วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 9 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2542

สารบัญ

- **การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม** 7
  3. **การทดลองใช้วัคซีนในท้องที่**

  วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชนี อัตถิ

  วันชัย ตีรณะวรวรรณ

- **เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูปและมีเดียมที่เตรียมขึ้น** 19

  สายพิณ ขุมทรัพย์ สินสมุทร นิลฉวี

- **ประสิทธิภาพในการตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโค โดยวิธีอีไลซ่า** 27

  นิตยา รักศรี รัชนี อัตถิ

- **เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของแพะอายุ 3 เดือน ที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในขนาดต่างกัน** 37

  สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล ลักษณา นิลฉวี

- **ผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในการผลิตระดับอุตสาหกรรม** 45

  สินสมุทร นิลฉวี สายพิณ ขุมทรัพย์

- **กองบรรณาธิการ** 53

แก้คำผิด

หน้าที่	บรรดทัดที่	คำที่ผิด	แก้ไขเป็น.....
สารบัญ ภาษาอังกฤษ	ชื่อเรื่องที่ 2	Suspesion	Suspension
สารบัญ ภาษาอังกฤษ	ชื่อเรื่องที่ 3	enjyme-linked	enzyme-linked
17	17	Septicaemaia	Septicaemia
47	3	มีความสูง 2,600 มิลลิเมตร	มีความสูง 1,895 มิลลิเมตร
47	11	มีความสูง 2,400 มิลลิเมตร	มีความสูง 1,380 มิลลิเมตร
47	11	ขนาดถัง 1,400 ลิตร	ขนาดถัง 3,200 ลิตร
47	25	pH 7.11-7.19	pH 7.10-7.19
47	26	pH 7.21-7.29	pH 7.20-7.29
48	Table 1	1,400 lite tank	1,400 litre tank

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 9 No. 1-2 September 1999

Contents

- Development of the large-scale production of haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine 7
  3. Field trial of haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine
  Vuthiporn Rungvetvuthivitaya Ratchanee Atthi
  Wanchai Teerathavorawan

- Comparison of IFFA-3 suspesion cell growth in premixed and prepared Basal Medium Eagle (BME) 19
  Saipin Khumsab Sinsamut Nilchavee

- The efficacy of an enjyme-linked immunosorbent assay for determining the immunity to haemorrhagic septicaemia in cattle 27
  Nittaya Ruksri Ratchanee Atthi

- Comparison of antibody titer in three-month old goats vaccinated with different doses of foot and mouth disease vaccine 37
  Somkiet Petchvanichkul Lucksana Nilchawee

- Effect of pH on IFFA-3 cell suspension growth in an industrial scale cultivation 45
  Sinsamut Nilchavee Saipin Khumsab

- Editorial board 53

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 9 ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2542 Volume 9 No. 1-2 September 1999

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านการผลิตชีวภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีน
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

ฉบับที่ 1-2 กันยายน 2542 พิมพ์เผยแพร่ กันยายน 2543 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	กัญญา สุวินทรากร
กองบรรณาธิการ	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	ไชยา สง่าประโคน
	สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ
	กฤษดา ลิมปนานนท์
	เดิมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
	พญาไท กรุงเทพฯ 10400
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ : เดือนมีนาคม และกันยายน
พิมพ์ที่	ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย
	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

The Journal of Veterinary Biologics

Editor	Payont Sinsuwonkwat
Assistant editor	Kunya Suvintarakorn
Editorial board	Somjai Kamolsiripichaiporn
	Chaiya Sangaprakhon
	Sahawatchara Ungvanijban
	Kritsada Limpananont
	Dermpol Ratanawonk
Office	Division of Veterinary Biologics,
	Phyathai, Bangkok, Thailand, 10400
Publications	twice a year in March and September

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน วัตถุประสงค์ เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ และหน่วยงานอื่นที่คล้ายกัน งานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

เรื่องที่จะนำลง

1. งานวิจัย (Technical papers) : เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง
2. บทความ (Articles) : เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน
3. เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

การส่งเรื่อง ส่งถึงกองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทร. 044-311592 Fax. 044-312870

ต้นฉบับ

1. ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น
2. ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ บนกระดาษ A 4 ส่งมาพร้อมกัน Diskket โดยพิมพ์บทความด้วยโปรแกรม MS.word 6 ขนาดกั้นบน 5/4" ล่าง 1" ซ้าย 5/4" ขวา 3/4" พร้อมสำเนาอีก 1 ชุด
3. มีความยาวไม่เกิน 8 หน้า

การลำดับเรื่อง

1. **ชื่อเรื่อง** (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี
2. **ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน** (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวกเป็นหมายเหตุ (foot note)
3. **บทคัดย่อ** (Abstract) เขียนสั้นให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แต่ละภาษาเขียนแยกหน้าต่างหาก โดยถ้าบทความหลักเป็นภาษาไทยให้เขียนบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษไว้หลังเอกสารอ้างอิงและถ้าบทความหลักเป็นภาษาอังกฤษให้เขียนบทคัดย่อเป็นภาษาไทยไว้หลังเอกสารอ้างอิงเช่นกัน
4. **คำสำคัญ** (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 4 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาไทยสะกดทับศัพท์ อยู่ใต้บทคัดย่อ
5. **เนื้อหา** (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

5.1 **บทนำ** (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

5.2 **อุปกรณ์และวิธีการ** (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้าควรทำเป็น foot note ไว้ที่ข้างล่างของหน้านั้น

5.3 **ผล** (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลาย ๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือ รูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเองและมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น ๆ

รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น ๆ

5.4 **วิจารณ์** (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึงตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 **สรุป** (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

5.6 **กิตติกรรมประกาศ** (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือที่ได้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

5.7 **เอกสารอ้างอิง** (References)

ก. **กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไลและคณะ, 2532)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Lin และLee (1981), Kumagai และคณะ (1961) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Lin and Lee, 1981) (Kumagai et al., 1961)

ข. **การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง** ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทย เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

กัญญา สุวินทรากร และอนุทิน หาญวีรพล 1991 (2534) การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไซน่าสเตรนซนิดผ่านกระต่าย โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชสารสัตวแพทย์ 21(2) : 69-78

Johnson, R.H. and Collings, D.F., 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci., 12 : 570-572.

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำราให้ระบุ ชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการ) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

Van Oirschot, J.T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6th ed. Leman, A.D. ed., Iowa state university Press, Iowa. p. 293-297.

หมายเหตุ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย ใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้ว ให้ผู้เขียนเพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม
3. การทดลองใช้วัคซีนในท้องที่

วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1] รัชนี อัตถิ[1] วันชัย ตีรถะวรวรรณ[1]

บทคัดย่อ

การทดลองใช้วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน(น้ำในน้ำมัน) ในท้องที่เพื่อทดสอบความปลอดภัย โดยศึกษาอาการข้างเคียงหลังฉีดวัคซีน ได้แก่ การแพ้วัคซีนชนิด Immediate type anaphylaxis และการบวมบริเวณฉีด นอกจากนี้ยังทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีนด้วย ผลจากการทดลองพบว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันไม่ทำให้เกิดการแพ้ชนิด immediate type anaphylaxis เมื่อฉีดในโค 1,075 ตัว และกระบือ 495 ตัว ขณะที่โค 286 ตัว และกระบือ 338 ตัว ที่ได้รับวัคซีนชนิดอะลั่มเจล มีการแพ้วัคซีนร้อยละ 4.5 เมื่อทดสอบการบวมบริเวณฉีด พบว่าควรฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อลึกตัวละ 1 มล. ด้วยเข็มเบอร์ 18 ยาว 11/2 นิ้ว โดยหลังฉีดวัคซีน 3 วัน บริเวณที่ฉีดจะมีการบวมระดับน้อยและปานกลางและจะค่อยๆยุบหายไปภายใน 21 วัน การตรวจระดับแอนติบอดีในซีรั่มโดยใช้วิธี enzyme - linked immunosorbent assay พบว่า ก่อนฉีดวัคซีน โคร้อยละ 100 (19/19) มีระดับแอนติบอดีต่ำกว่า 1:320 หลังจากนั้น ในวันที่ 21 และ 42 ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นเป็น 1:320 หรือมากกว่า และเมื่อตรวจโดยวิธี Passive mouse protection พบว่า ก่อนฉีดวัคซีน ซีรั่มจากโคร้อยละ 100 (19/19) ให้ผลลบ (ไม่ให้ความคุ้มโรคในหนูขาว) และหลังฉีดวัคซีน 21 วันและ 42 วันให้ผลบวก (ให้ความคุ้มโรคในหนูขาว) ร้อยละ 68.42 และ 89.47 ตามลำดับ

