วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 22 ฉบับที่ 2 กันยายน 2556

สารบัญ

- **จากกองบรรณาธิการ** **6**
- **พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีอีไลซ่า** **7**
  วิไล ลินจงสุบงกช กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย จุฬานีย์ น่วมจิตร์
  ปิยภรณ์ เจริญผล จรรยา สมานิตย์ โสภา สิงคลีบุตร รัตนีย์ ทองทา
- **เปรียบเทียบวิธีการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ชนิดแขวนลอย** **18**
  อนุรักษ์ ตระการรังสี สายพิณ ขุมทรัพย์
- **การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน** **28**
  อมรรัตน์ สวัสดิ์สิงห์ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย
- **ความรู้และหลักการเบื้องต้นด้าน Bio-safety และ Bio- security ห้องปฏิบัติการ** **36**
  วิไล ลินจงสุบงกช
- **คอลัมน์ "เข็มในกองฟาง"** **40**
  - การทำเครื่องหมายหนูไมซ์ด้วยวิธีง่าย ๆ **41**
  - หลอดกักหนูไมซ์อย่างง่าย !!! **44**

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 22 No. 2 September 2013

Contents

- **The editorial** 6

- **Development of production of foot and mouth disease ELISA reagent kit** 7

  Wilai Linchongsubongkoch Kingkarn Boonsuya Seeyo Julanee Nuamchit

  Piyaporn Chareonphol Janya Samanit Sopha Singkleebut Rattanee Thongtha

- **Comparison of temperature reduction methods in the cryopreservation of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell** 18

  Anurak Trakarnrungsee Saipin khumsub

- **Concentration of foot and mouth disease virus by hollow fiber ultrafiltration using polysulfone membrane** 28

  Amornrat Sawatsing Kingkarn Boonsuya Seeyo

- **Knowledge and basic principle of laboratory biosafety and biosecurity** 36

  Wilai Linchongsubongkoch

- Column : **"Needle in a haystack"** 40

  - Simple method for mouse identification 41

  - Simple mouse restrainer 44

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

---

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

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 ๆที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น

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 จิ๋วงพานิช 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

เนื้อหาของวารสารฉบับนี้ประกอบด้วย ผลงานการศึกษาทดลองของนักวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่งเป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาชีวภัณฑ์ในการตรวจสอบและเทคนิคการผลิตที่เกี่ยวกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย รวม 3 เรื่อง ซึ่งแม้ว่าผลงานวิชาการเหล่านี้จะยังไม่ก่อให้เกิดนวัตกรรมเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำออกสู่ผู้ใช้หรือเกษตรกรโดยตรง แต่มีความสำคัญในการนำไปสู่การต่อยอดทางวิชาการต่อไปเพื่อให้ได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีบทความทางวิชาการที่เป็นความรู้และหลักการเบื้องต้นด้านความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ และเกร็ดความรู้สั้นๆ ที่เกิดจากประสบการณ์การทำงานซึ่งนำมาบอกเล่าเป็นการเผยแพร่ความรู้ที่แฝงอยู่ ซึ่งบางครั้งไม่สามารถหาอ่านได้จากตำรา เพื่อเป็นองค์ความรู้แก่ผู้อ่านภายใต้คอลัมน์ที่ชื่อว่า เข็มในกองฟาง โดยในฉบับนี้เป็นเกร็ดความรู้เกี่ยวกับการทำงานทดลองที่ใช้หนูไมซ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับผู้ที่มีปัญหาการทำเครื่องหมายและการควบคุมหนูไมซ์เพื่อการทดลอง

กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิชาการของนักวิชาการและเป็นข้อมูลแก่ผู้เกี่ยวข้องและผู้สนใจทุกท่าน

ขอขอบคุณ

สพ.ญ.รัชนี อัตถิ

บรรณาธิการ

พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีอีไลซ่า

วิไล ลินจงสุบงกช[1] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[2] จุฬานีย์ น่วมจิตร์[2]
ปิยภรณ์ เจริญผล[2] จรรยา สมานิตย์[2] โสภา สิงคลีบุตร[2] รัตนีย์ ทองทา[2]

บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 โดยวิธีอีไลซ่า ได้ถูกพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งได้แก่ แอนติเจนชนิดเข้มข้น (concentrated antigen), rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody จากการตรวจสอบความใช้ได้ของแอนติเจน โดยการไตเตรทด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อไทป์ O, A และ Asia1 โดยให้ค่า working dilution ที่ 1:512, 1:1024 และ 1:1024 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติเจนชนิดเข้มข้นสามารถเก็บรักษาคุณภาพได้ยาวนานไม่ต่ำกว่า 1 ปี ส่วน rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody ไทป์ O, A และ Asia1 เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ โดยวิธีไตเตรท พบว่า rabbit trapping antibody ให้ working dilution หรือ optimal dilution สูงที่ 1:12800 ทั้ง 3 ไทป์ ในขณะที่ guinea pig detecting antibody ให้ working dilution หรือ optimal dilution สูงที่ 1:3200 ทั้ง 3 ไทป์ แสดงถึงมีความจำเพาะและความไวสูง สรุปโดยภาพรวมการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบเหล่านี้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีอีไลซ่า และยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น นอกจากนี้พบว่าสารตรวจสอบดังกล่าวสามารถเก็บรักษาคุณภาพที่อุณหภูมิ -20°C ได้ยาวนาน ดังนั้นชุดสารตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะเป็นประโยชน์ทั้งด้านลดการนำเข้าและประหยัดงบประมาณประจำปีในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ

คำสำคัญ: ชุดสารตรวจสอบ โรคปากและเท้าเปื่อย อีไลซ่า

---

[1] ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดเกิดจากเชื้อไวรัส ติดต่อง่าย และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ในสัตว์เศรษฐกิจ ส่งผลทำให้การส่งออกสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังต่างประเทศไม่ได้ เนื่องจากต่างประเทศใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า โรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งหมด 7 ไทป์คือ O, A , Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 (Brooksby and Rogers, 1975) ซึ่งในแต่ละไทป์ไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังแบ่งออกเป็นไวรัสชนิดย่อยอีกประมาณ 64 subtype (Pereira,1977) โดยแบ่งตามคุณสมบัติของแอนติเจนของไวรัสแต่ละชนิด พบระบาดในประเทศไทยเพียง 3 ไทป์คือ O, A และ Asia1 การตรวจวินิจฉัยโรคที่ให้ประสิทธิผลถูกต้อง แม่นยำ อ่านผลรวดเร็วและได้มาตรฐานตามหลักวิชาการ จะส่งผลเพิ่มประสิทธิภาพด้านการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งในระดับประเทศและระดับภูมิภาคให้บรรลุผลสำเร็จตามเป้าประสงค์ กรมปศุสัตว์มีนโยบายและแผนยุทธศาสตร์หลักในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย โดยเน้นควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ และฉีดวัคซีนสัตว์ในพื้นที่ให้ได้ 80% ของประชากรสัตว์ทั้งประเทศเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ให้ได้ herd immunity ไม่ต่ำกว่า 80% ซึ่งทางระบาดวิทยาถือว่าสามารถป้องกันโรคจากการระบาดได้ การตรวจหาไวรัส (antigen detection) ในสัตว์ป่วย และการตรวจหาแอนติบอดี (antibody detection) ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนหรือได้รับการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งสามารถตรวจได้หลายวิธี ได้แก่ Complement fixation (CF) test (Casey, 1995), Virus neutralization test (Rweyemamu et al., 1987) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธี Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี ELISA typing จากตัวอย่างเยื่อลิ้นหรือเยื่อกีบของสัตว์ป่วย (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ซึ่งพบว่าให้ความไวและแม่นยำกว่าวิธี CF test (Ferris and Dawson, 1988; Westbury et al., 1988) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิค ELISA มาใช้ตรวจหาแอนติบอดี ได้แก่ liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Hamblin et al., 1987) ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะมากกว่า วิธี VN test ถึง 2-2.5 เท่า (Westbury et al., 1988; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) สารตรวจสอบที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี ELISA ทั้ง antigen detection และ antibody detection ที่ใช้ปัจจุบัน เป็นสารตรวจสอบที่ผลิตที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อใช้ภายในศูนย์และแจกจ่ายให้กับหน่วยงานศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ของกรมปศุสัตว์ หรือบางครั้งแจกจ่ายให้กับหน่วยงานต่างประเทศภายใต้โครงการ South East Asia and China Foot and Mouth Disease Control (SEACFMD) Campaign สารตรวจสอบเหล่านี้ได้แก่ rabbit trapping antibody serum, guinea pig detecting antibody serum และ inactivated FMD antigen ของไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งเป็นสารตรวจสอบที่มีลักษณะเป็น fresh reagent โดยเฉพาะอย่างยิ่ง inactivated FMD antigen จะมีความไม่คงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การเก็บรักษาไม่ยาวนานและคุณภาพของแอนติเจนเสื่อมง่าย ส่วนสาร rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยากับโปรทีนต่างๆ (non specific blinding reaction) ในซีรัมได้ ทำให้เกิด background สูงรวมถึงการเกิดปฏิกิริยาข้าม serotype (cross reaction) ส่งผลให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย antigen detection และ antibody detection รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของสารตรวจสอบได้แก่ rabbit trapping antibody, guinea pig detecting antibody และ inactivated FMD antigen ทั้งด้านความบริสุทธิ์ ความจำเพาะ ความไว และคุณภาพการเก็บรักษา เพื่อลดการสูญเสียและลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมแอนติเจนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเข้มข้น

เพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ลงบนเซลล์ BHK-21 ทำการ inactivate ด้วย 2% binaryethyleneimine (BEI) นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 26°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำให้แอนติเจนเข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วย 7% polyethylene glycol (PEG 6000) ละลายตะกอนด้วย PBS หรือ Tris-Hcl ให้มีปริมาณความเข้มข้นประมาณ 20 เท่าจากปริมาตรเริ่มต้น เติม 1% bovine serum albumin (BSA) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพ ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของ antigen ได้แก่ complete inactivation โดยผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องกันจำนวน 3 ครั้ง, ตรวจ cross reaction และworking dilution หรือ optimal dilution โดยวิธี antigen titration ด้วยวิธี ELISA ก่อนนำไปใช้

เตรียมอนุภาค 146 S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1

น้ำยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านการ inactivate ด้วย 2% binary ethyleneimine (BEI) (Bahnemann, 1975) ทำการตกตะกอนด้วย 7% PEG 6000 และทำให้เข้มข้นประมาณ 200-250 เท่า โดยการปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ภายใต้สูญญากาศที่ความเร็ว 30,000 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกอนุภาค 146S ที่บริสุทธิ์โดยผ่าน 15-45 % sucrose density gradient ultracentrifugation ที่ความเร็วรอบ 27,000 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Brown and Cartwright, 1968; Cowan, 1968) ทำการเก็บหลอดที่มีปริมาณ 146S สูง(peak)โดยใช้ fraction collector ที่ต่อเข้ากับเครื่อง monitor ใช้ spectophotometor วัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนมิเตอร์ เพื่อคำนวณค่าปริมาณอนุภาค 146S (ug/ml) (Bachrach et al., 1964) เก็บเป็นสต๊อกในตู้ -80°C ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่ายและหนูตะเภาต่อไป

เตรียม rabbit trapping antibody ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1

เจือจางอนุภาค 146S จากสต๊อกด้วย 0.01M PBS ให้มีปริมาณ 50ไมโครกรัมต่อกระต่าย 1 ตัว นำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่าย หลังจากนั้น 28 วัน ทำการฉีดซ้ำโดยใช้ 146S ในปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่าย ทำการเจาะเลือดหลังฉีดครั้งที่สอง 10 วัน แยกซีรัมนำไปตรวจสอบความใช้ได้โดยตรวจ cross reaction และตรวจ หา working dilution ก่อนเก็บเป็นสต๊อกสำหรับใช้เป็นสารตรวจสอบในงาน ELISA ต่อไป

เตรียม guinea pig detecting antibody ของไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

