

เปรียบเทียบผลการใช้โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม 1% กับ 2% ในการเตรียมมีเดียชนิดไม่ใช้ซีรุ่ม ในการเพาะเซลล์ BHK-21 C₁₃ และเพาะไวรัส Type O 189

อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการใช้ โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม 1% กับ 2% ในมีเดียชนิด serum free medium ตัวอย่าง A และ ตัวอย่าง B ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ ชนิดแขวนลอยแบบต่อเนื่อง รวมถึงทดสอบการนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ 189

ผลการเพาะเซลล์ทดสอบตัวอย่างละ 5 passage เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่าง A เติม 1% และ 2% โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม มีค่า Multiplication rate เท่ากับ 3.00 ± 1.06 เท่า และ 2.43 ± 0.98 เท่า มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ $3.98 \pm 0.53 \times 10^6$ cell/ml และ $3.78 \pm 0.37 \times 10^6$ cell/ml ตามลำดับ ตัวอย่าง B เติม 1% และ 2% โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม มีค่า Multiplication rate เท่ากับ 2.51 ± 0.23 เท่า และ 2.01 ± 0.55 เท่า ตามลำดับ มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ $3.30 \pm 0.50 \times 10^6$ cell/ml และ $3.11 \pm 0.53 \times 10^6$ cell/ml ตามลำดับ ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อวัดจาก ค่า Multiplication rate ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างตัวอย่าง A และ ตัวอย่าง B ($P < 0.05$)

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 ทดสอบเซลล์ จากตัวอย่าง A เติม 1% และ 2% โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม มีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ 3.40 µg/ml และ 5.10 µg/ml มีค่า TCID₅₀ เท่ากับ 8.30 log TCID₅₀ /ml และ 8.10 log TCID₅₀ /ml ตามลำดับ ตัวอย่าง B เติม 1% และ 2% โบไวน์คาร์ฟซีรุ่มมีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ 1.8 µg/ml และ 1.40 µg/ml มีค่า TCID₅₀ เท่ากับ 7.70 log TCID₅₀ /ml และ 7.60 log TCID₅₀ /ml ตามลำดับ

การศึกษานี้สรุปได้ว่า มีเดียชนิด serum free medium ทั้ง 2 ตัวอย่าง สามารถนำมาปรับใช้ในการเพาะเซลล์ BHK-21 C₁₃ ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ทั้งการเติม 1% และ 2% โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม ผลการนำเซลล์ไปทดสอบเพาะไวรัส มีค่าอยู่ในเกณฑ์ของงานผลิตไวรัส

คำสำคัญ โบไวน์คาร์ฟซีรุ่ม serum free medium การเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ ชนิดแขวนลอย

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

Comparison of 1% and 2% Bovine Calf Serum in Serum free Medium for BHK-21 C₁₃ cell line and FMD Virus Type O 189 Culture

Aree katsuwonwong ¹

Abstract

The objective of this study was to comparative 2 commercial brand of serum free medium sample A and sample B for culture BHK-21 C₁₃ suspension cell and test for culture FMD virus type O 189 by additive 1% and 2% bovine calf serum.

The results of 5 passage cell cultures for 48 hours. Sample A additive 1% and 2% bovine calf serum cell multiplication rate was 3.00 ± 1.06 and 2.51 ± 0.23 times, cell number count was 3.98 ± 0.53 and $3.78 \pm 0.37 \times 10^6$ cells /ml respectively. Sample B additive 1% and 2% bovine calf serum cell multiplication rate was 2.43 ± 0.98 and 2.03 ± 0.55 times, cell number count was 3.30 ± 0.50 and $3.11 \pm 0.53 \times 10^6$ cells /ml respectively. the cell multiplication rate of sample A and sample B have no significant different. ($P < 0.05$)

The tests for culture FMD virus type O 189 BHK-21 C₁₃ suspension cell from, Sample A additive 1% and 2% bovine calf serum 146 S virus particles was 3.40 and 5.10 µg/ml, TCID₅₀ was 8.3 and 8.7 log TCID₅₀ /ml respectively. Sample B additive 1% and 2% bovine calf serum 146S virus particles was 1.8 and 1.40 µg/ml, TCID₅₀ was 7.70 and 7.60 log TCID₅₀ /ml respectively.

In conclusion both commercial brand of serum free medium by additive 1% and 2% bovine calf serum can apply to culture Bureau of Veterinary Biologics BHK-21 C₁₃ Suspension cell. The test for culture FMD virus type O 189 were accepted.

