
Tel. 0-4431-1476 extension 123
Fax. 0-4427-9794

Publications: Twice a year in March and September

จัดพิมพ์โดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัยอันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ

1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจนโดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์ วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน

1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น

1.4 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัดและต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น

2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

2.2.1 ตัวพิมพ์ ใช้ตัวอักษร Angsana New แบบปกติ ขนาด 15 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น **ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และ เอกสารอ้างอิง** ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 17 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น **คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ** เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 15

2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวนไม่เกิน 10 หน้า

2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบนที่ 6.5 ซม. และด้านซ้ายที่ 4.5 ซม. ส่วนด้านขวาและล่างที่ 1.5 ซม.

2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3….. ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติ ขนาด 15

2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
- รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง

2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella spp.*

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์

3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง

กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122, 123 โทรสาร 0-4431-5931

3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ

3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน

3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงอรรถ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) สั้นได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองความยาวไม่ควรเกิน 15 บรรทัด ภาษาไทยและภาษาอังกฤษเขียนแยกหน้า

4.4 คำสำคัญ (Key words) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งควรมีการทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงอรรถ

4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมืออุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

1. <u>วารสารหรือหนังสือ</u> เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981)
   เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิไลและคณะ, 2532; Kumakai *et al*., 1961)
   กรณี อ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
2. <u>บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน</u> ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น .....similar results (Layton, R. B. and

Weathers, C. C., unpublished data), ...for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)

3. <u>เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ</u> ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (,) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

1) <u>วารสาร</u> ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง เช่น

สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35

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

กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น

Carter, G.R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170–174.

Carter, G.R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61–63.

2) <u>หนังสือ</u> ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม พูลเกษ บรรณาธิการ หลักการทำไร่อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ หน้า 141-145

Office International des Epizooties. 2000. Principles of Veterinary Vaccine Production. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 42.

Dutta, S. K., Shankarappa, B. and Mattingly-Napier, B. 1991. Antigenic analysis of *Ehrlichia risticii* isolates. *In* Plowright, W., Rossdale, P. D., Wade, J. F. (ed.), Equine Infectious Diseases VI Proceedings of the Sixth International Conference 7-11 July 1991. R&W Publication (Newmarket) Limited. Suffolk, UK. pp. 61-65.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. *In* Leman, A. D. (ed.), Diseases of Swine, 6th ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

3) เว็บไซต์ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ (ถ้ามี) แหล่งที่มาและวันที่เข้าถึง เช่น

จันทรา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึ่งพิศ ดุลยพัชร์ 2541 อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm 27 มีนาคม 2541

Boscos, C. M. 2004. Canine TVT: Clinical findings, Diagnosis and Treatment. The 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association. 6-9 October 2004. Rhodes, Greece. Available from http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx [Accessed 10 January 2006].

จากกองบรรณาธิการ

กองบรรณาธิการมีความจำเป็นต้องรวมวารสารฉบับประจำปี 2554 และ 2555 ไว้เป็นเล่มเดียวกันคือวารสารฉบับนี้ เนื่องจากในปีที่ผ่านมาจำนวนผลงานของนักวิชาการที่ขอเผยแพร่ไม่เพียงพอสำหรับการออกวารสารแต่ละฉบับตามเวลาที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าวารสารจะออกล่าช้าแต่ประโยชน์จากเนื้อหาผลงานวิชาการในฉบับนี้ยังเป็นปัจจุบันซึ่งนักวิชาการที่ทำงานในห้องปฏิบัติการด้านไวรัสและในพื้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการดำเนินการต่อยอดทางวิชาการได้โดยเฉพาะเกี่ยวกับคุณสมบัติของไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

กองบรรณาธิการขอเชิญชวนให้นักวิชาการได้อ่านและใช้ประโยชน์จากผลงานต่าง ๆ ในฉบับนี้รวมถึงส่งผลงานวิจัย บทความด้านวิชาการตลอดจนเกร็ดความรู้ต่าง ๆ ที่จะเป็นประโยชน์ต่องานทางชีวภัณฑ์สัตว์มาเผยแพร่เพื่อวารสารฉบับต่อๆไปจะได้ออกตามกำหนด

สำหรับรูปแบบวารสารฉบับนี้เราได้ปรับปรุงรูปเล่มวารสารให้มีขนาดกะทัดรัดโดยลดขนาดของเล่มและตัวอักษรให้เล็กลงเพื่อความเหมาะสมมากขึ้นสำหรับผู้อ่าน และในฉบับต่อไปกองบรรณาธิการจะปรับปรุงสาระภายในเล่มให้มีบทความสั้น ๆ และเพิ่มเติมเกร็ดความรู้ด้านชีวภัณฑ์สัตว์และด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งเกิดจากทักษะและประสบการณ์ของผู้ทำงานเป็นเวลานานโดยมุ่งหวังให้ผู้อ่านได้รับประโยชน์สูงสุด

ขอขอบคุณ

สพ.ญ.รัชนี อัตถิ

บรรณาธิการ

Immuno-detection of 12S subunits as the degradation products of foot and mouth disease virus

Kritsada Limpananont[1] Phensri Thongnopnua[1*] Wilai Linchongsubongkoch[2]
Chaiya Sangaprakhon[3] Vimolmas Lipipun[1]

Abstract

The 12S subunits are inactive antigens resulting from the degradation of 146S particles which are important immunogen in foot and mouth disease (FMD) vaccine production. The immuno-detection of 12S subunits was established in this study. The 12S subunits were prepared by heat treatment method by incubating the purified 146S particles at 56 °C for 1 hour, at this stage the 146S particles would be degraded into 12S subunits, then the purification of 12S subunits was performed by using 5-25% sucrose density gradient ultracentrification. An indirect ELISA and indirect sandwich ELISA were used to detect the 12S subunits, it was found that the indirect sandwich ELISA demonstrated high sensitivity when compared with indirect ELISA. In conclusion, this method would be able to apply for the detection of 12S subunits in routine vaccine production.

Key words: foot-and-mouth disease, ELISA, 12S subunits, 146S particles degradation

---

[1]Biomedical Analysis Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2]Regional Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease in South East Asia, National Institute of Animal Health, Pakchong, Nakornratchasima 30130

[3]Quality Control Section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakornratchasima 30130

[*]Corresponding author: Phensri Thongnopnua, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Tel: 02-218-8308; E-mail: tphensri@chula.ac.th

Introduction

Foot and mouth disease (FMD) virus is a single-stranded RNA virus belonging to Picornaviridae family, genus Aphthovirus , it causes severe economic loss in cloven-hoofed animals. For controlling the disease, regular prophylactic vaccination is recommended for immunization of cattle, sheep, goats and pigs. To meet the standard requirement for vaccine production follow the guidance of the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organization for Animal Health (OIE), FMD vaccine is recommended to be inactivated and purified virus which mainly consists of the whole particle of 146S (OIE, 2000).

In Thailand, the FMD vaccines are produced by the Bureau of Veterinary Biologics (BVB), Pakchong, Nakhonratchasima. The vaccines are distributed over the country under the cold chain system such that the vaccines have to be maintained at $4^{O}C$ to ensure the stability of 146S particles in the vaccines (Sangaprakhon and Limpananont, 2001; Anderson, 1983). It has been reported that 146S particles, an important immunogen – in the vaccine could be degraded into subunits (12S particles) if the vaccines' temperature are elevated to be 25 – $37^{O}C$ (Brown and Wild, 1966; Cartwright et al., 1980, Cartwright et al., 1982). The immunogenicity of 12S subunits is very poor comparing to 146S particles (Crowther et al., 1995; Doel and Baccarini, 1981; Rweyemamu et al., 1979; Doel and Chong 1982). However, the quantification of 146S and 12S using monoclonal antibody in sandwich ELISA has been reported by Crowther et al. (1995), but the procedure for preparing and cloning the specific monoclonal antibodies is time consuming and laborious. In Thailand, no – specific method has been reported in determining the presence of 12S subunit particles which might be presented in viral culture fluid or routine vaccine manufacture process. Recently, testing of final product of vaccine production is the potency test in target animals as cattle or pigs that might be indicated the reduction of immunogenicity of vaccine due to the degradation of 146S particles into 12S subunit. The vaccine potency test is generally time consuming and expensive, in this regard, a new technology need to be developed and researched. Therefore, the objective of this study is to prepare the 12S subunits from 146S particle degradation and to establish a new technique for detecting 12S subunits by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using polyclonal antibodies.

Materials and methods

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were of analytical grade and used as received. Those purchased from Merck (Damstadt, Germany), were potassium di-hydrogen phosphate, sodium carbonate (anhydrous), sodium bicarbonate, sodium chloride, potassium chloride, di-sodium hydrogen phosphate, tween 20, 3, 3', 5, 5'-tetra methyl benzidine (TMB), hydrogen peroxide, sulfuric acid, citric acid. Skim milk was from Becton Dickinson and company (Difco, USA). The concentration of those chemicals were used according to the assay protocol.

Biological reagents

Purified 146S particles, guinea pig polyclonal anti-146S serum and anti-guinea pig peroxidase conjugate were generously supplied by BVB and Regional Reference Laboratory for foot and mouth disease in South East Asia (RRLFMD), Department of Livestock Development, Pakchong, Nakornratchasima. The working dilution of those biological reagents were used according to the assay protocol of BVB and RRLFMD.

Preparation of 12S subunit particles

Because 12S subunits are the degradation products of 146S particles by acidifying and heat treatment (Crowther et al., 1995), the degradation of 146S particles could be elevated at temperature higher than the storage temperature (Brown and Wild, 1966; Cartwright et al., 1980, Cartwright et al., 1982). This study, we determined the exposure time and temperature in which 146S particles could be completely degraded into 12S subunits and used this condition for preparing 12S subunits for further study. The preparation of 12S subunit was described below;

50 μg/ml of purified 146S particles in 0.01 M phosphate bufferd saline , pH 7.6 were prepared. An aliquot of each 2 ml. was transferred into twenty-four bottles in which they were separated into four sets. Six replications per each set were treated under different temperatures. They were 4^{O}C, 25^{O}C, 37^{O}C and 56^{O}C (Brown and Wild, 1966; Doel and Chong 1982; Rweyemamu et al., 1979). A 300 μl of each bottle was withdrawn at 1, 3, 6, 12, 18 and 24 hours, respectively. At different temperature treatment, sample at each sampling time point was pooled and loaded on 15-45% sucrose density gradient ultracentrification at 100,000 x *g* for 3 hours. The fractionated solutions were estimated by the UV detection spectophotometer at 254 nm (Bachrach et al.,1964), the purified untreated 146S particles peak

was used as a control and the decrease of 146S absorption peak in treated sample was defined as degradation of 146S particles into 12S subunits. The exposure time and temperature in which no virus peak was observed by UV detection at 254 nm, would be used as the suitable condition for preparing 12S subunits.

Purification of 12S subunit particles

There are two methods for 12S subunit purification; one is 5-15% sucrose density gradient ultracentification method, the other is heat treatment of 146S particle before 5-15% sucrose density gradient ultracentification method. Both procedures were described below;

- Two milliliters of purified virus (146S) containing 8 μg virus was directly loaded on 5-25% sucrose density gradient and ultracentrifugation at 100,000x *g* for 10 hours. The gradient was fractionated 0.5 ml from bottom, each fraction was diluted with carbonate buffer, pH 9.6 and would be used as untreated sample or control in both indirect ELISA and indirect sandwich ELISA .

- Two milliliters of purified virus (146S) containing 8 μg virus was incubated at 56^{O}C for 1 hour. This treated sample was loaded on 5-25% sucrose density gradient, and ultracentrifugation at 100,000 x *g* for 10 hours. The gradient was fractionated 0.5 ml from bottom, each fraction was diluted with carbonate buffer, pH 9.6 and used as treated sample in both indirect ELISA and indirect sandwich ELISA.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) technique for the detection of 12S subunits

The appropriate ELISA method for 12S subunits detection was performed and compared with indirect ELISA and indirect sandwich ELISA . The technique could quantitatively in differentiating 12S subunit from 146S particles. Procedure as described below.

Indirect ELISA

50 μl of each diluted fraction of untreated 146S particles and 50 μl of each diluted fraction of degraded 146S particles which were supposed to be 12S subunits were separately coated into ELISA plate using carbonate/bicarbonate coating buffer, three replications per dilution. The plate was incubated at 37^{O}C for 2 hours. After washing with PBS, 50 μl of blocking solution containing 5% skim milk in ELISA diluent was added and incubated at 37^{O}C for 1 hour. Plate was then washed and 50 μl of guinea pig anti-146S solution was added and incubated at 37^{O}C for 1 hour, wash with PBS, this step an excess of 146S antiserum was washed out. Then 50 μl of anti-guinea pig immunoglobulin peroxidase conjugate solution was added, incubated at 37^{O}C for 1 hour and washed with PBS. Then 100 μl of freshly prepared

chromogen-substrate solution containing TMB in citrate-acetate buffer and hydrogen peroxide were added. Leave the plate at room temperature for 20 min, then stopping solution of 50 μl of 0.1 N sulfuric acid was added in every wells. Absorbance values at 540 nm were measured by ELISA reader. The absorbance value of each fraction was determined and plotted versus the fraction withdrawn from the sucrose density gradient.

Indirect sandwich ELISA

ELISA plate was coated with 50 μl/well of rabbit anti146S serum in carbonate/bicarbonate buffer. Each diluted fraction of untreated 146S particles and each diluted fraction of degraded 146S particles supposing to be 12S subunits was separately added into the coated plate, three replications per dilution. The plate was incubated at 37^{O}C for 2 hours. Plate was then washed with PBS, this step, an excess 12S subunits was washed out. 50 μl of guinea pig anti-146S solution was added and incubated at 37^{O}C for 1 hour. 50 μl of anti-guinea pig immunoglobulin peroxidase conjugate solution was added, incubated at 37^{O}C for 1 hour, washed with PBS, then 100 μl of freshly prepared chromogen-substrate solution containing TMB in citrate-acetate buffer and hydrogen peroxide was added. Leave plate at room temperature for 20 min, then add stopping solution of 50 μl of 0.1 N sulfuric acid in every wells. Absorbance values at 540 nm were measured by Multiskan ELISA reader. The absorbance value of each fraction was determined and plotted versus the fraction withdrawn from the sucrose density gradient.

Dose-response correlation

The correlation between the concentration of 12S subunits and their detection response was analyzed by liner regression method (R^2) from indirect ELISA and indirect sandwich ELISA.

The 12S subunits particles were prepared by heat treatment method (Crowther et al., 1995) using two milliliters of purified 146S particle containing 8 μg viral protein, it was incubated at 56^{O}C for 1 hour in order to complete degradation into 12S subunit particles. This treated sample was divided into two portions, the first portion represented the high level of 12S subunits, the second portion represented the low level of 12S subunits by diluting with phosphate buffered saline at dilution ratio of 1:16. Both portions were purified by using 5-25% sucrose density gradient ultracentrification as method described in above paragraph. The fraction sample was made 2 fold series dilution from 1:20 to 1:2560 respectively, using carbonate buffer, pH 9.6. Each series dilution was used as sample solution in both indirect ELISA and indirect sandwich ELISA.

