การใช้เซลชนิดแขวนลอยสำหรับการผลิตวัคซินป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย: มาตรการสำหรับการประเมินผลของเซล, ไวรัสและวัคซิน

THE USE OF SUSPENSION CULTURE OF FMD VACCINE PRODUCTION: CRITERIA FOR THE EVALUATION OF CELLS, VIRUS AND VACCINE

สุทธิพจน์ ชมเฟื่องแก้ว ปนันท์ ธนเจริญวัฒน์ สมใจ กมลศิริพิชัยพร

Suthipojana Chomfuangkaew Panun Thanacharoenwat Somjai Kamolsiripichaiporn

ศูนย์ผลิตวัคซินป้องกันโรคปากและเจ้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ หนองสาหร่าย ปากช่อง นครราชสีมา 30130 (โทร. 311592)

FMD Vaccine Production Center, Department of Livestock Development, Nongsarai, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130 (Tel. 311592)

Abstract

Problems which concerned with the cell suspension culture for the production of FMD vaccine are stimulated to have a discussion. Introductory remarks are made on the following topics ;

1. terminology,

2. suspension cell lines that used for FMD vaccine production,

3. FMD virus which produced according to the cell suspension technique and correlation existing between in vitro test and antigenicity in domesticated laboratory animals,

4. FMD vaccine produced from virus cultivated on cell suspension.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลชนิดแขวนลอย (cell suspension culture) เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย ได้กระตุ้นให้เกิดความคิดที่จะพยายามกำหนดมาตรการสำหรับ

1. ความหมายของศัพท์ทางวิชาการที่ใช้อยู่ในขณะนี้
2. ลักษณะเฉพาะของเซลชนิดแขวนลอย ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย
3. ลักษณะเฉพาะของไวรัสที่ผลิตได้จากเซลชนิดแขวนลอย และสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างการทดสอบในห้องทดลองกับในสัตว์ทดลอง
4. ลักษณะเฉพาะของวัคซีนที่ผลิตจากไวรัส ที่เจริญมาจากเซลชนิดแขวนลอย

คำนำ

เนื่องจากมีเซลสายพันธุ์ (cell line) ที่ไว (susceptible) ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และสามารถเจริญได้ในสภาพแขวนลอย (suspension culture) ซึ่งสามารถผลิตเซล, ไวรัสหรือวัคซีนได้เป็นจำนวนมาก ทำให้เป็นที่ยอมรับว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เจริญในเซลหลายหลาก (heteroploid cell) หลังทำให้อ่อนกำลังลงด้วยฟอร์มาลิน (formalin) หรือสารอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ได้กระตุ้นให้หลายประเทศพยายามที่จะปรับปรุงระบบของการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีนี้ ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า การใช้เซลสายพันธุ์มีข้อได้เปรียบมากมายในการเพิ่มผลผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่เนื่องด้วยมีการใช้เซลชนิดแขวนลอยในสภาพต่าง ๆ กันในแต่ละแห่งของแต่ละประเทศ ทำให้เกิดปัญหาซึ่งเน้นหนักในด้านความต้องการต่ำสุด (minimum requirements) สำหรับเซลสายพันธุ์และมาตรการในการที่จะยอมรับวิธีการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยและวัคซีน ซึ่งผลิตด้วยเซลชนิดแขวนลอยนี้ ซึ่งความต้องการต่ำสุดและมาตรการสำหรับวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย นอกจากจะประกอบด้วยความคุ้มโรค (potency), ความปลอดภัย (safety) และความบริสุทธิ์ (sterility or

purity) แล้ว ยังต้องไม่มีคุณสมบัติสามารถทำให้เกิดเนื้องอก (tumorigenicity or oncogenicity) และสภาวะของภูมิแพ้ (allergy) อีกด้วย

ความหมายของศัพท์ทางวิชาการ (terminology)

ก่อนที่จะกล่าวถึงหัวข้อคุณลักษณะ (characteristic) ของเซล เราจำเป็นที่จะต้องทำให้ความขัดแย้งในความหมายของศัพท์ทางวิชาการหมดไปเสียก่อน โดยที่เราจะยึดถือบรรทัดฐานของ Tissue Culture Association (Fedoroff, 1967) สำหรับคำต่อไปนี้

1. เซลสายพันธุ์ (cell line)

เซลสายพันธุ์คือเซลที่เกิดขึ้นมาจากเซลปฐม (primary culture) ในการเพาะเลี้ยงเซลต่อครั้งแรก ดังนั้นเซลสายพันธุ์ก็คือ เซลเพาะเลี้ยงที่ประกอบขึ้นด้วยเซลสายพันธุ์ที่สืบสายต่อเนื่องจากเซลปฐม

2. เซลสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นไว้ (established cell line)

หมายถึงเซลสายพันธุ์ที่สามารถที่จะเพาะเลี้ยงได้ต่อไปเรื่อย ๆ ในหลอดทดลอง (in vitro)

3. พันธุ์ของเซล (cell strain)

พันธุ์ของเซลหรือชนิดของเซล สามารถที่จะเกิดมาจากเซลปฐมหรือเซลสายพันธุ์ หรือการเพิ่มจำนวนเซลจากเซลเดียวด้วยระบบไร้เพศ (cloning) โดยการคัดเลือก (selection) เซลที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว (specific properties) หรือมีเครื่องหมายเฉพาะตัว (specific marker) และคุณสมบัติหรือเครื่องหมายนั้นจะต้องคงอยู่ตลอดการเพาะเลี้ยงจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นต่อ ๆ ไป

4. พันธุ์ย่อยของเซล (substrain)

พันธุ์ย่อยของเซลสามารถที่จะเกิดจากพันธุ์เซล (strain) โดยการแยก (isolation) มาเพียงเซลเดียว (single cell) หรือเป็นกลุ่มของเซล (groups of cell) ที่มีคุณสมบัติหรือเครื่องหมายต่างไปจากเซลอื่น ๆ ในพันธุ์เซลนั้น

5. การเพิ่มจำนวนจากเซลเดียว (clone)

คือจำนวนของเซล (population of cells) ที่เกิดมาจากเซลเพียงเซลเดียวด้วยการแบ่งตัวแบบ *mitoses* แต่ก็ไม่จำเป็นที่จะต้องเป็นเซลชนิดเดียวกันหมด (homogeneous) ดังนั้นคำว่า

clone หรือ cloned ก็ไม่ได้บ่งชี้ว่าจะต้องเป็นเซลที่เหมือนกันหมดในกลุ่มเซลนั้น (cell population)

สำหรับคำต่อไปนี้จะถือตามบรรทัดฐานของ U.S. Department of Agriculture, Veterinary Biological Division ซึ่งกำหนดไว้เมื่อปี ค.ศ. 1970

1. คุณสมบัติที่สามารถทำให้เกิดเนื้องอก (tumorigenicity)