คำสำคัญ : เฮโมรายิกเซพติซีเมีย วัคซีนชนิดน้ำมัน การทดลองในท้องที่ ผลข้างเคียง

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

วัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดเชื้อตายที่มีใช้กันอยู่ในประเทศต่างๆเป็นวัคซีนที่ผลิตโดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ มีทั้งที่เป็นบรอทแบคเทอรินไม่ผสมสารแอดจูแวนท์ บรอทแบคเทอรินที่ตกตะกอนด้วยอะลั่มผสมอะลั่มเจล และผสมน้ำมันเป็นแอดจูแวนท์ ทั้งชนิดน้ำในน้ำมัน และน้ำในน้ำมันในน้ำ หรือมัลติเพิลอีมัลชั่น ซึ่งวัคซีนชนิดน้ำมันเป็นวัคซีนชนิดเดียวในปัจจุบันที่ให้ความคุ้มโรคได้นานถึง 1 ปี ขณะที่วัคซีนชนิดอื่นให้ความคุ้มโรค 4-6 เดือน (De Alwis,1984; Verma and Jaiswal,1998) และเกิดภาวะภูมิแพ้ชนิด Immediate type anaphylaxis ซึ่งอาจทำให้สัตว์ช็อคและตายหลังฉีดวัคซีนน้อยกว่า (Bain *et al.*, 1982) คุณสมบัติทั้งสองนี้ทำให้วัคซีนชนิดน้ำมันเป็นวัคซีนที่หลายประเทศเลือกใช้ และมีการปรับปรุงเพื่อความสะดวกในการผลิต การนำไปใช้และความปลอดภัย (Reddy *et al.*,1995; Shah *et al.*,1997; Verma and Jaiswal,1997) อย่างไรก็ตามวัคซีนชนิดน้ำมันโดยเฉพาะชนิดน้ำในน้ำมันอาจทำให้เกิดปฏิกริยาบริเวณฉีดเช่น การอักเสบ บวม หรือเกิดฝีปราศจากเชื้อได้ ซึ่งขึ้นกับคุณสมบัติของวัคซีน ขนาดและวิธีการฉีดวัคซีน(McKercher,1984)

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่มีคุณภาพดี มีความคงตัวสูง มีความหนืดต่ำและให้ความคุ้มโรคได้นานไม่ต่ำกว่า 1 ปี (รัชนีและคณะ 2538; รัชนีและคณะ 2540) ผ่านการทดสอบในหนูขาวและโคทดลองแล้ว จึงได้นำวัคซีนนี้ออกทดสอบใช้ในท้องที่โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความปลอดภัยของวัคซีนและเป็นข้อมูลการฉีดวัคซีนให้กับโคและกระบือในท้องที่ โดยทดสอบเกี่ยวกับอาการข้างเคียงหลังฉีดวัคซีน ได้แก่ การแพ้วัคซีนชนิด immediate type anaphylaxis และการบวมบริเวณฉีด โดยเปรียบเทียบกลุ่มสัตว์ และการใช้เข็มฉีดวัคซีนที่มีความยาวต่างกัน 2 ขนาด คือ 1 และ 11/2 นิ้ว และสุ่มตัวอย่างโคที่ฉีดวัคซีนแล้วเก็บซีรั่มนำมาตรวจวัดระดับแอนติบอดีก่อนและหลังฉีดวัคซีน โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และวิธี passive mouse protection

วิธีการทดลอง

วัคซีน

ใช้วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน 2 ชุด ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายประกอบด้วย เชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำในน้ำมัน[1] ผลิตตามวิธีของรัชนีและคณะ (2540) ประกอบด้วยแบคเทอรินมีความขุ่นก่อนผสมกับแอดจูแวนท์ วัดโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (OD_{540}) เท่ากับ 1.2 และ 2.4 สำหรับฉีดโคและกระบือเข้ากล้ามเนื้อปริมาณ 2 และ 1 มล. ตามลำดับ และวัคซีนชนิดผสมอะลั่มเจลของกรมปศุสัตว์ เพื่อเปรียบเทียบอาการข้างเคียงหลังฉีดวัคซีน

---

[1] Montanide ISA 70, Seppic, ฝรั่งเศส

การฉีดวัคซีนและสังเกตอาการข้างเคียง

การฉีดวัคซีนให้กับกลุ่มโคและกระบือ โดยฉีดวัคซีนขนาด 2 มล. ซึ่งเป็นขนาดฉีดที่กำหนดในเบื้องต้น ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพก (Glutial muscle) แล้ววิเคราะห์ผล เมื่อมีผลข้างเคียงโดยเฉพาะการบวมบริเวณฉีดจึงกำหนดขนาดฉีดลดลงเป็น 1 มล. โดยมีปริมาณแอนติเจนเท่าเดิมและวัคซีนผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการคุ้มโรคในโคทดลองแล้ว (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) แล้วจึงทดสอบผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น แบ่งวิธีการทดลองได้ดังนี้

การทดลองที่ 1 : ฉีดวัคซีนให้กับโคและกระบือของเกษตรกรรายย่อย 16 จังหวัดในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ เป็นโค 1,570 ตัว และกระบือ 624 ตัว โดยในแต่ละหมู่บ้านแบ่งสัตว์เป็น 2 กลุ่ม ฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน 2 มล.กลุ่มหนึ่ง และชนิดผสมอะลั่มเจลอีกกลุ่มหนึ่ง หลังจากนั้นเฝ้าสังเกตและนับจำนวนสัตว์ที่แสดงอาการแพ้วัคซีนชนิด Immediate type anaphylaxis เช่นกระวนกระวาย ขนลุกตั้งชัน น้ำมูกน้ำลายไหล หายใจหอบ ไอ ล้มลงนอน ช็อคหรือตายในวันที่ฉีดวัคซีน

การทดลองที่ 2 : ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันปริมาณ 2 มล. ให้กับโค และกระบือ แล้วสังเกตการบวมบริเวณฉีด ภายใน 1 สัปดาห์หลังฉีด ทำการทดลองในกลุ่มโค 1,061 ตัวและกระบือ 168 ตัวของเกษตรกรรายย่อย ในจังหวัดนครราชสีมาซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองเปรียบเทียบกับโคพันธุ์ผสมระหว่างสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน ซาฮิวาล และเรดซินดี จากต่างประเทศ จำนวน 302 ตัว ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย จังหวัดสระบุรี

การทดลองที่ 3: สังเกตการบวมระดับต่างๆ ในเวลา 1 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันซึ่งปรับลดขนาดฉีดเหลือ 1 มล. โดยเปรียบเทียบการใช้เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 และ 11/2 นิ้ว ฉีดวัคซีนให้กับโคนมพันธุ์ผสมออสเตรเลียนพรีเซียนและซาฮิวาล (AFS) ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ ทับกวาง จังหวัดสระบุรี จำนวน 190 และ 191 ตัวตามลำดับ แบ่งระดับการบวมบริเวณฉีดโดยวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่บวมและความหนาของผิวหนังที่บวมขึ้น ดังนี้

ระดับการบวมน้อย หมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม <5 ซม

ปานกลาง หมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม ≥ 5 ซม. และ ผิวหนังหนาขึ้น < 1 ซม.

มาก หมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม ≥ 5 ซม. และ ผิวหนังหนาขึ้น ≥ 1 ซม.

การทดลองที่ 4 : ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมัน ขนาด 1 มล. ให้กับโคคละพันธุ์ ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทับกวาง จังหวัดสระบุรี จำนวน 131 ตัว แล้วตรวจสอบบันทึกการบวมระดับต่างๆ ในวันที่ 3,7,14 และ 21 หลังฉีดวัคซีน และหลังจากฉีดวัคซีน 21 และ 42 วัน สุ่มตัวอย่างโค 19 ตัว มาเจาะเลือดเก็บซีรั่ม นำมาตรวจระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และ passive mouse protection (รัชนี และคณะ, 2538 ; Bain *et al.*,1982)

วิธี Passive mouse protection

ทำตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Bain et al.(1982) โดยฉีดตัวอย่างซีรั่มให้หนูขาว (Swiss albino) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ 5 ตัว เข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดเชื้อพิษให้หนูทั้ง 5 ตัวรวมหนูที่ไม่ได้ฉีดซีรั่มอีก 5 ตัวเป็นกลุ่มควบคุม โดยใช้เชื้อ *P. multocida* สเตรนเดียวกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เจริญใน

tryptose phosphate broth เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ฉีดในขนาด 100 LD_{50} สังเกตอาการหนูเป็นเวลา 7 วัน หนูกลุ่มควบคุมจะต้องตายหมด ส่วนหนูกลุ่มที่ฉีดซีรั่ม หากมีหนูรอดอย่างน้อย 1 ตัวถือว่าผล passive mouse protection เป็นบวก นั่นคือ ซีรั่มนั้นมีภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA

นำซีรั่มมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA แอนติเจนที่ใช้เคลือบเพลตเป็น heat stable antigen ที่เตรียมตามวิธีของ Heddleston et al.(1972) โดยเพาะเซลล์แบคทีเรียบน dextrose starch agar ที่อุณหภูมิ 37°ซ 18 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.15 M PBS, pH 7.2 ต้มใน waterbath อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 10,000 g อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เก็บส่วน Supernatant นำไปเคลือบเพลตโดยเจือจางด้วย 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6 ให้มีขนาดความเข้มข้นโปรตีน 80 µg/ml แล้วหยดลงในไมโครเพลต 96 หลุมชนิดก้นแบน[2]หลุมละ 100 µl เก็บในกล่องที่มีความชื้นที่ 4°ซ 1 คืน ล้างเพลต 3 ครั้งด้วยสารละลาย 0.15M PBS, pH7.2 ที่มี 0.05% tween20 (PBST) เติมสารละลาย 0.5% gelatin ใน PBST หลุมละ 200 µl อบที่ 37 °ซ 1 ชั่วโมง ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรกแล้วจึงเติมตัวอย่างซีรั่มที่เจือจาง 1:320 หลุมละ 100 µl อบที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง ล้างเพลต 3 ครั้งด้วย PBST แล้วจึงเติม horseradish peroxidase rabbit anti-bovine IgG [3] เจือจาง 1:7000 0.5% gelatin ใน PBST หลุมละ 100 µl อบที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง ล้างเพลต 3 ครั้งด้วย PBST แล้วจึงเติม O-phenylenediamine substrate อบในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที จึงหยุดปฏิกริยาด้วย 5N H_2SO_4 หลุมละ 50 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm (OD_{492}) แต่ละตัวอย่างทำ duplicate ในเพลตเดียวกัน และการทดสอบทุกเพลตมี negative control control และ positive control serum การแปลผลถือว่า ตัวอย่างซีรั่มที่มีค่า OD_{492} เท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่าของซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค (negative control serum) เป็นบวกหรือมีระดับแอนติบอดี ≥1:320