Keywords: Bovine Calf Serum, serum free medium, BHK-21 C₁₃ Suspension cell culture

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakonratchasima 30130

บทนำ

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ใช้วิธีการผลิตแบบ Suspension cell culture เพาะขยายเชื้อไวรัสใน BHK-21 C₁₃ suspension cell การผลิตวิธีนี้สามารถผลิตไวรัสได้ปริมาณมาก เนื่องจากเซลล์ BHK-21 C₁₃ เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงง่าย เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease; FMDV) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้แอนติเจนที่มีคุณภาพสูง จึงนิยมเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ชนิดนี้เพื่อผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม (MacPherson *et al.*, 1962) การเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ ของ สทช. เพาะเลี้ยงใน Growth medium serum (GMS) ซึ่งเป็นสูตรมีเดียมที่ดัดแปลงจาก Minimal Essential Medium (MEM) โดยสูตรของ GMS จะมีการปรับแต่งสารที่จำเป็นต่อการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มเติม แต่เดิมการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension ใช้ซีรัมเข้มข้น 10% (v/v) ในอาหารเพาะเลี้ยง ต่อมาจากการศึกษาของพยนต์และเชิงชาย (2533) เรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมเข้มข้น 5% (v/v) พบว่าเซลล์ยังเจริญเติบโตได้ดี ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยและวัคซีนล้มปัสกนจึงได้ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของซีรัมใน GMS เป็น 5% (v/v) ทำให้ลดการใช้ซีรัมลงไปได้มาก อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ อาจพบข้อเสียหลายประการ เช่น ปริมาณโปรตีนตกค้าง ซีรัมในแต่ละชุดการผลิต อาจมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอซึ่งยากต่อการควบคุม ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของเซลล์ไม่สม่ำเสมอ ไม่คุ้มทุนสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ใน bioreactor ขนาดใหญ่ (Gstraunthaler *et al.*, 2013)

ปัจจุบันมีการนำ serum free medium และ low serum medium มาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์อย่างแพร่หลาย มีเดียดังกล่าวประกอบด้วยสารเคมีเช่นเดียวกับ Basal Essential Medium (BEM) ทว่าไปแต่เพิ่มสารอาหารและฮอร์โมนที่ทดแทน โปวโนคาร์ลฟซีรัม คือ L-Glutamine, 2-mercaptoethanol, 2-aminoethanol (ethanolamine) Transferrin, และ Insulin (Taupier *et al.*, 1989) ซึ่งเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตและให้ผลผลิตสม่ำเสมอ กระบวนการการทำบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์สามารถทำได้ง่ายขึ้น ช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โปรตีนก่อโรค รวมทั้งการปนเปื้อนจากส่วนประกอบอื่นๆ ในซีรัมที่ส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Even *et al.*, 2006) นอกจากสามารถลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ซีรัมแล้ว ยังสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาทางจริยธรรมจากการใช้สารที่มีต้นกำเนิดจากสัตว์ในกระบวนการผลิตได้อีกด้วย

การนำ serum free medium ดังกล่าวมาใช้ในการเพาะเซลล์ของ สทช. ยังไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากเซลล์ของ สทช. ทำการเพาะด้วย GMS 5% โปวโนคาร์ลฟซีรัม มานาน ได้มีการทดลองนำ serum free medium มาเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension ของ สทช. เซลล์โตเพียง passage แรก ไม่สามารถ Subculture เพื่อเพาะเลี้ยงต่อได้

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการใช้โปวโนคาร์ลฟซีรัม 1% และ 2% (v/v) เพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension cell ใน serum free medium จำนวน 2 ตัวอย่าง เนื่องจากปัจจุบัน การผลิตชีวภัณฑ์ ผู้ผลิตมีการเปลี่ยน วิธีการจากการใช้ไข่ไก่ หรือ ผ่านสัตว์ทดลอง มาเป็นการใช้เซลล์ไลน์มากขึ้นทำโปวโนคาร์ลฟซีรัม ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการเตรียมมีเดียสำหรับเพาะเซลล์ มีราคาสูงขึ้นมากส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น ผลที่ได้จากการศึกษานำไปเป็นข้อมูลเพื่อปรับปรุงงานผลิตมีเดียและลดต้นทุนการผลิตต่อไป

