# P.F.U.

โดย

**กมล อวัยวานนท์ สพ.บ.**

กองวัคซีนและเซรัม, กรมปศุสัตว์

□ □

คำว่า P.F.U. นี้เป็นคำที่คุ้นเคยกันดีในหมู่สัตวแพทย์เราที่ทำงานทางห้องปฏิบัติการ แต่ออกจะแปลกหรือใหม่ สำหรับสัตวแพทย์ที่ทำงานทางด้านสาขาอื่น ๆ แต่ถ้าได้เป็นสัตวแพทย์แล้วไม่ว่าจะทำงานด้านใด วันดีคืนดีแล้วก็อาจจะต้องไปเจอเจ้าคำ ซึ่งประกอบด้วยอักษร 3 ตัวนี้เข้าจนได้ ผมเองสมัยเป็นนักเรียนก็ไม่เคยเจอกันมาก่อน ไปพบและรู้จักกับมันเข้าก็ตอนไปทำงานอยู่ในห้องแล็ป ก็เลยถือโอกาสซึ่งผมหนีท่านสารา ฯ ไม่พ้นนี้แนะนำมันให้รู้จักกับพี่น้องสัตวแพทย์เรา สำหรับท่านที่คุ้นเคยกับมันดีแล้วก็ได้ โปรดกรุณาผ่านเลยไปเถอะครับ

P.F.U. เป็นคำย่อมาจากคำเต็มว่า Plaque Forming Unit เป็นหน่วยกำหนดชนิดหนึ่งซึ่งใช้วัดความรุนแรง หรือ ไตเตอร์ของเชื้อไวรัส หน่วยความแรง P.F.U. นี้ จะหาหรือวัดออกมาได้ จะต้องใช้ Tissue Culture หรือเซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดแก้ว หรือ จานแก้วเท่านั้น ผิดกับหน่วยความรุนแรง 50% ที่เราคุ้นเคยกันมา ซึ่งเราอาจวัดหรือหาออกมาได้ โดยใช้สัตว์ทดลอง หรือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดแก้ว แล้วคำนวณค่าออกมาโดยอาศัยสูตรของ Reed And Muench หรือสูตรของ Behrens–Karber ก็จะได้ค่าความรุนแรงของเชื้อไวรัสออกมาเป็นหน่วย 50% เช่น $ID_{50}$ หรือ $LD_{50}$ หรือ $TCID_{50}$ เป็นต้น ซึ่งค่าความรุนแรง 50% นี้ หมายความว่าถ้าใช้เชื้อไวรัสหนึ่งหน่วยดังกล่าวนี้ ฉีดเข้าไปในสัตว์หรือ

เซลล์ชนิดนั้น 100 ตัว หรือ 100 หลอด จะทำให้สัตว์หรือเซลล์ดังกล่าวแสดงอาการ หรือตาย 50 ตัว หรือ 50 หลอด คือจะตายหรือแสดงอาการ 50% ของทั้งหมด โดยที่หนึ่งหน่วย 50% นั้น อาจจะประกอบด้วยเชื้อไวรัสเท่าไรก็ได้ ซึ่งก็จะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของสัตว์ทดลอง

ในการปฏิบัติงานทั่ว ๆ ไป ก็นิยมใช้หน่วย 50% นี้ ในการวัดหาความรุนแรงของเชื้อไวรัส ทั้งนี้เพราะสะดวกและง่ายในการปฏิบัติ แต่ในงานวิจัย หรืองานทดลองที่ต้องการความละเอียด ถูกต้อง แน่นอน ก็มักจะนิยมใช้หน่วย P.F.U กันส่วนมาก ทั้งนี้และทั้งนั้นก็เพราะว่า หน่วย P.F.U. นั้น เป็นที่ยอมรับกันว่า เป็นหน่วยสำหรับใช้วัดความรุนแรงของเชื้อไวรัส ได้ถูกต้องและละเอียดที่สุด หรือจะพูดว่ามันเป็นหน่วยทาง Statistic มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วย 50% ก็ได้