คือความสามารถของเซลที่จะเพิ่มจำนวน (multiply) ที่บริเวณที่เราฉีดเข้าไปในสัตว์ ดังนั้นมันจะก่อให้เกิดก้อนเนื้องอกที่กำลังเจริญเติบโต (growing tumors) ส่วนการทดสอบสำหรับคุณสมบัติที่สามารถทำให้เกิดเนื้องอกก็ทำได้โดยการฉีดเซลที่ยังมีชีวิตอยู่เข้าไปในสัตว์

2. คุณสมบัติที่สามารถทำให้เกิดเนื้องอก (oncogenicity)

คือความสามารถของตัวกระทำ (agent) ซึ่งอาจจะเป็นไวรัสหรือชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของเซลที่เหนี่ยวนำ (induce) ให้เกิดเนื้องอก (tumors) ในสัตว์ที่ใช้ทดลอง และการทดสอบสำหรับคุณสมบัติที่สามารถทำให้เกิดเนื้องอก ก็สามารถกระทำได้โดยฉีดเซลที่ทำให้แตกจากการแช่แข็งแล้วละลาย (freeze thaw) หรือใช้เสียงความถี่สูง (sonication) ทำให้เซลแตกเข้าไปในสัตว์

เซลสายพันธุ์ชนิดแขวนลอย (suspension cell lines) สำหรับการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ปัจจุบันนี้มีเซลสายพันธุ์เพียง 4 สายพันธุ์ที่ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งได้มีการปรับปรุงให้เป็นเซลชนิดแขวนลอย

1. BHK21, C–13

เซลสายพันธุ์นี้มีกำเนิดมาจากเซลไตของลูกหนูแฮมสเตอร์สีทอง (Golden Hamster) โดย MacPherson และ Stocker (1962) ซึ่งได้พิสูจน์ว่าไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดย Mowat และ Chapman ในปีเดียวกัน ต่อมาได้มีการพัฒนาให้เป็นเซลชนิดแขวนลอยโดย Capstick and Garland (1965) เซลสายพันธุ์นี้ได้กระตุ้นให้มีการพัฒนาการผลิตเซลชนิดแขวนลอยเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งปัจจุบันนี้ก็มีหลายประเทศที่ใช้เซลสายพันธุ์นี้สำหรับการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นจำนวนมาก รวมทั้งที่ศูนย์ผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย หนองสาหร่าย ฯ ด้วย

2. IB-RS-2

เซลสายพันธุ์นี้กำเนิดมาจากเซลไตของหมู (pig kidney) ซึ่งก็ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลชนิดเกาะแก้วชั้นเดียว (monolayer system) สำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย ต่อมาได้มีการพัฒนาให้เป็นเซลชนิดแขวนลอยโดย Chapman และ Ramshaw (1971) จนกระทั่งปัจจุบันนี้เซลสายพันธุ์ยังไม่เคยใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในระดับอุตสาหกรรม (industrial scale) เลย

3. IFFA-3

เซลสายพันธุ์นี้ เกิดจากการพัฒนามาเป็นเซลชนิดแขวนลอยจากเซลตัวอ่อนของหนูแฮมสเตอร์สีทอง คือ NIL-2 เซลแขวนลอยชนิดนี้ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และใช้ในการผลิตขนาดใหญ่ (large-scale production)

4. HmLu

เซลสายพันธุ์นี้มีกำเนิดมาจากเซลปอดของหนูแฮมสเตอร์สีทอง ซึ่งได้พัฒนามาเป็นเซลชนิดแขวนลอยโดย Stouraitis *et al.* (1975 a) ซึ่งเซลสายพันธุ์นี้ก็ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่ก็ยังคงยอมรับกันเพียงในระดับการทดลอง (experimental cultures) เท่านั้น

มาตรการสำหรับการจำแนกลักษณะของการเพาะเลี้ยงเซล (criteria for the characterization of a cell culture)

เมื่อเราทำการเพาะเลี้ยงเซลต่อกันมาหลาย ๆ รุ่น เซลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปจากเซลเริ่มต้นโดยการคัดเลือก (selection), การผ่าเหล่า (mutation) หรือการปะปนแปดเปื้อน (contamination) ซึ่งในบางครั้งอาจรวมไปถึงการผิดพลาดในการเขียนบ่งชี้ขณะทำการเพาะเลี้ยงเซลติดต่อข้ามรุ่น สำหรับในกรณีของเซลสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีแขวนลอยนั้น ในปัจจุบันนี้พบว่ามีมากมายหลายชนิด (strain) และชนิดย่อย (substrain) เกิดขึ้น ข้อมูลที่ได้มีการตีพิมพ์นั้นส่วนใหญ่จะใช้เซล BHK เพราะเป็นที่นิยมใช้แพร่หลาย สำหรับการผันแปร (variation) ของเซลสายพันธุ์นี้ก็ได้มีการค้นพบโดย Stocker และ MacPherson (1964) แต่รายละเอียดของเซลสายพันธุ์ BHK ในระดับชนิดและชนิดย่อยที่เกิดขึ้นในปัจจุบันนี้ยังไม่มีผู้ใด

รวบรวมไว้ เพราะปัญหาที่เกิดขึ้นคือการจำแนกแยกแยะละเอียดเพื่อบ่งชี้ (identification) ของเซลสายพันธุ์ (cell lines), พันธุ์ของเซล (strains) และพันธุ์ย่อยของเซล (substrains) ยังไม่ได้มีการกำหนดที่แน่นอน

แนวทางสำหรับการจำแนกแยกแยะเซลสายพันธุ์

โดยทั่วไปแล้วเราจะใช้มาตรฐานของ A.T.C.C. (The American Type Culture Collection) ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมเซลเพาะเลี้ยงจากสัตว์ (The animal cell culture collection) ได้แนะนำรายละเอียดของคุณสมบัติเฉพาะของเซลเพาะเลี้ยง (cell culture) ไว้ดังนี้

1. เปรียบเทียบความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ (comparative viability) ของเซลเมื่อก่อนและหลังแช่แข็ง (freezing),
2. ความต้องการของอาหารที่เซลใช้ (medium requirement),
3. ความสามารถในการเจริญเติบโตของเซล (growth potential of the cells),
4. รูปพรรณสันฐานที่เห็น (morphologic appearances),
5. ลักษณะของสารพันธุกรรม (chromosome) ของเซล
6. พิจารณาดูว่ามี mycoplasma, bacteria, fungi, protozoa, cytopathic virus หรือ virus like particles อยู่หรือไม่
7. ทดสอบด้วย specific antisera กับชนิดของสัตว์ที่เราใช้เป็นเซลเริ่มต้น (species of origin) โดยวิธีดังต่อไปนี้

- Mixed agglutination
- Fluorescent antibody
- Indirect hemagglutination
- Cytotoxic–antibody dye exclusion
- Agar–gel immunodiffusion

ซึ่งในบางกรณีการที่มี karyotype แตกต่างกันก็จะบ่งบอกถึงชนิดของสัตว์ (species) ได้เด่นชัดพอสมควร