วิธีการวิจัย

1. มีเดียและซีรัม

มีเดียที่ใช้ศึกษาคือ มีเดียสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดไม่ใช้ซีรัม (serum free medium) แบบผงสำเร็จรูป จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ Unknow A และ Unknow B มีสูตรสารเคมีเช่นเดียวกับ GMS+0% serum โดยเพิ่มสารทดแทน serum คือ L-Glutamine, 2-mercaptoethanol, 2-aminoethanol (ethanolamine) Transferrin, และ Insulin (Taupier et al., 1989) มีเดียที่ใช้เพาะไวรัส คือ GMS+0% serum (Rhone merieux, 1986a) และซีรัมที่ใช้ศึกษาคือ โปวโนคาร์ลฟซีรัม¹

2. เซลล์และไวรัส

เซลล์ที่ใช้ศึกษาคือ BHK-21 C₁₃ suspension ไวรัสที่ใช้ศึกษาคือ FMD virus type O 189 จากฝ่ายผลิตภัณฑ์โรคปากและเท้าเปื่อยฯ

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ ใน serum free medium 2 ชนิดที่มีการเติม โปวโนคาร์ลฟซีรัม 1% และ 2% (v/v) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ในขวดแก้วชนิดเติมอากาศ (wolff flask) ขนาด 2 ลิตร เพาะเลี้ยงปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร/รอบการผลิต (passage) ปริมาณเซลล์เริ่มต้น อยู่ระหว่าง $0.5-1.0 \times 10^6$ cell/ml ปรับ pH 7.00 ควบคุมอุณหภูมิที่ 36.5-37 °C ระยะเวลาการเพาะ 48 ชั่วโมง เติมน้ำ 10 ลิตร/ชั่วโมง รอบปั่น 60-70 รอบ/นาที และทำการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง เมื่อครบเวลาเพาะเลี้ยงเซลล์ นำเซลล์ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge²) 324 xg อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที (Rhone merieux, 1986b) เพื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน passage ต่อไป การเพาะเซลล์จะเพาะ 5 passage เพื่อให้เซลล์สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องใน มีเดียทดลอง ที่มีความเข้มข้นของ โปวโนคาร์ลฟซีรัม 1% และ 2% (v/v) ในอาหารเพาะเลี้ยง

4. การเพาะเลี้ยงไวรัส

เพาะเลี้ยง FMD virus type O 189 ด้วย BHK-21 C₁₃ suspension cells ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน มีเดียทดลองในข้อ 3 passage ที่ 5 ใน ขวดแก้วชนิดเติมอากาศ (wolff flask) ขนาด 2 ลิตร โดยนำเซลล์ที่ผ่านการตกตะกอนมาเติมมีเดีย GMS+0% serum ปริมาณเซลล์ 2.5×10^6 cell/ml จากนั้นเติม Seed virus 5% โดยปริมาตร เพาะไวรัสที่อุณหภูมิ 36.5-37 °C ค่า pH 7.4-7.6 รอบปั่น 60-70 rpm เพาะเลี้ยงไวรัสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง cytopathic effect (CPE) เมื่อ CPE มากกว่า 80% จึงเก็บไวรัส (harvest) ทำการสกัดแยกจากเซลล์โดยการ centrifuge² ที่ 2,026 xg อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที (Rhone merieux, 1986d) จากนั้นแยกเก็บน้ำไวรัสเพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

¹ ยี่ห้อ moregate ประเทศ นิวซีแลนด์ ² ยี่ห้อ Beckman coulter รุ่น J6-MI ประเทศ สหรัฐอเมริกา

5. การตรวจสอบปริมาณ 146S

หาปริมาณอนุภาค 146 S โดยใช้วิธีการแยกส่วนในซูโครสกราเดียนท์ (sucrose density gradient : SDG) ที่ระดับความเข้มข้น 15–45% ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge¹ และ rotor swing type SW41Ti 19,160 xg เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที ที่ 4°C จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยเครื่อง UV spectrophotometer² ที่ความยาวคลื่น 254 nm หาพื้นที่ใต้กราฟ (Rhone merieux, 1986f) คำนวณปริมาณอนุภาค 146 S เทียบกับ standard curve ซึ่งมีหน่วย $\mu\text{g/ml}$ (ไชยาและนพพร, 2543)

6. การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสที่มีชีวิต (TCID₅₀)

หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) โดยเจือจางเชื้อ FMDV แบบ 10- fold serial dilution จากนั้นนำไวรัสมาเติมลงใน 96-well plates หลุมละ 100 μl เติม primary lamb kidney cell ที่มีปริมาณเซลล์ 10^6 cell/ml หลุมละ 100-150 μl บ่มในตู้บ่มเซลล์อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเกิด CPE คำนวณปริมาณเชื้อที่ไตเตรทได้ รายงานผลเป็น TCID₅₀/ml โดยใช้ Spearman-Kärber Method (Spearman, 1908; Kärber, 1931)