คำว่า Plaque แปลตามตัวก็ว่า Lesion หรือบริเวณ หรือรอยวิการ P.F.U. จึงหมายถึงหน่วยซึ่งทำให้เกิดวิการขึ้น ซึ่งฟังดูแล้วก็ไม่ทำให้เข้าใจอะไรดีขึ้นเลย จะทำให้เข้าใจง่ายขึ้นถ้าจะพูดว่า ความหมายที่แท้จริงของ P.F.U. นั้น หมายถึง Particle หรืออาจจะพูดว่าตัวของเชื้อไวรัสดังนั้น หนึ่ง P.F.U. ก็หมายถึงเชื้อไวรัส หนึ่ง Particle หรือหนึ่งตัว เช่นตัวอย่างเขาบอกมาว่า เชื้อไวรัสนี้มีความรุนแรง หรือ ไตเตอร์ เท่ากับ $10^8$ P.F.U./c.c. ก็หมายความว่าเชื้อไวรัสนั้น ในหนึ่ง ซี.ซี. มีเชื้อไวรัสอยู่ $10^8$ Particle หรือ $10^8$ ตัว หรือเท่ากับ 100 ล้านตัว หรืออาจจะไปพบว่า วัคซีนชนิดนี้ในหนึ่งโด๊ส ประกอบด้วยเชื้อไวรัสเท่านั้นเท่านี้ P.F.U. ก็หมายความว่าในหนึ่งโด๊สของวัคซีนชนิดนั้น ประกอบด้วยเชื้อไวรัสเท่านั้นตัว

หน่วย P.F.U. เขาได้มาอย่างไร ? และทำไมถึงหมายถึงตัวของเชื้อไวรัส ? ก่อนจะพูดถึงเรื่องนี้ ผมต้องขอออกตัวก่อนว่าที่เขียนมานี้เป็นทำนองเล่าสู่กันฟังเท่านั้น ถ้าต้องการรายละเอียดทั้งหลายต้องขอให้ไปค้นหาเอาในตำรา ผมเองนั้นพูดไปแล้วก็แค่หางอึ่งเท่านั้น ที่อาจหาญมาเขียนเรื่องทำนองนี้ก็นับว่ากล้าหาญชาญชัยเต็มทนแล้ว

การทำ P.F.U. นั้น ความจริงก็คล้ายหรือดัดแปลงมาจากการทำ Bacterial Count นั่นเอง โดยดัดแปลงเทคนิคให้สามารถใช้กับเชื้อไวรัสได้แทบทุกชนิด ซึ่งผมจะนำมาเล่าให้ฟังคร่าว ๆ ดังนี้

Plaque Assay Method นั้น มีวิธีการทำ 2 วิธี ด้วยกัน คือ Monolayer Method และ Agar Cell–Suspension Method ซึ่งโดยหลักใหญ่ ๆ แล้วก็อาศัยหลักอันเดียวกัน แต่ต่างกันในทางเทคนิคปลีกย่อยเท่านั้น ดังนั้นผมจะพูดถึงเฉพาะ Monolayer Method เท่านี้ เพื่อให้เข้าใจความหมายและที่มาของคำว่า P.F.U.

วิธีการในขั้นแรกนั้น จะต้องเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเป็น Monolayer Sheet ขึ้นมาในขวดก่อน เมื่อได้เซลล์มาแล้ว ก็นำเชื้อไวรัสที่ต้องการหาค่าความรุนแรง มาทำเป็น Dilution เช่น $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$,.....ฯ แล้วก็นำขวดเซลล์ที่เตรียมไว้ดังกล่าวแล้ว มาดูดเอาน้ำยาเลี้ยงออก และทำการล้างเซลล์ด้วย Buffer ต่อไป ก็นำไวรัส Dilution มาฉีดเข้าในขวดเซลล์ อาจจะใช้ 3 หรือ 5 ขวด ต่อ Dilution เมื่อใส่ไวรัสแล้วเขย่าขวดเบา ๆ เพื่อให้เชื้อไวรัสกระจายไปทั่วพื้นเซลล์บนขวด แล้วนำไปตั้งในตู้อบ 37°C. นาน 30 นาที เพื่อให้เชื้อไวรัสดูดซึมเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นนำมาดูดเอาของเหลวในขวดออกให้หมด แล้วล้างเซลล์ด้วย Buffer อีกครั้ง ต่อมาก็เอา Agar ผสม Medium ใส่ลงไป Agar ที่ใช้จะต้องใช้ Agar บริสุทธิ์ เช่น Noble Agar ที่ใช้ทำเป็น 2 หรือ 3% Agar ผสมกับ Medium 50 ต่อ 50, Agar นั้น ถ้าอุณหภูมิต่ำก็จะแข็งตัว ฉะนั้น จะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 40—45 °C. จึงจะสามารถดูดด้วย Pipette ใส่เข้าไปในขวดเซลล์ได้ และถ้าอุณหภูมิสูงกว่าที่กล่าวนี้เมื่อใส่เข้าไปก็อาจจะทำให้เซลล์ตายได้ เพราะความร้อน Medium ที่ใช้ผสมกับ Agar จะต้องใช้เข้มข้นเป็น 2 เท่าของปกติ เพราะเมื่อผสมกับ cells แล้วจะทำให้มี Isotonic Balance พอดี