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบจำนวนโคและกระบือที่แสดงอาการแพ้วัคซีนชนิด immediate type anaphylaxis หลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและชนิดผสมอะลั่มเจล และทดสอบความแตกต่างของจำนวนโคและกระบือจากการบวมบริเวณฉีดเมื่อทดลองในโคและกระบือพื้นเมืองกับโคพันธุ์ต่างประเทศ ในการทดลองที่ 1 และ 2 ด้วย proportional Z-test และทดสอบความแตกต่างของการบวมบริเวณฉีดในการใช้เข็มฉีดความยาว 1 และ 1 1/2 นิ้ว ด้วย χ^2- test

---

[2]Maxisorp, Nunc, เดนมาร์ค [3]Sigma,เยอรมนี

ผลการทดลอง

การฉีดวัคซีนขนาด 2 มล.

จากการทดสอบอาการแพ้วัคซีนชนิด immediate type anaphylaxis ในโคและกระบือของเกษตรกรรายย่อยใน 16 จังหวัด พื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ หลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันขนาด 2 มล. เปรียบเทียบกับวัคซีนชนิดผสมอะลั่มเจล พบว่าโค 1,075 ตัวและกระบือ 495 ตัวที่ได้รับวัคซีนชนิดน้ำมันไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ขณะที่ร้อยละ 4.5 ของโค 286 ตัวและกระบือ 338 ตัว ที่ได้รับวัคซีนชนิดผสมอะลั่มเจล แสดงอาการแพ้วัคซีน คือ ซึม ขนลุกขัน หายใจหอบ (ตารางที่ 1) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการทดสอบการบวมบริเวณฉีดใน 1 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันให้กับโคและกระบือพื้นเมืองของเกษตรกรรายย่อยเปรียบเทียบกับโคพันธ์ต่างประเทศ พบว่า โคพันธุ์พื้นเมืองของเกษตรกรรายย่อยมีการบวมบริเวณฉีดร้อยละ 7 ขณะที่โคพันธุ์ต่างประเทศ มีการบวมร้อยละ 60 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบการบวมระหว่างโคและกระบือพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยการบวมในโคมากกว่ากระบือ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1: ผลการแพ้วัคซีนชนิด immediate type anaphylaxis หลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิก เซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และชนิดผสมอะลั่มเจลในโค-กระบือ

ชนิดสัตว์	วัคซีนชนิดน้ำมัน		วัคซีนชนิดผสม Alum gel	
	จำนวนที่ฉีดวัคซีน	แพ้วัคซีน	จำนวนที่ฉีดวัคซีน	แพ้วัคซีน
โค	1,075	0 (0.0%)	286	8 (2.8%)
กระบือ	495	0 (0.0%)	338	20 (5.9%)
รวม	1,570	0 (0.0%)*	624	28 (4.5%)*

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ , $P<0.05$

ตารางที่ 2: ผลการบวมบริเวณฉีดหลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันนาน 1 สัปดาห์ แยกตามกลุ่มชนิดและพันธุ์สัตว์

กลุ่มสัตว์	โค		กระบือ	
	จำนวนที่ฉีดวัคซีน	บวมบริเวณที่ฉีด	จำนวนที่ฉีดวัคซีน	บวมบริเวณที่ฉีด
พันธุ์พื้นเมือง	1,061	74 (7.0%)*	168	1 (0.6%)
พันธุ์ต่างประเทศ	302	181 (60.0%)*	-	-
รวม	1,363	255 (18.7%)	168	1 (0.6%)

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ,P<0.01

การฉีดวัคซีนขนาด1 มล.

จากการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันซึ่งปรับลดขนาดฉีดเหลือ 1 มล. โดยมีแอนติเจนเท่าเดิม เพื่อศึกษาการบวมหลังฉีด พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เข็มความยาว 1 นิ้วและ 1 ½ นิ้วในการฉีดวัคซีน การบวมบริเวณฉีดจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ(P<0.01) โดยการบวมในกลุ่มโคที่ฉีดด้วยเข็มยาว 1 นิ้ว มากกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยเข็มยาว 1 ½ นิ้ว (ตารางที่ 3)

เมื่อศึกษาการบวมบริเวณฉีดวัคซีนระดับต่างๆ ในวันที่ 3, 7, 14 และ 21 ตามการทดลองที่ 4 พบว่ามีผลรวมของอัตราการบวมทุกระดับเป็นร้อยละ 10.69 ในวันที่ 3 หลังจากนั้นการบวมลดลงเหลือร้อยละ 6.11 และ 0.76 ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ และไม่พบการบวมในวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน (ตารางที่ 4) และจากการทดสอบภูมิคุ้มโรคโค 19 ตัวที่สุ่มตัวอย่างจากกลุ่มโค 131 ตัวในการทดลองที่ 4 นี้ พบว่าหลังฉีดวัคซีน 21 และ 42 วัน โคมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ซึ่งตรวจโดยวิธี ELISA สูงขึ้นจากเดิมที่มีไตเตอร์ก่อนฉีดต่ำกว่า 1:320 เป็น 1:320 และมากกว่า ซึ่งถือว่ามีความคุ้มโรค และเมื่อตรวจด้วยวิธี passive mouse protection พบว่ามีความคุ้มโรคร้อยละ 68.42 (13/19) และ 89.47(17/19) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 : จำนวนโคที่มีการบวมบริเวณฉีดที่ระดับต่างๆหลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน ให้กับโคนมพันธุ์ AFS 1 สัปดาห์โดยใช้เข็มฉีดเบอร์ 18 ยาว 1 และ 11/2 นิ้ว

เข็มเบอร์ 18	**จำนวนที่ฉีดวัคซีน**	**จำนวนโคที่มีการบวมบริเวณฉีดระดับ***			
		น้อย	**ปานกลาง**	**มาก**	**รวม**
ยาว 1 นิ้ว	190	92 (48.42%)	23 (12.11%)	2 (1.05%)	117 (61.58%)**
ยาว 1 1/2นิ้ว	191	51 (26.70%)	15 (7.85%)	2 (1.05%)	68 (35.60%)**

*ระดับการบวมบริเวณฉีด **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ,P<0.01

น้อย : เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม <5 ซม

ปานกลาง : เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม ≥ 5 ซม.และ ผิวหนังหนาขึ้น < 1 ซม.

มาก : เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่บวม ≥ 5 ซม. และ ผิวหนังหนาขึ้น ≥ 1 ซม.

ตารางที่ 4: จำนวนและร้อยละของโคที่มีการบวมบริเวณฉีด จากการสังเกตหลังฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน 3, 7, 14 และ 21 วัน (n =131)

ระดับการบวมบริเวณฉีด	**หลังฉีดวัคซีน (วัน)**			
	3	**7**	**14**	**21**
น้อย	12 (9.16%)	8 (6.11%)	1 (0.76%)	0 (0%)
ปานกลาง	2 (1.53%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
มาก	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
รวม	**14 (10.69%)**	**8 (6.11%)**	**1 (0.76%)**	**0 (0%)**

ตารางที่ 5 : อีไลซ่าไตเตอร์และผลการทดสอบ passive mouse protection (PMPT) ของซีรั่มโคที่ฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน, n=19

หลังฉีดวัคซีน	จำนวนโค		
	อีไลซ่าไตเตอร์		มีความคุ้มโรคตรวจด้วย PMPT
	<1:320[a]	≥1:320[b]	
0 วัน	19 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
21 วัน	0 (0%)	19 (100%)	13 (68.42%)
42 วัน	0 (0%)	19 (100%)	17 (89.47%)

[a] ถือว่าไม่มีความคุ้มโรค

[b] ถือว่ามีความคุ้มโรค

วิจารณ์

วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่มีการใช้ในประเทศอื่นๆ เช่น ประเทศมาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา หรือปากีสถาน (FAO,1991; Shah *et al.*,1997; Verma and Jaiswal,1997) มีขนาดฉีดตัวละ 3 -5 มล.ทั้งสิ้น การทดลองครั้งนี้ได้กำหนดขนาดฉีดเบื้องต้นของวัคซีนที่จะใช้ในท้องที่ให้เหลือปริมาณฉีดตัวละ 2 มล. โดยคาดว่าน่าจะเป็นปริมาณที่เหมาะสม สะดวกสำหรับผู้ฉีด และทำให้บริเวณที่ฉีดเกิดอาการบวมน้อย เพราะการบวมและอักเสบบริเวณฉีดมากหรือน้อย นอกจากขึ้นกับคุณสมบัติ และปริมาณแอนติเจนในวัคซีน คุณสมบัติการเป็นอีมัลชั่นของวัคซีน ชนิดและสายพันธุ์สัตว์แล้วยังขึ้นกับปริมาณที่ฉีดด้วย (Mc Kercher,1986)