เจือจางอนุภาค 146S จากสต๊อกด้วย 0.01M PBS ให้มีปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อหนูตะเภา 1 ตัว นำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ผสมสารทั้งสองให้เข้ากันจนได้ emulsion ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภา หลังจากนั้น 28 วันทำการเจาะเลือดแยกซีรัมนำไปตรวจสอบความใช้ได้โดยตรวจ cross reaction และตรวจหา working dilution ก่อนเก็บเป็นสต๊อกสำหรับใช้เป็นสารตรวจสอบในงาน ELISA ต่อไป

ตรวจสอบความใช้ได้ของชุดสารตรวจสอบ

ชุดสารตรวจสอบที่ผลิตได้คือ แอนติเจนชนิดเข้มข้น, rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibodyไทป์ O, A และ Asia1นำมาตรวจสอบความใช้ได้โดยวิธี titration เพื่อหา working dilution และตรวจสอบ cross reaction เพื่อให้มั่นใจว่าสารตรวจสอบเหล่านี่มีความจำเพาะและมีความไวโดยไม่มี cross binding reaction กับไวรัสไทป์อื่น ดังนี้

Antigen titration สำหรับแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วย rabbit trapping antibody ต่อไทป์ O, A และ Asia1 ลงบน ELISA เพลท ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมตัวอย่างแอนติเจนเข้มข้นของแต่ละไทป์โดยเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 จนถึง 1:8192 ตามลำดับ เติมลงบนเพลท incubate ที่ 37^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย guinea pig detecting antibody ของแต่ละไทป์ลงบนเพลท incubate ที่ 37^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริค (H_2SO_4) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์ และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของไวรัสแต่ละไทป์ โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุดของไวรัสที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

Rabbit trapping serum titration ต่อไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วยตัวอย่าง rabbit trapping antibody ของแต่ละไทป์ โดยการเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 จนถึง 1:10240 ตามลำดับ ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมสารละลายแอนติเจนของแต่ละไทป์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการ titrate มาแล้วเติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย guinea pig detecting antibody ของแต่ละไทป์ลงบนเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริคเพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์ และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของ rabbit serumแต่ละไทป์ โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุด serum ที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

Guinea pig serum titration ต่อไวรัสไทป์ O, A และ Asia1

coat เพลทด้วย rabbit trapping antibody ต่อไทป์ O, A และ Asia1 ลงบน ELISA เพลท ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น วันรุ่งขึ้นเตรียมสารละลายแอนติเจนของแต่ละไทป์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการ titrate มาแล้วเติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมตัวอย่าง guinea pig serum ของแต่ละไทป์ โดยการเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 จนถึง 1:6400 ตามลำดับ เติมลงบนเพลท ทำการ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย conjugate เติมลงในเพลท incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายของกรดซัลฟูริค เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนมิเตอร์และหาค่า optimal dilution หรือ working dilution ของ guinea pig serum แต่ละไทป์โดยอ่านค่าที่ dilution สูงสุด serum ที่ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 1.5-1.8

ตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้น

การตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 หลังเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม ทำการสุ่มตัวอย่างทุกเดือนมาตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี antigen titration

ผล

การพัฒนาผลิตชุดสารตรวจสอบสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA นั้นสารตรวจสอบที่ผลิตได้มีดังนี้ แอนติเจนชนิดเข้มข้น, rabbit trapping antibody และguinea pig detecting antibody

ไทป์ O, A และ Asia1 ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้และความจำเพาะโดยวิธี antigen titration, cross reaction titration และ working dilution ผลดังแสดงในรูปแผนภูมิที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของแอนติเจนชนิดเข้มข้น พบว่าแอนติเจนไทป์ O , A และ Asia1 ชนิดเข้มข้นที่ผลิตได้ให้ working dilution ที่ 1:512, 1:1024 และ 1:1024 ตามลำดับ และพบว่าไม่มี cross reaction กับไทป์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจสอบความคงทนของแอนติเจนชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1ที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลานาน 12 เดือน ผลปรากฏว่า แอนติเจนแต่ละไทป์ยังคงมีคุณภาพให้ antigen titer สูง โดยมีค่า OD อยู่ในช่วง 2.5–2.8 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ rabbit trapping antibody โดยการตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ได้ค่า working dilution ที่ 1:12800 ทั้ง 3 ไทป์ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ guinea pig detecting antibody โดยการตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ได้ค่า working dilution ที่ 1:3200 ทั้ง 3 ไทป์ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

สรุปและวิจารณ์

การพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโรคปากแลเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ได้แก่ แอนติเจนชนิดเข้มข้น rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody พบว่าสารตรวจสอบที่ผลิตได้มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงระดับหนึ่ง เป็นสารที่มีคุณภาพ ให้ความจำเพาะและความไวสูงในแต่ละไทป์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการแจกจ่ายสารตรวจสอบเหล่านี้ให้กับหน่วยงานในกรมปศุสัตว์ได้แก่ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาคเพื่อนำไปใช้ในงานตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและยังให้ความจำเพาะและความไวสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารตรวจสอบที่ผลิตเป็นแอนติเจนที่มีความเข้มข้นประมาณ 20 เท่า เมื่อนำมาตรวจโดยวิธี antigen titration พบว่าให้ค่า working dilution สูงตั้งแต่ 1:512 ถึง 1:1024 (ตารางที่ 1) ซึ่งการใช้ working dilution ที่สูง จะสามารถเพิ่มความจำเพาะให้สูงขึ้นและยังสามารถแก้ปัญหาเรื่อง background อันเนื่องมาจาก non specific binding reaction และการเกิด cross reaction ระหว่างไทป์อื่นได้ การผลิตด้วยวิธีนี้จึงได้แอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงและจะส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ จากการทดสอบความคงทนในการเก็บรักษาคุณภาพของแอนติเจนทั้ง 3 ไทป์ โดยการสุ่มตรวจสอบ antigen titration ทุกเดือนเป็นเวลานาน 12 เดือน พบว่าแอนติเจนดังกล่าวไม่มีการเสื่อมคุณภาพ ยังคงให้ titer ในระดับสูงและคงที่ ได้ค่า OD อยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 2.8 (แผนภูมิที่ 1) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดลองต่อหลังเก็บรักษาเกินระยะเวลา 1 ปี

ส่วนกรณีการตรวจสอบ rabbit trapping antibody และ guinea pig detecting antibody ไทป์ O, A และ Asia1 ในแผนภูมิที่ 2 และ 3 พบว่าให้ working dilution ค่อนข้างสูงและไม่มี cross reaction กับไทป์อื่น แสดงถึงความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อเพิ่มปริมาณหรือขยายการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต โดยเพิ่มอุปกรณ์และครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่จำเป็นบางอย่าง เช่น อุปกรณ์สำหรับการขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงเซลล์และเพาะเลี้ยงไวรัส เครื่องทำไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์เป็นต้น จากผลสำเร็จในการพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบเหล่านี้จะสามารถประหยัดงบประมาณประจำปีได้ปีละหลายล้านบาท โดยไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ปัจจุบันชุดสารตรวจสอบสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 7 ไทป์ จะมีแหล่งผลิตและจำหน่ายที่หน่วยงาน World Reference Laboratory for FMD, Pirbrigth Laboratory ประเทศอังกฤษเท่านั้น ซึ่งสารตรวจสอบเหล่านี้มีราคาสูงมาก ดังนั้นในการวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดสารตรวจสอบครั้งนี้พบว่าได้สารตรวจสอบที่มีคุณภาพ ได้มาตรฐาน ราคาประหยัด รวมทั้งสามารถแจกจ่ายให้กับหน่วยงานต่างๆในกรมปศุสัตว์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 แห่งของกรมปศุสัตว์ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและการตรวจเฝ้าระวังโรคปากและเท้าเปื่อยตามแผนยุทธศาสตร์กรมปศุสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถแจกจ่ายหรือจำหน่ายให้กับหน่วยงานต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศสมาชิก OIE ภายใต้โครงการ South East Asia and China Foot Mouth Disease Control Campaign (SEACFMD) ให้บรรลุเป้าหมายและผลสำเร็จสำหรับการยื่นขอรับรองจาก OIE ในการจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยโดยฉีดวัคซีนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ภายในปี คศ. 2020 ตามแผนยุทธศาสตร์ SEACFMD 2020 Roadmap

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยเตรียมสารและเตรียมเซลล์ ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพาะเลี้ยงไวรัส เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ มีเดียและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในโครงการนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

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.

Bahnemann, H.G. 1975. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and it application for vaccine production. Arch Virol. 17: 47-56.

Brooksby, J. and Rogers. 1957. Method used in typing the virus of foot and mouth disease at Pirbright, 1950-1955. *In* Method of typing and cultivation of foot and mouth disease virus. Project 208 of OEEC, Paris. 31-34.

Brown, F. and Cartwright, B. 1963. Purification of radioactive foot and mouth disease virus. Nature (Lond). 199:1168-1170.

Casey, H.L. 1995. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation micro test. U.S. Public Health Service, Washington D.C., Publ. Health Monogr. 74: 1-34.

Cowan, K.M. 1968. Immunochemical studies of foot and mouth disease. IV. Preparation and evaluation of antisera specific for virus protein, sub-unit and the infection- associated antigen. J. of Imm. 10:1183-1191.

Ferris, N.P. and Dawson, M. 1988. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth disease and swine vesicular diseases. Vet. Microbiol. 16: 201-209.

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

Linchongsubongkoch, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody titer to foot and mouth disease virus by liquid phase blocking ELISA. Proceeding on 1st Vet. Biologics Conference. 62-72.

Pereira, H.G. 1977. Subtyping of foot and mouth disease virus. Dev. Biol. Stand. 35: 167-174.

Roeder P.L., Le Blance Smith P.R. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immnusorbent assay: a sensitivity, rapid, reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

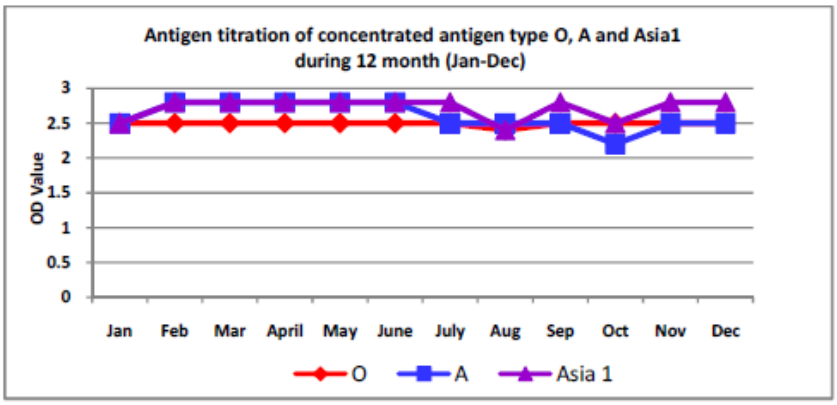
Rweyemamu, M.M., Booth, J.C., Heak, M., Pay, T.W.F. 1987. Microneutralization test for serology typing and subtyping of foot and mouth disease virus strains. J. Hygiene. Camb. 81: 107-122.

Westbury, H.A., Chamnanpood, P., Tungchaitrong,S. Doughty, W.J. 1988 . Single dilution ELISA for detection of serum antibody to foot and mouth disease virus in cattle. Vet. Microbiol. 18: 273-283.