Take 50 μl of each series dilution of 12S high level and 50 μl of each series dilution of 12S low level was separately added into ELISA plate for indirect ELISA and indirect sandwich ELISA as method described above.

Results

1. Preparation of 12S subunit particles

12S subunit particles could be prepared by heat treatment of 146S particles. In table 1, the degradation of 146S particles was significantly elevated at the temperature higher than 25°C, whereas at 56°C, the 146S particles were completely degraded within one hour of heat exposure such that no absorbance peak of 146S particles was observed as shown in figure 1(b). Therefore, in this study the 12S subunits were prepared by incubating 146S particles at 56°C for 1 hour.

2. Immuno-detection of 12S subunit particles

Figure 2 and 3 showed the performance of untreated 146S particles and 12S subunit particles treated from 146S particles. An indirect ELISA and indirect sandwich ELISA were used to detect those particles. The result found that an indirect sandwich ELISA in Figure 3 could detect both 146S particles and 12S subunits. As well as the purified 12S particles prepared from 5-25% sucrose density gradient ultracentrifuge method could detect the 146S and 12S by indirect ELISA only at fraction no. 3, 7 and 9 respectively. In contrast, the poor detection of 146S and 12S were found by indirect sandwich ELISA as shown in figure 2.

Dose-response correlation

Figure 4 and 5 demonstrated the relationship between the concentration of 12S at high level (a) and low level (b). For indirect sandwich ELISA in Figure 4, the correlation between 12S high and low level by liner regression (R^2) analysis was 0.8718 ($R^2 = 0.8718$). While the indirect ELISA in figure 5 demonstrated the correlation between 12S high and low level by liner regression (R^2) analysis was 0.9362 ($R^2 = 0.9362$).

In figure 6 and 7 demonstrated the preparation of 12S from 146S particles degradation in different exposure time and temperature, exposure time was at 1, 5, 10, 15, 20 and 25 hour, respectively and temperature condition was at 4, 25, 37 and 56°C, respectively.

Discussion

The 146S particles could be completed degeneration into 12S subunits within 1 hour at 56^{O}C. The total degradation of 146S was indicated from the undetectable absorbance peak of 146S at UV 254 nm as shown in figure 1 (b) when compared with untreated 146S particle in figure 1 (a) as a control which illustrated the absorbance peak representing the RNA content of 146S.

At high temperature condition, the ultraconfiguration of 146S particles at 100,000 x *g* for 10 hours were broken down into 12S subunits (Brown and Wild, 1966). It is then not possible to detect 146S degradation by UV spectrophotometer at 254 nm. Hence, as a result, the immuno-detection would be essential for detecting 12S subunits. Using a different immuno-detection technique of indirect ELISA and indirect sandwich ELISA might give a different result with several reasons. An indirect ELISA, the fractionated solution of 146S and 12S were coated directly into the solid phase of ELISA plate, this might contain a non-specific protein binding in the assay system or low concentration of 146S and 12S particles, therefore a low specific detection was found (figure 2). As well as an indirect sandwich ELISA , the rabbit anti 146S serum was coated into ELISA plate. Then the 146S and 12S in fractionated solution were added in the assay system, the low specific detection were found, this might be resulting from cross reaction of 12S subunit to rabbit anti146S serum or from non specific protein containing in the serum or fractionated samples as shown in figure3. Recently, the purification of 146S particle by using 15-45% sucrose density gradient ultracentrification method was being used as routine preparation in laboratory and vaccine production manufacture. However, the purification of 12S by using 5-15% sucrose density gradient ultracentrification method would be a meaningful tool for identifying 146S from 12S particle.

In this study, an indirect sandwich ELISA method indicated a high sensitive than indirect ELISA in detecting of 12S subunit particles (figure 4) as well as the series dilution of 12S subunits could be detected in samples containing high level and low level of 12S. In contrast, by indirect ELISA method indicated a low binding reaction in both samples (figure 5). Although Crowther et al.(1995) reported the quantification of 12S by using monoclonal antibody, but this study demonstrated the possibility of using polyclonal anti-146S serum for 12S detection (Figure 6 and 7), therefore, this method could be applied for the detection of 12S subunit particles in routine vaccine production.

Conclusion

The 146S particles which are the important immunogen in FMD vaccine, could be completely degraded into 12S subunits by heat treatment at 56°C for 1 hour. In order to detect the occurrence of 12S subunits, the use of 5-25 % sucrose density gradient ultracentrifuge method could be separated and purified of 12S subunits from 146S particles. An indirect sandwich ELISA using polyclonal antibody could be performed for 12S subunits detection which giving a satisfactory results.

Acknowledgements

This study was partially supported by graduate school of Chulalongkorn University. The laboratory work was done at the Bureau of Veterinary Biologics and Regional Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease in South East Asia and at Biomedical Analysis Research Unit, Chulalongkorn University.

References

Anderson, E.C., Doughty, W.J., and Muthiani, 1983. A. Observations on the stability of foot and mouth disease vaccine antigens. Vaccine. 1: 26-30.

Brown, F. and Wild, T.F. 1966. The effect of heat on the structure of foot and mouth disease virus and the viral ribonucleic acid. Biochim. Biophys. Acta. 119: 301-308.

Bachrach, H.L, Trautman, R., and Breese, S. Jr. 1964. Chemical and physical properties of virtually pure foot and mouth disease virus. Am. J. Res. 25: 333-342.

Cartwright, B., Chapman, W.G. and Brown, F. 1980. Serological and immunological relationships between the 146S and 12S perticles of foot and mouth disease virus. J. Gen. Virol. 50: 369-375.

Cartwright, B., Morrell, D.J. and Brown, F. 1982. Nature of the antibody to the foot and mouth disease virus particle, its 12S protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VP1. J. Gen. Virol. 63: 375-381.

Crowther, J.R., Reckziegel, P.O. and Prado, J.A. 1995. Quantification of whole virus particles (146S) of foot and mouth disease virus in presence of virus subunit (12S) using monoclonal antibodies in a sandwich ELISA. Vaccine. 13(12): 1064-1075.

Doel, T.R., and Baccarini, P.J. 1981. Thermal stability of foot and mouth disease virus. Arch. Virol. 70: 21-32.

Doel, T.R. and Chong, W.K.T. 1982. Comparative Immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot and mouth disease virus. Arch. Virol. 73: 185-191.

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.

Rweyemamu, M.M., Therry, G. and Pay, T.W.F. 1979. Stability and Immunogenicity of empty particles of foot and mouth disease virus. Arch. Virol. 59: 69-71.

Sangaprakhon, C. and Limpananont, K. 2001. Effect of temperature on the amount of 146S particles in swine trivalent Foot and Mouth Disease Vaccine. J. Vet. Biol. 11(1-2): 9-16.

Table 1 The stability 146S particles under different conditions of exposure time and temperature.

Sampling time (hours)	Mean 146S particles (μg/ml) (n = 2)			
	Temperature (^{O}C)			
	4	25	37	56
1	48.5	46.0	43.0	0
3	48.0	41.5	34.0	0
6	47.0	38.5	39.0	0
12	48.0	36.5	28.0	0
18	42.0	39.5	28.5	0
24	41.0	39.0	25.0	0

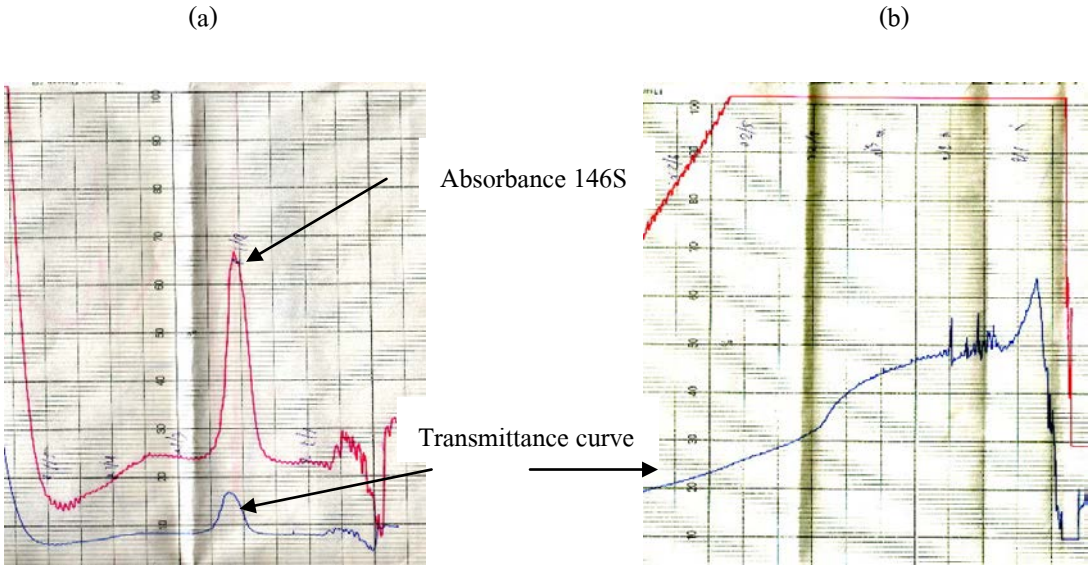


Figure 1 Absorbance peak of 146S particles at 254 nm by 15-45% sucrose density gradient ultracentrifugation
(a) Untreated 146S particles as control (b) Treated 146S particles at 56^{O}C for 1 hour

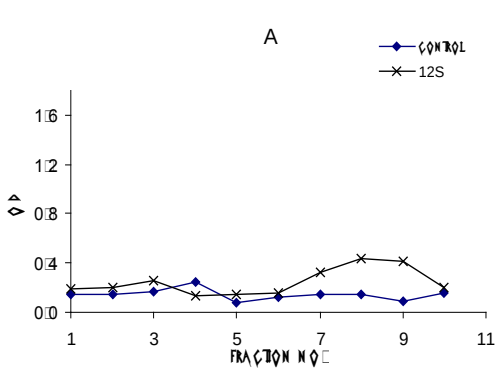


Figure 2 Indirect ELISA of 12S and control(146S)

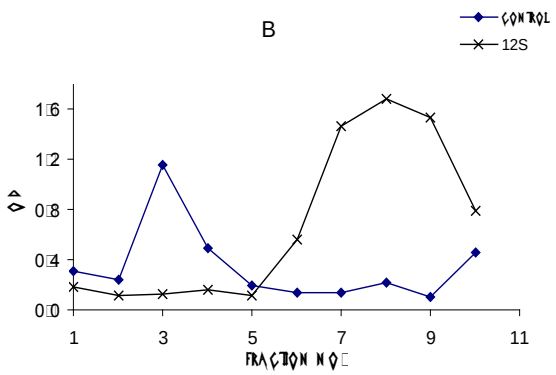
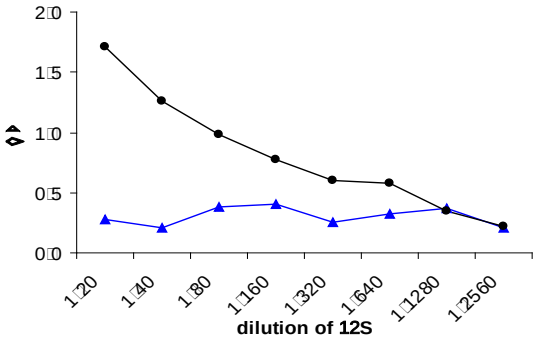


Figure 3 Indirect sandwich ELISA of 12S and control



e 4 Indirect sandwich ELISA for 12S subunits detection

(a) high level of 12S

(b) low level of 12S

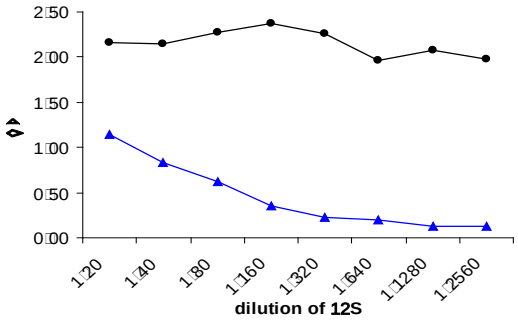


Figure 5 Indirect ELISA for 12S subunits detection

(a) high level of 12S

(b) low level of 12S

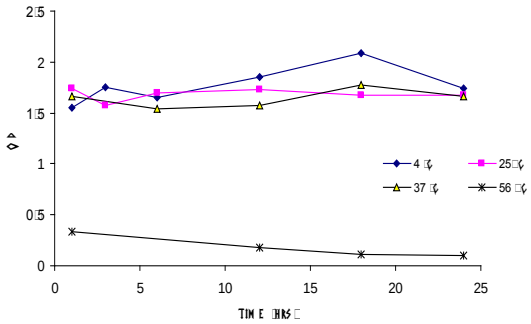


Figure 6 Indirect sandwich ELISA in detection of 146S particles at different exposure time and temperature

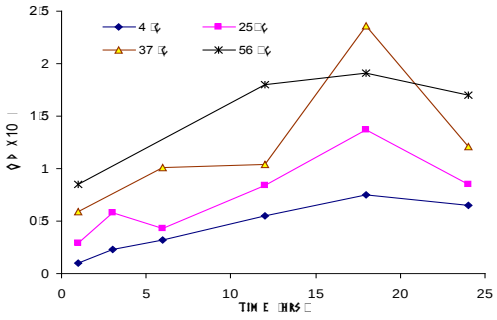


Figure 7 Indirect sandwich ELISA in detection of 12S subunits at different exposure time and temperature

การใช้วิธีทางอิมมูนในการตรวจหา 12S ซับยูนิต ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

กฤษดา ลิมปนานนท์[1] เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ[1*] วิไล ลินจงสุบงกช[3]
ไชยา สง่าประโคน[3] วิมลมาศ ลิปีพัน[1]

บทคัดย่อ

12S ซับยูนิต เกิดจากการสลายตัวของอนุภาค 146S ซึ่งเป็นอนุภาคสำคัญในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย การเตรียมอนุภาค 12S ซับยูนิตทำได้โดยการใช้ความร้อนบ่มอนุภาค 146S ที่อุณหภูมิ 56^{O} ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธี 5-25% sucrose density gradient ultracentrification นำอนุภาค 12S ซับยูนิตที่ได้ไปตรวจด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect sandwich ELISA โดยใช้ polyclonal antibodies พบว่าวิธี indirect sandwich ELISA ให้ความไวสูงกว่าวิธี indirect ELISA สรุปโดยภาพรวมวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบ อนุภาค 12S ซับยูนิตที่ได้จากการสลายตัวของอนุภาค 146S ซึ่งเป็นอิมมูนแอนติเจนสำคัญในการผลิตวัคซีน