8. ความไว (susceptibility) หรือไม่ไว (unsusceptibility) ต่อไวรัส

9. การทดสอบอื่น ๆ เช่น

- Tumorigenicity
- Oncogenicity
- Biochemical markers
- Drug susceptibility
- Isoenzyme analyses
- Electron microscopy

คุณสมบัติของเซลสายพันธุ์ชนิดแขวนลอยที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

1. ความต้องการอาหารที่เซลใช้ (medium requirement)

การปรับตัว (adaptation) และการเพาะเลี้ยง (repeat passage) ของเซลในอาหารเลี้ยงเซลที่ต่างกันจะเป็นผลให้เกิดพันธุ์ใหม่ หรือพันธุ์ย่อยใหม่ สำหรับเซล BHK นั้น ก็ได้มีรายงานว่าสามารถเจริญในสภาพแขวนลอยในอาหารสังเคราะห์ที่มีซีรั่ม (serum) และใช้ Lactalbumine hydrolysate ทดแทนหรือแทนที่กรดอมิโนและไวตามิน และในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีซีรั่ม (Keay, 1975 ; Tomei and Issel, 1975)

2. การเจริญเติบโต (growth)

สำหรับเซล BHK สามารถที่จะแบ่งย่อยออกเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ

2.1 เซลที่เจริญเฉพาะในสภาพเซลชั้นเดียวเกาะข้างแก้วเท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปการจัดเรียงตัวของเซล จะเป็นไปในลักษณะเรียงขนานกัน (parallel cell orientation)

2.2 เซลที่เจริญได้ทั้งในสภาพเซลแขวนลอยและเซลชั้นเดียวเกาะข้างแก้ว ทำให้ลักษณะของเซลโดยทั่วไปผิดไปจากเซลที่เจริญชั้นเดียวเกาะข้างแก้ว เมื่อสามารถเพาะเลี้ยงในสภาพเซลแขวนลอยได้ และเซลที่เปลี่ยนไปนี้จะเจริญในสภาพเกาะแก้วได้ต่ำกว่าเดิม แม้ว่าจะเจริญได้ดีในสภาพแขวนลอย (Ubertini *et al.*, 1969)

2.3 เซลที่เจริญได้เฉพาะในสภาพเซลแขวนลอยในการเพาะเลี้ยงที่มีการเพิ่มอากาศ

(airation) โดยการบั๊น (agitation) เท่านั้น ซึ่งจะไม่สามารถกลับมาเป็นเซลเจริญชั้นเดียวเกาะข้างแก้วได้อีก

ด้วยความสามารถของเซลในการเจริญเติบโตดังที่ได้มาแล้วนี้ ทำให้พบความแตกต่างระหว่างเซลสายพันธุ์ BHK จากหลาย ๆ ห้องทดลอง และได้มีการยืนยัน (confirm) ถึงความแตกต่างนี้ (Syusyukin *et al.*, 1976)

สำหรับผลผลิตเซลในช่วงเวลาต่อเนื่องที่กำหนดให้นั้น จะมีส่วนสัมพันธ์กับส่วนประกอบ (ingradient) ของอาหารเลี้ยงเซล ถ้าเราเพาะเลี้ยงต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ (continuous passage) ในอาหารเลี้ยงเซลที่สมบูรณ์ (enrich media) ก็จะได้เซลพันธุ์ที่มีการเจริญผิดปกติไป เช่นเจริญกว่าปกติ (fast growing)

3. รูปพรรณสันฐาน (morphology)

เซล BHK21 ที่พบโดย MacPherson และ Stocker (1962) นั้น เป็น fibroblastic type ซึ่งมีรูปร่างโดยทั่วไปคือ เซลจะยืดยาวคล้ายกระสวย (spindle shape) ซึ่งจะเรียงกันแบบเรียงขนานกันไปตามยาว การพัฒนาการเจริญในสภาพเซลแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้รูปพรรณสันฐานเปลี่ยนไป (Capstick *et al.*, 1966) ความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในรูปร่างและขนาดของเซล BHK21 นั้นได้มีการรายงานโดย Girard (1975) และ Syusyukin *et al.* (1976) ได้รายงานแสดงความแตกต่างใน mitotic activity และความเหนียวแน่นในการจับของสารเรืองแสง (fluorescence) ของส่วนประกอบของเซลบางส่วน

ความผันแปร (variations) ของรูปพรรณสันฐานของเซล IB–RS–2 ก็ได้มีการรายงานทั้งในเซลเจริญชั้นเดียวเกาะแก้วและเซลในสภาพแขวนลอย นอกจากนั้นยังได้พบการเปลี่ยนแปลงทางรูปพรรณสันฐานอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเกิดของเซล NIL–2

ในทางตรงกันข้ามกับความแตกต่างที่ได้กล่าวมาแต่ต้น การใช้รูปพรรณสันฐานเป็นมาตรฐานในการจำแนกพันธุ์และพันธุ์ย่อยนั้น มักจะพบความยุ่งยากสับสน โดยเฉพาะรูปร่างและขนาดของเซลนั้นจะไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับวงจรการเจริญเติบโต, อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลและสภาพแวดล้อมอื่น ๆ

4. นิวเคลียสวิทยา (karyology)

เซล BHK21 จัดเป็น diploid male ซึ่ง Capstick *et al.* (1966) ได้รายงานว่า พบการเปลี่ยนแปลงจาก diploid มาเป็น aneuploid ในระหว่างที่มีการพัฒนาการเจริญมาเป็นการเจริญชนิดเซลแขวนลอย ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่ามีเซล BHK21, C-13 มากมายหลายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotytpe) ต่างกัน

เซล IB-RS-2 ในสภาพเซลชั้นเดียวเกาะแก้วพบว่าเป็น pseudodiploid karyotype ในขณะที่เซลในรุ่นหลัง ๆ ที่ใช้เซล IB-RS-2 เป็นเซลเริ่มต้น เพื่อที่จะพัฒนาให้เป็นเซลชนิดแขวนลอย และเซลที่ได้รับการพัฒนาให้เป็นเซลชนิดแขวนลอยเรียบร้อยแล้วเป็น aneuploid karyotype

เซล NIL-2 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง karyotype ในระหว่างที่มีการจัดสร้างมันขึ้นมา (establishment) เซลในรุ่นหลังๆ จะเป็น hypodiploid karyotype แต่ยังไม่มีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของ karyotype ของเซลชนิดนี้ หลังจากที่ได้พัฒนาการเจริญไปเป็นการเจริญชนิดแขวนลอย

ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ karyotype นั้น มีประโยชน์อย่างมากในการที่จะชี้ให้ชัดถึงความแตกต่างของเซล เมื่อเปรียบเทียบกับเซลดั้งเดิม (parent cell)

5. การปนเปื้อน (contamination)

ตัวปนเปื้อน (contaminants) ส่วนใหญ่แล้ว อาจพบได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลที่ไม่ได้ใส่ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) Mycoplasma บางชนิดสามารถที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุ์เซล BHK21 โดยการเพิ่มจำนวน (form colonies) ใน agar suspension culture และมีรูปร่างการจับกลุ่ม (colonial morphology) บนแก้ว เซลที่ติดเชื้อ Mycoplasma จะพบว่ามีโครโมโซมผิดไปจากปกติ

ในการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope) พบ virus like particle เกาะบนเซล BHK21 ซึ่งพบได้เช่นกันบนเนื้อเยื่อจากเนื้องอกของหนูแฮมสเตอร์ (Hamster tumor) ปัจจุบันนี้กำลังมีการศึกษาต่อไปว่า virus like particle นี้ เกี่ยวข้องกับ tumorigenic หรือ oncogenic-properties ของเซล BHK21 หรือไม่

นอกจากนี้ยังพบว่า polyoma virus สามารถเปลี่ยนแปลง (transform) เซล BHK21

ให้เป็นเซลกลุ่มใหม่ที่แตกต่างไปจากเซล BHK21 เดิม และพบว่ามันสามารถเปลี่ยนแปลงเซลนี้ให้ลดความไว (reduee susceptibility) ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในหลาย ๆ พันธุ์

ไวรัสในคนและสัตว์หลายชนิดสามารถที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อชนิดแอบแฝง (persistent infection) ระหว่างการเพาะเลี้ยงในเซล BHK21 ดังนั้นการผลิตวัคซินป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้เซล BHK21 จึงแนะนำให้มีการตรวจคัด (screening) สารที่ไม่พึงประสงค์ (adventitious agent) ในซีรั่มด้วย

สำหรับเซล IB–RS–2 นั้นเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่ามีการปนเปื้อนด้วย swine fever disease virus

6. ชนิดของเซลเริ่มต้น (species of origin)

การที่จะจำแนก (identify) เซลโดยเปรียบเทียบกับชนิดของเซลเริ่มต้น (species of origin) ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน (Immunological methods) หรือทางพันธุศาสตร์ของเซล (Cytogenetical methods) นั้น สามารถทำได้โดยไม่ยากนัก โดยเฉพาะวิธีทางด้านภูมิคุ้มกัน แต่จนกระทั่งปัจจุบันนี้เท่าที่ทราบยังไม่มีรายงานที่พิมพ์ออกมา ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (antigenic characterization) ของเซลที่ใช้ในการผลิตไวรัสปากและเท้าเปื่อย

7. ความไวต่อไวรัส (virus susceptibility)

ห้องทดลองหลายแห่งได้พยายามที่จะคัดเลือกเซล BHK21 เพื่อหาพันธุ์ที่ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย นอกจากนั้นยังพบว่าในระดับที่ต่างกันใน semicontinuous suspension culture ก็มีความไวต่อไวรัสที่ต่างกันด้วย Syusyukin *et al.* (1976) กล่าวว่า เซล BHK21 ในสภาพแขวนลอยซึ่งเมื่อเริ่มต้นไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลชนิดนี้ไปเรื่อย ๆ พบว่าความไวต่อไวรัสลดลง ในขณะที่เซลที่เจริญชั้นเดียวในสภาพเกาะแก้ว (monolayer) จะคงที่ (stable) มากกว่า Cowan *et al.* (1974) ได้สังเกตพบว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเมื่อเพาะเลี้ยงในเซล BHK21 บางพันธุ์ ขนาดของ plaque เปลี่ยนไป ในขณะที่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของ plaque ในเซล BHK21 บางพันธุ์ ดังนั้นการใช้ความไวต่อไวรัส (virus susceptibility) และลักษณะของไวรัสที่เจริญในเซล ก็สามารถใช้ในการแยกแยะพันธุ์และพันธุ์ย่อยของเซลได้

ขอแนะนำ

ซูเอครอน

สำหรับสุกรที่หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ

สาเหตุ

- การขนย้าย
- การเปลี่ยนคอก
- อากาศร้อน
- การผสมพันธุ์
- การคลอด
- กระวนกระวาย
- ตื่นเต้น

POKPHAND

ซูเอดรอน

สำหรับสุกรที่หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ

ซูเอดรอน

เป็นยาฉีดที่ใช้สำหรับสุกรในกรณีที่หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ ซึ่งมีผลทำให้สุกรตาย เนื่องจากการขนส่ง การชั่งน้ำหนัก การย้ายคอก ช่วงที่พ่อสุกรกำลังผสมพันธุ์ ระหว่างการคลอดของแม่สุกร กระวนกระวาย ตื่นเต้น นอกจากนั้นช่วยป้องกันการตายอย่างทันทีทันใดของสุกรเนื่องจากหัวใจทำงานหนักเกินไป

ซูเอดรอน มีประโยชน์ดังนี้

1. ลดอัตราการตายจากการขนส่ง

ฉีดซูเอดรอน ก่อนการขนส่ง ½-1 ช.ม.

โดยแบ่งสุกรออกเป็น 2 กลุ่ม น้ำหนักเฉลี่ยสุกร 28-30 กก.

กลุ่มแรก - กลุ่มควบคุม ไม่ฉีด**ซูเอดรอน**

กลุ่มสอง - ฉีด**ซูเอดรอน** ตัวละ 0.5 ซีซี. โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

เวลาที่ใช้ในการขนส่ง 3-8 ช.ม.

ครั้งที่	จำนวนสุกร ที่ขนส่งทั้งหมด	กลุ่มควบคุม			กลุ่มฉีด**ซูเอดรอน**		
		จำนวน	ตาย	%	จำนวน	ตาย	%
1.	167	84	—	—	83	—	—
2.	1,400	1,400	22	1.57	—	—	—
3.	340	169	4	2.37	171	—	—
4.	560	560	18	3.2	—	—	—
5.	1,725	600	12	2.0	1,125	1	0.09
6.	1,480	780	20	2.56	700	—	—
รวมทั้งหมด	5,672	3,593	76	2.12	2,079	1	0.05

ผลการทดลองที่ประเทศเยอร์มันตะวันตก

ลดอัตราการตายเนื่องจากการขนส่ง
ฉีดซูเอครอน ก่อนการขนส่ง½-1 ช.ม.
ระหว่างการคลอดของแม่สุกร
ฉีดซูเอครอน ทันที

POKPHAND

รุปผลการทดลอง

ดได้ว่ากลุ่มควบคุม (ไม่ฉีด**ซูเอครอน**) จากสุกรทั้ง
3,593 ตัว ตาย 76 ตัว เท่ากับ 2.12% ในขณะที่กลุ่มที่
ซูเอครอน ตายเพียง 1 ตัว จากสุกรทั้งหมด 2,079 ตัว ซึ่งก็
กับ 0.05% เพราะฉะนั้น **ซูเอครอน** ช่วยไม่ให้สุกรตาย
จากการขนส่ง อันเป็นการลดความสูญเสียที่จะเกิด