7. การตรวจสอบความปราศจากเชื้อ

โดยใช้มีเดีย 2 ชนิดคือ fluid thioglycolate medium (FTM) และ soyabean casein digest medium (SCDM) โดย FTM บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 °C และ SCDM บ่มที่ อุณหภูมิ 20-25 °C เป็นเวลา 14 วัน (WOAH, 2024) อ่านผลโดยการสังเกตความขุ่นของอาหารทุกวันต้องไม่พบความขุ่น

8. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกจำนวนของเซลล์ BHK-21 C₁₃ ที่มีชีวิตเป็นจำนวน cell/ml เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงและ 48 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง คำนวณอัตราการแบ่งตัว (multiplication rate) ของเซลล์เพาะเลี้ยงทุก passage จากจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ลบด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น นำผลที่ได้หารด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น (อารีย์และวรัญญ, 2546) นำข้อมูลผลการเพาะเลี้ยงของ BHK-21 C₁₃ suspension cells ที่เพาะเลี้ยงใน serum free medium เติม โบวโนคาร์ลฟซีรั่ม 1% และ 2% (v/v) ทั้ง 2 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ด้วย T-test ผลการนำเซลล์ไปเพาะไวรัส แสดงผลปริมาณ 146S และค่า TCID₅₀ โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา

ผล

ผลการเพาะทดสอบ BHK-21 C₁₃ suspension cell ใน serum free medium ตัวอย่าง A เติม 1% โบวโนคาร์ลฟซีรั่ม จำนวน 5 passage มีค่า multiplication rate เท่ากับ 3.00 ± 1.06 จำนวนเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงเท่ากับ $3.98 \pm 0.53 \times 10^6$ cell/ml (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลการเพาะทดสอบ BHK-21 C₁₃ suspension cell ใน serum free medium ตัวอย่าง A เติม 2% โบวโนคาร์ลฟซีรั่ม จำนวน 5 passage มีค่า

¹ ยี่ห้อ Backman coulter รุ่น SW 41Ti ประเทศสหรัฐอเมริกา

² ยี่ห้อ Biotech รุ่น LKB UvicordS ประเทศสหรัฐอเมริกา

multiplication rate เท่ากับ 2.51 ± 0.23 จำนวนเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงเท่ากับ $3.78 \pm 0.37 \times 10^6$ cell/ml (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลการเพาะทดสอบ BHK-21 C₁₃ suspension cell ใน serum free medium ตัวอย่าง B เติม 1% โบวโนคาร์ลฟซีรัม จำนวน 5 passage มีค่า multiplication rate เท่ากับ 2.43 ± 0.98 จำนวนเซลล์ หลังการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงเท่ากับ $3.30 \pm 0.50 \times 10^6$ cell/ml (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลการเพาะทดสอบ BHK-21 C₁₃ suspension cell ใน serum free medium ตัวอย่าง B เติม 2% โบวโนคาร์ลฟซีรัม จำนวน 5 passage มีค่า multiplication rate เท่ากับ 2.03 ± 0.55 มีจำนวนเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง เท่ากับ $3.11 \pm 0.53 \times 10^6$ cell/ml (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลการเปรียบเทียบค่า multiplication rate ระหว่าง serum free medium ตัวอย่าง A กับ ตัวอย่าง B ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการทดสอบเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 ด้วยเซลล์ที่เพาะจาก serum free medium ตัวอย่าง A เติม 1% โบวโนคาร์ลฟซีรัม มีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ $3.4 \mu\text{g/ml}$ และมีค่า TCID₅₀ เท่ากับ $8.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (รูปที่ 2, รูปที่ 3) ผลการทดสอบเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 ด้วยเซลล์ที่เพาะจาก serum free medium ตัวอย่าง A เติม 2% โบวโนคาร์ลฟซีรัม มีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ $5.10 \mu\text{g/ml}$ และมีค่า TCID₅₀ เท่ากับ $8.10 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (รูปที่ 2, รูปที่ 3) ผลการทดสอบเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 ด้วยเซลล์ ที่เพาะจาก serum free medium ตัวอย่าง B เติม 1% โบวโนคาร์ลฟซีรัม มีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ $1.8 \mu\text{g/ml}$ และมีค่า TCID₅₀ เท่ากับ $7.70 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (รูปที่ 2, รูปที่ 3) ผลการทดสอบเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 ด้วยเซลล์ที่เพาะจาก serum free medium ตัวอย่าง B เติม 2% โบวโนคาร์ลฟซีรัม มีค่า 146 S ไวรัสเท่ากับ $1.40 \mu\text{g/ml}$ และมีค่า TCID₅₀ เท่ากับ $7.60 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (รูปที่ 2, รูปที่ 3)