คำสำคัญ: โรคปากและเท้าเปื่อย อีไลซ่า 12S ซับยูนิต การสลายตัวของอนุภาค 146S

---

[1]หน่วยปฏิบัติการวิจัย Biomedical Analysis คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
[2]ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
[3]กลุ่มทดสอบคุณภาพชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
[*]ผู้เขียนรับผิดชอบ โทรศัพท์ 02-218-8308 E-mail: tphensri@chula.ac.th

ประสิทธิภาพและอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในถังจุ่มฆ่าเชื้อในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

วิไล ลินจงสุบงกช ชาลินี ดีแปลง จรรยา สมานิตย์ สุรเชษฐ์ คุณแก้ว
รัตนีย์ ทองทา ปิยภรณ์ เจริญผล

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพและอายุการใช้งานน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารละลายใส่ในถังจุ่มฆ่าเชื้อที่ติดตั้งในอาคารห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยชีวภาพระดับ 3 หรือ Biosafety Laboratory level-3 (BSL-3) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อใช้สำหรับทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ปนเปื้อนมากับวัสดุ อุปกรณ์ สารตรวจสอบต่างๆ หรือ viral RNA ที่มีความประสงค์จะนำออกนอกพื้นที่เขตควบคุมของห้องปฏิบัติการ BSL-3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde และการเจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5%, 0.1% และ 0.01% เมื่อผสมกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวัน พบว่า 1% glutaraldehyde สามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 % และ 0.1 % ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้เช่นกัน ในขณะที่ความเข้มข้น 0.01% พบว่าไม่มีประสิทธิภาพทำลายไวรัสได้ ส่วนการทดสอบอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ glutaraldehyde ภายหลังการเตรียมและใช้งานในถังจุ่มฆ่าเชื้อที่ระยะ 3, 4, 5 , 6 และ 7 เดือน พบว่าที่ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.1% ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้และมีอายุการใช้งานนานถึง 7 เดือน ซึ่งเป็นการยืดอายุการใช้งานและประหยัดน้ำยาฆ่าเชื้อโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนทุกๆ 3 เดือนตามปกติ

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย glutaraldehyde ถังจุ่มฆ่าเชื้อ

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 3013

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม picornavirus สามารถแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วจากสัตว์ป่วยและจากสิ่งของที่ปนเปื้อนเชื้อ วิธีการควบคุมและป้องกันโรคไม่ให้แพร่กระจายไปสู่สัตว์อื่นหรือสิ่งแวดล้อมบริเวณข้างเคียงให้ได้ผลดีคือการตัดวงจรการแพร่เชื้อโดยการฆ่าเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในสิ่งของต่างๆ วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องใช้หรือบริเวณพื้นที่ที่เกิดโรคหรือที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อน การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมในการฆ่าหรือทำลายไวรัสได้อย่างสมบูรณ์และยังป้องกันการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปสู่บริเวณข้างเคียงหรือสู่สิ่งแวดล้อม มีรายงานการใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นกรดและด่างชนิดเข้มข้นจะสามารถฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ผลดี (Sellers, 1968) แต่มีข้อเสียคือสารบางชนิดทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนังและกัดกร่อนอุปกรณ์หรือเครื่องมือ ปัจจุบันได้มีการใช้เป็นยาฆ่าเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหรือทำลายเชื้อไวรัสอย่างแพร่หลาย เช่นสารในกลุ่ม quaternary ammonium compound, chlorine และ iodine สำหรับฆ่าเชื้อไวรัส Swine Vesicular Disease, Vesicular Stomatitis ได้ผลและมีประสิทธิภาพโดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Shirai *et al.*, 1999) จากรายงานของพยนต์และคณะ (2543) ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆที่สามารถฆ่าหรือทำลายเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 5 นาที ได้แก่ 4% โซดาแอช (Na_2CO_3), 0.5% Glutar-Z (glutaraldehyde) และ 0.25% speedyne เป็นต้น จากข้อมูลเหล่านี้จึงมีการนำสารละลาย 1% glutaraldehyde มาใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อไวรัสใส่ในถังจุ่มฆ่าเชื้อเพื่อใช้สำหรับทำลายไวรัสที่อาจปนเปื้อนมากับวัสดุ อุปกรณ์ หรือภาชนะที่ใส่สารหรือ viral RNA ต่างๆ ที่ได้ใช้งานในพื้นที่ควบคุมของห้องปฏิบัติการมีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 หรือ BSL-3 ก่อนที่จะส่งต่อไปยังหน่วยล้างเพื่อทำการล้าง อบหรือนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อใช้งานใหม่ต่อไปหรือมีความประสงค์จะนำสารตรวจสอบหรือ viral RNA ไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปจำเป็นต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อปนเปื้อนก่อนตามหลักการ biosecurity system ของอาคาร BSL-3 โดยนำวัสดุอุปกรณ์ดังกล่าวในถังจุ่มฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นถังใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde เป็นเวลา 20 นาทีก่อนนำออกนอกพื้นที่ BSL-3

โดยปกติจะทำการเตรียมสารละลาย 1% glutaraldehyde จำนวนปริมาตร 70 ลิตรใส่ในถังจุ่มฆ่าเชื้อและทำการเปลี่ยนใหม่ทุกๆ 3 เดือน ตามคำแนะนำของผู้เชี่ยวชาญด้าน biocontainment จากออสเตรเลีย (เอกสารไม่ตีพิมพ์) ซึ่งค่อนข้างจะสิ้นเปลืองน้ำยาฆ่าเชื้อและมีราคาแพง หากสามารถยืดอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อดังกล่าวโดยยังคงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสได้จะทำให้ประหยัดงบประมาณได้ระดับหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพและอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในถังจุ่มฆ่าเชื้อภายหลังการเตรียมและใช้งานเกิน 3 เดือน เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

เพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ baby hamster kidney-21(BHK-21)ใน growth medium ประกอบด้วย MEM + 5% bovine serum + 0.07% $NaHCO_3$ บ่มในตู้ incubator 37°C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ได้เซลล์เป็น confluent monolayer สำหรับใช้ศึกษาด้าน cell toxicity และ inhibitory test ของน้ำยาฆ่าเชื้อ

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

เพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) ไทป์เอเชียวันในเซลล์ BHK-21 ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเกิด complete cytopathic effect (CPE) ภายใน 18 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่น แยกเก็บส่วนใสเป็นสต็อคสำหรับการทดลองและตรวจสอบ virus titer โดยวิธี 50% tissue culture infectivity dose ($TCID_{50}$) คำนวณ virus titer ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

น้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde สำหรับใส่ในถังจุ่มฆ่าเชื้อ

น้ำยาฆ่าเชื้อ Glutar-vet ซึ่งมีส่วนประกอบของ 10 % glutaraldehye (W/V) จากบริษัทผู้ผลิต ทำการเตรียมเป็นน้ำยา 1% glutaraldehyde โดยการเจือจางด้วย deionized (DI) water ในอัตราส่วน 1: 10 เตรียมปริมาตรทั้งหมด 70 ลิตรใส่ในถังจุ่มฆ่าเชื้อโดยใช้ glutaraldehyde 7 ลิตร ผสมน้ำ DI จำนวน 63 ลิตร จดบันทึกวันที่เตรียมและวันที่เปลี่ยนน้ำยาซึ่งปกติจะเปลี่ยนน้ำยาฆ่าเชื้อใหม่ทุก ๆ 3 เดือนโดยเปิดวาล์วด้านล่างถังเพื่อทิ้งน้ำยาเดิมออกให้หมด ล้างทำความสะอาดถังและใส่น้ำยา 1 % glutaraldehyde ที่เตรียมใหม่ลงในถังจุ่มฆ่าเชื้อในการใช้งานตามปกติ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการเปลี่ยนน้ำยาเมื่อครบกำหนดโดยยังใช้งานตามปกติ แต่จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเนื่องในถังจุ่มที่ระยะการใช้งานที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 เดือนตามลำดับ ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งต้องทำการตรวจสอบทันที โดยตรวจสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหรือทำลายไวรัสด้วยวิธี virus titration

การตรวจสอบคุณสมบัติด้านความเป็นกรดและด่าง

น้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde นำมาทำการเจือจางให้เป็น 0.5%, 0.1 และ 0.01 % โดยใช้ DI water นำไปตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นกรดและด่าง โดยการวัดด้วยเครื่อง pH meter ทำการวัดค่า pH จำนวน 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

ตรวจสอบความเป็นพิษของน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีต่อเซลล์ BHK-21 โดยเจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อโดยวิธี10-fold serial dilution จาก undiluted ถึง 10^{-5} จากนั้น inoculate ลงบนเซลล์ BHK-21 บ่มในตู้ CO_2 incubator 37°C เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ภายใน 24-48 ชั่วโมง โดยแสดงค่าเป็นความเจือจางสูงสุดที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจหาประสิทธิภาพในการฆ่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Inhibition test)

เป็นการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในความเข้มข้นต่างๆที่สามารถฆ่าหรือทำลายคุณสมบัติด้าน infectivity ของไวรัสได้อย่างสมบูรณ์

วิธีการมีดังนี้ นำตัวอย่างน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ใน dunk tank ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5 %, 0.1 % และ 0.01 % ตามลำดับโดยใช้ DI water เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) ไทป์เอเชียวัน โดยใช้ปริมาณความรุนแรงไวรัส (virus titer)ไม่ต่ำกว่า 6.0 log $TCID_{50}$/0.2 ml ทำการผสม virus-disinfectant mixture ในปริมาณที่เท่ากันผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจสอบด้วยวิธี virus titration โดยเจือจางแบบ 10-fold serial dilution และ inoculate สารละลายดังกล่าวปริมาตร 0.2 ml ลงบนเซลล์ BHK-21 ในไมโครเพลทแบบ 24 หลุม บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่ 37^{o}C ตรวจดู CPE ภายใน 48 ชั่วโมง หาปริมาณไวรัสที่มีหลงเหลือโดยวิธี $TCID_{50}$ คำนวณตามวิธีของ Reed and Muench (1938) และวิเคราะห์ เป็นค่า log inhibition titer หรือ log reduction titer ซึ่งค่าที่ยอมรับจะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 3 log inhibition titer หรือ reduction titer ซึ่งถือว่าน้ำยาฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการฆ่าหรือทำลายคุณสมบัติด้าน infectivity ของไวรัสได้ตามมาตรฐานของ United State Environmental Protection Agency หรือ UEPA (1976)

การตรวจสอบไวรัสที่หลงเหลืออยู่ในสารละลาย virus-disinfectant mixture

เป็นการตรวจหาไวรัสที่หลงเหลืออยู่ในสารละลาย virus-disinfectant mixture โดยวิธี virus isolation test และ ELISA typing เพื่อยืนยันผลการทดสอบ

วิธีการมีดังนี้นำสารละลาย virus-disinfectant mixture ในแต่ละ dilution ของแต่ละชุดมาทำการ inoculate ลงบน primary lamb kidney cell ปล่อยให้สารละลายถูก absorb เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้ CO_2 incubator 37^{o}C ดูด inoculum ทิ้งให้หมด จากนั้นเติม maintenance medium ใหม่ บ่มใน Incubator อ่านผล CPE ภายใน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างทั้งหมดไปทำการตรวจหาไวรัสที่หลงเหลือ ด้วยวิธี ELISA typing ตามวิธีการของ Roeder and Le Blanc Smith (1987)

ผล

1. การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1%, 0.5% ,0.1% และ 0.01% glutaraldehyde ดังแสดงในตารางที่ 1
2. การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำยาฆ่าเชื้อที่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 2

3. การตรวจสอบหาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ FMDV (Inhibition test) และอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1%, 0.5%, 0.1% และ 0.01% glutaraldehyde ที่สามารถทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของ FMDV ได้อย่างสมบูรณ์ และการใช้งานใน dunk tank ที่ระยะ 3–7 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

สรุปผลและวิจารณ์

จากการศึกษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อ พบว่ามีสภาวะเป็นกรดอย่างแรง (ช่วง pH 4.9 - 5.6) ซึ่งไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะไว (sensitive) และถูกทำลายได้ง่ายในสภาวะเป็นกรด (Sellers, R.F, 1968) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ BHK-21 ของน้ำยาฆ่าเชื้อในระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ตาย เป็นการป้องกันการอ่านผลผิดพลาดในการจำแนกระหว่างเซลล์ตายเนื่องจากความเป็นพิษของน้ำยาฆ่าเชื้อหรือเนื่องจากไวรัสหลงเหลืออยู่ใน virus-disinfectant mixture จากตารางที่ 2 พบว่าอยู่ที่ dilution 1:1905 (log 3.28) หมายถึงต้องเจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อเป็น 1905 เท่าจะทำให้เซลล์ไม่เป็นพิษหรือตาย นอกจากนี้ยังทำการยืนยันผลโดยการตรวจสอบ virus isolation และ ELISA typing เพื่อให้การวิเคราะห์ผลถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากที่สุด จากการศึกษาการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในถังจุ่มฆ่าเชื้อสำหรับจุ่มหรือแช่วัสดุ อุปกรณ์หรือภาชนะใส่สารหรือ viral RNA เพื่อทำลายเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ BSL-3 ก่อนนำออกนอกพื้นที่เขตหวงห้ามหรืออาคารปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 ตามหลักการ biosecurity นั้น ผลการทดสอบในตารางที่ 7 สรุปได้ว่าน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde สามารถฆ่าหรือทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนการทดสอบอายุการใช้งานของ 1% glutaraldehyde ใน dunk tank พบว่าสามารถใช้งานต่อไปได้ถึง 7 เดือนโดยยังคงให้ประสิทธิภาพการทำลายไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ตามตารางที่ 3

กรณีการทดสอบน้ำยา glutaraldehyde ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5%. 0.1 % และ 0.01% จากตารางที่ 4 และ 5 พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5 % และ 0.1% ให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ คือมีค่า log inhibition titer > 3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพยนต์และคณะ (2543) ได้ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อ glutaraldehyde ที่ความเข้มข้น 0.25% สามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ภายในเวลา 5 นาที และจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อดังกล่าวมีอายุการใช้งานได้นานถึง 7 เดือนเช่นเดียวกัน ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.01% glutaraldehyde นั้นไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสได้ เนื่องจากตรวจพบมีไวรัสหลงเหลืออยู่จึงไม่แนะนำให้ใช้ที่ความเข้มข้น 0.01% ตามตารางที่ 6 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการทดลองอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อเพียง 7 เดือนเท่านั้น เนื่องจากพบว่าการยืดเวลาการใช้งานนานมากกว่า 7 เดือน พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงขึ้น ทำให้ไม่สามารถ