วัตถุประสงค์ในการใช้ Agar นั้น ก็เพื่อจะเป็นตัวป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสที่ดูดซึมเข้าสู่เซลล์ตรงไหนแล้ว เมื่อแตกลูกแตกหลานออกมามากมาย จะไม่สามารถ Diffuse หรือ

กระจัดกระจายไปได้ ทั้งนี้ ก็เพราะว่าเมื่อใส่ Agar ผสม Medium ลงไปแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที อุณหภูมิก็จะลดลง Agar ก็จะแข็งตัว Coat อยู่บนพื้นหน้าเซลล์ทั้งหมด ในภาวะที่เป็นของแข็งเช่นนี้ เชื้อไวรัสที่เกิดขึ้นก็จะกระจัดกระจายไปไม่ได้ จึงเท่ากับเป็นการบังคับให้เชื้อไวรัสที่เกิดขึ้นจากไวรัสตัวแรกที่ใส่ลงไปนั้น เกาะกินเฉพาะเซลล์ที่อยู่ติด ๆ กันโดยรอบ จึงทำให้เกิดบริเวณเซลล์ตายขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ

ส่วน Medium นั้น ก็ทำหน้าที่เป็นอาหารสำหรับเซลล์ที่ยังไม่ถูกเชื้อไวรัสทำลายให้มีชีวิตต่อไปจนตลอดการทดลอง ซึ่งจะกินเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งบริเวณที่เซลล์ถูกทำลาย หรือ Plaque ที่กล่าวถึงข้างต้นนั้น ก็จะขยายใหญ่ขึ้นจนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากนั้นก็นำขวดเซลล์มาย้อมด้วยสีพวก Vital Stain เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะติดสี ส่วนบริเวณเซลล์ตายก็จะใหญ่จนสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า มันเกิดจากฝีมือของไวรัสจำนวนมากมาย อันเกิดจากไวรัสต้นตอที่ใส่เข้าไปนั้นตัวเดียว ดังนั้นจึงทำให้เราสามารถคำนวณย้อนกลับไปหาไวรัสต้นตอที่นำมาหาค่าความรุนแรงได้ว่า ในหนึ่ง ซี.ซี. มีกี่ P.F.U. หรือกี่ตัว สูตรสำหรับคำนวณหาก็มีอยู่ว่า

$$\text{P.F.U./C.C.} = \frac{\text{จำนวน Plaques ที่นับได้.}}{\text{ปริมาตรที่ใส่ต่อขวด} \times \text{Dilution}}$$

Plaques ที่เกิดจากไวรัส Dilution ต่ำ ๆ ก็จะมีจำนวนมากมายและอาจจะเหลื่อมซ้อนกัน นับจำนวนได้ยาก ก็คัดทิ้งไปไม่นำมาใช้ในการคำนวณ จำนวน Plaques จาก Dilution เดียวกันหลาย ๆ ขวด ก็นำมาหาเอาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปใช้ในการคำนวน โดยละเอียดแล้วเขาจะมีกำหนดให้ว่าขวดขนาดนั้น จะต้องมีจำนวน Plaques เท่านั้นถึงเท่านั้น จึงจะมีค่าความผิดพลาดเท่านั้นเท่านี้เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะจำเป็นสำหรับผู้ที่ปฏิบัติงานทางด้านนี้โดยตรงเท่านั้น

ในปัจจุบัน ได้มีผู้ดัดแปลงเทคนิคในการทำ Plaques โดยใช้สารอย่างอื่นแทน Agar ซึ่งมีความยุ่งยากในการควบคุมอุณหภูมิดังกล่าวแล้ว สารที่นำมาใช้ก็คือสารพวก Methyl Cellulose ซึ่งเมื่อละลายแล้วจะเป็นของเหลวที่มีความหนืดมาก สามารถควบคุมให้

ไวรัส Form Plaques โดยไม่กระจัดกระจายดังกล่าวแล้วได้ แต่ในระหว่าง 72 ชั่วโมงนั้น จะไปเคลื่อนไหวไม่ได้ เพราะมันไม่ Fix แน่นเช่น Agar

การทำ Plaque นั้น นอกจากจะเป็นการ Titrate เชื้อไวรัสแล้ว ยังเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการ Purified เชื้อไวรัสได้อีกด้วย โดยการแยกเชื้อไวรัสจากแต่ละ Plaques นั้นมาเลี้ยง ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างกว้างขวางในการค้นคว้าการผลิตวัคซีนไวรัสเชื้อเป็น ไวรัสแต่ละอย่างแต่ละชนิดนั้นจะ Form Plaque ซึ่งมีขนาดและรูปร่างต่าง ๆ กันไป เป็นลักษณะเฉพาะของมัน เรื่องของ P.F.U. ก็ END เพียงเท่านี้.