วิจารณ์

จากผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension ใน serum free medium ตัวอย่าง เติม 1% และ 2% โบวโนคาร์ลฟซีรัม จำนวน 5 passage ทั้ง unknown A และ unknown B มีค่าจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ 48 ชั่วโมง อยู่ในเกณฑ์ของงานผลิตเซลล์ ซึ่งจะอยู่ระหว่าง 2.0×10^6 - 2.8×10^6 cell/ml (พยนต์, 2547) และค่า multiplication rate ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน serum free medium ทั้ง ตัวอย่าง A และตัวอย่าง B สามารถนำไปเพาะเลี้ยง FMD virus type O 189 มีค่า 146 S ไวรัส และค่า TCID₅₀ อยู่ในเกณฑ์ของงานผลิตไวรัส

ในการทดลองครั้งนี้ ผลการเพาะเซลล์ด้วยการเติม 1% และ 2% โบวโนคาร์ลฟซีรัม ให้ผลในการเพาะเซลล์ไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงแปลผลได้ว่า การเติม โบวโนคาร์ลฟซีรัม ลงในมีเดียมี ชนิดนี้ในระดับ 1% ก็เพียงพอแล้ว และสามารถนำข้อมูลไปเปรียบเทียบราคาค้นทุนในการเพาะเซลล์ได้โดยคิดจากราคาต่อลิตร ของ GMS +5% โบวโนคาร์ลฟซีรัม เทียบราคากับ serum free medium +1% โบวโนคาร์ลฟซีรัม

ดังนั้นหาก โบวโนคาร์ลฟซีรัม ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีราคาสูงขึ้นในอนาคต และทำให้เพิ่มต้นทุนสำหรับการใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับอุตสาหกรรม การปรับราคาจำหน่ายชีวภัณฑ์ขึ้นตาม

ต้นทุนทำได้ยาก เนื่องจากนโยบายของกรมปศุสัตว์ ที่ผลิตชีวภัณฑ์เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรในประเทศ สทช. สามารถพิจารณาแนวทางการใช้ serum free medium โดยการเติม 1% โบวีนคัลฟซีรัม ทดแทนการผลิตแบบเดิม ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถเพาะเซลล์ได้แบบต่อเนื่องหรือหากสามารถทำการปรับสภาพเซลล์ให้สามารถโตใน 100 % serum free medium ได้ก็มีแนวโน้มที่เป็นไปได้ในอนาคต สทช.อาจผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้โดยไม่ต้องใช้ โบวีนคัลฟซีรัม

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับจากการศึกษาของ Hela *et al.* (2001) ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21 C₁₃ ในมีเดียที่ปราศจากซีรัม 2 ชนิดและมีเดียที่ปราศจากโปรตีนจากสัตว์ 3 ชนิด พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงไวรัสให้ผลผลิตของไวรัสดีตามไปด้วย และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Paul *et al.* (2016) ที่ได้พัฒนาสูตรมีเดียที่ปราศจากโปรตีนจากสัตว์และซีรัมปรับสารอาหารให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ BHK-21 C₁₃ suspension ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์ที่ได้มีความหนาแน่นสูง ค่าไตเตอร์และปริมาณ 146S ของ FMDV ที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบปกติ และเมื่อตรวจสอบการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกัน พบว่ามีระดับภูมิคุ้มกันเท่ากัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตวัคซีน FMD ในมีเดียที่ไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนและซีรัมได้ ข้อดีของการลดปริมาณซีรัมที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ลง นอกจากช่วยลดต้นทุนการผลิตวัคซีนแล้ว ยังช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนทางชีวภาพ โปรตีนก่อโรค การปนเปื้อนของสารที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่ชัดในซีรัม รวมทั้งเลี่ยงปัญหาทางจริยธรรมจากการใช้สารที่มีต้นกำเนิดจากสัตว์ในกระบวนการผลิต