แตกต่างทางด้านพฤติกรรมของทั้ง 2 กลุ่มนั้นสามารถ
ได้ชัด เมื่อสุกรไปถึงปลายทาง

กรที่ไม่ได้ฉีดยาจะมี อัตราการหายใจเร็วขึ้น และหายใจ
ลำบาก ตื่นเต้นและกร้าวร้าวบางตัวพบว่ามีผิวหนังเป็นสี
น้ำเงิน (เขียว) เนื่องจากขาดอ๊อกซิเจน
ส่วนสุกรที่ฉีด**ซูเอครอน**พบว่า การหายใจปกติ ไม่กร้าวร้าว
และไม่ตื่นเต้นสภาพดี

2. ระหว่างการคลอดของแม่สุกร

ระหว่างการคลอด จะมีการหลั่งของอะดรีนาลิน ซึ่งจะมีผลต่อมดลูก อะดรีนาลินจะออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ อ๊อกซี่โตซิน และจะลดปฏิกริยาของการคลอดลง มีผลทำให้ระยะเวลาของการคลอดนานขึ้น (เนื่องจากความเครียดที่เกิดขึ้น) ถึงแม้ระดับของอ๊อกซี่โตซินในซีรั่มจะปกติก็ตาม การคลอดที่ยาวนานจะมีผลทำให้สุกรมีอาการกร้าวร้าวยิ่งขึ้น

การฉีด **ซูเอครอน** ทันทีที่แม่สุกรเริ่มคลอด จะทำให้ระยะเวลาของการคลอดสั้นลง และช่วยทำให้ลูกสุกรรอดตายได้

การทดลองใช้แม่สุกรจำนวน 1,066 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มแรก - แม่สุกรสาว จำนวน 308 ตัว

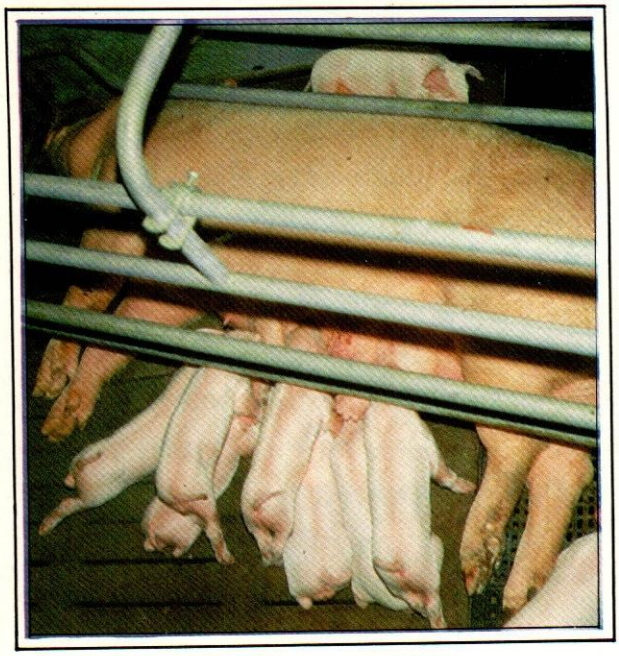
กลุ่มสอง - แม่สุกรที่เคยให้ลูกมาแล้วจำนวน 758 ตัว

ในแต่ละกลุ่ม - ครึ่งหนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (ไม่ฉีด**ซูเอครอน**)
- ครึ่งหนึ่งฉีด**ซูเอครอน**

	แม่สุกรสาว		แม่สุกรที่เคยให้ลูก	
	ควบคุม	ฉีด**ซูเอครอน**	ควบคุม	ฉีด**ซูเอครอน**
จำนวนลูกสุกรที่ได้	176	132	367	391
ขนาดครอก	9.2	9.0	11.5	11.5
ลูกสุกรตายแรกคลอด (%)	9.7	7.2	7.7	7.1
ลูกสุกรตายภายในอาทิตย์แรก (%)	7.2	6.3	8.9	8.8
ความเสียหายทั้งหมด	16.9	13.4	16.6	15.9
เวลาในช่วงการคลอดมากกว่า 6 ชั่วโมง (%)	17.5	9.6	13.2	11.4
การให้ยาปฏิชีวนะป้องกันโรค MMA (%)	14.8	12.9	17.4	14.1
พบโรค MMA (%)	20.5	9.9	19.1	17.4
แม่สุกรตาย	4	1	6	5

เอช. บอสเทดท์ และ พี.อาร์.รูดอฟฟ์ ประเทศเยอร์มันตะวันตก

จากผลการทดลอง
คุณภาพซากสุกรดีขึ้น



จากผลการทดลองพบว่า

- ความเสียหายทั้งหมด (ลูกสุกรตายแรกคลอดและตายภายในอาทิตย์แรก) ที่เกิดขึ้นในกลุ่มที่ฉีด**ซูเอครอน** จะน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสังเกตุเห็นได้ชัดจากแม่สุกรสาว คือจาก 16.9% เหลือ 13.4%
- เวลาในการคลอดนานกว่า 6 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ฉีด **ซูเอครอน** จะมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม คือ 9.6% กับ 17.5% และ 11.4% กับ 13.2% ตามลำดับ
- เกี่ยวกับโรค MMA ที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ชัดว่ากลุ่มที่ฉีด **ซูเอครอน** เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจะลดลงมากโดยเฉพาะในแม่สุกรสาว

3. คุณภาพซากสุกรดีขึ้น

จากการทดลองโดยฉีด **ซูเอครอน** แก่สุกรที่จะส่งเข้าโรงฆ่า 1/2 ชั่วโมงก่อนการขนส่งเป็นระยะทาง 170 กม. ใช้เวลา 4 ชั่วโมง สุกรถูกฆ่าหลังจากถึงโรงฆ่า 1 ชั่วโมง จากการตรวจซากพบว่า **ซูเอครอน**จะทำให้การเกิด พีเอสอี (PSE) ลดลง (เนื้อสีซีด, นุ่มและเป็นน้ำ) และจะเห็นได้ชัดว่าเนื้อบริเวณสันหลังจะได้รับการปรับปรุงให้มีคุณภาพดีกว่าเนื้อสะโพก ซึ่งจะมีผลต่อการขายสุกรของผู้เลี้ยง ทำให้ได้ราคาสูงขึ้น และเป็นที่พอใจแก่ผู้ขายและผู้บริโภค

ส่วนประกอบ

ในแต่ละ 1 ซีซี.ประกอบด้วย

4 - คาร์บาโซลิล้อกซี - 3 - ไอโซโพรพิลอมิโน - 2 - โพรพานอล	0.5 มิลลิกรัม
เบนซิล แอลกอฮอล์	20.9 มิลลิกรัม
ลิควิด ฟีนอล	2.0 มิลลิกรัม

ขนาดและวิธีใช้

ในสุกร ใช้ **ซูเอครอน** 1 ซีซี.ต่อน้ำหนักสุกร 50 กก. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ยาจะออกฤทธิ์เต็มที่หลังจากฉีดไปแล้ว 30 นาที และ ฤทธิ์จะคงอยู่ได้นาน 8-12 ชั่วโมง

ขนาดบรรจุ

ขวดละ 50, 100 ซีซี.