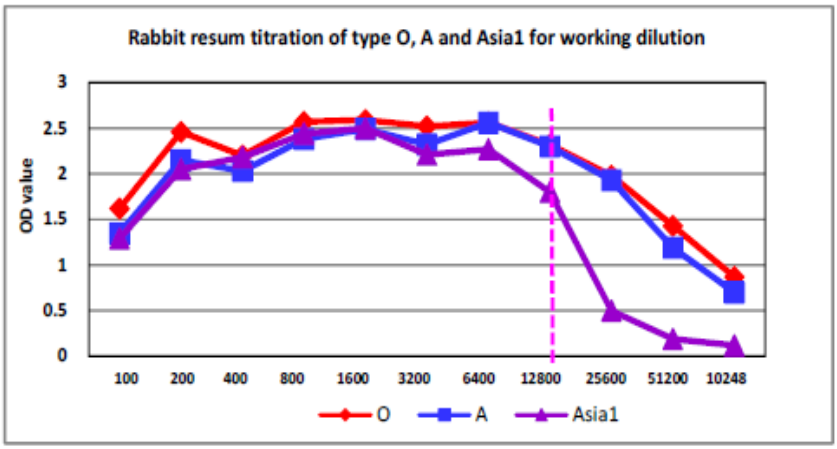
ตารางที่ 1 แสดงการตรวจสอบความใช้ได้ของไวรัสชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 โดยวิธี antigen titration และตรวจหา working dilution และ cross reaction สรุปผลการหา working dilution โดยอ่านค่าที่ OD ช่วง 1.5-1.8 ของไทป์ O, A และ Asia1 เท่ากับ 1:512, 1: 1024 และ 1:1024 ตามลำดับ

	Conc. Ag 20X	Cross titration		Conc. Ag 20X	Cross titration		Conc. Ag 20X	Cross titration	
dilution	type O	to type A and Asia1		type A	to type O and Asai1		type Asia1	to type O and A	
1:2	2.35	0.43	0.38	2.64	0.39	0.41	2.91	0.31	0.15
1:4	2.25	0.37	0.35	2.5	0.34	0.33	2.89	0.31	0.13
1:8	2.07	0.33	0.33	2.49	0.26	0.28	2.85	0.15	0.12
1:16	1.93	0.29	0.28	2.34	0.17	0.21	2.71	0.12	0.13
1:32	1.87	0.13	0.19	2.2	0.13	0.15	2.68	0.13	0.12
1:64	1.74	0.13	0.15	2.18	0.11	0.14	2.41	0.13	0.09
1:128	1.68	0.07	0.13	2.14	0.05	0.12	2.14	0.09	0.08
1:256	1.76	-	-	2.11	-	-	2.2	-	-
1:512	*1.54	-	-	2.09	-	-	2.07	-	-
1:1024	1.13	-	-	*1.65	-	-	*1.87	-	-
1:2048	0.83	-	-	0.8	-	-	0.76	-	-
1:4096	0.51	-	-	0.47	-	-	0.37	-	-
1:8192	0.37	-	-	0.36	-	-	0.29	-	-

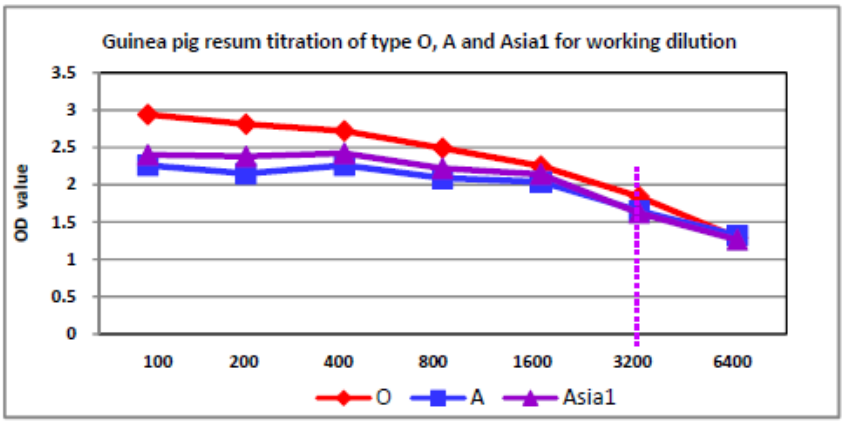
* Working dilution type O = 1:512, type A = 1:1024 , type Asia1 =1:1024



แผนภูมิที่ 1 แสดงค่าการตรวจสอบคุณภาพ ความคงทนของไวรัสชนิดเข้มข้นไทป์ O, A และ Asia1 ที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลานาน 12 เดือน โดยสุ่มตัวอย่างตรวจทุกเดือน



แผนภูมิที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ rabbit trapping antibody โดยตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ตามลำดับ



แผนภูมิที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของ guinea pig detecting antibodyโดยตรวจหา working dilution ของไทป์ O, A และ Asia1 ตามลำดับ

Development of production of foot and mouth disease ELISA reagent kit

Wilai Linchongsubongkoch[1] Kingkarn Boonsuya Seeyo[2] Julanee Nuamchit[2]
Piyaporn Chareonphol[2] Janya Samanit[2] Sopha Singkleebut[2] Rattanee Thongtha[2]

Abstract

The production of ELISA reagents used for foot and mouth disease diagnosis were developed and validated, those reagents were concentrated antigen, rabbit trapping antibody and guinea pig detecting antibody against serotype O, A and Asia1, respectively. The validation of concentrated antigen using ELISA titration assay was demonstrated specificity that illustrated the high working dilution of serotype O, A and Asia1 at 1:512, 1:1024 and 1:1024 respectively. In addition, a keeping quality of concentrated antigen was investigated; the result demonstrated a high antigen titer that prolonged stability up to one year. The validation of rabbit trapping and guinea pig detecting antibody were carried out, the high working dilution of rabbit antiserum to serotype O, A and Asia1 was found at 1:12800, while working dilution of guinea pig antiserum to serotype O, A and Asia1 was found at 1:3200. This result indicated a high specificity and sensitivity of all reagents. In conclusion, the developed ELISA reagents could be used to enhance the efficacy and accuracy of foot and mouth disease diagnosis and those reagents could be kept freezer -20^{o}C for a long time which prolonged high quality. Thus, these developed reagents will be benefit for reducing of importing and saving of annual budget for purchasing the reagents from foreign country.

Key words: Reagent kit, foot and mouth disease, ELISA

---

[1] FMD Expert and Consultant of Department of Livestock Development

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

เปรียบเทียบวิธีการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ชนิดแขวนลอย

อนุรักษ์ ตระการรังสี[1] สายพิณ ขุมทรัพย์[1]

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบวิธีการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย 2 วิธี คือ การควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องแช่เยือกแข็งและการลดอุณหภูมิตามลำดับจาก 4°ซ. -20°ซ. และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°ซ. ทดสอบการรอดชีวิตและจำนวนเซลล์เฉลี่ยทุก 3 เดือน หลังเก็บเป็นเวลา 2 ปี พบว่าเซลล์ที่เก็บด้วยเครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและจำนวนเซลล์เฉลี่ยในแต่ละ passage ที่นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงหลังเก็บสูงกว่าเซลล์ที่เก็บด้วยการลดอุณหภูมิตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการใช้มีเดียมสำหรับแช่เยือกแข็งที่มีและไม่มีซีรัม ในการเก็บรักษาเซลล์แต่ละวิธี พบว่า การรอดชีวิตและจำนวนเซลล์เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังเก็บรักษาตั้งแต่ 12 เดือนขึ้นไป เพื่อให้มีจำนวนเพียงพอสำหรับใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการเพาะขยายเซลล์ในระดับอุตสาหกรรม เซลล์ที่เก็บด้วยเครื่องแช่เยือกแข็งต้องการการเพาะเลี้ยงด้วยจำนวน passage น้อยกว่าเซลล์ที่เก็บด้วยการลดอุณหภูมิตามลำดับ ดังนั้นสามารถใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย โดยใช้มีเดียมสำหรับแช่เยือกแข็งที่มีหรือไม่มีซีรัมได้

คำสำคัญ: เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย การรักษาสภาพเยือกแข็ง การลดอุณหภูมิ

---

[1]กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 3013

บทนำ

การเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยใน growth medium for suspension (GMS) ที่มี 20% fetal calf serum (FCS) และ 10% dimethylsulfoxide (DMSO)โดยใช้เซลล์จำนวน 1 x 10^7 เซลล์/มล. บรรจุขวดละ 10 มล. ซึ่งการเก็บรักษาเซลล์ในปัจจุบันโดยการลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้นจากอุณหภูมิ 4°ซ. นาน 2 ชม. ย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ. นาน 1 ชม. หลังจากนั้นจึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -80°ซ. การเก็บโดยวิธีนี้ สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นาน 24 เดือน แต่ขั้นตอนนี้มีความยุ่งยากและใช้เวลานาน นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตประมาณ 60% และต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 3-5 passages เซลล์จึงสามารถขยายต่อไปได้

การเก็บรักษาเซลล์นอกจากใช้วิธีการย้ายขวดบรรจุเซลล์จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่างๆ เพื่อการลดอุณหภูมิแล้วอาจใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ (Cryogenic freezer) ซึ่งสามารถควบคุมการลดอุณหภูมิด้วยไนโตรเจนเหลวได้อย่างสม่ำเสมอ ตั้งแต่ 0.1°ซ./นาที ถึง 50°ซ./นาที และทำความเย็นได้ถึง -170°ซ. จากการศึกษาของ Mazur (1984) พบว่าการเก็บรักษาเซลล์ไข่ของหนูไมซ์ในไนโตรเจนเหลว โดยลดอุณหภูมิลงในอัตรา 2°ซ./นาที เมื่อนำมาละลายทำให้เซลล์ไข่ของหนูมีอัตราการรอดชีวิตถึง 70 % จึงมีแนวคิดที่จะนำเครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์มาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์เพื่อช่วยลดขั้นตอนการย้ายขวดบรรจุเซลล์ และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ซึ่งมีผลต่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากเพียงพอสำหรับการเพาะขยายเซลล์ในถังขนาดใหญ่

นอกจากนี้การใช้มีเดียมในการเก็บรักษาเซลล์สามารถใช้ Serum-free medium for cryopreservation (Cryo-SFM) ซึ่งเป็นมีเดียมที่ไม่มีซีรัมเป็นส่วนประกอบทำให้ควบคุมคุณภาพได้ง่าย ไม่มีความผันแปรจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และใช้เป็นมีเดียมมาตรฐานระหว่างห้องทดลองต่างๆ การเลือกใช้มีเดียมให้เหมาะสมกับชนิดของเซลล์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Freshney, 2005)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะเปรียบเทียบการใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์กับวิธีการย้ายขวดบรรจุเซลล์จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่างๆ และเปรียบเทียบการใช้มีเดียมที่ประกอบด้วย Cryo-SFM แทนมีเดียมเดิมที่ประกอบด้วย GMS + 20% FCS + 10% DMSO เพื่อเป็นทางเลือกในการเก็บรักษาเซลล์ที่เหมาะสม นำมาปรับปรุงพัฒนากระบวนการเก็บรักษาและผลิตเซลล์ที่มีคุณภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย passage ที่ 15-20

มีเดียม

1. มีเดียมสำหรับเก็บรักษาเซลล์
    1.1 Growth medium for suspension (GMS)[1] ที่มี 20% fetal calf serum (FCS)[2] และ 10% dimethylsulfoxide (DMSO)[3]
    1.2 Cryo-SFM[4]
2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย GMS ที่มี 5% FCS

เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์[5] (Cryogenic freezer)

เป็นเครื่องควบคุมการทำความเย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ทำให้สามารถลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว ช่วยลดขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์สามารถทำความเย็นได้ถึง -170°ซ. สามารถปรับลดอุณหภูมิเพื่อทำความเย็นในอัตราตั้งแต่ 0.1°ซ./นาที ถึง 50°ซ./นาที ช่องเยือกแข็ง (freezing chamber) มีขนาด 300 x 250 x 350 มม. (กว้าง x ยาว x สูง) สามารถใส่ขวดขนาด 20 มล. ได้ 144 ขวด

การเพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$

เพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 2 ลิตรแบบเติมอากาศที่มี GMS ที่ผสม 5% FCS จำนวน 3 ขวด ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 2 วันให้ได้จำนวนเซลล์ต่อขวด เท่ากับ 3.2×10^6 เซลล์/มล.

วิธีการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$

แบ่งเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละขวด ออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 250 มล. แล้วนำเซลล์ทั้ง 4 กลุ่มไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ยี่ห้อ Tomy Seiko model RB-18TS ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นำตะกอนเซลล์แต่ละกลุ่มผสมในมีเดียมที่ต่างกัน (ตารางที่ 1) ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 1×10^7 เซลล์/มล. แบ่งเซลล์ใส่ขวดเก็บเซลล์ขนาดความจุ 20 มล. ขวดละ 10 มล. จำนวน 8 ขวด/กลุ่ม ทำวิธีเดียวกันนี้จนครบทั้ง 3 ขวด แล้วนำไปเก็บรักษาโดยวิธีที่ต่างกันทั้ง 4 กลุ่ม

---

[1]Amresco, America Lot no.1712C419

[2]Biological Industries, Israel Lot no.215079

[3]BDH Laboratory Supplies Poole,England Lot no.K23327888 648

[4]Promocell,Germany Lot no.6082503

[5]Nicool Plus PC Air Liquid[tm], France

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของมีเดียมและวิธีการเก็บรักษาเซลล์แต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	ส่วนประกอบมีเดียมแต่ละขวด (มล.)				วิธีเก็บรักษาเซลล์
	GMS	FCS	DMSO	Cryo- SFM	
1	7	2	1	-	วิธีที่ใช้ปัจจุบัน*
2	7	2	1	-	ใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์**
3	-	-	-	10	วิธีที่ใช้ปัจจุบัน*
4	-	-	-	10	ใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์**

* แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ. 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ -20°ซ. 1 ชั่วโมง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°ซ.
**ใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์โดยลดอุณหภูมิลงในอัตรา 2 °ซ./นาที จนถึงอุณหภูมิ -40°ซ. และลดลงในอัตรา 5°ซ./นาที จนถึงอุณหภูมิ -80°ซ. นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°ซ.

การเพาะขยายเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ หลังการเก็บรักษา

นำเซลล์ที่เก็บไว้จากทั้ง 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ขวด มาเพาะเลี้ยงทุก ๆ 3 เดือน จนครบ 24 เดือนโดยนำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °ซ. จนละลายหมด ภายในเวลาไม่เกิน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เก็บตะกอนเซลล์ผสมกับมีเดียม (5% FCS + GMS) pH 7.2 ปริมาตร 200 มล. ในขวด Roux นับจำนวนเซลล์เพื่อหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในขวด Roux ที่อุณหภูมิ 37°ซ. กวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็วรอบ 400 รอบ/ นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ 20 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต ตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ทั้งขนาดและรูปร่างของเซลล์ และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อไป 5 passages โดยในแต่ละ passage ใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีชีวิตในแต่ละขวดจำนวนเท่ากับ 0.5×10^6 เซลล์/ มล. ในมีเดียม (5% FCS + GMS) pH 7.2 ปริมาตร 200 มล. แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. กวนด้วยความเร็วรอบ 400 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ 20 มล. เพื่อนับจำนวน เซลล์ที่มีชีวิตตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นและเปรียบเทียบ passage ที่ให้ปริมาณเซลล์ไม่น้อยกว่า 2.4×10^6 เซลล์/มล. ตามมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 50 ลิตร (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2555) ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินในการนำไปเพาะขยายเซลล์เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การวิเคราะห์ผล

โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของเซลล์และจำนวนเซลล์เฉลี่ยในแต่ละ passage เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงหลังจากเก็บรักษาของทั้ง 4 กลุ่มแล้วนำมาเปรียบเทียบทางสถิติโดย One-way ANOVA (multiple comparison แบบ Scheffe)

การนับจำนวนเซลล์ (Billie and Francis, 1981)

นำตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 0.5 มล. ย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue ปริมาตร 0.5 มล. นำเซลล์มาใส่สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ชนิด Spencer bright line นับจำนวนเซลล์ ที่อยู่บริเวณช่องขอบทั้งสี่มุมของสไลด์ทั้งหมด ซึ่งมีปริมาตรช่องละ 1 x 10^{-4} มล. นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์/มล.

โดยใช้สูตร $C = \frac{ny \times 10^4}{4}$ เซลล์/ มล.

C คือ ความเข้มข้นของเซลล์/มล.

n คือ จำนวนเซลล์ที่อยู่บริเวณช่องขอบทั้งสี่มุมของสไลด์ ทั้งหมด

y คือ dilution factor ของตัวอย่าง

ผล

พบว่าเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยทั้ง 4 กลุ่มหลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 เดือน กลุ่มที่ 2 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 2 เมื่อนำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยทั้ง 4 กลุ่มหลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 เดือน ตามลำดับ มาเพาะเลี้ยงจำนวน 5 passages พบว่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยในทุก passage ของกลุ่มที่ 2 และ 4 สูงกว่ากลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 3

วิจารณ์

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่าการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ที่อุณหภูมิ -80°ซ. โดยใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของเซลล์และจำนวนเซลล์เฉลี่ยในแต่ละ passage สูงกว่าวิธีการเก็บที่ใช้ในปัจจุบันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงหลังจากการเก็บรักษา ทั้งนี้เป็นเพราะการเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีปัจจุบัน จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์นี้จะทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ ของเหลวภายในเซลล์จะไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เสียหายและตายได้ การเก็บรักษาเซลล์โดยใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ทำให้เซลล์เย็นลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ในเวลาใกล้เคียงกัน

ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กผนังเซลล์จึงไม่เสียหาย เซลล์ยังคงสภาพและเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน (Mazur, 1984) มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตที่สูงขึ้นและขั้นตอนการเก็บใช้เวลาน้อยกว่า

นอกจากนี้การใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ยังช่วยลดจำนวน passage ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังการเก็บรักษา เพื่อนำไปเป็นเซลล์เริ่มต้นในการเพาะขยายเพื่อผลิตเซลล์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป (ตารางที่ 3) ทำให้ประหยัดเวลา และลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน

เมื่อเปรียบเทียบการใช้มีเดียม 2 ชนิด การใช้ Cryo-SFM จะให้ผลใกล้เคียงกับการใช้มีเดียมที่มีซีรัม แสดงว่าสามารถใช้ทดแทนกันได้ ทั้งนี้ต้องเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียในด้านต่างๆ เช่น ต้นทุน คุณภาพ และความสะดวกในการใช้งาน

สรุป

วิธีการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาเซลล์ชนิดแขวนลอยโดยการใช้เครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์ซึ่งสามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอ ด้วยไนโตรเจนเหลว ดีกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบันซึ่งลดอุณหภูมิโดยนำเซลล์ไปแช่ในอุณหภูมิ 4°ซ. -20°ซ. และ -80°ซ. ดังนั้นสามารถนำเครื่องแช่เยือกแข็งเซลล์มาใช้ในการเก็บรักษาเซลล์แทนวิธีการเดิมได้ โดยใช้มีเดียม GMS+FCS+DMSO หรือมีเดียม Cryo-SFM

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ช่วยให้การทดลองสำเร็จลุล่วงด้วยดีและคณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้ข้อคิดเห็นทางด้านวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ 2555 เรื่องมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 50 ลิตร (SOP-FCSM-030) หน้า 3

Bird, B. R. and Forester, F. T. 1981. Basic Laboratory Techniques in cell culture. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories, Laboratories Training and Consultation Division. p. 135.

Freshney, R. I. 2005. Introduction. *In* Culture of animal cells: a manual of basic technique, 5th ed. Hoboken N.J., John Wiley and Sons. pp. 1-9.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells : mechanism and implications. Am. J. Physiol. 247 : 125-142.

ตารางที่ 2 ปริมาณและเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยหลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 เดือน

หลังเก็บ (เดือน)	กลุ่ม 1		กลุ่ม 2		กลุ่ม 3		กลุ่ม 4	
	ปริมาณเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์/ขวด)	% รอดชีวิต	ปริมาณเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์/ขวด)	% รอดชีวิต	ปริมาณเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์/ขวด)	% รอดชีวิต	ปริมาณเซลล์ ($\times 10^8$ เซลล์/ขวด)	% รอดชีวิต
	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD	$\bar{x}$ ± SD
3	0.78±0.02	78.3±1.5^a	0.87±0.03	87.3±2.5^b	0.76±0.02	76.3±1.5^a	0.86±0.01	86.0±1.0^b
6	0.75±0.01	75.0±1.0^a	0.85±0.02	85.3±1.5^b	0.73±0.02	72.5±1.5^a	0.82±0.01	82.0±1.0^b
9	0.71±0.02	71.0±2.0^a	0.81±0.02	81.3±1.5^b	0.70±0.02	69.7±1.5^a	0.79±0.01	79.3±1.2^b
12	0.68±0.02	68.3±1.5^a	0.80±0.01	80.0±1.0^b	0.65±0.01	65.0±1.0^a	0.77±0.01	77.0±1.0^b
15	0.66±0.01	66.0±1.0^a	0.77±0.01	77.0±1.0^b	0.62±0.01	62.0±1.0^a	0.75±0.01	75.3±0.6^b
18	0.64±0.02	63.7±1.2^a	0.74±0.01	74.0±1.0^b	0.59±0.02	59.0±2.0^a	0.71±0.02	71.3±1.5^b
21	0.61±0.01	61.0±1.0^a	0.71±0.01	71.3±0.6^b	0.58±0.02	58.0±2.0^a	0.67±0.02	67.3±1.5^b
24	0.59±0.02	58.7±2.1^a	0.68±0.02	68.0±2.0^b	0.55±0.03	55.0±2.6^a	0.64±0.01	64.0±1.0^b

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b ที่ต่างกันเหนือตัวเลขในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย 5 passages เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงหลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 เดือน

หลังเก็บ (เดือน)	Passage	กลุ่ม 1 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{x} \pm SD$	กลุ่ม 2 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{x} \pm SD$	กลุ่ม 3 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{x} \pm SD$	กลุ่ม 4 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{x} \pm SD$
3	1	**2.45±0.02**[a]	**2.56±0.05**[b]	**2.45±0.02**[a]	**2.50±0.03**[b]
	2	2.47±0.01[a]	2.63±0.05[b]	2.46±0.02[a]	2.54±0.05[b]
	3	2.50±0.02[a]	2.74±0.08[b]	2.49±0.02[a]	2.55±0.04[b]
	4	2.51±0.01[a]	2.85±0.12[b]	2.52±0.04[a]	2.69±0.15[b]
	5	2.54±0.01[a]	2.91±0.08[b]	2.55±0.06[a]	2.73±0.12[b]
6	1	2.06±0.02[a]	2.32±0.07[b]	2.03±0.02[a]	2.24±0.05[b]
	2	**2.45±0.02**[a]	**2.60±0.07**[b]	**2.50±0.05**[a]	**2.54±0.04**[b]
	3	2.48±0.01[a]	2.70±0.06[b]	2.51±0.06[a]	2.57±0.06[b]
	4	2.51±0.02[a]	2.83±0.10[b]	2.55±0.06[a]	2.60±0.08[b]
	5	2.53±0.01[a]	2.89±0.06[b]	2.57±0.07[a]	2.74±0.12[b]
9	1	1.92±0.03[a]	2.14±0.05[b]	1.83±0.03[a]	2.08±0.06[b]
	2	**2.43±0.02**[a]	**2.52±0.04**[b]	2.25±0.17[a]	**2.47±0.02**[b]
	3	2.47±0.02[a]	2.61±0.08[b]	**2.46±0.01**[a]	2.52±0.05[b]
	4	2.49±0.02[a]	2.73±0.11[b]	2.49±0.03[a]	2.58±0.04[b]
	5	2.51±0.02[a]	2.83±0.07[b]	2.51±0.07[a]	2.69±0.10[b]
12	1	1.83±0.02[a]	2.10±0.15[b]	1.74±0.02[a]	1.94±0.06[b]
	2	2.25±0.02[a]	**2.49±0.04**[b]	2.11±0.03[a]	**2.49±0.03**[b]
	3	**2.44±0.03**[a]	2.61±0.11[b]	**2.42±0.03**[a]	2.54±0.06[b]
	4	2.52±0.01[a]	2.74±0.14[b]	2.47±0.02[a]	2.61±0.06[b]
	5	2.54±0.02[a]	2.82±0.09[b]	2.49±0.01[a]	2.80±0.09[b]
15	1	1.51±0.02[a]	1.79±0.03[b]	1.58±0.04[a]	1.81±0.06[b]
	2	2.03±0.02[a]	2.37±0.02[b]	1.84±0.05[a]	2.26±0.12[b]
	3	**2.44±0.04**[a]	**2.64±0.12**[b]	2.14±0.03[a]	**2.49±0.02**[b]
	4	2.51±0.04[a]	2.69±0.08[b]	**2.42±0.03**[a]	2.60±0.03[b]
	5	2.55±0.05[a]	2.78±0.05[b]	2.47±0.02[a]	2.75±0.06[b]