อ่านผลการเปลี่ยนแปลงเซลล์หรือจำแนกระหว่างเซลล์ตายจากความเป็นพิษหรือตายเนื่องจากไวรัสได้ โดยปกติการนำวัสดุ อุปกรณ์หรือภาชนะใส่สารต่างๆออกนอกพื้นที่ BSL-3 จำเป็นต้องผ่านกระบวนการทำลายหรือฆ่าเชื้อไวรัสที่อาจปนเปื้อนออกสู่ภายนอก โดยการแช่สิ่งต่างๆดังกล่าวลงในถังจุ่มฆ่าเชื้อที่บรรจุน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งจากการศึกษาทดลองของพยนต์และคณะ (2543) ใช้ 1% glutaraldehyde สำหรับฆ่าหรือทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยใช้เวลาเพียง 5 นาทีเท่านั้น ดังนั้นระยะเวลาในการแช่สิ่งของในถังจุ่มฆ่าเชื้อเป็นเวลา 20 นาทีในอาคาร BSL-3 ทำให้มั่นใจว่าน้ำยาฆ่าเชื้อสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างสมบูรณ์และยังพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อดังกล่าวสามารถมีประสิทธิภาพและมีอายุการใช้งานนานถึง 7 เดือน ซึ่งผู้เชี่ยวชาญ Biocontainment จากออสเตรเลียแนะนำให้เปลี่ยนน้ำยาฆ่าเชื้อใน dunk tank ทุก 3 เดือน (เอกสารไม่ติมพ์) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถยืดอายุการใช้งานและประหยัดน้ำยาฆ่าเชื้อดังกล่าวโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนทุกๆ 3 เดือนตามปกติ ทั้งนี้ยังทำให้เกิดความเชื่อมั่นว่าวัสดุ อุปกรณ์ หรือสิ่งต่างที่ผ่านการจุ่มฆ่าเชื้อใน dunk tank แล้วมีความปลอดภัย ไม่มีโอกาสเสี่ยงต่อการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปสู่ภายนอกหรือสิ่งแวดล้อมตามหลักความปลอดภัยและมั่นคงทางชีวภาพ (biosafety and biosecurity)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านในหน่วยเตรียมสาร ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารละลายต่างๆ และเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้งานศึกษาวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

พยนต์ สินสุวงค์วัฒน์ วิไล ลินจงสุบงกช ธนรัตน์ จานุกิจ สุนันท์ ร่มลำดวน 2543 ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆในการฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 หน้า 85-93

Anon. 1976. United State Environmental Protection Agency (US-EPA). Efficacy data requirement: virucides. pp.1-5.

Reed, L. and Muench, H. 1938. A Simple method of estimating 50 percent end–points. Amer. J. Hyg. 27: 493-497.

Roeder, P. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. The detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43:225-232.

Shirai, J., Kanno, T., Tsuchiya, Y., Mitsubayashi, S. and Seiki, K. 1999. Effect of chlorine, iodine and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. J. Vet. Med. Sci. 62(1): 85-92.

Sellers, R.F. 1968. The inactivation of foot and mouth disease virus by chemicals and disinfectants. Vet. Rec. 83: 504-506.

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำยาฆ่าเชื้อในความเข้มข้นต่างๆ

ขนาดความเข้มข้นน้ำยาฆ่าเชื้อ	ค่าเฉลี่ย pH
1 % glutaraldehyde	4.91
0.5% glutaraldehyde	4.90
0.1% glutaraldehyde	5.12
0.01% glutaraldehyde	5.62

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเป็นพิษของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเซลล์ BHK-21

ขนาดความเข้มข้นน้ำยาฆ่าเชื้อ	ระดับความเจือจางสูงสุดที่มีผลต่อเซลล์
1% glutaraldehyde	1:1905 (log 3.28)
0.5% glutaraldehyde	1: 316 (log 2.50)
0.1% glutaraldehyde	1:316 (log 2.50)
0.01% glutaraldehyde	1:56 (log 1.75)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเป็นพิษต่อเซลล์และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ในการทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัส แสดงผลเป็น log inhibition titer (log $TCID_{50}$/0.2 ml)

น้ำยาฆ่าเชื้อ	อายุการใช้งาน ของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1 % glutaraldehyde ใน dunk tank									
	3 เดือน		4 เดือน		5 เดือน		6 เดือน		7 เดือน	
	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer
1% glutar	2.75	-	2.50	-	3.50	-	3.50	-	3.50	-
Virus control	6.75	-	6.0	-	6.875	-	7.25	-	6.5	-
1% glutar + virus	0	6.75*	0	6.0*	0	6.875*	0	7.25*	0	6.5*

*Log inhibition titer = virus titer of control – virus titer of sample

หมายเหตุ: Log inhibition titer ที่ยอมรับได้จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 3 log inhibition titer ถือว่าน้ำยาฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการทำลายคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัสได้ ตามมาตรฐาน UEPA

ตารางที่ 4 แสดงผลการเป็นพิษต่อเซลล์และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.5% glutaraldehyde ในการทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัส โดยแสดงผลเป็น log inhibition titer (log $TCID_{50}$/0.2 ml)

น้ำยาฆ่าเชื้อ	อายุการใช้งาน ของน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.5 % glutaraldehyde ใน dunk tank									
	3 เดือน		4 เดือน		5 เดือน		6 เดือน		7 เดือน	
	TCID50/ 0.2ml	Inhibition Titer	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer
0.5% glutar	ND**		2.50	-	2.50	-	ND**		ND**	
Virus control	ND**		6.0	-	7.25	-	ND**		ND**	
0.5% glutar + virus	ND**		2.75	3.25*	2.625	4.525*	ND**		ND**	

*Log inhibition titer = virus titer of control – virus titer of sample, ** = Not done

ตารางที่ 5 แสดงผลการเป็นพิษต่อเซลล์และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.1% glutaraldehyde ในการทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัส โดยแสดงผลเป็น log inhibition titer (log $TCID_{50}$/0.2 ml)

น้ำยาฆ่าเชื้อ	อายุการใช้งาน ของน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.1 % glutaraldehyde ใน dunk tank									
	3 เดือน		4 เดือน		5 เดือน		6 เดือน		7 เดือน	
	TCID50/ 0.2ml	Inhibition Titer	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer
0.1% glutar	2.50	-	ND**		2.50	-	2.50		2.50	
Virus control	7.25	-	ND**		6.50	-	7.25		6.50	
0.1% glutar + virus	2.50	4.75*	ND**		2.50	4.0 *	2.375	4.875*	2.65	3.938*

*Log inhibition titer = virus titer of control – virus titer of sample, ** = Not done

หมายเหตุ: Log inhibition titer ที่ยอมรับได้จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 3 log inhibition titer ถือว่าน้ำยาฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการทำลายคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัสได้ตามมาตรฐาน UEPA

ตารางที่ 6 แสดงผลการเป็นพิษต่อเซลล์และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.01%glutaraldehyde ในการทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัส โดยแสดงผลเป็น log inhibition titer (log $TCID_{50}$/0.2 ml)

น้ำยาฆ่าเชื้อ	อายุการใช้งาน ของน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.01 % glutaraldehyde ใน dunk tank									
	3 เดือน		4 เดือน		5 เดือน		6 เดือน		7 เดือน	
	TCID50 / 0.2ml	Inhibition titer	TCID50 / 0.2ml	Inibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer	TCID50/ 0.2ml	Inhibition titer
0.01% glutar	ND**		ND**		1.50	-	ND**		1.50	-
Virus control	ND**		ND**		6.50	-	ND**		5.75	-
0.01% glutar + virus	ND**		ND**		3.75	2.75 *	ND**		4.0	1.75*

** = Not done

ตารางที่ 7 สรุปผลประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายหรือยับยั้งคุณสมบัติทาง infectivity ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และอายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ 1%, 0.5%, 0.1% และ 0.01% glutaraldehyde ใน dunk tank ที่ระยะ 3, 4, 5, 6 และ 7 เดือน

อายุการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อ glutaraldehyde ใน dunk tank	Virus titer ของ FMDV ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ glutaraldehyde (log $TCID_{50}$/0.2ml)				Log inhibition titer * ที่หลงเหลือ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ (log $TCID_{50}$/0.2ml)			
	1 %	0.5 %	0.1 %	0.01%	1 %	0.5 %	0.1 %	0.01%
3 เดือน	0	ND**	2.50	ND**	6.75	ND	4.75	ND**
4 เดือน	0	2.75	ND**	ND**	6.0	3.25	ND**	ND**
5 เดือน	0	2.625	ND**	3.75	6.875	4.625	ND**	2.75
6 เดือน	0	ND**	2.375	ND**	7.25	ND**	4.437	ND
7 เดือน	0	ND**	2.50	4.0	6.5	ND**	3.938	1.75

* Log inhibition titer = log titer of control virus – log titer of sample,

** = Not done

หมายเหตุ: Log inhibition titer มีค่าน้อยกว่า log 3 หมายถึงน้ำยาฆ่าเชื้อไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสได้ตามมาตรฐาน UEPA

The efficacy and expiry time of 1% glutaraldehyde as a disinfectant in dunk tank for killing foot and mouth disease virus

Wilai Linchongsubongkoch Chalinee Deepang Janya Samanit
Surached Khunkeaw Rattanee Thongtha Piyaporn Chareonpol

Abstract

The efficacy and expiry time of 1% glutaraldehyde used as a disinfectant in dunk tank for killing foot and mouth disease virus (FMDV) contaminated in materials or reagents were studied. As the biosecurity laboratory principle, all those materials need to be passed the decontamination process before taking out from the restriction area in the biosafety laboratory level-3 (BSL-3) at the FMD Regional Reference Laboratory. The results of this studies showed that 1% glutaraldehyde could kill FMDV completely. The similar results were occurred when used glutaraldehyde at the concentration 0.5% and 0.1%, whereas the concentration of 0.01% gluataraldehyde could not kill FMDV completely. In addition, the expiry time of the glutaraldehyde after being prepared and kept in dunk tank during period of 3, 4, 5, 6 and 7 months were investigated in order to study the duration of effective glutaraldehyde. It was showed that only 1%, 0.5% and 0.1% glutaraldehyde were effective at the period of 7 months. In conclusion, it was indicated that 1%, 0.5% and 0.1% glutaraldehyde could kill FMDV completely and could be prolong in using for 7 months. This investigation would be benefit for saving budget and time in routine changing and preparing of disinfectant.

Key words: Foot and mouth disease virus, glutaraldehyde, dunk tank

---

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล[1] ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์หรือmultiplicity of infection (MOI) ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดสำหรับผลิตวัคซีน โดยการหาจำนวนและเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นของเซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ เพื่อให้ได้เซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มพื้นผิวขวดเพาะเซลล์ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงไวรัสในขนาด MOI ต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0.01, 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 เก็บตัวอย่าง หลังการเพาะเลี้ยงไวรัส 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำไปหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) จากการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเซลล์คือ $1.4x10^6$ เซลล์/มล. ระยะเวลา 2 วัน และพบว่าขนาด MOI 0.05, 0.10 และ 0.15 หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 48 ชั่วโมงมีผลผลิตไวรัสสูงเท่ากับ 6.83±0.05, 6.88±0.12 และ 6.86±0.05 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ขณะที่ MOI 0.01 และ 0.025 ให้ผลผลิตไวรัสค่อนข้างต่ำกว่าคือ เท่ากับ 6.01±0.06 และ 6.33±0.02 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 24 ชั่วโมง พบว่า MOI 0.01, 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 ให้ผลผลิตต่ำเท่ากับ 4.20±0.08, 4.23±0.09, 4.67±0.18, 4.80±0.14 และ 4.83±0.16 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 36 ชั่วโมง ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เท่ากับ 5.58±0.08, 5.70±0.06, 6.40±0.08, 6.46±0.05 และ 6.44±0.04 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ให้ผลผลิตสูงคือ MOI เท่ากับ 0.05 และเวลาในการเพาะเลี้ยงคือ 48 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ปริมาณไวรัส วัคซีนกาฬโรคเป็ด multiplicity of infection เซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast, 1° CEF) อายุ 11 วัน ซึ่งการเตรียมเซลล์ตามวิธีการเดิมจะวัดปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.5-0.6% ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมดที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง ใช้เวลาประมาณ 48-96 ชั่วโมงในการเพาะเลี้ยงเซลล์จนเต็มพื้นผิวขวดเพาะเซลล์ (Roux flask) ใส่ไวรัสสเตรนแจนเซน (Jansen strain) ซึ่งมีปริมาณไวรัสเท่ากับ 3.0-4.0 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 39 °ซ. จนเกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบรูณ์ จึงเก็บไวรัสโดยปั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนกากเซลล์ ก่อนนำไปผลิตวัคซีน เก็บตัวอย่างน้ำไวรัสเพื่อนำไปทดสอบคุณภาพ การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิโดยการใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ 0.5-0.6% ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ในแต่ละครั้งไม่คงที่และไม่ทราบจำนวนเซลล์ต่อปริมาณไวรัส ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณไวรัสและการเกิด CPE ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงไวรัสไม่คงที่เช่นกัน ทำให้มีโอกาสได้ผลผลิตไวรัสต่ำ ซึ่งไม่เหมาะสำหรับนำไปผลิตเป็นวัคซีน ปัจจุบันได้มีการนับจำนวนเซลล์เพื่อหาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณและความสมบรูณ์คงที่เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนให้ผลผลิตไวรัสสูงในระยะเวลาที่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาทดลองครั้งนี้เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างไวรัสต่อจำนวนเซลล์ หรือ multiplicity of infection (MOI) ในการเพาะเลี้ยงไวรัสเพื่อให้ได้ผลผลิตไวรัสสูง โดยใช้ค่า MOI ต่าง ๆ กัน เพื่อหาค่า MOI ที่เหมาะสม และหาปริมาณเซลล์ตั้งต้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณและคุณภาพคงที่

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF หรือ growth medium (GM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 9% Medium 199 Earle solution, 3.6% calf serum, 2.6% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM vitamin solution และ 0.1% amphotericin B solution และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสหรือ maintenance medium (MM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 4.7% Medium 199 Earle solution, 3.6% calf serum, 2.5% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM vitamin solution, 0.1% amphotericin B solution, 4% Ham F10 solution และ 4% tryptose phosphate broth solution ตามขั้นตอนและวิธีการเตรียมของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (2530)

การเตรียมเซลล์ 1° CEF

ใช้ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free, SPF) อายุ 11 วัน จำนวน 150 ฟอง เก็บตัวอ่อนใส่จานแก้วที่สะอาด ตัดส่วนหัวทิ้ง บดผ่านไซริงค์แก้วขนาด 20 มล. ล้างเนื้อเยื่อโดยเติม phosphate buffered saline (PBS) pH 6.8-7.2 และกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กนาน 5 นาที ตั้งให้เนื้อเยื่อตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยการเติมสารละลาย 0.25% trypsin นาน 30 นาที (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) เก็บส่วนที่เป็นของเหลวหรือเซลล์แขวนลอยโดยกรองผ่านตะแกรงลวดสแตนเลสขนาดรู 0.25 มม. ผสมสารละลาย lactalbumin hydrolysate 50% โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที (Beckman model J-6B centrifuge) นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยซีรัมลูกโค 1.5 เท่าโดยปริมาตร ปั่นอีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนตะกอนมาเติม GM และเก็บเซลล์แขวนลอยบางส่วนนำมาย้อมด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์ และทำการคำนวณเซลล์เริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

การหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF ในขวด Roux flask ขนาด 250 ซม.^{2} โดยนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในปริมาณต่าง ๆ กัน เติม GM ปริมาตร 130 มล. ต่อขวด แบ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ขวด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 0.8 x 10^6 เซลล์/มล.
กลุ่มที่ 2 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.0 x 10^6 เซลล์/มล.
กลุ่มที่ 3 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.2 x 10^6 เซลล์/มล.
กลุ่มที่ 4 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.4 x 10^6 เซลล์/มล.
กลุ่มที่ 5 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.6 x 10^6 เซลล์/มล.

เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 5 กลุ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 39°ซ. เป็นเวลา 2 วัน ย่อยเซลล์ ด้วย trypsin-versene (Freshney, 1984) และนับจำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดโดยใช้ hemocytometer เลือกจำนวนเซลล์เริ่มต้นจากกลุ่มที่ให้เซลล์เจริญเติบโตสมบูรณ์เต็มพื้นที่ผิวขวดและมีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด สำหรับหาค่า MOI ต่อไป

การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ด

สต็อกไวรัสกาฬโรคเป็ดสเตรนแจนเซน (Jansen strain) ที่เก็บในตู้แช่แข็ง -70°ซ. นำมาตรวจสอบหาปริมาณไวรัสก่อนเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า MOI ตามวิธีการดังนี้ เพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF ในไมโครเพลทชนิดก้นแบน 96 หลุมโดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ 4x10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 39°ซ. ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มก้นเพลท เตรียมตัวอย่างไวรัสโดยการเจือจางแบบ ten-fold series dilution ที่ความเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} ด้วย PBS pH 6.8-7.2 เติมน้ำไวรัสลงในไมโครเพลทที่เพาะเลี้ยงเซลล์และถ่ายมีเดียมเก่าทิ้งหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยใส่ความเจือจางละ 8 หลุม

บ่มในตู้อุณหภูมิ 39°ซ.ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อ่านผลการเกิด CPE จนครบ 5 วัน คำนวณหาค่า $TCID_{50}$/มล. ด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938)

การหาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ หรือ MOI

เพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF ในขวดเพาะเซลล์ Roux flask จำนวนทั้งสิ้น 48 ขวด โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นจากผลของการทดลองในข้อ 3 ที่ให้เซลล์เจริญเติบโตสมบูรณ์เต็มพื้นที่ผิวขวดในที่นี้คือ กลุ่มที่ 4 จำนวนเซลล์เริ่มต้น $1.4x10^6$ เซลล์/มล. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 39°ซ. เป็นเวลา 2 วัน สุ่มตัวอย่างเซลล์ 3 ขวด มาย่อยหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต่อขวด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองการหาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม หรือ MOI สำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสเพื่อผลิตวัคซีนต่อไป ดังนี้

$$\text{ปริมาตรไวรัสที่ต้องใช้ (มล.)} = \frac{\text{ค่า MOI x จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/ขวด)}}{\text{ปริมาณไวรัส } (TCID_{50}/\text{มล.})}$$

นำเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่เหลือจำนวน 45 ขวด แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 9 ขวด นำมาใส่ไวรัสในขนาด MOI ต่าง ๆ ดังนี้ 0.01, 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 ตามลำดับ บ่มในตู้อุณหภูมิ 39 °ซ. เก็บตัวอย่างไวรัสหลังการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บกลุ่มละ 3 ขวด คำนวณหาค่า $TCID_{50}$/มล. ด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938)

ผล

การหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ $0.8x10^6$, $1.0x10^6$, $1.2x10^6$, $1.4x10^6$ และ $1.6x10^6$ เซลล์/มล. ในเวลา 2 วัน เมื่อนำมาย่อยและนับจำนวนเซลล์ได้ค่าเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าเซลล์เริ่มต้นที่ $1.4x10^6$ และ $1.6x10^6$ เซลล์/มล. สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเต็มพื้นที่ผิวขวด เท่ากับ $1.0\pm0.04x10^6$ เซลล์/มล. และ $1.01\pm0.02x10^6$ เซลล์/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่เซลล์เริ่มต้นที่ $0.8x10^6$, $1.0x10^6$, $1.2x10^6$ เซลล์/มล. ให้จำนวนเซลล์เพียง $0.55\pm0.02x10^6$, $0.69\pm0.02x10^6$ และ $0.82\pm0.03x10^6$ เซลล์/มล. ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเพาะขยายเซลล์ได้น้อย

การหาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมโดยใช้ค่า MOI ต่าง ๆ

การเพาะเลี้ยงไวรัสโดยคำนวณปริมาณไวรัสต่อเซลล์ หรือ MOI ที่ต่างกัน ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1 ผลการตรวจปริมาณไวรัสพบว่าขนาด MOI 0.05, 0.10 และ 0.15 ของการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 48 ชั่วโมงจะให้ผลผลิตไวรัสสูงสุดเท่ากับ 6.83 ± 0.05, 6.88 ± 0.12 และ 6.86 ± 0.05 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ในขณะที่ MOI 0.01 และ 0.025 ให้ผลผลิตไวรัสค่อนข้างต่ำกว่าคือเท่ากับ 6.01 ± 0.06 และ

6.33±0.02 log $TCID_{50}$/มล. ส่วนการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 24 ชั่วโมง พบว่า MOI 0.01, 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 ให้ผลผลิตไวรัสต่ำ เท่ากับ 4.20±0.08, 4.23±0.09, 4.67±0.18, 4.80±0.14 และ 4.83±0.16 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ 36 ชั่วโมงให้ผลผลิตไวรัสค่อนข้างต่ำ เท่ากับ 5.58±0.08, 5.7±0.06, 6.40±0.08, 6.46±0.05, และ 6.44±0.04 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ

วิจารณ์

การหาอัตราส่วนของปริมาณไวรัสต่อเซลล์หรือ MOI เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไวรัสในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงไวรัสเพื่อให้ได้ผลผลิตไวรัสสูง สำหรับนำไปผลิตวัคซีนให้มีคุณภาพ ในการศึกษาทดลองหาค่า MOI ที่เหมาะสมและการหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่สมบรูณ์และเจริญเติบโตขยายเต็มพื้นที่ผิวขวดในระยะเวลาที่กำหนดจะทำให้กระบวนการผลิตวัคซีนได้ผลผลิตและมีคุณภาพคงที่และเป็นไปอย่างมีระบบ สามารถนำมาบริหารจัดการและวางแผนการผลิตได้ตามเป้าหมาย การผลิตวัคซีนแบบเดิมนั้นไม่มีการนับจำนวนเซลล์อาจทำให้ปริมาณไวรัสไม่สัมพันธ์กัน การปรับหรือหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณไวรัสต่อเซลล์ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงและขยายปริมาณไวรัสได้มากขึ้น หรือให้ผลผลิตไวรัสสูง จากการศึกษาทดลองครั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ขนาด MOI 0.05 ทำให้เซลล์เกิด CPE อย่างสมบรูณ์ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 6.83±0.05 log $TCID_{50}$/มล. เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงไวรัสที่ใช้ขนาด MOI 0.10 และ 0.15 ได้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 6.88±0.12 และ 6.86±0.05 log $TCID_{50}$/มล. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ในทางปฏิบัติการใช้ปริมาณไวรัสน้อยหรือขนาด MOI ต่ำ จะทำให้การเพาะเลี้ยงไวรัสได้ผลดีให้ผลผลิตไวรัสสูงและมีคุณภาพคงที่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงแนะนำให้ใช้ขนาด MOI ที่เหมาะสมคือ 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hajjar *et al*. (1989) ที่เพาะเลี้ยง Herpes simplex virus ในเซลล์ arterial smooth muscle โดยใช้ค่า MOI เท่ากับ 0.05-0.1 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ไตสุกรจะใช้ค่า MOI เท่ากับ 0.1 (กัญญาและคณะ, 2548)

ส่วนการศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1° CEF ที่เหมาะสมจะทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์และการเจริญเติบโตเป็นไปตามระยะเวลาที่กำหนดและได้เซลล์มีคุณภาพคงที่ สามารถวางแผนระบบการผลิตได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเซลล์ปฐมภูมิมีอัตราส่วนเซลล์ที่รอดชีวิตค่อนข้างต่ำ (Freshney, 1984) จึงจำเป็นต้องมีการนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ซึ่งมีผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพการเพาะเลี้ยงไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีน จากการทดลองครั้งนี้พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 1.4×10^6เซลล์/มล. และ 1.6×10^6 เซลล์/มล. จะได้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวขวดภายในระยะเวลา 2 วัน มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.0±0.04x10^6 เซลล์/มล. และ1.01±0.02 x10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน

สรุป

การศึกษาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ดโดยใช้ MOI ต่าง ๆ กัน สรุปได้ว่าขนาด MOI 0.05, 0.1 และ 0.15 ทำให้เซลล์เกิด CPE ได้อย่างสมบรูณ์ ในระยะเวลา 2 วันและให้ผลผลิตไวรัสสูงเฉลี่ยเท่ากับ 6.83±0.05, 6.88±0.12 และ 6.86±0.05 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ในทางปฏิบัติค่า MOI ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.05 ส่วนการศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง 1° CEF สรุปได้ว่าเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์และขยายจำนวนเซลล์เต็มพื้นที่ผิวขวด Roux flask ในเวลา 2 วันคือเซลล์เริ่มต้นที่ $1.4x10^6$ เซลล์/มล. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทดลองครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนและบริหารจัดการด้านกระบวนการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดทั้งระบบให้ได้คุณภาพและเป็นไปตามเป้าหมาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ดและคณะกรรมการพัฒนาวิชาการและประชาสัมพันธ์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้งานทดลองครั้งนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

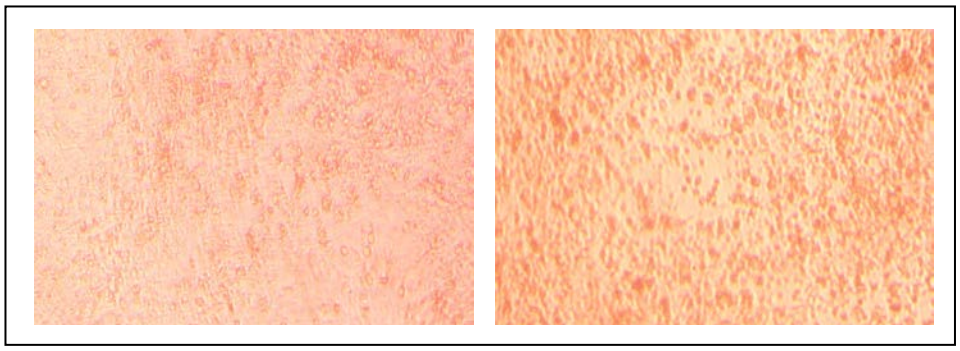
กัญญา สุวินทรากร วาสนา ภิญโญชนม์ ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และพิงพันธ์ เจริญสุระสถล 2548 การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE^-/Thในระดับอุตสาหกรรม หนังสือรายงานการวิจัย การปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE^-/Th และการพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 31-68

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ 2530 การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-4

Freshney, R.I. 1984. Culture of animal cells: A manual of basic technique, 3rd ed. Newyork USA. pp. 99-122.

Hajjar, D.P., Nicholson, A.C., Hajjar, C.A., Sando, G.N., and Summer, B.D. 1989. Decreased messenger RNA translation in herpesvirus-infected arterial cells: Effects on cholesteryl ester hydrolase. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3366-3370.

Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.



36 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง

รูปที่ 1 การเกิด CPE ของเซลล์ 1° CEF หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ดเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง ที่ใช้ค่า MOI เท่ากับ 0.05 (ภาพขยาย 40 X)

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ 1° CEF ที่ได้หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 2 วัน โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน

ขวดที่	จำนวนเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย ($x10^6$ เซลล์/ มล.)				
	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
1	0.55	0.74	0.81	1.07	1.00
2	0.53	0.70	0.81	1.01	1.05
3	0.55	0.71	0.86	0.93	1.01
4	0.58	0.67	0.85	0.99	0.98
5	0.57	0.60	0.77	1.01	1.02
Mean±SD	0.55±0.02	0.69±0.02	0.82±0.03	1.00±0.04	1.01±0.02

ตารางที่ 2 ปริมาณไวรัสที่ค่า MOI ต่าง ๆ หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสนาน 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่	ปริมาณไวรัสที่ใช้ค่า MOI ต่าง ๆ (log $TCID_{50}$/มล.)														
	24 ชั่วโมง					36 ชั่วโมง					48 ชั่วโมง				
	0.01	0.025	0.05	0.10	0.15	0.01	0.025	0.05	0.10	0.15	0.01	0.025	0.05	0.10	0.15
1	4.30	4.10	4.80	4.90	4.90	5.55	5.80	6.40	6.40	6.40	6.00	6.35	6.80	6.80	6.80
2	4.10	4.30	4.55	4.70	4.70	5.70	5.64	6.30	6.50	6.43	6.10	6.35	6.80	7.05	6.90
3	4.20	4.30	4.70	4.80	4.90	5.50	5.70	6.50	6.50	6.50	5.94	6.30	6.90	6.80	6.90
Mean	**4.20**	**4.23**	**4.67**	**4.80**	**4.83**	**5.58**	**5.71**	**6.40**	**6.46**	**6.44**	**6.01**	**6.33**	**6.83**	**6.88**	**6.86**
±SD	**±0.08**	**±0.09**	**±0.18**	**±0.14**	**±0.16**	**±0.08**	**±0.06**	**±0.08**	**±0.05**	**±0.04**	**±0.06**	**±0.02**	**±0.05**	**±0.12**	**±0.05**

Optimum multiplicity of infection for duck plague viral culture

Tawatchai Patchanukool[1] Ritluechai Poosungnuen[1]

Abstract

The multiplicity of infection (MOI) for duck plague viral culture in vaccine production was studied. The initial cell number and incubation time for primary chicken embryo fibroblast (1°CEF) culture were first optimized. The result showed that 1° CEF at the initial amount of $1.4x10^6$ cells/ml form a confluent monolayer within 2 days. The cells were then inoculated with duck plague virus at different MOIs as followings: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.15. The virus titration was carried out by 50% tissue culture infective dose method ($TCID_{50}$). The result demonstrated that, after cultivation for 48 hours, the viral cultures at MOIs of 0.05, 0.10 and 0.15 give high viral titers of 6.83±0.05, 6.88±0.12 and 6.86±0.05 log $TCID_{50}$/ml, respectively. Whereas the cultures at MOIs of 0.01 and 0.025 gave low viral titers of 6.01±0.06 and 6.33±0.02 log $TCID_{50}$/ml, respectively. In addition, the low viral titers were obtained after cultivation for 24 and 36 hours with the same MOI variations. The viral titers were 4.20±0.08, 4.23±0.09, 4.67±0.18, 4.80±0.14 and 4.83±0.16 log $TCID_{50}$/ml, respectively after cultivation for 24 hours and they were 5.58±0.08, 5.70±0.06, 6.40±0.08, 6.46±0.05 and 6.44±0.04 log $TCID_{50}$/ml, respectively after cultivation for 36 hours. In conclusion, the appropriate MOI and cultivation time for duck plague virus high yield production were 0.05 and 48 hours.

