

การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกรอง แบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลิซัลโฟน

อมรรตน์ สวัสดิ์สิงห์¹ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย²

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O₁₈₉ ให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลิซัลโฟนที่ 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 ($p < 0.05$) การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลิซัลโฟน ที่ MWCO 500,000 ดาลตัน สามารถกรองไวรัสได้บริสุทธิ์กว่าที่ MWCO 100,000 ดาลตัน ทั้งนี้การเลือกใช้ MWCO ต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ปัจจัยอื่น ๆ รวมทั้งสถานะในการกรองและความบริสุทธิ์ที่ต้องการ

คำสำคัญ: เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวง, โพลิซัลโฟนเมมเบรน, 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 BHK₂₁C₁₃ แบบแขวนลอย การเพาะและเพิ่มปริมาณไวรัส การแยกส่วนน้ำไวรัสออกจากกากเซลล์ การทำให้ไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ การทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรคและเก็บรักษาไวรัสที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ในโครเจนเหลวที่อุณหภูมิ -198°C เพื่อเก็บเป็นสต็อกแอนติเจนสำหรับนำไปผสมเป็นวัคซีน การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบันจะผลิตเป็นวัคซีนที่มีความบริสุทธิ์ (purified vaccine) สูงปราศจากการปนเปื้อนส่วน non structure protein, NSPs ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามมาตรฐาน World organization for animal health, OIE (2012) ทั้งนี้วัคซีนที่มีความบริสุทธิ์สูงจะต้องมีปริมาณอนุภาค 146S สูง ซึ่ง Crowther (1986) พบว่าอนุภาค 146S และ 75S มีคุณสมบัติเป็น immunogen สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี ดังนั้นในกระบวนการผลิตวัคซีนโดยเฉพาะขั้นตอนการทำไวรัสให้เข้มข้นและบริสุทธิ์เพื่อจัดเก็บเป็นสต็อกแอนติเจนและนำไปผสมเป็นวัคซีนนั้น จำเป็นต้องผลิตแอนติเจนที่มีปริมาณอนุภาค 146S มากที่สุด เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพและให้ความคุ้มโรคสูง

กระบวนการ ultrafiltration เป็นกระบวนการทำความสะอาดเข้มข้นโดยแยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน เอนไซม์ รวมทั้งแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ ออกจากน้ำและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ซึ่งอาศัยแรงดันต่ำเป็นแรงขับเคลื่อนให้ของเหลวเคลื่อนผ่านช่องว่างของเมมเบรนในการแยกอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดใหญ่ออกจากของเหลวส่วนใหญ่ใช้กับอนุภาคที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut off, MWCO) 1,000-1,000,000 ดาลตัน วัสดุที่ใช้เป็นเมมเบรนในกระบวนการ ultrafiltration ได้แก่ โพลีซัลโฟน เซลลูโลส อะซิเตท โพลีพรอพิลีน ไนลอน โพลีไวนิลคลอไรด์ เป็นต้น (พัฒน์พงษ์, 2552) ซึ่งโพลีซัลโฟนเป็นเมมเบรนที่มีความแข็งแรงสูงทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ -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 คาลตัน ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้เข้มข้นและบริสุทธิ์สูงขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ให้ได้มาตรฐานสากลและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน หรือ AEC ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O₁₈₉ จากฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ BHK₂₁C₁₃ แบบแขวนลอย และเกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบูรณ์ภายใน 20-24 ชั่วโมง และผ่านการทำให้ไวรัสใสโดยแยกจากเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงแบบต่อเนื่องและกรองผ่านไส้กรองขนาดรูกรอง 3 ไมครอน เก็บตัวอย่างจำนวน 5 ชุด ชุดละ 10 ลิตร

เครื่องกรอง

เครื่องกรองแบบเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟนประกอบด้วย Peristaltic pump¹ และชุดไส้กรองเมมเบรนเส้นใยกลวงชนิดโพลีซัลโฟน ขนาด MWCO ที่ 100,000² และ 500,000³ คาลตัน ซึ่งมีพื้นที่การกรอง 650 ตร.ซม.

การทำไวรัสให้เข้มข้น

แบ่งตัวอย่างไวรัสแต่ละชุดเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ลิตร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กรองโดยใช้เมมเบรนขนาด MWCO ที่ 100,000 คาลตัน

กลุ่มที่ 2 กรองโดยใช้เมมเบรนขนาด MWCO ที่ 500,000 คาลตัน

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

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

² Xamplar cartridge: Cat. No. UFP-100-C-4MA ของบริษัท GE Healthcare Bio-Science, USA

³ Xamplar cartridge: Cat. No. UFP-500-C-4MA ของบริษัท GE Healthcare Bio-Science, USA

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างไวรัสที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบหมุนเหวี่ยงเส้นใยกลวงชนิดโพลิซัลโฟน ขนาด MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 คาลตัน 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 คาลตัน โดยวิธี student t-test

ผล

ผลการศึกษาพบว่าน้ำไวรัสก่อนการทำให้เข้มข้นด้วยการกรองมีค่าปริมาณเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ $4.08 \pm 1.58 \mu\text{g/ml}$ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ $4.49 \pm 3.31 \text{ mg/ml}$ และไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 40 เท่าของ MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 คาลตัน มีค่าเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ $148.4 \pm 3.82 \mu\text{g/ml}$ และ $156.4 \pm 59.94 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ $33.37 \pm 3.79 \text{ mg/ml}$ และ $25.80 \pm 4.73 \text{ mg/ml}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และไวรัสที่ทำให้เข้มข้น 100 เท่าของ MWCO ที่ 100,000 และ 500,000 คาลตัน มีค่าเฉลี่ยของอนุภาค 146S เท่ากับ $373 \pm 111.12 \mu\text{g/ml}$ และ $387.4 \pm 125.76 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ $50.00 \pm 1.86 \text{ mg/ml}$ และ $37.03 \pm 2.65 \text{ mg/ml}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สรุปและวิจารณ์

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศพ.ญ. รัชณี อัคริ ผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ ศพ.ญ. วิไล จงสูงงกช ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปากและเท้าเปื่อยและที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ และคณะกรรมการพัฒนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ในการให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขเรื่องเต็มผลงานวิชาการ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานห้องปฏิบัติการฝ่ายผลิตและฝ่ายทดสอบวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

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

พัฒน์พงษ์ ดิษะรา 2552 การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ความเข้มข้นสูงโดยระบบถังปฏิกรณ์

ชีวภาพแบบใช้เมมเบรน 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 (คาลตัน)	
	100,000	500,000
146S ($\mu\text{g/ml}$) (mean $\pm$ SD)	148.4 $\pm$ 43.32	156.4 $\pm$ 59.94
Total protein content (mg/ml) (mean $\pm$ SD)	33.37 $\pm$ 3.79	25.80 $\pm$ 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 (คาลตัน)	
	100,000	500,000
146S ($\mu\text{g/ml}$) (mean $\pm$ SD)	373 $\pm$ 111.12	387.4 $\pm$ 125.76
Total protein content (mg/ml) (mean $\pm$ SD)	50.00 $\pm$ 1.86	37.03 $\pm$ 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 Sawatsing¹ Kingkarn Boonsuya Seeyo²

Abstract

The concentration of foot and mouth disease virus (FMD) virus type O₁₈₉ 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