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย 5 passages เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงหลังเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 เดือน (ต่อ)

หลังเก็บ (เดือน)	Passage	กลุ่ม 1 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{X} \pm SD$	กลุ่ม 2 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{X} \pm SD$	กลุ่ม 3 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{X} \pm SD$	กลุ่ม 4 ปริมาณเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) $\bar{X} \pm SD$
18	1	1.32±0.02[a]	1.84±0.10[b]	1.62±0.11[a]	1.66±0.07[b]
	2	1.46±0.06[a]	2.34±0.05[b]	1.78±0.10[a]	2.26±0.11[b]
	3	2.02±0.05[a]	**2.50±0.04[b]**	2.09±0.06[a]	**2.49±0.04[b]**
	4	**2.42±0.03[a]**	2.64±0.06[b]	**2.43±0.02[a]**	2.60±0.08[b]
	5	2.45±0.03[a]	2.76±0.06[b]	2.45±0.02[a]	2.70±0.06[b]
21	1	1.20±0.02[a]	1.69±0.14[b]	1.17±0.02[a]	1.56±0.07[b]
	2	1.51±0.03[a]	2.03±0.26[b]	1.31±0.03[a]	1.84±0.12[b]
	3	1.81±0.07[a]	2.38±0.08[b]	1.84±0.03[a]	2.21±0.17[b]
	4	2.05±0.21[a]	**2.55±0.09[b]**	2.28±0.03[a]	2.37±0.03[b]
	5	**2.44±0.04[a]**	2.68±0.05[b]	**2.46±0.09[a]**	**2.65±0.09[b]**
24	1	0.88±0.04[a]	1.42±0.10[b]	0.87±0.02[a]	1.29±0.05[b]
	2	1.25±0.09[a]	1.78±0.08[b]	1.16±0.03[a]	1.80±0.13[b]
	3	1.56±0.14[a]	2.33±0.08[b]	1.33±0.02[a]	2.13±0.12[b]
	4	2.12±0.13[a]	**2.47±0.02[b]**	1.80±0.08[a]	2.36±0.04[b]
	5	**2.43±0.03[a]**	2.50±0.21[b]	**2.43±0.02[a]**	**2.63±0.07[b]**

หมายเหตุ : ตัวหนาหมายถึง Passage ที่ผ่านเกณฑ์ (จำนวนเซลล์ไม่น้อยกว่า 2.4×10^6 เซลล์/มล.) ใช้เพาะขยายจำนวนต่อไป

: ตัวอักษร a, b ที่ต่างกันเหนือตัวเลขในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Comparison of temperature reduction methods in the cryopreservation of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell

Anurak Trakarnrungsee[1] Saipin khumsub[1]

Abstract

Two temperature reduction methods in the cryopreservation of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells were compared, i.e. a controlled- rate freezing by using cryogenic freezer and step freezing at 4 °C, -20°C then stored at -80°C. After storage, cell viability and average cell count were tested every three months for two years. The result showed that cells frozen by using cryogenic freezer had significantly ($P < 0.05$) higher percentage of viable cells and cell number in each passage of cell recovery than cells frozen by step freezing. When compared the cryopreservative medium with serum to the medium without serum in each method, the viability and average cell count were not significantly different ($P > 0.05$). In addition, for cells recovery after 12 months of longer storage to obtain sufficient number of cells for starting the cell expansion in an industrial scale, cells frozen by cryogenic freezer needed to be subcultured for less passages than cells frozen by step freezing. Therefore, cryogenic freezer could be used for storage $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells in either serum containing medium or serum free cryopreservative medium.

Key words: $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells, cryopreservation, temperature reduction methods

---

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

การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน

อมรรัตน์ สวัสดิ์สิงห์[1] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[2]

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O_{189} ให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟนที่ MWCO 100,000 และ 500,000 ดาลตัน โดยเก็บตัวอย่างก่อนการกรองและที่ความเข้มข้น 40 และ 100 เท่า นำมาหาปริมาณอนุภาค 146S ด้วยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation เพื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ recovery และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method เพื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ purity พบว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของอนุภาค 146S หลังผ่านเครื่องกรองที่ MWCO 100,000 และ 500,000 ดาลตัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) สำหรับค่า purity พบว่าที่ MWCO 500,000 ดาลตัน มีเปอร์เซ็นต์ purity สูงกว่าที่ MWCO 100,000 ดาลตัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน ที่ MWCO 500,000 ดาลตัน สามารถกรองไวรัสได้บริสุทธิ์กว่าที่ MWCO 100,000 ดาลตัน ทั้งนี้การเลือกใช้ MWCO ต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ ปัจจัยอื่น ๆ รวมทั้งสภาวะในการกรองและความบริสุทธิ์ที่ต้องการ

คำสำคัญ: เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวง, โพลีซัลโฟนเมมเบรน, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี suspension cell culture method (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1982) ซึ่งมีกระบวนการผลิตเริ่มตั้งแต่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบแขวนลอย การเพาะและเพิ่มปริมาณไวรัส การแยกส่วนน้ำไวรัสออกจากกากเซลล์ การทำไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ การทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรคและเก็บรักษาไวรัสที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -198°C เพื่อเก็บเป็นสต๊อกแอนติเจนสำหรับนำไปผสมเป็นวัคซีน การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบันจะผลิตเป็นวัคซีนที่มีความบริสุทธิ์ (purified vaccine) สูง ปราศจากการปนเปื้อนส่วน non structure protein, NSPs ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามมาตรฐาน World organization for animal health, OIE (2012) ทั้งนี้วัคซีนที่มีความบริสุทธิ์สูงจะต้องมีปริมาณอนุภาค 146S สูง ซึ่ง Crowther (1986) พบว่าอนุภาค146S และ 75S มีคุณสมบัติเป็น immunogen สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี ดังนั้นในกระบวนการผลิตวัคซีนโดยเฉพาะขั้นตอนการทำไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์เพื่อจัดเก็บเป็นสต๊อกแอนติเจนและนำไปผสมเป็นวัคซีนนั้น จำเป็นต้องผลิตแอนติเจนที่มีปริมาณอนุภาค 146S มากที่สุด เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพและให้ความคุ้มโรคสูง

กระบวนการ ultrafiltration เป็นกระบวนการทำความเข้มข้นโดยแยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน เอนไซม์ รวมทั้งแบคทีเรียและจุลชีพอื่นๆ ออกจากน้ำและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ซึ่งอาศัยแรงดันต่ำเป็นแรงขับดันให้ของเหลวเคลื่อนผ่านช่องว่างของเมมเบรนในการแยกอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดใหญ่ออกจากของเหลว ส่วนใหญ่ใช้กับอนุภาคที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut off, MWCO) 1,000-1,000,000 ดาลตัน วัสดุที่ใช้เป็นเมมเบรนในกระบวนการ ultrafiltration ได้แก่ โพลีซัลโฟน เซลลูโลส อะซีเตท โพลีพรอพิลีน ไนลอน โพลีไวนิลคลอไรด์ เป็นต้น (พัฒนพงษ์, 2552) ซึ่งโพลีซัลโฟนเป็นเมมเบรนที่มีความแข็งแรงสูง ทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ -100 ถึง 150 องศาเซลเซียส สามารถฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยไอน้ำและสารเคมีได้ มีความทนทานทั้งในกรด-ด่าง (pH 2-13) (GE Healthcare Bio-Science, 2014)

มีรายงานการทำให้ไวรัสเข้มข้นโดยกระบวนการ ultrafiltration โดยใช้เมมเบรนชนิดโพลีซัลโฟน ใน Polio virus, Baboon endogenous virus (BaEV), Rubella virus, Influenza virus และ Enteric virus (Zhi-Guo and Clark, 1994) นอกจากนี้ยังมีการใช้เมมเบรนชนิดโพลีซัลโฟน มาใช้ในการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของประเทศอาร์เจนตินา (GE Healthcare Bio-Science, 2014) โดยบริษัทผู้ผลิตแนะนำให้เลือกเมมเบรนที่มี MWCO ขนาดเล็กกว่าโมเลกุลเป้าหมาย 3-5 เท่า (GE Healthcare Bio-Science, 2007) ซึ่งอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8.08×10^6 ดาลตัน จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวง

ชนิดโพลีซัลโฟน MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นและบริสุทธิ์สูงขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ให้ได้มาตรฐานสากลและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน หรือ AEC ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O_{189} จากฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบแขวนลอย และเกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบูรณ์ภายใน 20-24 ชั่วโมง และผ่านการทำให้น้ำไวรัสใสโดยแยกกากเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงแบบต่อเนื่องและกรองผ่านไส้กรองขนาดรูกรอง 3 ไมครอน เก็บตัวอย่างจำนวน 5 ชุด ชุดละ 10 ลิตร

เครื่องกรอง

เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟนประกอบด้วย Peristaltic pump[1] และชุดไส้กรองเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน ขนาด MWCO ที่ 100,000[2] และ 500,000[3] ดาลตัน ซึ่งมีพื้นที่การกรอง 650 ตร.ซม.

การทำไวรัสให้เข้มข้น

แบ่งตัวอย่างไวรัสแต่ละชุดเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ลิตร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กรองโดยใช้เมมเบรนขนาด MWCO ที่ 100,000 ดาลตัน

กลุ่มที่ 2 กรองโดยใช้เมมเบรนขนาด MWCO ที่ 500,000 ดาลตัน

โดยตั้งค่าความเร็วรอบการหมุนของเครื่องปั๊ม เท่ากับ 260 รอบ/นาที และแรงดันเท่ากับ 5 บาร์ เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ก่อนการกรองและที่ความเข้มข้น 40 เท่า และ 100 เท่า เพื่อตรวจหาปริมาณอนุภาค 146S และปริมาณโปรตีน

---

[1] รุ่น Quixstand™ Benchtop System ของบริษัท GE Healthcare Bio-Science, USA

[2] Xampler cartride: Cat. No. UFP-100-C-4MA ของบริษัท GE Healthcare Bio-Science, USA

[3] Xampler cartride: Cat. No. UFP-500-C-4MA ของบริษัท GE Healthcare Bio-Science, USA

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างไวรัสที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน ขนาด MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน ในแต่ละชุดของแต่ละกลุ่ม มาตรวจหาปริมาณอนุภาค 146S โดยใช้วิธี 15-45 % sucrose density gradient ultracentrifugation (ไชยาและนพพร, 2543) และตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951)

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหา percent recovery (% recovery) ของอนุภาค 146S และหา percent purity (% purity) ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างไวรัสเข้มข้น ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{total amount of 146S particle in the concentrate} \times 100}{\text{total amount of 146S particle in the original volume}}$$

$$\% \text{ Purity} = \frac{(\text{total protein before concentration} - \text{total protein after concentration}) \times 100}{\text{total protein before concentration}}$$

คำนวณค่าทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน โดยวิธี student t-test

ผล

ผลการศึกษาพบว่าน้ำไวรัสก่อนการทำให้เข้มข้นด้วยการกรองมีค่าปริมาณเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ 4.08 ± 1.58 µg/ml และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 4.49 ± 3.31 mg/ml และไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 40 เท่าของ MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน มีค่าเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ 148.4 ± 3.82 µg/ml และ 156.4 ± 59.94 µg/ml ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 33.37 ± 3.79mg/ml และ 25.80 ± 4.73 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 100 เท่าของ MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน มีค่าเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ 373 ± 111.12 µg/ml และ 387.4 ± 125.76 µg/ml ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 50.00 ± 1.86 mg/ml และ 37.03 ± 2.65 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สรุปและวิจารณ์

จากผลการศึกษาการใช้เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟนพบว่า ค่า purity ของ MWCO ที่ 500,000 ทั้งความเข้มข้น 40 และ 100 เท่า มีเปอร์เซ็นต์ purity สูงกว่า MWCO ที่ 100,000 ดาลตันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับข้อมูลของ Barteling (2002) ว่าเมื่อใช้ MWCO ที่มีขนาดใหญ่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของอนุภาค 146S หลังผ่านเครื่องกรอง MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 ดาลตัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน ขนาด MWCO ที่ 500,000 ดาลตันสามารถกรองไวรัสให้มีความบริสุทธิ์มากกว่า MWCO ที่ 100,000 ดาลตัน ทั้งนี้การเลือกใช้ขนาด MWCO ต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ สภาวะในการกรอง ความบริสุทธิ์และปริมาณไวรัสที่ต้องการ รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ และถ้านำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พอสรุปได้ว่าสามารถนำเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน มาใช้ในการทำให้ไวรัสเข้มข้นได้ และสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนเพื่อปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ให้ได้มาตรฐานสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ รัชนี อัตถิ ผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปากและเท้าเปื่อยและที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ และคณะกรรมการพัฒนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ในการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขเรื่องเต็มผลงานวิชาการ ขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานห้องปฏิบัติการฝ่ายผลิตและฝ่ายทดสอบวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

ไชยา สง่าประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์ 2543 การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2): 61-71

พัฒนพงษ์ ติชะรา 2552 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ความเข้มข้นสูงโดยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้เมมเบรน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ แหล่งที่มา http://kmcenter.rid.go.th/kcresearch/km/pdf/1650/VC02668.pdf 27 พฤษภาคม 2557

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.