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า มีเดียชนิด serum free medium ทั้ง 2 ตัวอย่าง สามารถนำมาปรับใช้ในการเพาะเซลล์ BHK-21 C₁₃ ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ทั้งการเติม 1% และ 2% โบวีนคัลฟซีรัม เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจาก serum free medium ทั้ง 2 ตัวอย่างสามารถนำไปเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189 โดยมีค่า 146 S ไวรัส และมีค่า TCID₅₀ อยู่ในเกณฑ์ของงานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และ น.สพ. ฤทธิ์ลือชัย ปุ่สูงเนิน ผู้เชี่ยวชาญด้านไวรัสสัตว์ (ที่ปรึกษา) นางสาวธารีรัตน์ สุภาพ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่กลุ่มบริการวิชาการและการตลาด เจ้าหน้าที่งานสารสนเทศ ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออันดียิ่งในการจัดทำผลงานในครั้งนี้

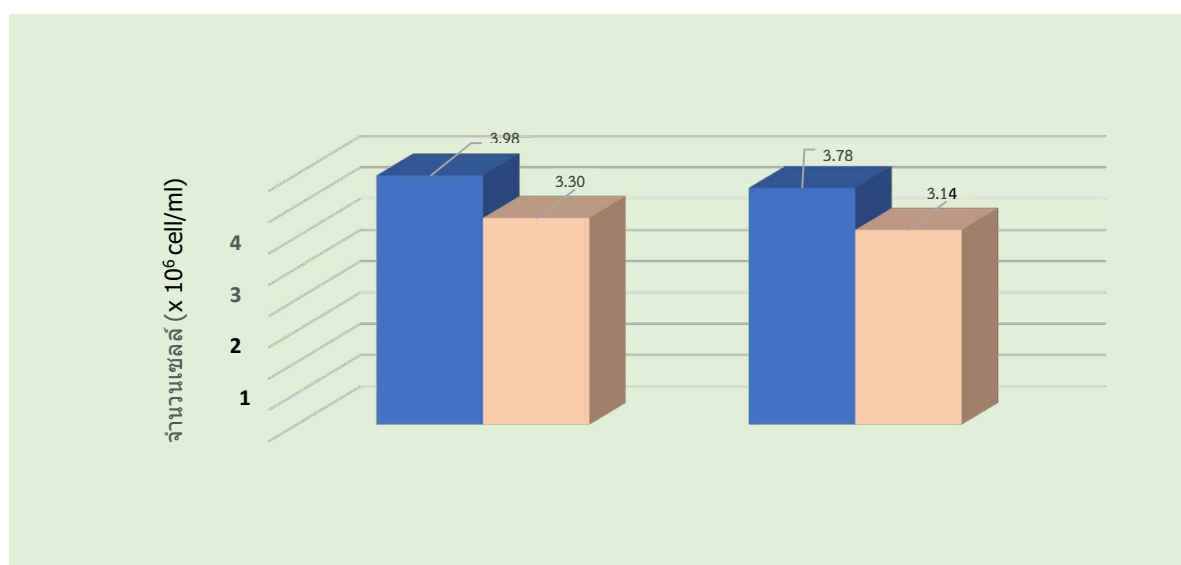
เอกสารอ้างอิง

- ไชยา สง่าประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์ 2543 การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี sucrose density gradient Ultracentrifugation วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2): 61-71
- พยนต์ ลินสูงศ์วัฒน์ และเชิงชาย จันทรัมย์ 2533 การเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ แบบซัสเพนชันคัลเจอร์ ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำตาลเลือด 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 1 (1): 61-71
- พยนต์ ลินสูงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1) : 1-64
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2568 เรื่อง การทดสอบสารเคมีโดยการเพาะเซลล์ BHK₂₁ C₁₃ ในขวดเพาะเซลล์ ขนาด 2 ลิตรแบบเติมอากาศ (SOP-FCSC-024)
- อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์และวรัญญู ชมเฟื่องแก้ว 2546 ผลของสารต้านจุลชีพ Marbofloxacin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ IFFA-3 วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 13 (1) : 29-36
- Even, M.S., Sandusky, C.B. and Barnard, N.D. 2006. Serum-free hybridoma culture: Ethical, scientific and safety considerations. Trends Biotechnol. 24:105–108.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T. And Van Der Valk, J. 2013. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology. 65:791–793.
- Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 162:480-483.
- MacPherson, I. and Stoker, M. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones An investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology. 16: 147–151.
- Paul, G., Shawn, B., Borka, N., Stephen G. and Angel V.R. 2016. Production of stable, immunogenic foot-and-mouth disease vaccine in a chemically defined, serum-free medium optimized for BHK21 Cells. ECI Symposium Series
- Rhone Merieux, 1986a. section 1: culture media -in-FMD VACCINE PRODUCTION CENTER contract n.27/1986. Department of livestock development, Ministry of agriculture and cooperatives, KINGDOM OF THAILAND. pp 1-178
- Rhone Merieux, 1986b. section 2: cell production unit -in-FMD VACCINE PRODUCTION CENTER contract n.27/1986. Department of livestock development, Ministry of agriculture and cooperatives, KINGDOM OF THAILAND. pp 1-70