Key words: viral titer, duck plague vaccine, multiplicity of infection**,** primary chicken embryo fibroblast

---

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนแช่แข็งและทำแห้งของการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] ธวัชชัย ปัจฉานุกูล[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนการเก็บแช่แข็งและการทำแห้งวัคซีนกาฬโรคเป็ด โดยการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) โดยใช้เซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนและหลังการเก็บน้ำไวรัสแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70^0ซ เป็นเวลา 6 เดือน จำนวน 6 ชุด พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสเท่ากับ 7.15±0.26 และ 6.98±0.25 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบหาปริมาณไวรัสในขั้นตอนการผลิตเป็นวัคซีนก่อนและหลังการทำแห้งจำนวน 6 ชุด พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสเท่ากับ 6.96±0.11 และ 6.46±0.20 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) คิดเป็นค่าเฉลี่ยการสูญเสียเท่ากับ 0.49±0.28 log $TCID_{50}$/มล. หรือคิดเป็นร้อยละ 7.08±2.54 ซึ่งค่าปริมาณไวรัสที่มีอยู่ในวัคซีนที่ทำการศึกษาครั้งนี้ยังคงสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

คำสำคัญ: วัคซีนกาฬโรคเป็ด การสูญเสียปริมาณไวรัส การแช่แข็ง การทำแห้ง

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

วัคซีนกาฬโรคเป็ดผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นชนิดทำแห้ง สเตรนแจนเซน (Jansen strain) ซึ่งมีปริมาณไวรัสเป็นไปตามมาตรฐาน ASEAN ต้องไม่น้อยกว่า 5.5 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/มล. (ASEAN Secretariat, 1998) กระบวนการผลิตวัคซีน 1 ชุดใช้ระยะเวลาประมาณ 28 วัน เริ่มจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงไวรัส ผสมเป็นวัคซีน การบรรจุ และการทำแห้งวัคซีน และการทดสอบคุณภาพและความคุ้มโรควัคซีน การทดสอบคุณภาพในกระบวนการผลิต (in-process testing) เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้มั่นใจว่าได้ผลผลิตวัคซีนมีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ ขั้นตอนการผลิตไวรัสจะมีการเก็บไวรัสแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. ก่อนเพื่อการทดสอบหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี $TCID_{50}$ และการทดสอบคุณภาพอื่น ๆ ก่อนนำไปผสมเป็นวัคซีน นอกจากนี้ระยะเวลาการเก็บไวรัสขึ้นอยู่กับความต้องการวัคซีนของผู้ใช้ รวมทั้งปัจจัยในการผลิต เช่น ไข่ไก่ฟัก สารเคมี สภาพเครื่องจักร และอื่น ๆ ที่อาจทำให้กระบวนการผลิตวัคซีนไม่เป็นไปตามระยะเวลาที่กำหนด จำเป็นต้องเก็บไวรัสแช่แข็งไว้ โดยปัจจุบันจะเก็บรักษาไว้ไม่เกิน 6 เดือน เมื่อต้องการผลิตเป็นวัคซีนจึงนำไวรัสละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25°ซ. นาน 3 ชั่วโมง นำไปผสมเป็นวัคซีนตามองค์ประกอบของวัคซีนที่กำหนดพร้อมใส่สารคงสภาพ (stabilizer) และบรรจุลงขวดขนาด 12 มล. ขวดละ 2 มล. ด้วยเครื่องบรรจุอัตโนมัติในห้องสะอาดปราศจากเชื้อ (clean room) ควบคุมอุณหภูมิที่ 22°ซ. ใช้เวลาบรรจุประมาณ 3 ชั่วโมง ก่อนเข้าเครื่องทำแห้ง (lyophilizer) และใช้เวลาทำแห้งอีก 44 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาอลูมิเนียม ติดฉลากและบรรจุกล่อง โดยวัคซีนต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.5 log $TCID_{50}$/มล. จะเห็นว่ากระบวนการผลิตวัคซีนมีขั้นตอนที่อาจทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณไวรัส เช่น การแช่แข็ง การละลายไวรัส และการทำแห้งวัคซีน หากมีการปรับปรุงกระบวนการเหล่านี้อาจลดความสูญเสียในกระบวนการผลิตได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาการสูญเสียปริมาณไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีน ได้แก่ ขั้นตอนก่อนและหลังการแช่แข็งที่ -70°ซ. และขั้นตอนก่อนและหลังการทำแห้งวัคซีนกาฬโรคเป็ด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการหาสาเหตุหรือปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในการสูญเสียปริมาณไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีน เพื่อนำมาปรับปรุงกระบวนการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast, 1° CEF) โดยนำตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free, SPF) อายุ 11 วัน บดและล้างเนื้อเยื่อด้วย phosphate buffered saline (PBS) pH 6.8-7.2 จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนมาย่อยด้วย 0.25% trypsin นาน 30 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวโดยกรองผ่านตะแกรงลวดสแตนเลส ผสมสารละลาย lactalbumin hydrolysate 50% โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที (Beckman model J-6B centrifuge) นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยซีรัมลูกโค 1.5 เท่าโดยปริมาตร ปั่นอีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนตะกอนมาเติม growth medium และย้อมด้วย trypan blue นับปริมาณเซลล์เพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530)

การเพาะเลี้ยงไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด

ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนแจนเซน ในเซลล์ 1° CEF ให้ได้ปริมาณตามที่กำหนดของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และตามมาตรฐาน OIE (2012)

เก็บตัวอย่างไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่บรรจุในขวดพลาสติกปริมาตร 1,500 มล./ขวด ก่อนและหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. นาน 6 เดือน จำนวน 6 ชุดๆ ละ 5 ตัวอย่าง ๆ ละ 5 มล. เพื่อทดสอบหาปริมาณไวรัส โดยละลายตัวอย่างหลังจากการแช่แข็งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25°ซ. นาน 3 ชั่วโมง

การผลิตวัคซีน

นำไวรัสที่ผ่านการทดสอบปริมาณไวรัสได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ผสมกับส่วนประกอบตามสูตรวัคซีน และเติมสารคงสภาพ (stabilizer) ได้แก่ โพลีไวนีลไพโรลิโดน แลคโตส และทริปโตน ตามที่กำหนด เก็บตัวอย่างวัคซีนก่อนและหลังการทำแห้ง จำนวน 6 ชุด ๆ ละ 3 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบหาปริมาณไวรัส

การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี $TCID_{50}$/มล.

เพาะเลี้ยงเซลล์ 1° CEF ในไมโครเพลทชนิดก้นแบน 96 หลุม โดยมีปริมาณเซลล์ประมาณ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 39^{O}ซ. ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มก้นเพลท ทำการถ่ายมีเดียมเก่าทิ้ง เตรียมตัวอย่างไวรัสโดยการเจือจางแบบ ten-fold series dilution ที่ความเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} ด้วย PBS pH 6.8-7.2 เติมน้ำยาไวรัสหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ dilution ละ 8 หลุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 39^{O}ซ. ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อ่านผลการเกิด cytopathic effect (CPE) จนครบ 5 วัน คำนวณหาปริมาณไวรัสเป็นค่า $TCID_{50}$/มล. ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี t-test (วิสาข์, 2548) เปรียบเทียบหาปริมาณไวรัสก่อนและหลังการแช่แข็งน้ำไวรัสที่ -70°ซ และเปรียบเทียบในวัคซีนก่อนและหลังการทำแห้ง

ผล

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัส เพื่อใช้เตรียมวัคซีนกาฬโรคเป็ดก่อนการแช่แข็งจำนวน 6 ชุด ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 7.15±0.26 log $TCID_{50}$/มล. และปริมาณไวรัสหลังการเก็บแช่แข็งที่ -70° ซ เป็นเวลา 6 เดือน ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.98±0.25 log $TCID_{50}$/มล. ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสที่ผสมเป็นวัคซีนพร้อมสารคงสภาพ จำนวน 6 ชุด ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส 6.96±0.11 log $TCID_{50}$/มล. และปริมาณไวรัสหลังการทำแห้งวัคซีนได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.46±0.20 log $TCID_{50}$/มล. ซึ่งพบว่ามีปริมาณไวรัสลดลงเล็กน้อย เฉลี่ยเท่ากับ 0.49±0.28 log $TCID_{50}$/มล. หรือคิดเป็นร้อยละ 7.08±2.54 ดังแสดงในตารางที่ 2

วิจารณ์

ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดทำแห้งขั้นตอนการเพาะเลี้ยงไวรัสสามารถเก็บสต็อคไวรัสไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 °ซ. เป็นเวลานาน 6 เดือน เพื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนได้ตามแผนและเป้าหมายการผลิต ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณไวรัสก่อนและหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. นาน 6 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) ส่วนปริมาณไวรัสในวัคซีนหลังการทำแห้งมีค่าน้อยกว่าก่อนการทำแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) คิดเป็นร้อยละ7.08±2.54 สอดคล้องกับการทดลองของกัญญาและคณะ (2548) พบว่าขั้นตอนการทำแห้งวัคซีนอหิวาต์สุกรมีการสูญเสียปริมาณไวรัสร้อยละ 9.19±2.76 ซึ่งในวัคซีนอหิวาต์สุกรใช้น้ำตาลแลคโตสและโพลีไวนีลไพโรลิโดนเป็นสารคงสภาพเช่นเดียวกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด และมีสารทริปโตนเป็นส่วนประกอบเพิ่ม จากการศึกษาของ Scott และคณะ (1976) พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลแลคโตสเป็นสารคงสภาพอย่างเดียวจะมีการสูญเสียปริมาณไวรัสมากกว่าการใช้น้ำตาลสองชนิดร่วมกันและถ้าใช้น้ำตาลซูโครสร่วมกับโบไวน์อัลบูมินและกลูตาเมทในฟอสเฟตบัพเฟอร์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาไวรัสได้ดียิ่งขึ้น จะเห็นได้ว่าสารคงสภาพที่ใช้ในการทำแห้งวัคซีนมีผลต่อปริมาณไวรัสภายหลังการทำแห้ง นอกจากนี้ปัจจัยอื่น ๆ เช่น โปรแกรมการทำแห้งก็มีผลต่อการสูญเสียปริมาณไวรัสซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุป

จากการศึกษาปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดก่อนและหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. นาน 6 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) ส่วนปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนและหลังการทำแห้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) พบว่ามีการสูญเสียปริมาณไวรัสหลังการทำแห้ง จึงแนะนำการเตรียมไวรัสเริ่มต้นก่อนผลิตเป็นวัคซีนควรมีปริมาณไวรัสค่อนข้างสูง ต้องไม่น้อยกว่า 6.5 log $TCID_{50}$/มล. ในทางปฏิบัติวัคซีนบรรจุปริมาตร 1 มล. เท่ากับ 100 โด๊ส เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่จะต้องเจือจางเป็น 100 เท่า ดังนั้นเมื่อคำนวณเป็นปริมาณไวรัสต่อโด๊สจะต้องมีไวรัสไม่น้อยกว่า 3.5 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามมาตรฐานที่กำหนด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด และคณะกรรมการพัฒนาวิชาการและประชาสัมพันธ์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้งานทดลองครั้งนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กัญญา สุวินทรากร วาสนา ภิญโญชนม์ ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และพิงพันธ์ เจริญสุระสถล 2548 การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรม หนังสือรายงานการวิจัยการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th และการพัฒนาวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 44

วิสาข์ เกษประทุม 2548 ความน่าจะเป็นและสถิติเบื้องต้น สำนักพิมพ์ พ.ศ. พัฒนา จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 219-250

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ 2530 การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-4

ASEAN Secretariat. 1998. General requirements in veterinary vaccines. *In* Manual of ASEAN Standards for Animal Vaccines. Livestock Publication Series No. 2A pp. 26-27.

Office International des Epizooties (OIE). 2012. Duck virus enteritis Requirements for Vaccines. *In* Terrestrial Manual (2012). Available from http://www.Oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.07-DVE.pdf [Accessed 19 March 2013]

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoint. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Scott, E. M. and Woodside, W. 1976. Stability of pseudorabies virus during freeze-drying and storage: Effect of suspending media. J. clin.microbiol. 4(1): 1-5.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนแจนเซน ก่อนและหลังแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ

ชุดที่	ค่าเฉลี่ย (Geometric mean, GM±SD) ปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนแจนเซน (log $TCID_{50}$/มล.)			
	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง	การสูญเสีย	ร้อยละการสูญเสีย*
1	7.12±0.29	6.95±0.22	0.17	2.39
2	7.16±0.14	7.07±0.16	0.09	1.26
3	7.17±0.30	6.99±0.38	0.18	2.51
4	7.31±0.25	7.03±0.18	0.28	3.83
5	7.04±0.24	6.92±0.34	0.12	1.70
6	7.08±0.31	6.94±0.20	0.14	1.98
GM±SD	**7.15±0.26**	**6.98±0.25**	**0.16±0.07**	**2.28±0.89**

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนแจนเซนในวัคซีนก่อนและหลังการทำแห้ง

ชุดที่	ค่าเฉลี่ย (Geometric mean , GM±SD) ปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนแจนเซน (log $TCID_{50}$/มล.)			
	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	การสูญเสีย	ร้อยละการสูญเสีย*
1	6.87±0.11	6.49±0.16	0.38±0.19	5.53±2.75
2	6.85±0.09	6.13±0.18	0.71±0.20	10.36±2.41
3	7.17±0.06	6.38±0.07	0.78±0.06	10.88±0.44
4	7.15±0.07	6.72±0.14	0.43±0.32	6.01±4.24
5	6.88±0.14	6.55±0.00	0.33±0.14	4.80±1.97
6	6.85±0.13	6.52±0.20	0.33±0.24	4.82±3.43
GM±SD	**6.96±0.11**	**6.46±0.20**	**0.49±0.28**	**7.08±2.54**

หมายเหตุ ในวัคซีน 1 มล. เท่ากับ 100 โด๊ส

*ร้อยละการสูญเสีย = $\frac{\text{ปริมาณไวรัสก่อนแช่แข็ง/ทำแห้ง – ปริมาณไวรัสหลังแช่แข็ง/ทำแห้ง}}{\text{ปริมาณไวรัสก่อนแช่แข็ง/ทำแห้ง}} \times 100$

The loss of virus titer on freezing storage and lyophilization of duck plaque vaccine production

Ritluechai Poosungnuen[1] Tawatchai Patchanukool[1]

Abstract

A study of duck plague virus titer loss during freezing storage and lyophilization in the vaccine production process was performed. Six batches of duck plague viral stocks and vaccines were tested for the viral contents by 50% Tissue Culture Infective Dose ($TCID_{50}$) method using primary chicken embryo fibroblast. The results showed no significant difference ($p>0.01$) between the mean log $TCID_{50}$ of the viral stocks before and after freezing for 6 months which were 7.15±0.26 and 6.98±0.25 log $TCID_{50}$/ml., respectively. However, the mean log $TCID_{50}$ of the vaccines showed significant difference ($p<0.01$) between the vaccine before and after lyophilization which were 6.96±0.11and 6.46±0.20 log $TCID_{50}$/ml., respectively. The mean percentage loss of viral content was 7.08±2.54. Nevertheless, in this study the viral content in the vaccines were indicted virus titer higher than standard minimum requirement.