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 ใช้วัคซีนขนาด 2 มล. ไม่พบว่าโคและกระบือ เกิดสภาวะภูมิแพ้ชนิด immediate type anaphylaxis หลังได้รับวัคซีนชนิดน้ำมัน ขณะที่วัคซีนชนิดอะลั่มเจล ทำให้เกิดการแพ้ทั้งในโคและกระบือรวม 4.5% ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของหลายประเทศในเอเชียซึ่งระบุว่าหากฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอะลั่มเจล จะทำให้ทำเกิดการแพ้ชนิด immediate type anaphylaxis 0.1 ถึง 10 เปอร์เซนต์ (Bain,1982) ชี้ให้เห็นว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่ผลิตได้ทำให้เกิดการแพ้น้อยกว่าวัคซีนชนิดอะลั่มเจล ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์หนึ่งของการผลิตวัคซีนชนิดน้ำมันขึ้นแทนวัคซีนชนิดอะลั่มเจล นอกเหนือจากคุณสมบัติการให้ความคุ้มโรคที่สูงและนานกว่า

การที่วัคซีนชนิดน้ำมันไม่ก่อให้เกิดการแพ้ชนิด immediate type anaphylaxis ซึ่งเกิดขึ้นภายในเวลาอันรวดเร็วหลังสัตว์ได้รับวัคซีนก็เนื่องจาก คุณสมบัติของวัคซีนชนิดน้ำมันโดยเฉพาะชนิดน้ำในน้ำมัน ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีลักษณะวัคซีนที่แอนติเจนซึ่งเป็น whole killed bacteria กระจายตัวอยู่ในอนุภาคน้ำมัน เมื่อฉีดเข้าร่างกายวัคซีนจะรวมตัวอยู่บริเวณฉีด เกิด depot formation และแอนติเจนจะค่อยๆแยกตัวออกจากน้ำมันแล้วจึงถูกดูดซึมจากบริเวณที่ฉีดอย่างช้าๆ การรวมตัวของวัคซีนชนิดน้ำมันบริเวณที่ฉีด ก็จะมีเซลล์ macrophage ถูกดึงดูดมารวมกันเป็นจำนวนมากบริเวณนั้น เป็นกลไกหนึ่งในการทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มโรคในร่างกายสัตว์ ทำให้เกิดการบวม อักเสบขึ้น ซึ่งปฏิกริยาที่มีการบวมบริเวณฉีดนี้ไม่อาจหลีกเลี่ยงได้และขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างดังกล่าวแล้ว ตามปกติการบวมจะยุบหายไปภายใน 3 สัปดาห์ ยกเว้นในสัตว์บางตัวที่อาจเกิดสภาวะภูมิแพ้ชนิด delayed type hypersensitivity

ผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าการฉีดด้วยวัคซีนขนาด 2 มล. ทำให้เกิดการบวมภายใน 1 สัปดาห์ และเป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มโคพันธุ์ต่างประเทศมีอัตราการบวมบริเวณที่ฉีดสูงกว่ากลุ่มโคพื้นเมืองมาก ซึ่งเป็นการสนับสนุนในเรื่องของชนิดและพันธุ์สัตว์เป็นปัจจัยหนึ่งของการบวมต่างกัน อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาแยกสายพันธุ์โดยละเอียดแต่ก็สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นได้ว่าสายพันธุ์มีผลต่อการบวมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ แอนติเจนในวัคซีนเองก็มีผลต่อการบวมบริเวณฉีดด้วย ตามที่ได้เคยทดลองเบื้องต้น(ข้อมูลซึ่งไม่ได้เผยแพร่)โดยเปรียบเทียบระดับการบวมจากการฉีดวัคซีนชนิดน้ำในน้ำมันกับอีมัลชั่นที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกับวัคซีนแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแทน whole killed bacteria

การลดอาการข้างเคียงโดยการแก้ไขที่แอนติเจนเป็นไปได้ยากเพราะแอนติเจนในวัคซีนประกอบด้วยสาร endotoxin ซึ่งเป็น immunogen ด้วย ดังนั้นเพื่อที่จะลดอาการข้างเคียงให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้เมื่อพบว่าการใช้วัคซีนขนาดฉีด 2 มล. ทำให้มีการบวมบริเวณฉีดในอัตราที่สูง จึงได้ปรับลดขนาดฉีดลง ดำเนินการทดลองในเรื่องของการฉีด และศึกษาระดับการบวมบริเวณฉีดดังการทดลองที่ 3 และ 4 ผลจากการทดลองทำให้พบว่ากลุ่มโคที่ใช้เข็มฉีดวัคซีน ที่มีความยาว 1 1/2นิ้ว มีอัตราการบวมน้อยกว่าโคกลุ่มเดียวกันที่ฉีดด้วยเข็มยาว 1 นิ้ว ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากกลุ่มที่ใช้เข็มยาวกว่า วัคซีนถูกฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึกกว่าซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปของวัคซีนชนิดน้ำมันที่ควรฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึกและไม่ควรฉีดเข้าใต้ผิวหนังเพราะจะทำให้มีการอักเสบบริเวณฉีดหรือเป็นฝีแบบ granuloma ได้ (Goto,1978)และเมื่อศึกษาระดับการบวมบริเวณฉีดเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้นก็พบว่า จากกลุ่มโคทดลองทั้งสิ้น 131 ตัว จะเริ่มเห็นการบวมใน 3 วันหลังฉีดวัคซีนซึ่งเป็นการบวมขนาดน้อยและปานกลาง การบวมจะค่อยๆลดลง และยุบหายไปในเวลาไม่เกิน 21 วัน โดยในกลุ่มทดลองนี้ไม่พบโคตัวใดมีการบวมมากเลย ดังนั้นการฉีดที่ถูกต้องเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการบวมบริเวณฉีดซึ่งสามารถแก้ไขได้ โดยการระมัดระวังการฉีดที่ถูกทาง การใช้เข็มฉีดยาขนาดที่เหมาะสมกับขนาดของสัตว์ และการรักษาความสะอาดขณะฉีด

สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังฉีดวัคซีนจากการสุ่มตัวอย่างเก็บซีรั่มโค 19 ตัวจากกลุ่ม 131 ตัว ที่ฉีดวัคซีนในการทดลองที่ 4 พบว่า ระดับแอนติบอดีตรวจโดย ELISA สูงขึ้น ตั้งแต่หลังฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์ เช่นเดียวกับความคุ้มโรคที่ตรวจโดยวิธี PMPT ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ได้มีการทดลองแล้วว่ามีความสัมพันธ์กับ

ความคุ้มโรคเมื่อทดลองโดยการฉีดพิษทับในโค (Chandrasekaran *et al.*1994;Bain *et al.*1982) ดังนั้น ก็สามารถสรุปผลโดยรวมได้ว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันให้ความคุ้มโรคเป็นที่น่าพอใจ

สรุป

วัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันมีผลข้างเคียงน้อยกว่าวัคซีนชนิดอะลั่มเจลเมื่อทดลองใช้ในท้องที่ ไม่พบการแพ้ชนิด immediate type anaphylaxis เมื่อฉีดวัคซีนขนาด 1 มล.พบว่าจะทำให้เกิดการบวมบริเวณฉีดระดับบวมน้อย และปานกลาง ภายใน 3 วันหลังฉีด และการบวมจะหายไปภายใน 21 วัน การฉีดวัคซีนควรฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึก ปริมาตรฉีด 1 มล. ใช้เข็มฉีดเบอร์ 18 ยาว 1 ½ นิ้ว และจากการสุ่มตัวอย่างตรวจระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีน 21 และ 42 วัน ด้วยวิธี ELISA พบว่า โค 100%(19/19) มีไตเตอร์เท่ากับและมากกว่า 1:320 และมีความคุ้มโรคเมื่อตรวจด้วยวิธี passive mouse protection เท่ากับ 68.42 (13/19) และ 89.47%(17/19) ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทับกวาง จังหวัดสระบุรี สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดต่างๆที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และ นิเทศ เลิศลิมชลาลัย 2538 การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม 1. ผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียต่อคุณสมบัติและประสิทธิภาพของวัคซีน สัตวแพทยสาร 46(4) : 33-40

รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และ นิเทศ เลิศลิมชลาลัย 2540 การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม 2. การผลิตในขนาดอุตสาหกรรม สัตวแพทยสาร 48(1): 29-35

Bain,R.V.S., DeAlwis,M.C.L., Carter,G.R. and Gupta,B.K. 1982. Haemorrhagic Septicaemia, FAO Animal Production and Health, Paper No.33 FAO, Rome.

Chandrasekaran,S., Kennett,L., Yeap,P.C., Muniandy,N.,Rani,B. and Mukkur,T.K.1994.Relationship between active protection in vaccinated buffaloes against haemorrhagic septicaemia and passive mouse protection test or serum antibody titres. Vet Microbiol. 41(4):303-309.