ผลิตโดย
PRAEMIX WIRKSTOFF GMBH
Sandhofer Straße 116
6800 Mannheim 31
Federal Republic of Germany

ผู้แทนจำหน่าย
บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อิน-เอ็กซ์ จำกัด
36 ซอยเย็นจิต ถนนจันทน์ กรุงเทพฯ 10120
โทร. 2114660-79, 2110801

8. ความสามารถที่ทำให้เกิดเนื้องอก (tumorigenicity and oncogenicity)

คุณสมบัติที่เซลหรือตัวกระทำสามารถก่อให้เกิดเนื้องอก (tumorigenic and oncogenic properties) ก็เป็นจุดสำคัญอีกจุดหนึ่งสำหรับการจำแนกลักษณะของเซล คุณสมบัติที่สามารถทำให้เกิดเนื้องอกของเซลนั้น เราสามารถวัดออกมาเป็นปริมาณที่ก่อให้เกิดเนื้องอกได้ (tumor dose) เช่น TD_{50} (โดยอาศัยมาตรฐานของ Tissue Culture Association) และระยะเวลาที่มีการพัฒนามาเป็นเซลเนื้องอก (tumor cell)

9. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker)

ความแตกต่างในความไว (sensitivity) ต่อสารพวกยาปฏิชีวนะ, สารที่มีโครงสร้างคล้ายกับพิวรีนและไพริมิดีน (purine and pyrimidine analoque), สารที่มีโครงสร้างคล้ายกรดอมิโน (amino acid analoque) และสารยับยั้งการย่อยสลายพวกคาร์โบไฮเดรท (inhibitor of carbohydrate metabolism) นั้น สามารถที่จะบอกความแตกต่างของเซลปกติกับเซลที่มีการเปลี่ยนแปลงไปได้ นอกจากนั้น Syusyukin *et al.* (1976) ยังได้ค้นพบว่า น้ำย่อย (enzyme) สองชนิดคือ acid-phosphatase และ succinic dehydrogenase ลดความสามารถ (activity) ของมันลง ในเซลชนิดที่แขวนลอยบางพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งคิดว่าการเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีผลต่อการลดความไว (reduce susceptibility) ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วย

มาตรการสำหรับการประเมินผลของไวรัส

จากการศึกษาพบว่า มีส่วนประกอบที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน (antigenic components) หลาย ๆ ชนิดในไวรัสหยาบ (crude virus) ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ตัวอย่างเช่นไวรัสที่สมบูรณ์ (complete virion, 25 μm หรือ 146 S), โปรตีนหุ้มไวรัสที่ไม่มีสารพันธุกรรม (capsid protein, 75 S), โปรตีนย่อยของไวรัส (virus protein subunit, 7μm หรือ 12 S), และตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกันการติดเชื้อของไวรัส (V.I.A. antigen, 4.5 S) จุดประสงค์ของการเพาะเลี้ยงไวรัสในปริมาณมาก ๆ ก็คือ การผลิตตัวที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคซึ่งก็มีเพียง 2 ชนิด จากที่กล่าวมาข้างต้นนั้นคือ 146 S และ 75 S ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สำคัญในการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค

การประเมินผลของตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคได้นั้น ส่วนใหญ่จะใช้วิธีทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ในสัตว์ เพื่อจะเอาไปใช้ป้องกันโรคในท้องที่ แต่เนื่องจากค่าใช้จ่ายและเวลาที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มเป็นอุปสรรค ทำให้การทดสอบอื่น ๆ เช่น การทดสอบการติดเชื้อ (infectivity test) การทดสอบการจับกับคอมพลีเมนท์ (complement fixation test), การหาปริมาณไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen) และการหาปริมาณของไวรัสถูกนำมาใช้ในการประเมินผลของไวรัส

1. การทดสอบการติดเชื้อหรือการถูกบุกรุก (infectivity test)

อัตราส่วนของหน่วยของการติดเชื้อ (infectivity unit) ต่อไวรัสทั้งหมดนั้น จะแตกต่างกันในการเตรียมไวรัสที่ต่างชุดกัน ซึ่งตามปกติแล้วการทดสอบการติดเชื้อนั้นจะวัดได้เพียงตัวไวรัส (virus particle) ที่ประกอบด้วยสารพันธุกรรมที่เข้มแข็ง (active RNA) เท่านั้น นอกจากนั้นการทดสอบนี้ยังให้ผลแตกต่างกันเมื่อทดสอบในหนู mice และเซลเพาะเลี้ยงกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เจริญบนเซล BHK21 ชนิดแขวนลอย ซึ่งถ้าเราให้ไวรัสเจริญไปเรื่อย ๆ ในเซลชนิดแขวนลอยจะพบว่า ค่าติดเชื้อ (infectivity titer) จะลดลงกว่าค่าเริ่มต้นในลูกหนู mice (Stouraitis *et al.*, 1975 b) แต่จะเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าเริ่มต้นในเซลเพาะเลี้ยง ในทางตรงกันข้ามในกรณีของเซล BHK21 ชนิดเซลชั้นเดียวเกาะแก้วจะพบว่า ค่าการติดเชื้อค่อนข้างคงที่ ดังนั้นการทำนายความสามารถในการเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก็สามารถที่จะใช้การทดสอบการติดเชื้อได้วิธีหนึ่ง แม้ว่าโปรตีนหุ้มไวรัสที่ไม่มีสารพันธุกรรม ก็สามารถเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคได้ดีพอ ๆ กับไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S) แต่ไม่สามารถที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อได้ (non infective)

2. การทดสอบการจับกับคอมพลีเมนท์ (complement fixation test)

การทดสอบการจับกับคอมพลีเมนท์ วัดปฏิกิริยาของตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน (antigen) กับภูมิคุ้มกันโรค (antibody) ที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะบอกให้รู้ว่ากำลังวัดตัวที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคตัวไหนอยู่ ในบางกรณีโปรตีนย่อยของไวรัส (12 S antigen) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิ แต่ไม่ใช่เป็นภูมิคุ้มกันโรค จะรบกวนการวัดปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen) และโปรตีนหุ้มไวรัสที่ไม่มีสารพันธุกรรม (75 S antigen) ซึ่งเป็นตัวที่กระตุ้นให้เกิด

ภูมิคุ้มกันโรคได้ ซึ่งภายหลังพบว่าวิธีนี้ยังไม่ได้เป็นเครื่องบ่งชี้ที่แน่นอนของความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค (Cowan, 1970)

การเตรียมภูมิคุ้มกันโรคที่จำเพาะต่อส่วนของไวรัสที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคเดียว ๆ โดยการแยกเอาภูมิคุ้มกันที่ไม่ต้องการออกนั้น มีประโยชน์มากในการหาปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen) แต่ขั้นตอนในการเตรียมภูมิคุ้มกันให้บริสุทธิ์จะลดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific reactivity) ของภูมิคุ้มกันให้ต่ำลง