- Rhone Merieux, 1986d. section 4: virus treatment *-in-* FMD VACCINE PRODUCTION CENTER contract n.27/1986. Department of livestock development, Ministry of agriculture and cooperatives, KINGDOM OF THAILAND. pp 1-51
- Rhone Merieux, 1986f section 6: Laboratory tests *-in-* FMD VACCINE PRODUCTION CENTER contract n.27/1986 Department of livestock development Ministry of agriculture and cooperatives KINGDOM OF THAILAND. 1-114
- Spearman, C. 1908. The method of “right and wrong cases” (“constant stimuli”) without Gauss’s formulae. *British J. of Psychology*. 2:227-242.
- Taupier, M.A., Lord, E.M. 1989. Serum free cell culture medium, U.S. Patent 4816401, March 28, 1989. Available from <https://patents.google.com/patent/US4816401A/en> [Accessed 22 February 2025]
- World Organization for Animal Health (WOAH), 2024. Test for sterility and freedom from contamination of biological material intended for veterinary use. Chapter 1.1.9. Available from <https://www.woah.org/> [Accessed 23 February 2025]

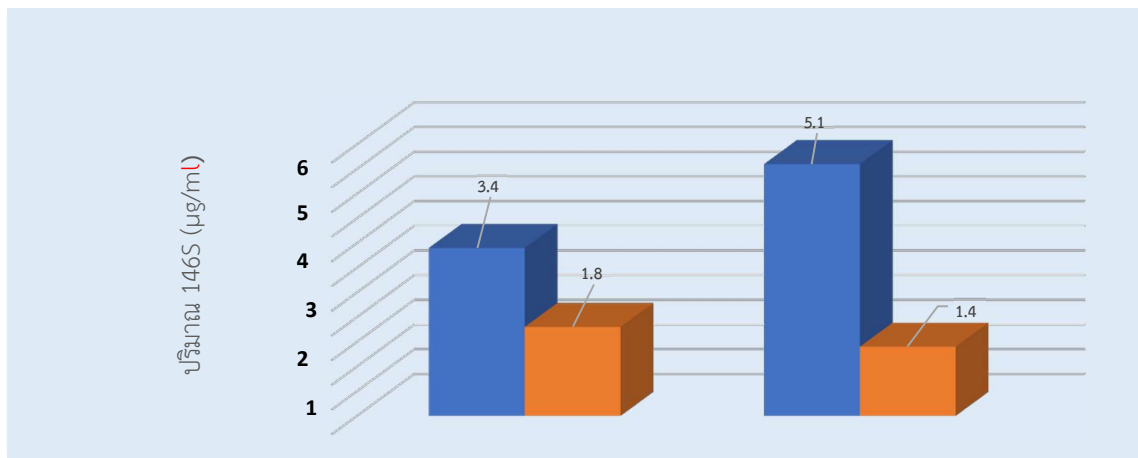
ตารางที่ 1 แสดงค่าการแบ่งตัวของ BHK-21 C₁₃ suspension cell ที่เพาะเลี้ยงใน unknown A และ unknown B serum free medium

Sample	Multiplication rate (times) (mean±SD)	Number of passages
unknown A +1% โบวีนคาล์ฟซีรัม	3.00±1.06	5
unknown A +2% โบวีนคาล์ฟซีรัม	2.43±0.98	5
unknown B +1% โบวีนคาล์ฟซีรัม	2.51±0.23	5
unknown B +2% โบวีนคาล์ฟซีรัม	2.01±0.55	5