Key words: duck plaque vaccine, virus titer loss, freezing storage, lyophilization

[1]Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การศึกษาการปนเปื้อนนอนสตรัคเจอรัลโปรตีนในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

ไชยา สง่าประโคน[1] ดิลก อ้วนพรมมา[2] กาณต์ กีเนีย[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาการปนเปื้อนของนอนสตรัคเจอรัลโปรตีนในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ผลิตจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ โดยฉีดวัคซีน 2 เท่าของโด๊สปกติ ให้สัตว์ทดลอง จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 4, 8, 12 และ 16) และเจาะเลือดเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อนอนสตรัคเจอรัลโปรตีน (3ABC) ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนถึงสัปดาห์ที่ 24 ใช้สัตว์ทดลอง จำนวน 5 ตัว/ชุดการผลิต พบว่าวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร จำนวน 3 ชุดการผลิต (HT53W, HT53X, HT53Y) และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 3 ชุดการผลิต (T54B, T54C, T54D) ให้ผลลบทุกตัวตลอดการทดลอง แสดงว่า วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิต มีความบริสุทธิ์เพียงพอโดยไม่กระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีต่อนอนสตรัคเจอรัลโปรตีนตามมาตรฐานที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) กำหนด ดังนั้นวัคซีนสามารถนำไปใช้ในท้องที่เพื่อสร้างเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยได้

คำสำคัญ: นอนสตรัคเจอรัลโปรตีน, แอนติบอดี, วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย เป็นโรคระบาดที่มีความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์เศรษฐกิจ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียรายได้ทางเศรษฐกิจในด้านการส่งออกปีละหลายร้อยล้านบาท เนื่องจากต่างประเทศใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้าทำให้ไม่สามารถส่งสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังต่างประเทศได้ การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ คือ วิธีการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และปฏิบัติตามกฎระเบียบอย่างเคร่งครัด ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงมีโครงการรณรงค์การฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยในโค-กระบือ ในพื้นที่ปีละ 2 ครั้ง ให้ครอบคลุมไม่น้อยกว่า 80% ของประชากรสัตว์ทั่วประเทศ สำหรับสุกร อาจมีการฉีดวัคซีนมากกว่าปีละ 2 ครั้ง โดยเฉพาะฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์และขึ้นอยู่กับสภาวะการระบาดหรือความชุกของโรคในพื้นที่ เนื่องจากกรมปศุสัตว์มีนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ในการสร้างเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการใช้วัคซีนในพื้นที่เขต 2 ตามข้อกำหนดขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health, OIE) โดยมีเป้าหมายและระยะเวลาในการดำเนินงานเป็นเวลา 5 ปี ตั้งแต่ปี 2552-2556 ดังนั้นเพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามมาตรฐานและข้อกำหนด OIE ด้านการใช้วัคซีนเพื่อสนับสนุนโครงการให้ประสบความสำเร็จได้นั้น วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่จะใช้ในการสร้างเขตปลอดโรคจะต้องเป็นวัคซีนที่มีคุณภาพและมีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากการปนเปื้อนส่วนที่เรียกว่า non-structural proteins (NSP) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease virus, FMDV) โดยในภาวะที่สัตว์มีการติดเชื้อ ไวรัสจะเจริญเพิ่มจำนวน (replication) สร้างส่วนที่เรียกว่า structural protein (SP) ได้แก่ VP1, VP2, VP3 และ VP4 ประกอบกันเป็นแคปสิด (capsid) ของไวรัสและส่วนที่เรียกว่า NSP ได้แก่ 3A, 3B, 3C, 2A, 2B, 2C และ 3D ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ต่างๆ เช่น protease, RNA dependent RNA polymerase หรือเรียกว่า virus infection associated antigen (VIA antigen) ดังนั้นสัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อทั้ง SP และ NSP ขณะที่ถ้าฉีดวัคซีนที่มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากการปนเปื้อน สัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีเฉพาะต่อ SP เท่านั้น ทำให้สามารถแยกสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้ (OIE,2009)

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนชนิดบริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ด้วยวิธี ultrafiltration และตกตะกอนด้วยสารเคมี ทำให้หมดฤทธิ์ ด้วย binary ethyleneimine (BEI) (พยนต์, 2547; Bartelling, 2002) ซึ่งขั้นตอนนี้จะสามารถขจัดส่วนของ NSP ให้เหลือน้อยที่สุดหรือหมดไปได้ ทำให้ได้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อนำไปผสมเป็นวัคซีน จะได้วัคซีนที่ไม่มีการปนเปื้อน NSP ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันคุณภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จำเป็นต้องตรวจสอบว่ามีส่วน NSP อยู่ในวัคซีนหรือไม่ โดยการฉีดวัคซีนในสัตว์ซ้ำหลายๆครั้ง ด้วยขนาด 2 เท่าของโด๊สปกติ และตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โค พันธุ์พื้นเมือง ไม่จำกัดเพศ อายุไม่น้อยกว่า 6 เดือน สุขภาพแข็งแรง จำนวน 15 ตัว และสุกรพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 8 สัปดาห์ สุขภาพแข็งแรง จำนวน 15 ตัว เป็นสัตว์ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ SP และ NSP

วัคซีน

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิดเอเควียส สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ จำนวน 3 ชุดการผลิต (T54B, T54C และ T54D) และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน สำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ จำนวน 3 ชุดการผลิต (HT53W, HT53X และ HT53Y) ที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

การฉีดวัคซีนและเจาะเลือดในสัตว์

-ฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ โดยใช้ปริมาณเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 4 สัปดาห์ โดยใช้สัตว์ 5 ตัว/ชุดวัคซีน

-เจาะเลือดสัตว์ ทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนจนถึง 24 สัปดาห์ และแยกเก็บซีรัมสำหรับทดสอบหาแอนติบอดีต่อ SP และ NSP

การทดสอบระดับแอนติบอดีในซีรัม

<u>การตรวจหาแอนติบอดีต่อ SP โดยวิธี Liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay (LP-ELISA)</u>

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ และ เอเชียวัน โดยวิธี Indirect double antibody sandwich ELISA (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2554) โดยการ coat rabbit anti-FMDV ลงใน flat-bottom microplate เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C แยกเตรียม virus-serum mixture ใน U-bottom microplate แยกแต่ละไทป์ โดยเจือจางซีรัมแบบ 2-fold dilution แล้วเติมไวรัสที่มีความเข้มข้นคงที่ (เมื่ออ่านค่า 50% ของ OD_{max} ที่ 450 nm. มีค่า = 1.5 จากการทำ antigen titration) ลงในซีรัมควบคุม และตัวอย่างซีรัมที่จะทดสอบซึ่งทำเป็น dilution ไว้ ด้วยปริมาตรเท่ากันคือ 50µl นำไปเขย่าค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นถ่ายสารละลาย virus-serum mixture จาก U-bottom microplate ไปยัง flat-bottom microplate ซึ่ง coat rabbit anti-FMDV และล้างด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม Guinea pig anti-FMDV serum นำไปเขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS หลังจากนั้นเติม anti guinea pig IgG-HRP

conjugate เขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม substrate หลุมละ 100 µl ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของ substrate ด้วย 1M H_2SO_4 หลุมละ 50 µl นำไปอ่านค่า Optical density(OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่าแอนติบอดีตามวิธีของ Hamblin และคณะ (1986) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2009) กำหนดไว้ว่า

- ค่า log ELISA $\leq$ 1.60 หรือ 1:40 แปลผลเป็นลบ และ
- ค่า log ELISA $\geq$ 1.95 หรือ 1:90 แปลผลเป็นบวก

<u>การตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP โดยวิธี non-structural protein test (NSP test)</u>

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC ของ NSP ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปซึ่งผลิตในเชิงพาณิชย์ (PrioCHECK® FMDV NS, Switzerland) ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือของผู้ผลิต โดยการเจือจางซีรั่มที่ต้องการตรวจ และซีรัมควบคุม เป็น 1:5 ใน plate ที่ coat ด้วย 3ABC monoclonal antibody ซึ่งถูกจับด้วย 3ABC protein FMDV ที่มีความจำเพาะกัน ที่มากับชุดตรวจสอบ เขย่าให้เข้ากัน วางค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง(20-25°C) ล้างด้วย PBS เติม conjugate หลุมละ 100µl วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม substrate หลุมละ 100µl วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติม stop solution หลุมละ 100µl นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่า percentage inhibition (PI) ซึ่งถ้า

- ค่า PI $<$ 50% แปลผลเป็นลบ คือ ไม่มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV
- ค่า PI $\geq$ 50% แปลผลเป็นบวก คือ มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

หาค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดี (antibody titer) ต่อ SP จากการทดสอบโดยวิธี LP-ELISA

ผล

จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในสัตว์ทดลอง โดยใช้ปริมาณเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ และเจาะเลือดสัตว์ ทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่ก่อนฉีดวัคซีนจนถึง 24 สัปดาห์ ได้ผลดังนี้

แอนติบอดีต่อ SP โดยวิธี LP-ELISA

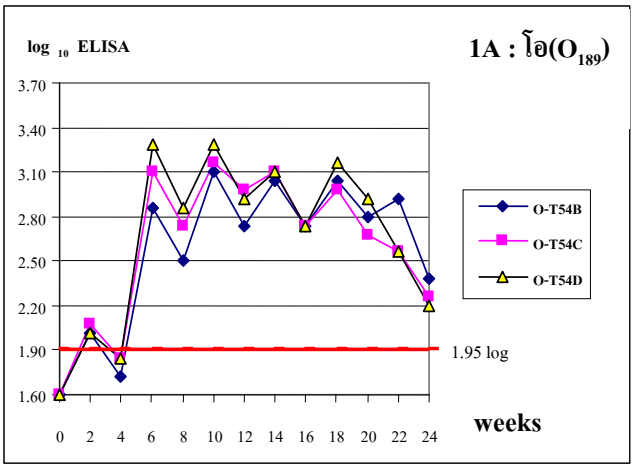
-วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ทั้ง 3 ชุด เมื่อฉีดวัคซีนเข็มแรกจะกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีต่อไทป์โอ และ เอ มีค่าเฉลี่ย log ELISA ต่ำกว่า 1.95 (รูปที่ 1A, 1B) ขณะที่ไทป์เอเชียวัน มีค่าเฉลี่ย log ELISA สูงกว่า 1.95 ตั้งแต่ฉีดเข็มแรก (รูปที่ 1C)

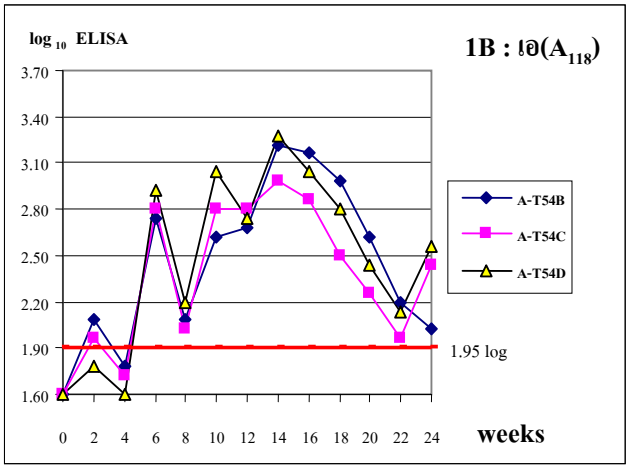
-วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ทั้ง 3 ชุด เมื่อฉีดวัคซีนเข็มแรกจะกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดีต่อไทป์โอมีค่าเฉลี่ย log ELISA ต่ำกว่า 1.95 (รูปที่ 2A) ,ไทป์เอ มีค่าเฉลี่ย log ELISA ต่ำกว่า 1.95 ในวัคซีนชุด HT53W ส่วนวัคซีนชุด HT53X และ HT53Y มีค่าเฉลี่ย log ELISA สูงกว่า 1.95 (รูปที่ 2B) สำหรับไทป์เอเชียวัน มีค่าเฉลี่ย log ELISA ต่ำกว่า 1.95 ในวัคซีนชุด HT53W ขณะที่วัคซีนชุด HT53X และ HT53Y มีค่าเฉลี่ย log ELISA สูงกว่า 1.95 (รูปที่ 2C) และหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 แล้ว ระดับแอนติบอดีต่อทั้ง 3 ไทป์ จะมีค่าเฉลี่ย log ELISA สูงกว่า 1.95

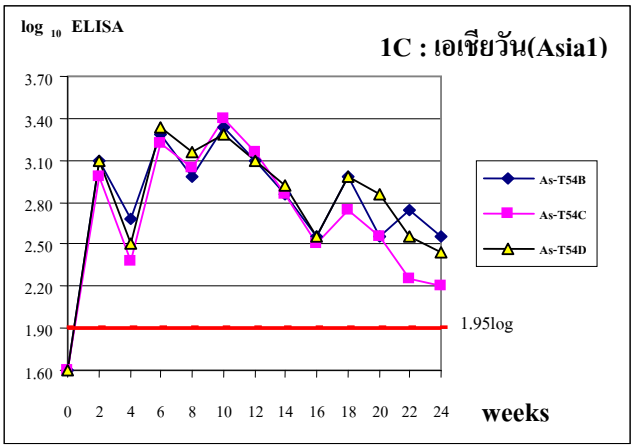
แอนติบอดีต่อ NSP โดยวิธี NSP test

-วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ทั้ง 3 ชุด มี %PI< 50% ในโคทดลองทุกตัว แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP หรือให้ผลลบ (รูปที่ 3A, 3B และ 3C)