Crowther, J.R. 1986. Antigenic structure of foot and mouth disease virus. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 5(2): 299-314.

GE Healthcare Bio-Science. 2007. Purification technologies for vaccines and vectors. Uppsala, Sweden. pp. 12-13.

GE Healthcare Bio-Science. 2014. Cross flow filtration method handbook. Uppsala, Sweden. p.19.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.A. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1982. Vaccine Production. Proceedings in Third country training Program on foot and mouth disease control (group training course), 24 February – 16 March, Bangkok, Thailand. pp. 180-201.

World organization for animal health (OIE). 2012. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Seventh edition. Chapter 2.1.5 pp. 145-173.

Zhi-Guo, S. and Clark, K.C.. 1994. Crossflowmembrane filtration. *In* Roger, G.H.(ed.) , Protein purification process engineering. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. pp. 77-78.

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 40 เท่า

การวิเคราะห์	MWCO (ดาลตัน)	
	100,000	**500,000**
146S (µg/ml) (mean ±SD)	148.4±43.32	156.4±59.94
Total protein content (mg/ml) (mean ± SD)	33.37±3.79	25.80±4.73
% Recovery	92.98[a]	95.84[a]
% Purity	81.30[a]	85.09[b]

ตัวอักษร [a, b] ที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 100 เท่า

การวิเคราะห์	MWCO (ดาลตัน)	
	100,000	**500,000**
146S (µg/ml) (mean ±SD)	373±111.12	387.4±125.76
Total protein content (mg/ml) (mean ± SD)	50.00±1.86	37.03 ±2.65
% Recovery	93.34[a]	96.09[a]
% Purity	87.64[a]	91.45[b]

ตัวอักษร [a, b] ที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Concentration of foot and mouth disease virus by hollow fiber ultrafiltration using polysulfone membrane

Amornrat Sawatsing[1] Kingkarn Boonsuya Seeyo[2]

Abstract

The concentration of foot and mouth disease virus (FMD) virus type O_{189} by polysulfone hollow fiber ultrafiltration was studied. Clarified FMD viral fluids were concentrated by ultrafiltration using the polysulfone membrane with molecular weight cutoff (MWCO) values of 100,000 and 500,000 Daltons. The samples were collected before the ultrafiltration process and after 40 and 100 times concentrations. The quantification of 146S particles by sucrose density gradient ultracentrifugation and total protein by Lowry method were carried out to determine recovery and purity of 146S particles. The recovery of 146S particles after ultrafiltration, at 40 and 100 times concentrations, using the membrane with MWCO of 100,000 Daltons were found to be no significant difference with MWCO of 500,000 Daltons. For the purity, using MWCO 500,000 Daltons resulted in significantly higher purity than the MWCO of 100,000 Daltons. This experiment indicated that the hollow fiber ultrafiltration using polysulfone membrane with higher MWCO tend to give a better purity concentrated virus than the lower MWCO. However, the selection of an appropriate membrane pore size requires the consideration of other factors including operating conditions and the purity requirement of the final product, for further pilot scale experiment.

Key words: hollow fiber ultrafiltration, polysulfone membrane, foot and mouth disease virus

---

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

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

ความรู้และหลักการเบื้องต้นด้าน Bio-safety และ Bio- security ห้องปฏิบัติการ

(Knowledge and basic principle of laboratory biosafety and biosecurity)

สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช[1]

หลักการและเหตุผล

เนื่องจากกรมปศุสัตว์มีนโยบายในการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการให้มีขีดความสามารถในการตรวจสอบและตรวจวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพได้มาตรฐานสากลและมีความปลอดภัยทางชีวภาพทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อสอดคล้องและรองรับโรคระบาดในปัจจุบันซึ่งส่วนใหญ่เป็นโรคอุบัติใหม่ บางครั้งเป็นโรคที่เกิดอุบัติซ้ำ หรือโรคประจำถิ่นที่ระบาดอย่างต่อเนื่องซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติหรือการกลายพันธุ์ของเชื้อหรือผลกระทบจากภาวะโลกร้อนทำให้เกิดความรุนแรงและอันตรายมากขึ้น ได้แก่โรคไข้หวัดนก (Avian influenza), โรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ หรือโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด exotic เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการจัดทำระบบมาตรการความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการของหน่วยงานภายในกรมปศุสัตว์หรือ Laboratory Bio-safety and Bio-security โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความรู้และความเข้าใจในการปฏิบัติงานที่เกี่ยวกับเชื้ออันตรายได้อย่างถูกต้อง เป็นการลดความเสี่ยง เพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้ปฏิบัติงานและป้องกันการรั่วไหลของเชื้ออันตรายไปสู่ชุมชนและสิ่งแวดล้อม

Bio-safety หรือความปลอดทางชีวภาพ เป็นหลักการและวิธีปฏิบัติมาตรฐานของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการให้สามารถปฏิบัติงานกับเชื้ออันตรายได้อย่างปลอดภัย โดยมีอุปกรณ์ที่สามารถควบคุมให้เกิดความปลอดภัยและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อไม่ให้เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน

Bio-security หรือความมั่นคงทางชีวภาพ เป็นหลักการและวิธีปฏิบัติมาตรฐานด้านความปลอดภัยในการป้องกันคน สัตว์หรือสิ่งมีชีวิตให้มีความปลอดภัยจากเชื้อโรค และเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้ออันตรายมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องมีการติดตั้งระบบการควบคุมความปลอดภัยของอาคารหรือห้องปฏิบัติการอย่างสมบูรณ์ (complete microsecurity system)

---

[1] ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

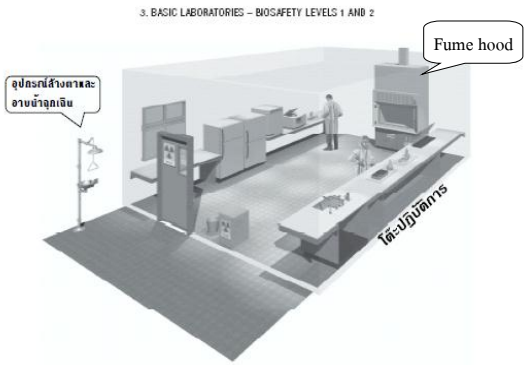
หลักการและมาตรฐานเบื้องต้นของ bio-safety and bio-security laboratory

หลักการด้านความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพเกี่ยวกับการปฏิบัติงานกับเชื้ออันตราย ประกอบด้วยอุปกรณ์สำหรับควบคุมความปลอดภัยผู้ปฏิบัติงานเช่น personnel protective equipment (PPE) ได้แก่ เสื้อกาวน์ ถุงมือ หมวก ผ้าปิดปาก แว่นตานิรภัย หรืออุปกรณ์สำหรับป้องกันเชื้อได้แก่ biological safety cabinet class II , UV light cabinet ตู้นึ่งหรืออบฆ่าเชื้อ (autoclave or hot oven) เป็นต้น

สำหรับระบบความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการหรืออาคารที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพ ต้องมีการออกแบบให้ถูกต้องตามมาตรฐานและสามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพตามหลัก Bio-security laboratory ซึ่งสามารถแบ่งระดับห้องปฏิบัติการหรืออาคารตามมาตรฐานสากล ได้ 4 ระดับ ดังนี้

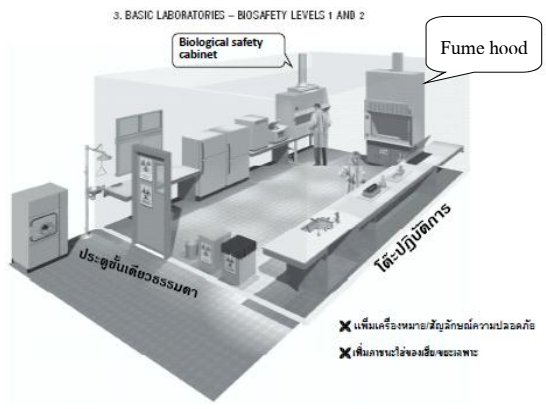
1. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ1 (Bio-safety laboratory level-1, BSL-1)

เป็นห้องปฏิบัติการที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ หรือผู้ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการเป็นแบบปิดมีประตูชั้นเดียว โต๊ะปฏิบัติงาน อ้างล้างมือ อุปกรณ์ได้แก่ Fume hood, เครื่องมือวิทยาศาสตร์เบื้องต้น, เสื้อกาวน์ ถุงมือและแว่นตานิรภัย ไม่จำเป็นต้องอาบน้ำเข้า-ออก



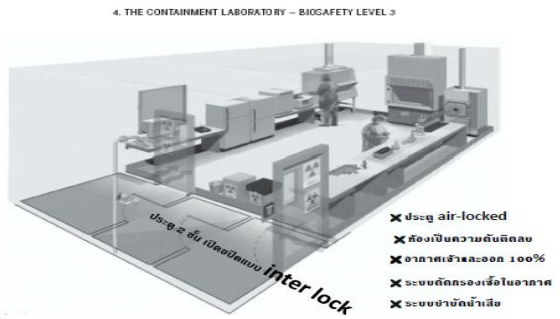
2. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (Bio-safety laboratory level-2, BSL-2)

เป็นห้องปฏิบัติการที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อที่มีความเสี่ยงปานกลาง ไม่ติดต่อโดยทางเดินหายใจ เช่น hepatitis B, Salmonella, Measles virus, toxoplasma เป็นต้น อุปกรณ์ควบคุมความปลอดภัยได้แก่ biological safety cabinet มีเครื่องหมาย biohazard บอกชื่อโรคและชื่อบุคคลที่เข้าปฏิบัติ งานในห้องนี้มีอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่จำเป็น อุปกรณ์ป้องกันได้แก่ เสื้อกาวน์ ถุงมือ แว่นตานิรภัย



3. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Bio-safety laboratory level-3, BSL-3)