De Alwis,M.C.L. 1984. Haemorrhagic septicaemia in cattle and buffaloes. Office International Des Epizooties Revue Scientifique et Technique. 3:707-730.

FAO 1991. Proceedings of the FAO/APHCA workshop on haemorrhagic septicaemia, February 1991,Kandy, Sri Lanka.

Goto,N.1978 Comparative studies on effects of incomplete oil adjuvants with different physical properties. Jpn.J.Med. Sci. Biol. 31: 53-79.

Heddleston,K.L., Gallagher,J.E. and Rebers,P.A. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis.16:925-936.

Lucas,M.J. and Lucas,S.E. 1994. Diagnostic sampling and treatment techniques. In: Clinical Textbook for Veterinary Technicians 3rd edition, McCurnin,D.M. Philadelphia, WB Saunders Co. p.174.

McKercher,P.1986. Oil adjuvants:Their use in Veterinary Biologics. In: Nervig,R.M.,Gough,P.M., Kaeberle,M.L. and Whetstone,C.A. (eds.) Advances in carriers and adjuvants for veterinary Biologics. The Iowa State University Press,Iowa, pp.115-119.

Reddy,G.S.,Rao,K.A. and Srinivasan,V.N.1995. Immunity conferred by oil-adjuvant haemorrhagic septicaemia vaccine. Indian Journal of Animal Sciences. 66(7):703-704.

Shah,N.H.,Shah,N.H. and de Graff,F.K. 1997. Protection against haemorrhagic septicaemia induced by vaccination of buffalo calves with an improved oil adjuvant vaccine. FEMS Microbiol Lett. 155(2):203-207.

Verma,R. and Jaiswal,T.N. 1997.Protection, humoral and cell-mediated immune responses in calves immunized with multiple emulsion haemorrhagic septicaemaia vaccine.15(11):1254-1260.

Verma,R. and Jaiswal,T.N. 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccine. Vaccine 16(11-12): 1184-1192.

Voller,A.,Bidwell,D. and Bartlett,A.1976. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections pp 359-371. In: Rose,N. and Friedman,H.(eds.) Manual of Clinical immunology. American Society of Microbiology, Washington.

Development of the large -scale production of haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine

3. Field trial of haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine

Vuthiporn Rungvetvuthivitaya[1] Ratchanee Atthi[1] Wanchai Teerathavorawan[1]

Abstract

The field trial of haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine (water-in-oil) was carried out in 16 provinces of the central, northeastern and southern regions of the country to test for vaccine safety. The adverse reactions such as postvaccination anaphylaxis and the swelling at the injection site in addition to the immune response were studied. The results showed that no anaphylaxis occurred in 1,075 cattle and 495 buffaloes vaccinated with haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine whereas 4.5% of 286 cattle and 338 buffaloes that were vaccinated with the alum vaccine showed anaphylactic reactions. When the swelling at the injection site was studied, the results indicated that the volume of the vaccine should be 1 ml per head and it should be given by deep intramuscular injection using the needle of 18-gauge and 1½ inch length. The vaccine caused mild and moderate degree of swelling at 3 days post injection and the swelling disappeared at 21 days. Results of the antibody determination showed that, by an enzyme-linked immunosorbent assay, 100%(19/19) of cattle serum samples gave titers of $\geq$1:320 at 21 and 42 days after vaccination which were higher than those of <1:320 at the day of vaccination. The percentage of the protection were 68.42 and 89.47 % respectively by the passive mouse protection test.

Key words : Haemorrhagic septicaemia, oil adjuvant vaccine, field trial, adverse reaction

[1]Veterinary Biologics Center, Veterinary Biologics Division , Pakchong , Nakhonratchasima 30130

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ในมีเดียมผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้น

สายพิณ ขุมทรัพย์[1] **สินสมุทร นิลฉวี**[1]

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยใน Basal Medium Eagle (BME) ชนิดผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้นจากสารละลายสต๊อคในขวด Wolff จำนวน 5 passage พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมทั้งสองชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดี

คำสำคัญ : เซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย BME

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย (Suspension cell culture) (Makarasen and Sinsuwongwat, 1986) เซลล์ IFFA-3 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster เป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน โดยเพาะเลี้ยงใน Basal Medium Eagle (BME) การเตรียมมีเดียมให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอทุก ๆ ชุดการผลิต เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้เซลล์ที่ดีมีคุณภาพ แต่ในทางปฏิบัติมักมีหลายปัจจัยที่เป็นอุปสรรคในการเตรียมมีเดียม ปัญหาเรื่องสารเคมีเป็นปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยซื้อสารเคมีจากหลายบริษัท และการเตรียมมีเดียมในปริมาณน้อย ๆ มีโอกาสผิดพลาดได้สูง เพราะในส่วนผสมใช้สารเคมีบางชนิดปริมาณน้อยมาก จึงนิยมใช้การเตรียมในรูปสารละลายสต๊อคความเข้มข้นสูง แต่สารละลายสต๊อคจะมีปัญหาคุณภาพของสารเสื่อมลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา(Parker, n.d.)และหากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จะมีผลกระทบต่อเซลล์จากสารพิษ (นงลักษณ์และปรีชา, 2541) การทดลองใช้มีเดียมสำเร็จรูปในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะลดปัญหาความผิดพลาดต่าง ๆ การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูป และปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น เพื่อทราบผลของประสิทธิภาพของมีเดียมทั้งสองชนิด สำหรับนำไปพัฒนาการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เซลล์ IFFA-3

เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster passage ที่ 37-41 ในสภาพแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ BME ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 x 10

2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

2.1 ชนิดผงสำเร็จรูป (Premixed powder)[1] มีส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรในตาราง ที่ 1

2.2 เตรียมจากผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรในตารางที่ 1 ให้เป็นสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า (10 × conc. BME)

3. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Wolff bottle) แบบแขวนลอย ขนาด 2 ลิตร จำนวน 40 ขวด

---

[1] Hyclone ®, U.S.A. Lot no. AHG 8660 A

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 จาก Seed cell ในมีเดียม BME+2% Calf serum[1] เพื่อขยายเป็นเซลล์เริ่มต้นให้มีปริมาณ 0.3×10^6 เซลล์/มล.

2. การเตรียมมีเดียม

2.1 เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูป จำนวน 20 ลิตร โดยชั่งตามอัตราส่วน 12.155 กรัม/ลิตร ละลายใน Deionized Water (DW) ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ[2] เติม Penicillin G,[3] Dihydrostreptomycin[4] และ $NaHCO_3$[5] ปริมาณ 120.42, 50 และ 2,050 มก./ลิตร ตามลำดับในสารละลายข้างต้น ปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้สารละลาย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วทำการกรองปลอดเชื้อในตู้ Laminar air flow ด้วยเครื่องกรอง Disc filter ที่ใช้แผ่นกรอง Pore size 0.45 และ 0.2 ไมครอน มีเดียมปลอดเชื้อที่ได้บรรจุลงขวดปริมาตร 5 ลิตร จำนวน 4 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°C. เพื่อใช้ในการเพาะเซลล์

2.2 เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า ละลาย ใน DW ที่ผ่านเครื่องกรองน้ำ เติม Penicillin G, Dihydrostreptomycin, Meat peptone,[6] Yeast extract[7] และ $NaHCO_3$ ปริมาณ 120.42, 50, 2,000, 1,000 และ 2,050 มก./ลิตร ตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 6.8 แล้วทำการกรองปลอดเชื้อ บรรจุลงขวดปริมาตร 5 ลิตร จำนวน 4 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°C. เพื่อใช้ในการเพาะเซลล์

3. นำเซลล์ IFFA-3 จากข้อ 1 มาทำการเพาะเลี้ยงในขวด Wolff โดยใช้มีเดียมที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 ปริมาตร 1 ลิตร ชนิดละ 2 ขวด เติม 2% Calf serum ควบคุม pH โดยใช้ 4% CO_2 เพาะเลี้ยงใน Water bath ควบคุมอุณหภูมิ 35.5°C. ใช้ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงต่อ 1 Passage เก็บตัวอย่างเซลล์ครั้งละ 10 มล. จากขวดเพื่อดูลักษณะและนับจำนวน แล้วทำการ Subculture เซลล์ข้างต้น โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุก Passage ลงในมีเดียมทั้ง 2 ชนิดต่อไปจนครบ 5 Passage ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

---

[1] De Veau®, France Lot no. 61904

[2] Millipore®, U.S.A. Super Q

[3] Pharma and Chemic Vertrieb®, Germany Lot no. SG 0326

[4] ICN®, U.S.A. Lot no. 97033

[5] BDH®, England Lot no. S 180296

[6] Organotechnie®, France Lot no. 368

[7] Lab M®, England Lot no. 2733

ตารางที่ 1 ปริมาณสารเคมีใน Basal Medium Eagle **ชนิดผงสำเร็จรูป** (Premixed powder) **และที่เตรียมจาก** สารละลายสต๊อค (Solution)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/l)	
	Premixed powder	Solution
NaCl	6,800	6,800
KCl	400	400
Mg Cl_2 anhydrous	79.6	-
Mg $Cl_2 \cdot 6\ H_2O$	-	170
Na $H_2\ PO_4 \cdot H_2O$	139.7	-
Na $H_2\ PO_4 \cdot 2\ H_2O$	-	158.2
D-glucose anhydrous	1,000	1,000
Ca Cl_2 anhydrous	200	-
Ca $Cl_2 \cdot 2\ H_2O$	-	264.9
L-Arginine HCl	21	21
L-Cystine	-	12
L-Cystine 2 HCl	15.6	-
L-Glutamine	300	300
L-Histidine	8	8
L-Isoleucine	26	26.2
L-Leucine	26	26.2
L-lysine HCl	36.5	36.5
L-Methionine	7.5	7.5
L-Phenylalanine	16.5	16.5
L-Threonine	24	24
L-Tryptophan	4	4
L-Tyrosine	18	18
L-Valine	23.5	23.5
D (+) Biotin	1	1
Choline chloride	1	1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/l)	
	Premixed powder	Solution
Folic acid	1	1
myo-Inositol	2	2
Nicotinamide	1	1
D-Pantothenic acid calcium salt	1	1
Pyridoxal HCl	1	1
Thiamine HCl	1	1
Riboflavine	0.1	0.1
Meat peptone	2,000	-
Yeast extract	1,000	-

ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในทุก Passage เท่ากับ 0.3 x 10^6 เซลล์/มล. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ในมีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูปได้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ใน Passage ที่ 1 ถึง 5 เป็น 1.118, 1.410, 1.323, 1.558 และ 1.113 × 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ และมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น 10 เท่า ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ใน Passage ที่ 1 ถึง 5 เป็น 1.263, 1.240, 1.103, 1.200 และ 0.890 × 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 เมื่อนำค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์มาเปรียบเทียบทางสถิติ (t-test) พบว่า Passage ที่ 1, 2, 3 และ 5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ส่วน Passage ที่ 4 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ IFFA-3 เมื่อเพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้นจากสารละลายสต๊อคเข้มข้นที่ 48 ชั่วโมง

Passage	Premixed powder ($\times 10^6$ cell/ml)	Solution ($\times 10^6$ cell/ml)	Sd.
1	1.118	1.263	0.356
2	1.410	1.240	0.414
3	1.323	1.103	0.250
4	1.558[a]	1.200[a]	0.115
5	1.113	0.890	0.223

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า Passage ที่ 1 ของการทดลอง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูปมีปริมาณเซลล์น้อยกว่าในมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Freshney, 1994) เพราะเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากมีเดียมที่เตรียมขึ้นจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปใน Passage ที่ 2, 3, 4 และ 5 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูปมีปริมาณเซลล์มากกว่ามีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น และใน Passage ที่ 5 พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในมีเดียมทั้งสองชนิด มีปริมาณเซลล์น้อยกว่า Passage อื่น อาจเป็นผลจากคุณภาพของมีเดียมที่เสื่อมไปตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (Parker, n.d.) เมื่อนำค่าปริมาณเซลล์มาเปรียบเทียบทางสถิติ (t-test) พบว่า Passage ที่ 1, 2, 3 และ 5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน Passage ที่ 4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเป็นผลจากอายุของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละ Passage ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดจะมีช่วงอายุที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแตกต่างกัน (Griffiths and Riley, 1985) ควรจะทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

มีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูป มีสารเคมีบางชนิดที่เปลี่ยนไปจากมีเดียมที่เตรียมจากสารละลายสต๊อคเข้มข้น (ตารางที่ 1) เนื่องจากต้องการให้มีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูปอยู่ในสถานะที่สามารถละลายได้ดีในน้ำ เพื่อความสะดวกในการใช้งาน จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนสารเคมีบางชนิดให้สามารถละลายได้ดีในน้ำด้วย ซึ่งมีผลต่อน้ำหนักที่ใช้ แต่น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต้องการไม่เปลี่ยนแปลง

การทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตมีเดียม ทั้งด้านการเพิ่มคุณภาพและการเก็บรักษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

สรุป

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยโดยใช้มีเดียมที่เตรียมจาก BME ชนิดผงสำเร็จรูปและชนิดที่เตรียมจากสารละลายสต๊อค พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในมีเดียมทั้ง2ชนิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ น.สพ.อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์ น.สพ.สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล สพ.ญ.รัชนี อัตถิ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกให้การทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 แบคทีเรียและการทำให้เกิดโรค จุลชีววิทยาทั่วไป ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. หน้า 639

Freshney ,R. I. 1994. Culture of animal cell, a manual of basic technnique. 3rd ed, Wiley-Liss, Inc. Publisher New York. p. 71-103.

Griffiths, J.B. and Riley, P.A. 1985. Cell Biology : Basic Concepts. In :Animal Cell Biotechnology. R.E.Spier and J.B.Griffiths eds., Vol. 1, Academic Press, London. p.43-46.

Makarasen,P. and Sinsuwongwat,P. 1986. Vaccine and Vaccine Production, Third Country training program on Foot and Mouth disease control (Group training Course) February 24-March 16, Bangkok, Thailand. p.180-183.

Parker, C. R. n.d. Chemically defined media, Method of tissue culture 3rd ed, Harper and Row Publisher, New York. p. 62-80.

Comparison of IFFA-3 Suspension Cell Growth in Premixed and Prepared Basal Medium Eagle (BME)

Saipin Khumsab[1] Sinsamut Nilchavee[1]

Abstract

The comparison of IFFA-3 suspension cell growth in premixed and prepared BME was conducted in wolff bottles five passages continuously. The result indicated that IFFA-3 suspension cell can grow well in both media.

Key words : IFFA-3 suspension cell, BME

[1] Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ประสิทธิภาพในการตรวจภูมิคุ้มกัน ต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโค โดยวิธีอีไลซ่า

นิตยา รักศรี[1] รัชนี อัตถิ[1]

บทคัดย่อ

ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพในการตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโคด้วยวิธี ELISA โดยใช้ heat extract antigen ของ *Pasteurella multocida*, serotype B:2,5 strain เดียวกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโค ที่นำเชื้อมาต้มที่อุณหภูมิ 100 °C และปั่นแยกที่ 10,000 g นำส่วนใสมาใช้เป็นแอนติเจน ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเท่ากับ 80 μg/ml ทดสอบซีรั่มโค จำนวน 70 ตัวอย่าง จากโคที่มีความคุ้มโรค 51 ตัว และไม่มีความคุ้มโรค 19 ตัว ที่ทราบผลจากการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนด้วยการฉีดพิษทับ โดยตรวจระดับแอนติบอดีในซีรั่มที่มีความเจือจางเป็นลำดับขั้น เพื่อวิเคราะห์ค่าแอนติบอดีที่ใช้ตัดสินว่าเป็นบวกหรือลบในการแปลผลความคุ้ม พบว่าการใช้ค่าที่ 1:320 จะให้ค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำของการทดสอบเท่ากับ 90.20%, 84.21% และ 88.57% ตามลำดับ และใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เท่ากับ 0.14 ในการตัดสินว่าโคมีความคุ้มโรค ผลการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ วิธี ELISA ในการตรวจแยกโคที่มีความคุ้มและไม่มีความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ตรวจสอบความคุ้มโรคในฝูงสัตว์ และศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีน

คำสำคัญ : ELISA ภูมิคุ้มกัน โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย heat extract antigen

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทนำ

ปัจจุบันศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ทำการตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี Passive mouse protection test (PMPT) (รัชนีและคณะ 2538, Bain et al., 1982) โดยฉีดซีรั่มที่ต้องการทดสอบให้หนูขาว หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงจึงฉีดเชื้อพิษทับด้วย *Pasteurella multocida*, serotype B:2,5 ที่เป็นสาเหตุของโรคแล้วดูผลการตายของหนูขาว ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จึงทราบผล นอกจากวิธีนี้แล้วมีวิธีทางซีรั่มวิทยาอื่นๆ ที่นิยมใช้ในการตรวจภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง เช่น วิธี indirect hemagglutination test (IHA) และวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความคุ้มโรค เมื่อตรวจโดยการฉีดเชื้อพิษทับในโค ได้มีการศึกษาการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนหลายชนิดที่ได้ผลดี ได้แก่ potassium thiocyanate extracts (Lukas et al., 1987), boiled whole cells (Neramitmansook et al., 1990), formalinized whole cells (Gershwin and Friebertshauser, 1987) lipopolysaccharide (Confer et al., 1986) และ heat extract antigen (Al-Lebban et al., 1988) ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้มีส่วนประกอบของ outer membrane protein ซึ่งเป็น immunogen ของเชื้อ (Pati et al., 1996) สำหรับวิธี IHA ต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผลของผู้ตรวจซึ่งมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย ปัจจุบันจึงนิยมใช้วิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสูงกว่าวิธี IHA (Pati et al., 1996) การอ่านผลง่ายและมีความแน่นอน เพราะใช้เครื่องอ่านผล และสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ (Engvall and Permann., 1972) ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค และตรวจวัดความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาวิธีการทดสอบความคุ้มต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโคด้วยการวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มด้วยวิธี ELISA โดยใช้ heat extract antigen

อุปกรณ์และวิธีการ

ซีรั่ม

ตัวอย่างซีรั่ม 70 ตัวอย่าง จากโคที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย กรมปศุสัตว์ ด้วยวิธีฉีดเชื้อพิษทับโดยตรง จากโคที่ฉีดวัคซีน 1 มล. เพียงครั้งเดียวและโคที่ไม่ได้ฉีด วัคซีนแบ่งซีรั่มเป็น 2 กลุ่มคือ ซีรั่มจากโคมีความคุ้มโรค 51 ตัว และไม่มีความคุ้มโรค 19 ตัว