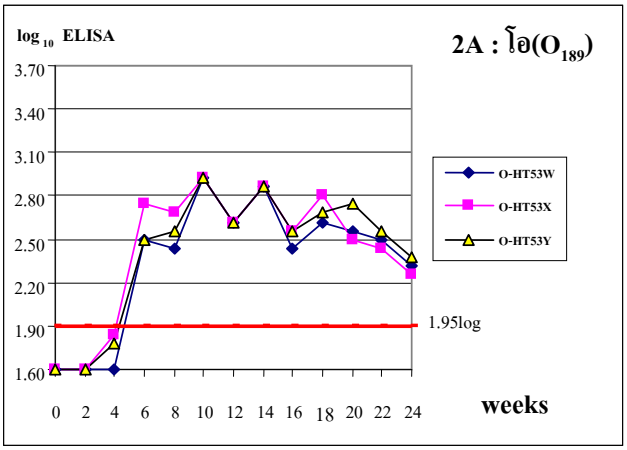
-วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ทั้ง 3 ชุด มี %PI< 50% ในสุกรทดลองทุกตัว แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP หรือให้ผลลบ (รูปที่ 4A, 4B และ 4C)

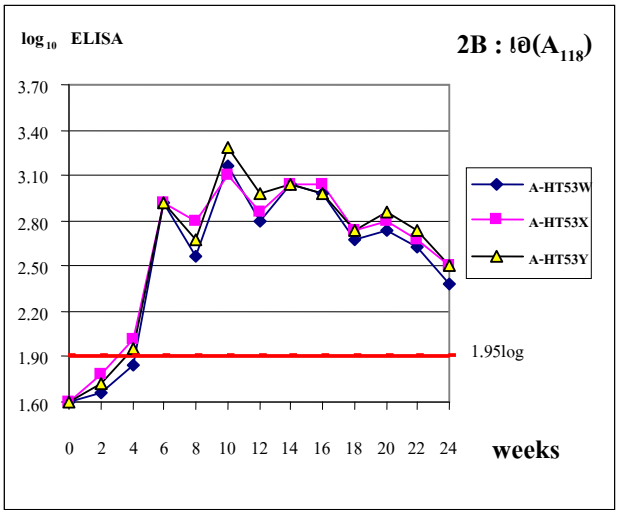


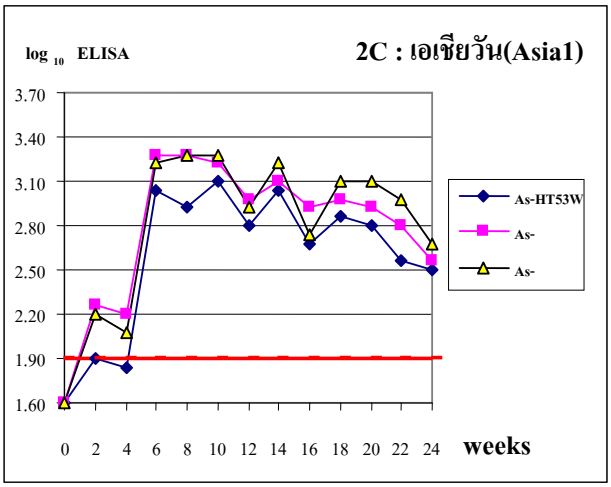




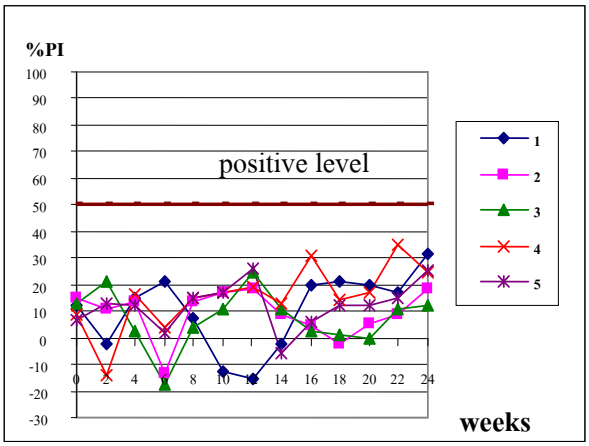
รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีต่อ SP ของ FMDV ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี LP-ELISA จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียส สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ ชุด T54B, T54C และ T54D เป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 4, 8, 12 และ 16) และเจาะเลือดสัตว์ทุก 2 สัปดาห์ (n=5 ต่อชุดวัคซีน)


log 10 ELISA
2A : โอ(O189)
3.70
3.40
3.10
2.80
2.50
2.20
1.90
1.60
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
weeks
1.95log
O-HT53W
O-HT53X
O-HT53Y

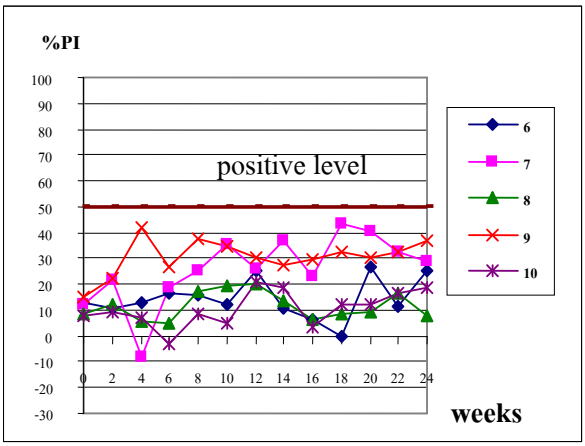

log 10 ELISA
2B : เอ(A118)
3.70
3.40
3.10
2.80
2.50
2.20
1.90
1.60
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
weeks
1.95log
A-HT53W
A-HT53X
A-HT53Y


log 10 ELISA
2C : เอเชียวัน(Asia1)
3.70
3.40
3.10
2.80
2.50
2.20
1.90
1.60
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
weeks
As-HT53W
As-
As-

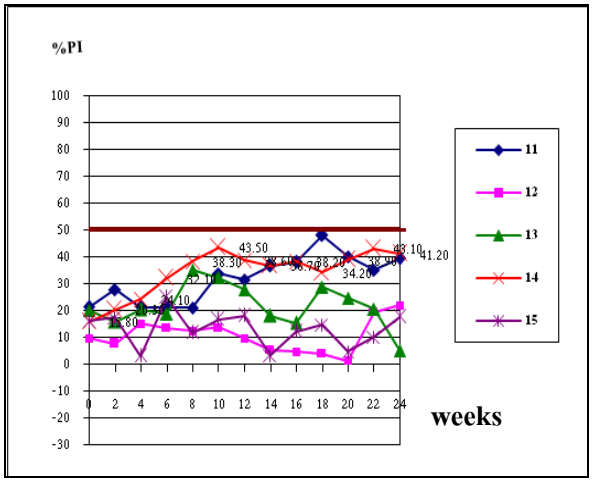
รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีต่อ SP ของ FMDV ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี LP-ELISA จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน สำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ ชุด HT53W, HT53X และ HT53Y เป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 4, 8, 12 และ 16) และเจาะเลือดสัตว์ทุก 2 สัปดาห์ (n=5 ต่อชุดวัคซีน)



3A : T54B

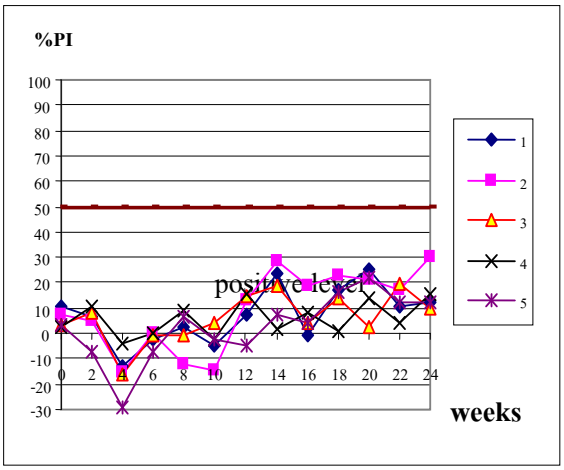


3B : T54C

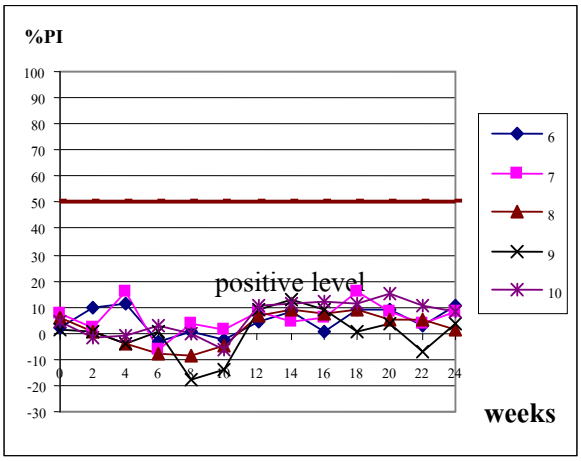


3C : T54D

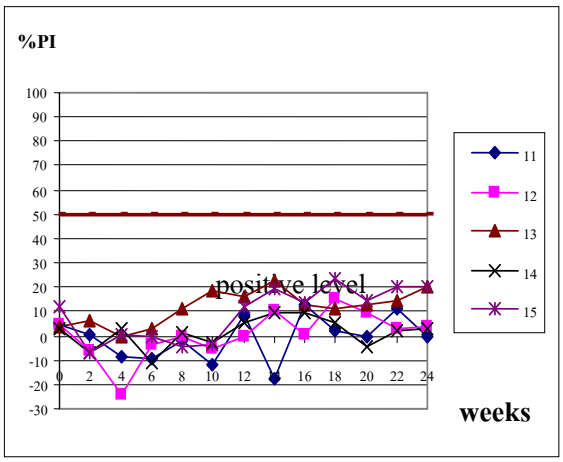
รูปที่ 3 แสดง %PI ของ 3ABC-NSP test จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียส สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ ชุด T54B, T54C และ T54D เป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ทุก 4 สัปดาห์(สัปดาห์ที่ 0, 4, 8, 12 และ 16) และเจาะเลือดสัตว์ ทุก 2 สัปดาห์ (n=5 ต่อชุดวัคซีน)



4A : HT53W



4B : HT53X



4C : HT53Y

รูปที่ 4 แสดง %PI ของ 3ABC-NSP test จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน สำหรับสุกรชนิด รวม 3 ไทป์ ชุด HT53W , HT53X และ HT53Y เป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จำนวน 5 ครั้ง ทุก 4 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 4, 8, 12 และ 16) และเจาะเลือดสัตว์ ทุก 2 สัปดาห์ (n=5 ต่อชุดวัคซีน)

วิจารณ์

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อ SP ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ และสุกร ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าหลังฉีดวัคซีนในสัตว์ ทั้งโคและสุกรมีการตอบสนองต่อไวรัสแอนติเจนทั้ง 3 ไทป์ โดยมีค่า log ELISA สูงกว่า 1.95 หรือ 1:90 ที่ถือว่าให้ผลบวกตามมาตรฐาน (OIE, 2009) เมื่อฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 (รูปที่ 1A และ 1B) ในไทป์ โอ และ เอ ยกเว้นไทป์ เอเชียวัน ค่า log ELISA สูงกว่า 1.95 ตั้งแต่การฉีดวัคซีนเข็มแรก (รูปที่1C) ขณะที่วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร มีค่า log ELISA สูงกว่า 1.95 หลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 แล้ว ทั้ง 3 ไทป์ (รูปที่ 2A, 2B และ 2C)

จากข้อกำหนดขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE, 2009) ระบุให้มีการทดสอบการปนเปื้อนนอนสตรัคเจอรัลโปรตีนของไวรัสในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยทำการฉีดวัคซีนในสัตว์ซ้ำหลายๆครั้ง ไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง ภายในเวลา 3-6 เดือน โดยฉีดครั้งละไม่น้อยกว่า 2 เท่าของโด๊สปกติ หลังจากฉีดเข็มสุดท้าย 30-60 วัน ให้เจาะเลือดตรวจหาแอนติบอดีต่อนอนสตรัคเจอรัลโปรตีน โดยวิธี NSP test ซึ่งถ้าให้ผลลบ แสดงว่า วัคซีนนั้นมีความบริสุทธิ์ (purity) เพียงพอ และจากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่า วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ มีความบริสุทธิ์ได้ตามมาตรฐาน สามารถนำไปใช้ในท้องที่
เพื่อประโยชน์ในการแยกสัตว์ที่ติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้

สรุป

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ สามารถนำไปใช้ในท้องที่เพื่อประโยชน์ในการแยกสัตว์ที่ติดเชื้อออกจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย กรมปศุสัตว์ ที่ได้อนุมัติเงินทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการและประชาสัมพันธ์ คณะกรรมการสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และสัตวแพทย์หญิงวิไล ลินจงสุบงกช ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิจัยและวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ได้ช่วยพิจารณาโครงการและให้คำแนะนำในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้ความช่วยเหลือในการดูแลสัตว์ทดลอง และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจ LP-ELISA และ NSP test

เอกสารอ้างอิง

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2547 วิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 42-54

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2554 วิธีทดสอบ การตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Measurement of antibody titer of foot and mouth disease virus) นครราชสีมา: ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์.ฉบับที่ 4: 1-17

Barteling, S.J. 2002. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 21(3): 577-588.

Hamblin C., Barnett I.T.R. and Hedger R.S. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. J. Immunol. Methods, 93: 115-121.

Office International des Epizooties (OIE). 2009. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth edition, Chapter 2.1.5 pp. 1-29.

A study on non-structural protein contamination in foot and mouth disease vaccine

Chaiya Sangaprakhon[1] Dilok Auonpromma[2] Kan Keenia[1]

Abstract

A study on non-structural protein (NSP) contamination in foot and mouth disease (FMD) vaccine, produced by Bureau of Veterinary Biologics (BVB), Department of Livestock Development, was conducted. Five animals per batch number of vaccine were vaccinated 5 times with a double dose of vaccine every 4 weeks (0, 4, 8, 12 and 16) and collected blood every 2 weeks (up to 24 weeks) for NSP-3ABC antibodies detection. The results found that 3 batches of the trivalent (O, A, Asia1) FMD vaccine for swine (HT53W, HT53X and HT53Y) and 3 batches of the trivalent (O, A, Asia1) FMD vaccine for cattle (T54B, T54C and T54D) gave negative results in all animals every times.

In accordance with the OIE standard procedure for the quality control of FMD vaccine by testing for antibody against non-structural proteins, the FMD vaccine produced from BVB was purified enough to not inducing antibody to the NSP. It can be used to vaccinate animals for establishing free zone with vaccination.

Key words: non-structural protein, antibody, foot and mouth disease vaccine

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

[2] Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130