เป็นห้องปฏิบัติการที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อก่อให้เกิดโรคหรือเป็นอันตรายกับมนุษย์ สัตว์หรือผู้ปฏิบัติงานและติดต่อโดยทางเดินหายใจ ระดับอันตรายเชื้ออาจเป็นอันตรายถึงชีวิตหรือเป็นโรคที่ไม่เคยมีระบาดในประเทศ เช่น FMD exotic type, Avian influenza, H5N1, H1N1 หรือ H7N9 เป็นต้น อุปกรณ์ควบคุมความปลอดภัยได้แก่ biological safety cabinet class II เครื่องมือวิทยาศาตร์ที่จำเพาะเพื่อป้องกันการแพร่กระจาย มีเครื่องหมาย biohazard เข้มงวดกับบุคคลเข้า-ออกและต้องปฏิบัติตามคู่มือการใช้ห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด ต้องแสดงชื่อผู้มีสิทธิใช้ห้องปฏิบัติการ มีการควบคุมบุคคลภายนอกเข้ามาบริเวณเขตควบคุม โดยใช้ access door หรือกุญแจเฉพาะ อาคารหรือห้องปฏิบัติการต้องมีการติดตั้งระบบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพเพื่อป้องกันการรั่วไหลเชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อม (complete microsecurity system) ได้แก่ระบบความดันติดลบ (negative pressure system), ระบบดักกรองเชื้อทางอากาศ (HEPA filter system) ที่มีประสิทธิภาพกรองไม่น้อยกว่า 99.99% ก่อนปล่อยอากาศออกนอกอาคาร, ระบบจ่ายอากาศเข้า-ออก 100% ต้องไม่มีการดึงอากาศภายในกลับเข้ามาใช้ใหม่, ระบบบำบัดน้ำเสีย (biowaste treatment) ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อก่อนปล่อยออกนอกอาคาร, ผู้ปฏิบัติงานต้องเปลี่ยนชุดปฏิบัติการแบบ 100% และต้องอาบน้ำ สระผมก่อนออกนอกพื้นที่เขตควบคุม, มีประตูเข้า-ออกเป็นแบบ air-locked system สำหรับควบคุมและรักษาความดันติดลบให้คงที่

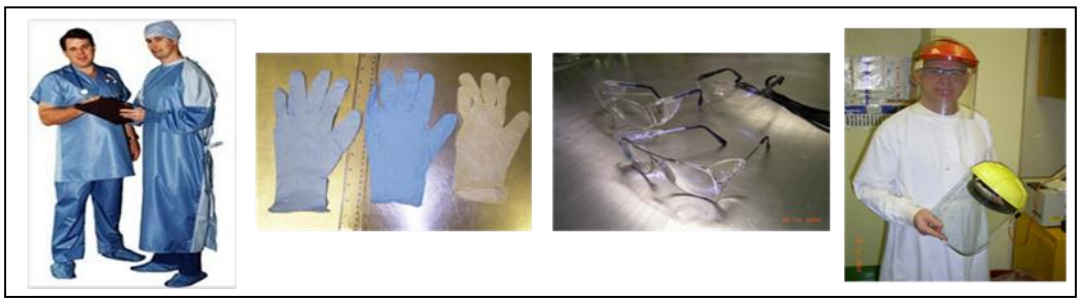


ภาพระบบ microsecurity อาคาร BSL3 ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ได้แก่ ระบบจ่ายอากาศเข้า-ออก ระบบดักกรองเชื้อทางอากาศ ระบบบำบัดน้ำเสีย อุปกรณ์ฆ่าเชื้อต่างๆ เช่น pass box, dunk tank และ 2-door autoclave เป็นต้น

4. ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4 (Bio-safety laboratory level-4, BSL-4)

เป็นห้องปฏิบัติการที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อที่ก่อโรคหรือเป็นอันตรายถึงชีวิตและมีโอกาสติดผู้ปฏิบัติงานได้สูง ได้แก่โรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์ เช่น NIPPA, SARS เป็นต้น อุปกรณ์ที่ควบคุมความปลอดภัยได้แก่ ตู้ isolator และต้องอยู่ในพื้นที่ความดันติดลบสูงกว่าปกติ พร้อมอุปกรณ์ฆ่าเชื้ออยู่ภายในเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะเพื่อป้องกันการกระจายเชื้อ ชุดปฏิบัติการพิเศษป้องกันการติดเชื้อระหว่างปฏิบัติงาน มีการฉีดพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อเสื้อผ้าผู้ปฏิบัติงานและต้องอาบน้ำและเปลี่ยนชุดใหม่ก่อนออกนอกพื้นที่ปฏิบัติงาน

ตัวอย่างเครื่องหมาย Biohazard, ตู้ isolator และชุดปฏิบัติการพิเศษสำหรับเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ BSL4 (แหล่งรูปภาพ: Australian Animal Health Laboratory, AAHL, ออสเตรเลีย)



ตัวอย่างอุปกรณ์ควบคุมความปลอดภัยผู้ปฏิบัติงาน (Personnel Protective Equipment, PPE) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (แหล่งรูปภาพ : Australian Animal Health Laboratory, AAHL, ออสเตรเลีย)

เอกสารอ้างอิง

- Biosafety in microbiological and Biomedical Laboratories, CDC , NIH, 4th Edition 1999.
- Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition, World Health Organization (WHO), Geneva, 2004.

“เข็มในกองฟาง”

ความรู้ที่แฝงในตัวบุคคลเปรียบเหมือนเข็มที่ซ่อนอยู่ในกองฟาง
ถ้าค้นหาพบและนำออกมาใช้ก็สามารถก่อประโยชน์ได้

ความรู้ที่มีอยู่ในตัวคน ถ้าไม่มีการนำออกมาเปิดเผย ถ่ายทอด แลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างกัน ในที่สุดความรู้ก็จะสูญหายไปพร้อมตัวคนนั้น

ความรู้ที่ขาดการจัดเก็บอย่างมีระบบ และไม่มีการนำความรู้นั้นไปใช้ประโยชน์ในการปฏิบัติงาน ความรู้นั้นก็จะไม่ยั่งยืน

การทำเครื่องหมายหนูไมซ์ด้วยวิธีง่ายๆ

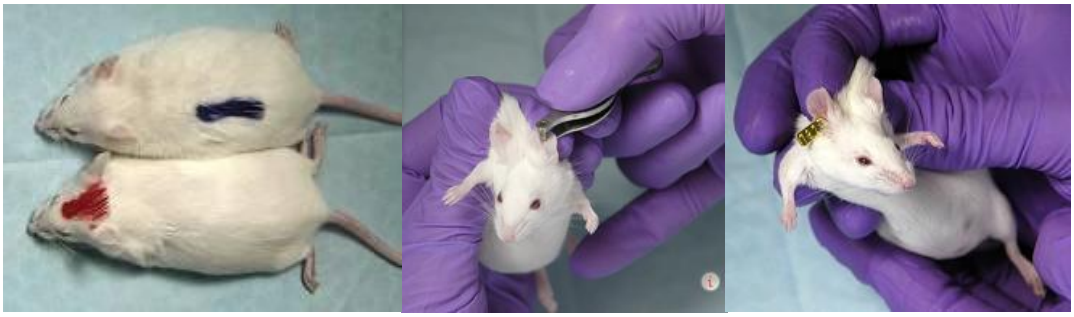
(Simple method for mouse identification)

สพ.ญ.รัชนี อัตถิ[1]

การทดสอบคุณภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เช่น การทดสอบความปลอดภัย และความคุ้มโรคของวัคซีน ส่วนใหญ่วิเคราะห์ผลโดยการนับจำนวนสัตว์ทดลองที่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อวัคซีนเป็นอัตราหรือเปอร์เซ็นต์สัตว์รอด หรือตาย หรือแสดงอาการป่วยจากจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมักใช้สัตว์ทดลองขนาดเล็กเช่น หนูไมซ์ หนูตะเภา เป็ด หรือไก่ จึงไม่จำเป็นต้องทำเครื่องหมายที่ตัวสัตว์ เพียงแต่มีป้ายชื่อระบุเป็นกลุ่มทดลองติดที่กรงหรือคอก แต่บางการทดลอง เช่น การติดตามระดับภูมิคุ้มโรค ที่ต้องเจาะเลือดเป็นระยะ และต้องใช้ผลการทดลองรายตัว จำเป็นต้องทำเครื่องหมายที่ตัวสัตว์ เช่น เป็ด ไก่ ใช้วิธีหนีบเบอร์ที่ปีก ซึ่งมักไม่ค่อยมีปัญหาอะไร เพราะมีการใช้บ่อย จึงมีอุปกรณ์พร้อม แต่สำหรับหนูไมซ์ซึ่งในสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ยังไม่เคยมีการทดลองที่ต้องติดตามผลเป็นรายตัวมาก่อน จึงต้องหาวิธีทำเครื่องหมายที่เหมาะสม

วิธีทำเครื่องหมายที่ตัวหนูไมซ์มีหลายวิธี ดังนี้

1. การแต้มสี
2. การเจาะรูใบหู
3. การติดเบอร์หู
4. การฝังไมโครชิบ
5. การสัก

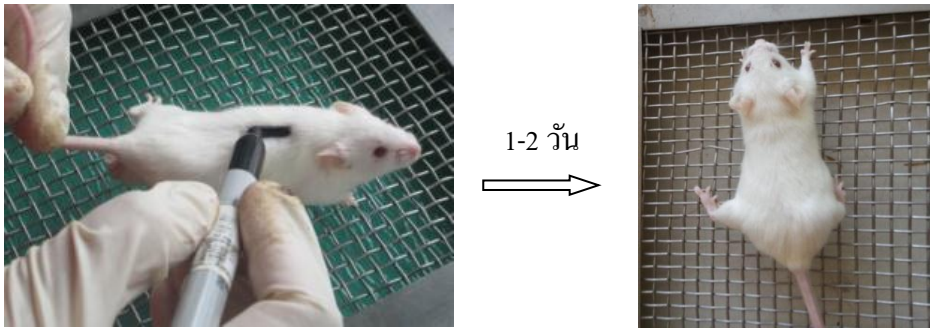


[1] ผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

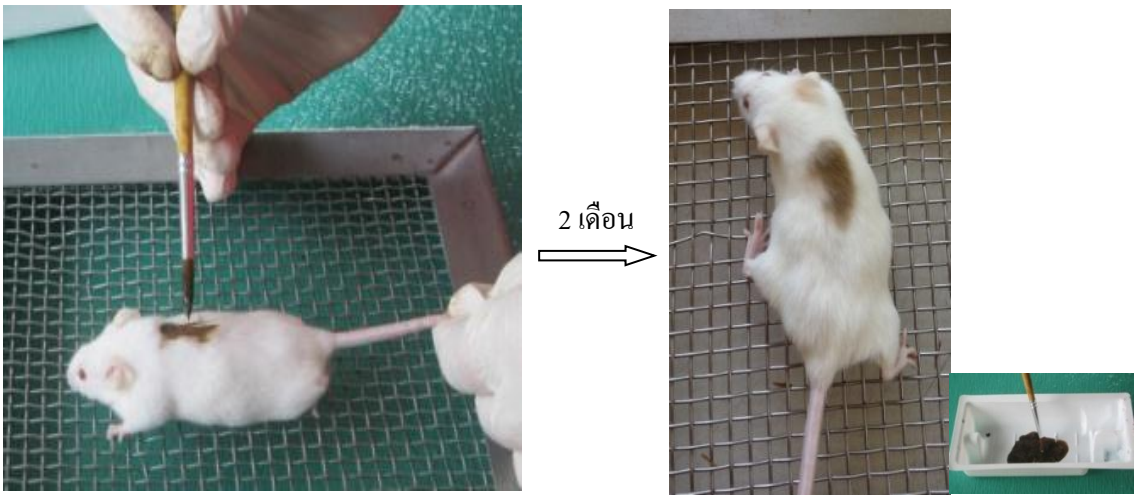
ที่มา:http://www.theodra.com/rodent_laboratory/identification.html

จากวิธีที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดต้องใช้อุปกรณ์ทั้งสิ้น แต่วิธีที่ 1 การแต้มสี ใช้อุปกรณ์ที่หาง่ายกว่าวิธีอื่น เพียงแต่เลือกว่าจะใช้อะไรมาแต้มสีที่จะทำให้สีติด เดิมใช้ปากกา permanent marker ซึ่งใช้ในห้องแลปทั่วไป นำมาเขียนที่หลัง ขาหน้าและขาหลัง ตามแต่กำหนดรหัสว่าแต้มสีที่ตำแหน่งใดอ่านเป็นหมายเลขอะไร แต่สีที่เขียนด้วย permanent marker ไว้ติดอยู่เพียงวันเดียวสีก็จางหายไปหมดทำให้เกิดปัญหาในการทดลอง จึงแก้ปัญหาเฉพาะหน้าโดย แต้มสีทับทุกวัน ซึ่งทำให้ยุ่งยากและเสียเวลามาก