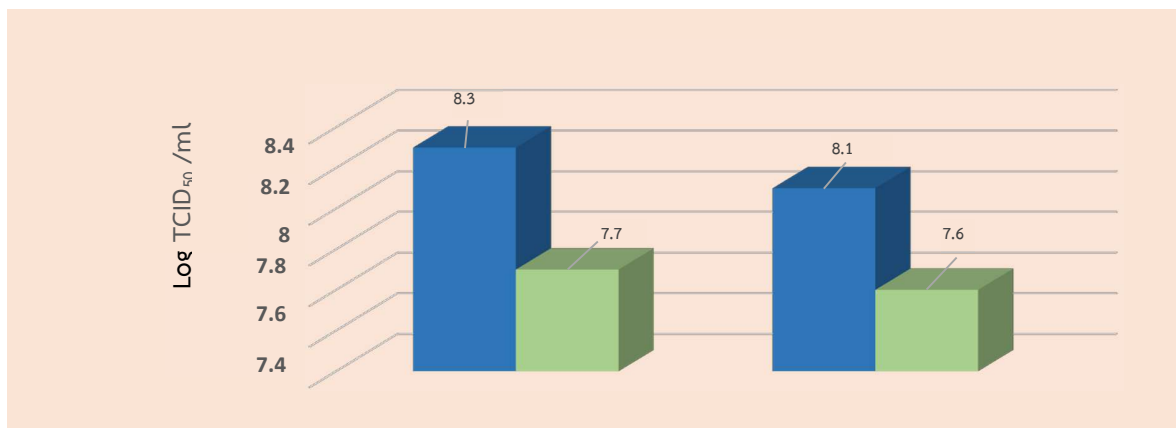
■ unknown A 1% โบวีนคาล์ฟซีรัม 2% โบวีนคาล์ฟซีรัม
■ unknown B 1% โบวีนคาล์ฟซีรัม 2% โบวีนคาล์ฟซีรัม

รูปที่ 1. กราฟแสดงจำนวนเซลล์ BHK-21 C₁₃ เกลี่ย 5 passage จากการเพาะเลี้ยงใน Unknown A และ Unknown B serum free medium เติม 1% และ 2% โบวีนคาล์ฟซีรัม



unknown A 1% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม
 unknown B 1% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม

รูปที่ 2 ค่า 146 S ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O 189 จากเซลล์เพาะเลี้ยงใน Unknown A และ Unknown B serum free medium เติม 1% และ 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม



unknown A 1% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม
 unknown B 1% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม

รูปที่ 3 ค่า TCID₅₀ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย Type O 189 จากเซลล์เพาะเลี้ยงใน unknown A และ unknown B serum free medium เติม 1% และ 2% โปวไน์คาร์ลฟซีรัม

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลการเพาะเซลล์ BHK-21 C13 และ ค่า146 S, TCID₅₀ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ 189

Sample	cell Passage	Cell start 0 hours (x 10 ⁶ cell /ml)	Cell count 24 hours (x 10 ⁶ cell /ml)	Cell count 48 hours (x 10 ⁶ cell /ml)	Multiplication rate (times)	Cell Initial virus culture (x 10 ⁶ cell /ml)	FMDV Type O189 146 S (µg/ml)	FMDV Type O 189 TCID ₅₀ (log TCID ₅₀ /ml)
Sample A + 1% โบวไนต์คัลฟ ซีรัม	1	1.10	1.88	3.15	1.86	-	-	-
	2	1.04	2.41	3.95	2.80	-	-	-
	3	0.68	1.72	3.91	4.75	-	-	-
	4	1.15	2.64	4.35	2.78	-	-	-
	5	1.18	1.93	4.53	2.84	2.50	3.4	8.3
Sample A + 2% โบวไนต์คัลฟ ซีรัม	1	1.06	1.52	2.43	1.29	-	-	-
	2	1.00	2.31	3.69	2.69	-	-	-
	3	0.69	1.49	3.41	3.94	-	-	-
	4	1.11	2.61	3.36	2.03	-	-	-
	5	1.12	1.44	3.62	2.23	2.50	1.8	7.7
Sample B + 1% โบวไนต์คัลฟ ซีรัม	1	0.98	1.58	3.18	2.24	-	-	-
	2	1.08	3.08	3.75	2.47	-	-	-
	3	1.08	1.50	4.18	2.87	-	-	-
	4	1.11	2.90	3.97	2.58	-	-	-
	5	1.12	1.55	3.81	2.40	2.50	5.1	8.1
Sample B + 2% โบวไนต์คัลฟ ซีรัม	1	1.08	1.48	3.32	2.07	-	-	-
	2	1.01	2.56	3.09	2.06	-	-	-
	3	1.05	1.35	2.25	1.14	-	-	-
	4	1.13	2.55	3.57	2.16	-	-	-
	5	0.96	1.32	3.51	2.65	2.50	1.4	7.6