Positive control serum เป็น antiserum ที่เก็บรวมจากโค 2 ตัวที่ฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 มล. หลังจากนั้น 1 เดือนฉีดด้วยเชื้อ *P. multocida* จำนวน 10^8colony forming unit ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้โคที่ไม่ได้รับวัคซีนตายภายใน 24 ชั่วโมง เจาะเลือด หลังฉีดเชื้อ 2 สัปดาห์ เก็บซีรั่มใช้เป็น positive control serum

Negative control serum เป็นซีรั่มรวมของโค 2 ตัว จากแหล่งที่ไม่เคยมีการเกิดโรค ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน และไม่มีความคุ้มโรคเมื่อทดสอบโดยการฉีดเชื้อพิษทับ

การเตรียม heat extract antigen

เตรียมตามวิธีของ Heddleston et al. (1972) โดยละลายเชื้อ *P. multocida* serotype B:2,5 ที่เก็บในสภาพระเหยแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ dextrose starch agar (DSA) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชม. เลือกโคโลนีนำมาเพาะเลี้ยงต่อใน tryptose broth ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 6 ชม. หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณเชื้อโดยเพาะลงบน DSA ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชม. จากนั้นล้างเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.15 M PBS pH 7.2 ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 100 °C เป็นเวลา 1 ชม. นำไปปั่นที่ 10,000 g อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำมาวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) นำไปหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเคลือบเพลตด้วยการทำ chequerboard titration ตามวิธีดัดแปลงจาก Voller et al. (1976) โดยเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนที่มีระดับความเข้มข้นโปรตีน 20, 40, 80 และ 160 μg/ml และนำมาทำปฏิกิริยากับ positive และ negative serum ที่ทำให้มีระดับความเจือจาง two fold dilution เริ่มต้นที่ 1:50, 1:100 จนถึง 1:1600

การทดสอบความคุ้มต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA

การตรวจความคุ้มต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA ตามวิธีดัดแปลงจาก Voller et al. (1976) โดยเจือจาง heat extract antigen ด้วย coating buffer (0.05M carbonate buffer, pH 9.6) ให้มีความเข้มข้นโปรตีน 80 μg/ml แล้วเติมลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตชนิดก้นแบน[1] หลุมละ 100 μl เก็บในกล่องที่มีความชื้น ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่ 4 °C เทแอนติเจนทิ้ง ล้างเพลตด้วย 0.15 M PBS + 0.05% Tween20 (PBST) 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.5% gelatin ใน PBST ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 200 μl อบที่ 37°C 1 ชม. ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรกแล้วเติมตัวอย่างซีรั่มเจือจางแบบ serial dilution เริ่มต้นที่ diluion 1:10 ถึง dilution 1:5120 (two-fold dilution) อบที่ 37 °C นาน 1 ชม. ล้างเพลต เช่นเดียวกับครั้งแรก เติม horseradish peroxidase rabbit anti-bovine IgG (whole molecule)[2] ที่เจือจางเป็น 1:7000 ด้วย 0.5% gelatin ใน PBST ในทุกหลุม หลุมละ 100 μl อบที่ 37 °C 1 ชม. ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม O-phenylenediamine substrate ทุกหลุม หลุมละ 200 μl อบในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5N H_2SO_4 ทุกหลุม หลุมละ 50 μl นำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 492 nm ซีรั่มที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่าของซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค (negative control serum) ถือว่าเป็นบวก ทุกตัวอย่างทำ duplicate ในการทดสอบทุกเพลตจะมี positive control serum และ negative control serum อยู่ด้วย

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณค่า ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และ ความแม่นยำ (accuracy) ของวิธี ELISA โดยใช้วิธีการของ Vecchio (1966) ตามสูตรคำนวณดังนี้ :-

%Sensitivity = a / (a+c) x 100,

---

[1] Maxisorp, Nunc, Denmark

[2] Sigma, Germany

%Specificity = d / (b+d) x 100,

%Accuracy = (a+d) / (a+b+c+d) x 100

เมื่อ a คือจำนวนตัวอย่างที่เป็น true positive, b คือจำนวนตัวอย่างที่เป็น false positive, c คือจำนวนตัวอย่างที่เป็น true negative และ d คือจำนวนตัวอย่างที่เป็น false negative

ผลการทดลอง

ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมใช้ในการเคลือบเพลต (ภาพที่1) พบว่าแอนติเจนทุกระดับความเข้มข้นสามารถให้ผลแตกต่างระหว่าง positive และ negative serum แต่ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ160μg/ml เมื่อทดสอบกับซีรั่มเจือจางจนถึง 1:1600 จะให้ผลแตกต่างมากกว่าการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 80 μg/ml ในการทดสอบตัวอย่างซีรั่มโค

ระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียของตัวอย่างซีรั่มโคมีการกระจายตัวดังภาพที่ 2 ซีรั่มของโคที่มีความคุ้มโรค มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1:80 ถึง 1:5120 ส่วนซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มมีไตเตอร์ตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:640 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธี ELISA โดยใช้จุดตัดในการแปลผลที่ระดับต่างๆ พบว่าที่จุดตัด 1:320 ให้ค่าความไว ความจำเพาะ และ ความแม่นยำเท่ากับ 90.20%, 84.21% และ 88.57% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เมื่อนำค่าทั้งหมดมาสร้างกราฟ receiver operating characteristic (ROC) (Hanley and McNeil., 1982) (ภาพที่ 3) จะเห็นว่าที่จุดตัด 1:320 อยู่ใกล้มุมบนด้านซ้ายของกราฟมากที่สุด ซึ่งเป็นจุดที่มีทั้งความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำของการทดสอบสูง เหมาะสำหรับใช้เป็นค่าจุดตัดในการแปลผลเพื่อหาระดับความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย และใช้ค่า OD_{492} ที่ 0.14 เป็นค่าตัดสินว่าซีรั่มโคมีความคุ้มโรค จากผลการทดสอบซีรั่มโคทั้งหมดที่ความเจือจางระดับเดียวคือ 1:320 (ตารางที่ 2)

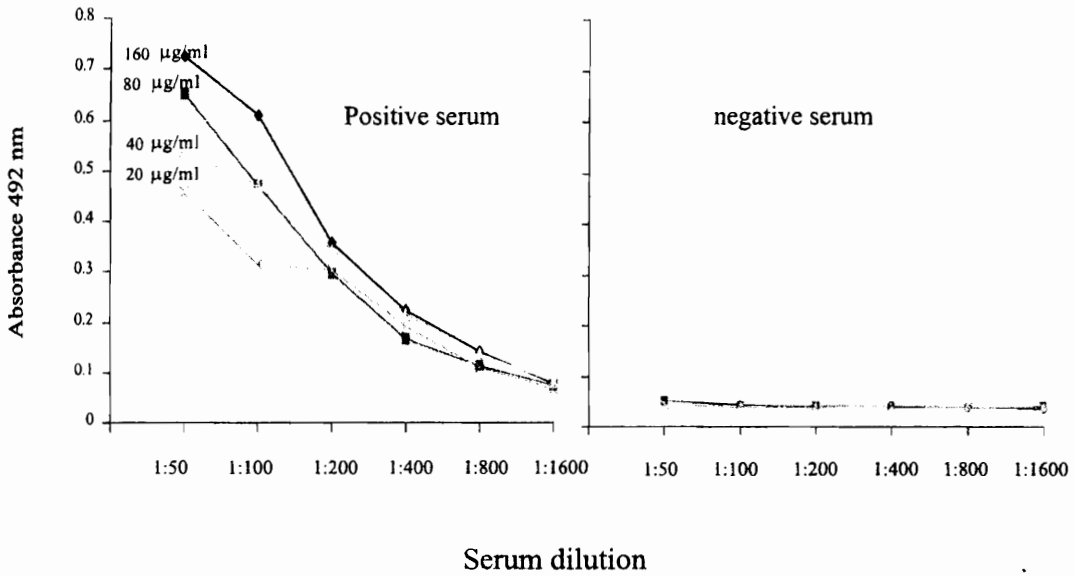
วิจารณ์

การทดลองครั้งนี้ อ่านระดับของแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในซีรั่มโคเป็นไตเตอร์ โดยถือว่าไตเตอร์มีค่าเท่ากับความเจือจางสูงสุดที่ยังให้ผลบวก ซึ่งเกณฑ์ตัดสินการทดสอบที่ให้ผลบวกมีหลายวิธี ได้แก่ การตัดสินจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 2 เท่าของค่าที่วัดได้จากซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค หรือ negative serum (Siegel and Remington, 1983) การตัดสินจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าค่าของ negative เป็น 2-2.5 เท่าของค่า standard deviations (Yolken and Leister,1981) หรือการตัดสินโดยสร้างเส้นโค้งระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเจือจางต่างๆ ของซีรั่มแล้วใช้ค่าไตเตอร์จากความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าค่าของ base line ของเส้นโค้งที่ได้เป็นจำนวนเท่าที่กำหนด (Banchuin et al., 1984., Holmgren and Svennerholm, 1973) เป็นต้น ผลการทดลองครั้งนี้ ใช้การตัดสินโดยวิธีแรกซึ่งจากการปฏิบัติพบว่า มีความสะดวก ให้ผลดี โดยไม่ต้องสร้างส่วนโค้งหรือคำนวณค่า standard deviations เช่นวิธีอื่น