ต่อมามีโอกาสคุยกับเพื่อนร่วมอาชีพชาวไต้หวัน ซักถามกันไปมาในวงสนทนาก็ได้ความรู้ว่า เขาใช้ Picric acid แต้มสีที่ขนหนูไมซ์ เป็นสีเหลือง สีติดทนนานหลายเดือน แต่ก็ต้องจัดหาซื้อมาเพราะห้องแลปของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ไม่ได้ใช้สารนี้เลย เพื่อนอีกคนเล่าว่าเคยมีคนเอายาย้อมผมของคนนี่แหละมาทำเครื่องหมายที่ตัววัว หรือหมู จึงเกิดความคิด หายาย้อมผมมาใช้บ้างซึ่งก็ได้ผลดีมาก เพราะขนของสัตว์ก็เหมือนผมคนนั่นเอง หลังจากนั้นก็ใช้ยาย้อมผมของคนยี่ห้อที่เป็นครีมในซองเล็กๆเพราะราคาไม่แพง นำมาแต้มสีทำเครื่องหมายที่ตัวหนูไมซ์ได้เป็นร้อยตัว สีติดทนนานตลอดการทดลองประมาณ 2 เดือน และหากสีเริ่มจางก็เติมสีได้ตลอดเวลา ซึ่งปัจจุบันยังคงทำเครื่องหมายหนูทดลองด้วยการใช้ยาย้อมผมนี้อยู่เพราะสะดวกและปลอดภัย ไม่ทำให้หนูทดลองเจ็บปวด



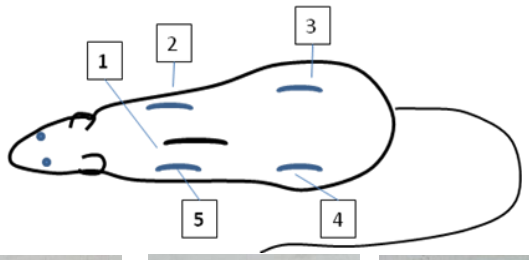
การใช้ permanent marker สีจางหายภายใน 1-2 วัน

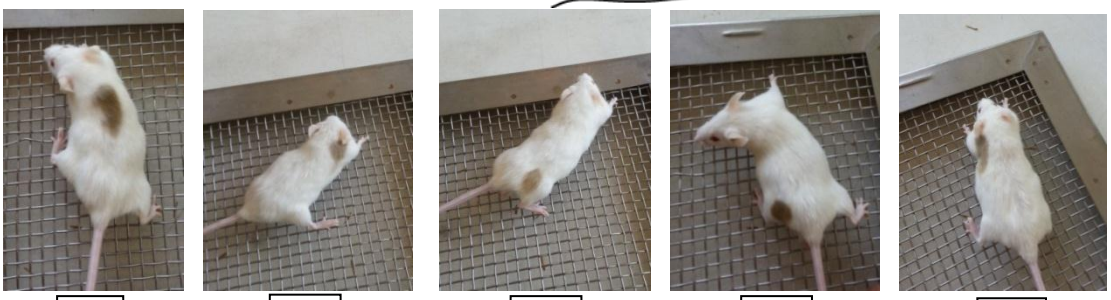


การใช้ยาย้อมผมแต้ม สีติดทนนานอย่างน้อย 2 เดือน

การทำเครื่องหมายส่วนใหญ่จะใส่หนูขาวในกล่อง ๆละ 5 ตัว ดังนั้นทำเครื่องหมายตัวหนูขาวในกล่องโดยแต้มยาย้อมผมที่หนูไมซ์บนตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 5 ตำแหน่งเท่านั้น ผนวกกับเลขกำกับเบอร์กล่องแต่ละกล่องก็สามารถระบุตัวหนูไมซ์ในการทดลองได้อย่างไม่สับสนแล้ว ด้วยวิธีง่ายๆ ค่าใช้จ่ายไม่แพง

ตัวอย่างการกำหนดรหัสประจำตัวหนู





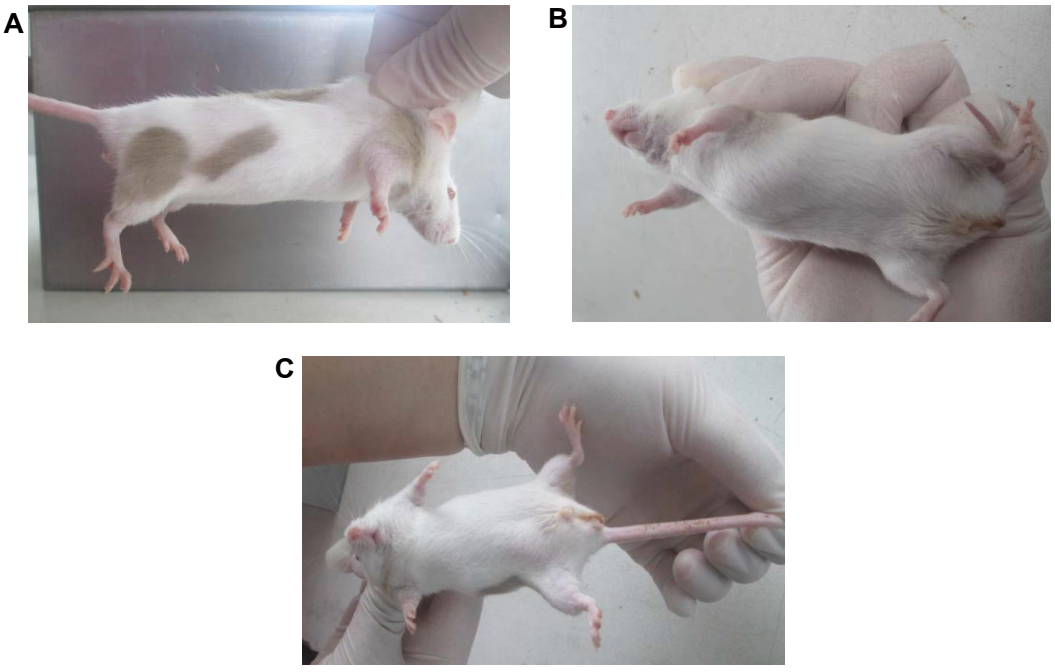
.....

หลอดกักหนูไมซ์อย่างง่าย !!!

(Simple mouse restrainer)

อารีรัตน์ แพงเพ็ง[1]
สพ.ญ.วราพร สินสุวงศ์วัฒน์[1]

ปกติเราจะคุ้นเคยกับการควบคุมหนูด้วยมือ โดยการจับหนังคอและล็อคหางหนู แต่บางครั้งการควบคุมหนูก็ไม่ง่ายอย่างที่คิด โดยเฉพาะมือใหม่หรือมือเก่าแต่ห่างหาย มักจะบีบหนังคอหนูไม่อยู่และจะโดนหนูแว้งกัดได้บ่อยครั้ง หรือบางครั้งบีบหนังคอผิดตำแหน่ง หนูอาจหายใจไม่ออกและสิ้นใจคามือได้



ภาพตัวอย่าง เทคนิคการจับหนูด้วยมือเปล่า โดยการดึงหนังคอและล็อคหางหนู

ด้วยปัญหาดังกล่าว “หลอดกักหนูอย่างง่าย” จึงถูกทำขึ้นเพื่อช่วยในการควบคุมหนูไมซ์ขณะปฏิบัติงานเจาะเลือด หรือฉีดวัคซีน โดยหลอดนี้สามารถช่วยลดความเจ็บปวด ความเครียดของหนู จากการบีบจับ และยังสามารถช่วยป้องกันผู้ปฏิบัติงานจากการโดนกัด

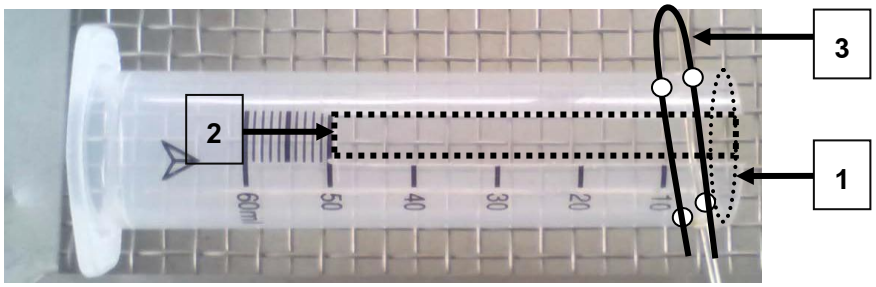
[1] กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

หลอดกักหนู ถูกทำขึ้นจากวัสดุง่ายๆ ดังนี้

1. กระบอกฉีดยา ขนาด 60 มล.
2. มีดคัตเตอร์
3. ปากกา
4. ลวดยาว 15 ซม. หรือลวดหนีบกระดาษใหญ่

มีวิธีการทำ 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ตัดส่วนปลายให้เป็นช่องเปิด
2. ตัดตามแนวยาวของหลอดให้เป็นช่องสีเหลี่ยมผืนผ้าขนาด ประมาณ 5X1 ซม.
3. เจาะรูที่ปลายหลอดด้านช่องเปิด เพื่อใช้สอดลวดสำหรับกั้นหนู

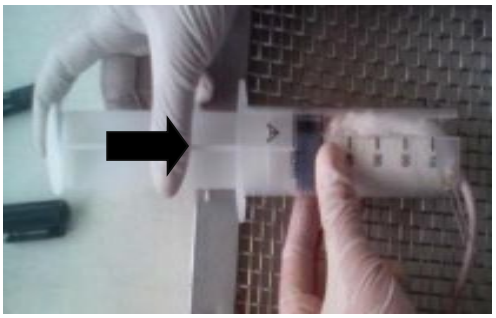


วิธีการใช้งานหลอด

1. จับหนูที่ส่วนปลายหาง และวางหนูไว้บนโต๊ะหรือฝากรง

2. ปล่อยหนูให้วิ่งเข้าหลอดกัก

3. สอดลวดผ่านรู เพื่อกั้นหนูไว้ จากนั้นดันก้านหลอดลงเพื่อให้ช่องพอดีกับตัวหนู

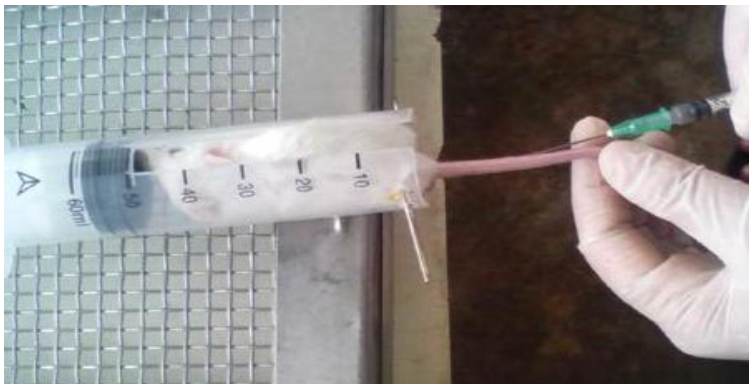


ตัวอย่างการใช้งานหลอดกักหนูอย่างง่าย

1. การฉีดยาเข้าใต้ผิวหนัง ดึงหนังที่หลังของหนู ผ่านช่องที่เจาะตามแนวหลอด

2. การฉีดยาเข้ากล้าม ดึงขาหลังของหนูออกมาทางช่องที่เจาะตามแนวหลอด

3. การเจาะเลือดที่หาง



ข้อเสนอแนะ

สามารถนำแนวคิดของ “หลอดกักหนู” ไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น หนูตะเภา กระต่าย เป็นต้น ทั้งนี้ควรคำนึงถึงขนาดท่อกักให้เหมาะสมกับขนาดสัตว์ เพื่อไม่ให้สัตว์เครียด และอึดอัดเกินไป

••