เราอาจสรุปได้ว่า การทดสอบการจับกับคอมพลีเมนท์ไม่ได้วัดความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคอย่างแท้จริง เพราะจากการสังเกตของ Brown (1971) พบว่า ไวรัสที่ถูกลดความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคโดยให้ทำปฏิกิริยากับน้ำย่อย trypsin และที่มีภูมิคุ้มกันสูง (hyperimmune serum) จะจับกับคอมพลีเมนท์ได้ดีพอ ๆ กับไวรัสที่สมบูรณ์

3. การหาปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen)

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า ส่วนใหญ่ของความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จะสัมพันธ์กับปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen) ซึ่งไวรัสที่สมบูรณ์นี้จะมีความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อ และสามารถจับกับคอมพลีเมนท์ได้ด้วย อีกวิธีหนึ่งที่ใช้กันในการหาปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์นอกเหนือจากการทดสอบการติดเชื้อและการทดสอบการจับกับคอมพลีเมนท์ก็คือ การพิจารณาดูการดูดซับรังสีเหนือม่วง (ultra violet absorption) ที่ช่วงคลื่น 254 nm และ radial immunodiffusion (เช่น Single radial immunodiffusion–S.R.I.D.)

ในการหาปริมาณของไวรัสที่สมบูรณ์ (140 S antigen) สิ่งที่สำคัญที่จะต้องคำนึงถึงก็คือ จะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโปรตีนที่ผิวหนังของไวรัส เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบทั้งชนิดที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น การหาปริมาณไวรัสที่สมบูรณ์เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือได้มากกว่า อย่างไรก็ดีจากประสบการณ์ที่ผ่านมาพบว่า การทดสอบด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ความคุ้มโรคของวัคซีนได้ดีเสมอไป (Lindholm's Institute, 1975 a and b)

4. การหาปริมาณโปรตีนของไวรัส

จากการศึกษาโดยใช้ polyacrylamide–gel electrophoresis (P.A.G.E.) ของไวรัสโรค

ปากและเท้าเปื่อย พบแถบของโปรตีนจำนวนมากมายซึ่งแสดงว่ามีสายเป็ปไทด์ (polypeptide) หลาย ๆ ชนิดในโปรตีนของไวรัส เมื่อใช้น้ำย่อย trypsin ย่อยไวรัสก่อน จะพบว่ารูปแบบ(pattern) ของแถบของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งภายหลังพบว่าสายเป็ปไทด์เพียงชนิดเดียวของโปรตีนของไวรัสที่เปลี่ยนไป จากการศึกษาต่อมาพบว่าน้ำย่อย trypsin จะย่อยโปรตีนที่เปลือกหุ้มของไวรัส (capsid protein) ตัวหนึ่ง ให้แตกออกมาเป็นสองสายเป็ปไทด์ ซึ่งยังคงอยู่บนเปลือกหุ้มของไวรัสนั้น นอกจากนั้นการให้น้ำย่อย trypsin ทำปฏิกิริยากับไวรัสจะทำให้เพิ่มความหนาแน่น (density) ของไวรัส และลดความสามารถในการติดเชื้อลงโดยไม่ลดจำนวนของโด๊ส ต่อมา Meloen (1976) ได้พบว่า การลดความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคของวัคซีน ที่เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการเพาะเลี้ยงในเซล BHK21 ชนิดแขวนลอย เกิดขึ้นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่ไวต่อน้ำย่อย trypsin (trypsin sensitive site) บนตัวไวรัส

5. ขนาดของ *plaque* (plaque size)

คุณสมบัติในการสร้าง plaque ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่เจริญในระบบการเพาะเลี้ยงที่ต่างกันจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของไวรัส, ประวัติของการเลี้ยงต่อเนื่อง, ระบบการเพาะเลี้ยง (culture system) ที่เปลี่ยนไปและชนิดของเซล BHK21 ขนาดของ plaque ที่แตกต่างกันไปจะให้คุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคที่ต่างกัน ดังนั้นการหาปริมาณของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการผลิตวัคซีนอาจจะให้ผลผิดพลาดได้

มาตรการในการประเมินผลสำหรับวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย

วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลชนิดแขวนลอย จะต้องมีมาตรการในการประเมินผลทั่ว ๆ ไป (general criteria) ดังเช่น ความปลอดภัย (safety), ความบริสุทธิ์ (purity) และความคุ้มโรค (potency) นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว จะต้องมีมาตรการในการประเมินผลเฉพาะ (specific criteria) ซึ่งจะต้องเกี่ยวข้องกับเซลสายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย (ตัวอย่างเช่น Tumorigenicity และ oncogenicity) และอาการแพ้ (allergy) สำหรับมาตรการในการประเมินผลทั่ว ๆ ไปนั้น ได้กล่าว

มาแล้วในเรื่องการประเมินผลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ดังนั้นในหัวข้อนี้จะขอกล่าวเฉพาะมาตรการในการประเมินผลเฉพาะเท่านั้น

มาตรการในการประเมินผลเฉพาะ (specific criteria)

1. เซลสายพันธุ์ที่เหมาะสม (suitability of cell line)

ก่อนที่จะอธิบายหัวข้อนี้ จะขอชี้ให้เห็นข้อสังเกตเบื้องต้นก่อนเช่น

1.1 ในปัจจุบันนี้มีเซลสายพันธุ์สองสายพันธุ์คือ BHK21 และ IFFA–3 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบเซลแขวนลอยจำนวนมาก (large scale)

1.2 เซล BHK21 สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสจำนวนมาก ใช้ทั้งในระบบเซลแขวนลอยและเซลชั้นเดียวเกาะแก้ว ดังนั้นมาตรฐานสำหรับระบบเซลชั้นเดียวเกาะแก้วก็อาจจะถูกนำมาคัดแปลงใช้สำหรับเซล BHK21 ในระบบเซลแขวนลอยได้

1.3 เซลสายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์นั้น มีต้นกำเนิดมาจากหนูแฮมสเตอร์สีทองที่มีสุขภาพดี

1.4 เซลสายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้ในระบบเซลแขวนลอยนั้นเป็น heteroploid

1.5 ในช่วงสิบปีที่ผ่านมานี้มีวัวและควายเป็นจำนวนล้าน ที่ได้รับการฉีดวัคซินป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ผลิตจากไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลสายพันธุ์ BHK21 จากข้อมูลที่มีในขณะนี้แสดงให้เห็นว่า วัคซินนี้มีประสิทธิภาพและปราศจากผลที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็นเหตุผลที่พอจะเชื่อได้ว่าเซลสายพันธุ์อื่น ๆ ก็คงจะให้ผลคล้าย ๆ กัน

ด้วยเหตุผลที่ว่ามีการเกิดเซลสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน และพันธุ์ย่อยต่าง ๆ กันที่ไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และความเป็นไปได้ที่จะคัดเลือกเซลสายพันธุ์ใหม่ ๆ และพันธุ์ย่อยใหม่ ๆ ในอนาคต จึงจำเป็นสำหรับกลุ่มที่สนใจในเรื่องนี้ควรจัดตั้งหน่วยงานระดับชาติ เกี่ยวกับความต้องการต่ำสุดสำหรับการคัดเลือกและใช้เซลสายพันธุ์ต่าง ๆ สำหรับการผลิตวัคซินป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย

ปัจจุบันนี้ยังไม่มีการจัดตั้งหน่วยงานระดับชาติดังกล่าว มาตรการสำหรับคัดเลือกเซลสายพันธุ์ที่จะใช้ในการผลิตวัคซินจึงยังไม่มี เราได้นำ The United States Department of

Agriculture, Veterinary Biologic Division (1970) มาปรับปรุงใช้ เพื่อค้นหาและคัดเลือกเซลสายพันธุ์สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย

2. ภูมิแพ้ (allergy)

วัวควาย ในหลายประเทศได้รับการกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ตามปกติปีละครั้งหรือมากกว่า ดังนั้นผลเสียที่ตามมาของการฉีดวัคซีนซ้ำ (booster) อาจจะเกิดได้จากขบวนการทำให้ไวผิดธรรมดา (hypersensitization) สิ่งที่จะต้องคำนึงถึงก็คือผลเสียที่พบในวัคซีนที่ผลิตจากเซล BHK21 ในท้องที่เป็นเวลาหลายปีมาแล้ว ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอาการของภูมิแพ้ที่เกิดขึ้นช้า ๆ (delayed allergy) และส่วนน้อยจะเป็นภูมิแพ้ที่เกิดขึ้นในทันทีทันใด (immediate allergy) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นเนื่องจากมีตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มอื่น ๆ มากมาย ที่ไม่ใช่ไวรัสที่อยู่ในวัคซีนในช่วงการเตรียมไวรัส ตัวที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มพวกนี้อาจเป็นพวกที่มาจากเซล, อาหารเลี้ยงเชื้อและซีรั่ม ตลอดจนยาปฏิชีวนะและตัวปนเปื้อนต่าง ๆ เนื่องจากมีการรวมกันของตัวกระตุ้นพวกนี้กับตัวที่ส่งเสริมการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้ม (adjuvant) เช่น aluminium hydroxide, saponin, oil emulsion และอื่น ๆ อีก ซึ่งทำให้มีโอกาสที่จะเกิดผลร้ายแรงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังนั้นจึงแนะนำให้มีวิธีการมาตรฐานสำหรับตรวจหาตัวที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลในวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. พิจิตร มกรเสน หัวหน้าหน่วยผลิตวัคซีน และ น.สพ. พยนต์ สินสุวงค์วัฒน์ หัวหน้าแผนกผลิตวัคซีนชนิดเซลแขวนลอย ที่ช่วยกรุณาตรวจทานต้นฉบับให้ และขอขอบพระคุณ น.สพ. ทินกร จันดาแก้ว หัวหน้างานผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย และ ร.ต. น.สพ. สุธรรม ปุณยอุปพัทธ์ ผู้อำนวยการกองผลิตชีวภัณฑ์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนกลุ่มผู้เขียนมาโดยตลอด ตลอดจนนายเดิมพล รัตนวงศ์ ที่ช่วยกรุณาพิมพ์ต้นฉบับ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

Brown, F. (1971). The relationship of structure to the immunological and serological properties of FMDV. Proc. 2nd Int. Congress Virology, Budapest, Hungary, p. 150–151.

Capstick, P.B. & Garland, A.J. (1965). Observations on the use of BHK21, clone–13 cells for Foot–and–mouth vaccine production. Bull. Off. Int. Epizoot. 64 : 215–223.

Capstick, P.B., Garland, A.J., Masters, R.C. & Chapman, W.G. (1966). Some functional and morphological alterations occurring during and after the adaptation of BHK21, clone–13 cells to suspension culture. Exp. Cell Res. 44 : 119–128.

Champman, W.G. & Ramshaw, I,A. (1971). Growth of the IB–RS–2 pig kidney cell line in suspension culture and its susceptibility to Foot–and–mouth disease virus. Appl. Microbiol. 22 : 2.

Cowan, K.M. (1970). An immunochemical approach to Foot–and–mouth disease virus vaccine. Protency evaluation. Report, Meeting F.A.O. Ankara, Turkey, p. 20–31.

Cowan, K.M., Erol, N. & Whiteland, A.P. (1974). Heterogenicity of type Asia 1 Foot–and–mouth disease virus and BHK21 cell and the relationship to vaccine preparation. Bull. Off. Int. Epizoot. 81 : 1271–1298.

Fedoroff, S. (1967). Proposed usage of animal tissue culture terms. J. Nat. Cancer. Inst. 38 (4) : 607–611.

Girard, H.C. (1975). Evaluation of BHK cells. Report, Meeting FAO, Brescia, Italy, p. 20–23.

Keay, L. (1975). Autoclavable low cost serum–free cell culture media. The growth of L–cells and BHK cells on peptones. Biotechn. Bioeng. 17 : 745–746.

Lindholm's Institute (1975 a). Correlation of the above parameters with potency of vaccine. Quoted from report, Meeting FAO, Brescia, Italy, p. 9.

Lindholm's Institute (1975 b). Note on media and serum. Report, Meeting FAO, Brescia, Italy, p. 66.

MacPherson, I & Stocker, M. (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones–An investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology 16 : 147–151.

Meloen, R.H. (1976). Localization on Foot-and-mouth disease virus (FMDV) of an antigenic deficiency induce by passage in BHK cells. Arch. Virol. 51 : 299-306.

Mowat, G.N. & Chapman, W.G. (1962). Growth of Foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. Nature, Lond. 194 : 253-255.

Stouraitis, P., Qzawa, Y. & Maussa, A.A.M. (1975 a). Susceptibility of hamster lung (Mm Lu) line to Foot-and-mouth disease virus. Report Meeting FAO, Brescia, Italy, p. 54.

Stouraitis, P., Hussein, K. & Moussa, A.A.M. (1975 b). Susceptibility of baby mice to Foot-and-mouth disease virus produced in BHK21, C-13 and HmLu cells. Report, Meeting FAO, Brescia, Italy, p. 93.

Syusyukin, A.A., Tsvetkovn, N.E., Kudryavsteva, G.A., Syusyukina, M.S. & Efimov, N.I. (1976). Culture of Foot-and-mouth disease virus in different sublines of BHK21 cells. Veterinariya, Moscow 5 : 46-48 (in Russian)

Tomei, L.D. & Issel, C.J. (1975). Growth and immunogenicity of Foot-and-mouth disease virus in baby hamster kidney cells adapted to and continuously growth in a serum-free chemically defined media. Biotechn. Bioeng. 17 : 765-778.

Ubertini, B., Nardelli, L., Barri, S., Panina, G.F. & Lodelti, E. (1969). Production of Foot-and-mouth disease (FMD) vaccine at The Istibuto Zooprofilattico Sperimentale at Brescia. Report, Meeting FAO, Brescia Italy, p. 16.