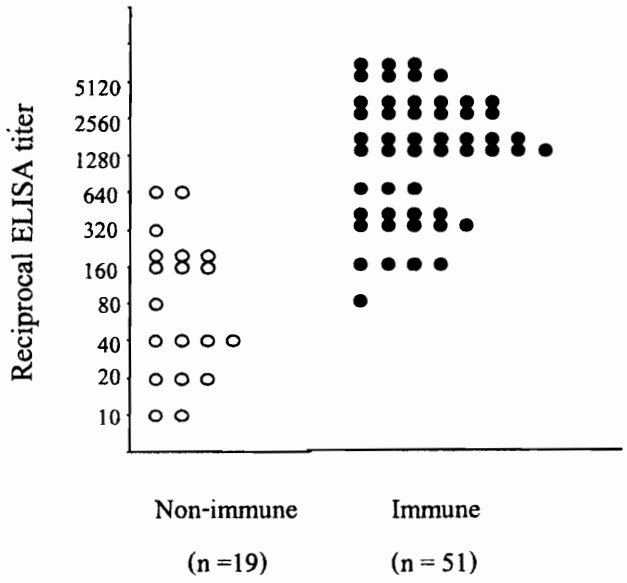
การตรวจสอบความคุ้มโรคในซีรั่มโคที่รวบรวมจากการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จำนวน 70 ตัวอย่าง พบว่า โคที่มีไตเตอร์ ระหว่าง 1:80 ถึง 1:640 เป็นโคที่มาจากทั้งกลุ่มมีความคุ้ม

และไม่มีความคุ้มโรค ดังนั้น การตัดสินโคที่มีค่าไตเตอร์ในระดับดังกล่าวจึงมีโอกาสที่จะให้ผลบวกเท็จหรือผลลบเท็จได้ จากตารางแสดง ค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำของการทดสอบ โดยใช้ค่าจุดตัดต่างๆ (ตารางที่ 2) กราฟ ROC พบว่าที่จุดตัด 1:320 เหมาะสมสำหรับใช้ในการแปลผลความคุ้มโรคในซีรั่มโคต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยมีความไว ความจำเพาะและความแม่นยำของวิธีทดสอบสูง เท่ากับ 90.20%, 84.21% และ 88.57% ตามลำดับ มีความผิดพลาดในการให้ผลบวกเท็จ 15.79% (3/19) ขณะที่เมื่อใช้จุดตัด 1:160 ถึงแม้จะมีความไวสูงกว่า แต่ความจำเพาะและ ความแม่นยำต่ำกว่า และให้ผลบวกเท็จสูงถึง 46.24% (9/19) และที่จุดตัด 1:640 มีความไวและความแม่นยำของวิธีทดสอบต่ำ แม้ว่าจะให้ผลบวกเท็จต่ำ คือ 10.53% (2/19) ก็ตาม เมื่อทดสอบซีรั่มโคที่ความเจือจาง 1:320 (ตารางที่ 3) ก็พบว่า ค่า OD_{492} ที่ใช้ตัดสินว่าโคมีความคุ้มโรค คือ 0.14 ซึ่งเท่ากับ 2 เท่าของค่าเฉลี่ย OD_{492} ของซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำวิธี ELISA มาใช้ในการทดสอบระดับแอนติบอดีและความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในซีรั่มโคได้การตรวจโดยวิธี ELISA ทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มได้จำนวนมากในคราวเดียว อ่านผลได้รวดเร็วแม่นยำเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบระดับแอนติบอดีรายตัว โดยการเจือจางซีรั่มที่ระดับต่างๆ และสามารถตรวจสอบความคุ้มโรคของฝูงสัตว์ รวมทั้งใช้ประเมินประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนในท้องที่แทนวิธี PMPT ซึ่งใช้อยู่ในปัจจุบันโดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งการใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบต้องควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวกับคุณภาพของสัตว์ทดลองรวมทั้งการดูแลจัดการ นอกจากนั้นไม่สามารถอ่านผลเชิงปริมาณโดยวัดค่าเป็นไตเตอร์ในการแปลผลได้อย่างละเอียดเท่าวิธี ELISA



ภาพที่ 1 ค่า OD ของ positive และ negative control serum เมื่อทดสอบกับ heat extract *P. multocida* B:2,5 antigen ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี ELISA

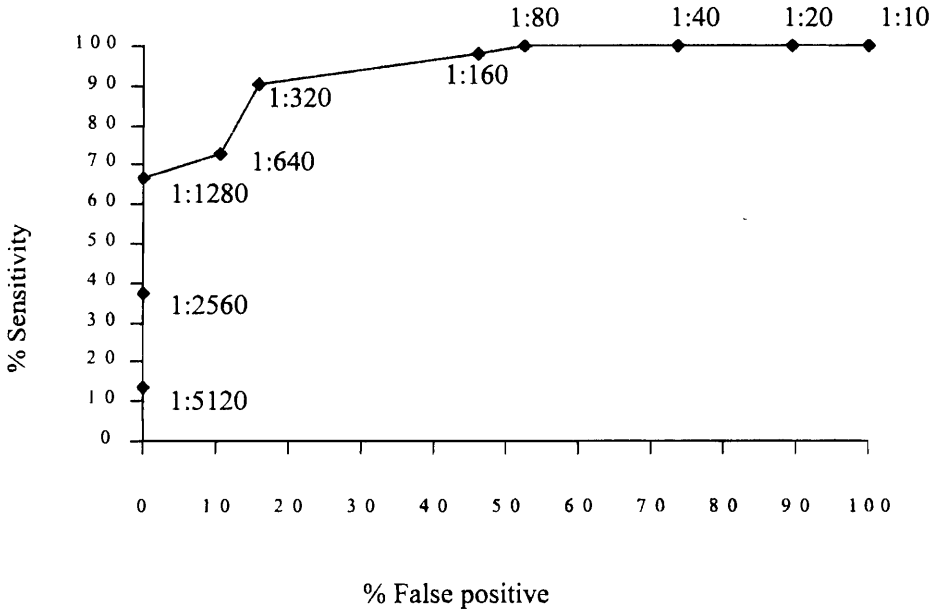


ภาพที่ 2 การกระจายตัวของระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียจากซีรั่มโค 2 กลุ่ม กลุ่มที่มีความคุ้มโรคจำนวน 51 ตัว และกลุ่มที่ไม่มีความคุ้มโรค จำนวน 19 ตัว

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่จุดตัดระดับต่างๆ

จุดตัด	% Sensitivity	% Specificity	% Accuracy	% False positive*
≥ 1:10	100	0	72.86	100
≥ 1:20	100	10.53	75.71	89.47
≥ 1:40	100	26.32	80	73.68
≥ 1:80	100	47.37	85	52.63
≥ 1:160	98.04	53.76	85	46.24
≥ 1:320	90.2	84.21	88.57	15.79
≥ 1:640	72.55	89.47	80	10.53
≥ 1:1280	66.67	100	75.71	0
≥ 1:2560	37.25	100	54.29	0
≥ 1:5120	13.75	100	37.14	0

*% False positive = 100 - % Specificity



ภาพที่ 3 กราฟเส้น ROC ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA

ตารางที่ 2 ค่า OD ของซีรั่มโคที่มีความคุ้มโรคและไม่มีความคุ้มโรค เมื่อทดสอบโดยใช้ซีรั่มเจือจางที่ 1:320

ซีรั่ม	จำนวนตัวอย่าง	Mean ± SD
โคที่มีความคุ้มโรค	51	0.435 ± 0.241
โคที่ไม่มีความคุ้มโรค	19	0.070 ± 0.013

SD, Standard deviation

ค่า cut-off OD เท่ากับ 0.14 (2 x Mean OD ของซีรั่มโคไม่มีความคุ้มโรค)

เอกสารอ้างอิง

รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และนิเทศ เลิศลิมชลาลัย. 2538. การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม สัตวแพทยสาร 46(4) : 33-39.

Al-Lebban,Z.S., Corbeil,L.B. and Coles,E.H. 1988. Rabbit pasteurellosis: Induce disease and vaccination. Am. J. Vet. Res. 49: 312-316.

Bain,R.V.S., De Alwis, M.C.L., Carter,G.R. and Gupta,B.K. 1982. Haemorrhagic Septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper, 33. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Banchuin,N., Vanadurongwan,S., Sarasombath,S., Sukosol,T. and Pimolpan,V. 1984. ELISA for the measurement of intestinal antibody to *Salmonella typhi* protein antigen. Asian Pacific J. Allergy Immunol. 2:85-90.

Confer,A.W., Panciera,R.J. and Mosier,D.A. 1986. Serum antibodies to *P. haemolytica* lipopolysaccharide: Relationship to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Am. J. Vet. Res. 47: 1134-1138.

Engvall, E. and Permann, P.1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tube. J. Immunol. 109: 129-135.

Gershwin,L.J. and Fribertshauser,K. 1987. Demonstration of *Pasteurella* specific immunoglobulin E in Bovine Serum. Am. J. Vet. Res. 48:169-175.

Hanley,J.A., and McNeil,B.J. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. Radiology 143:29-32.

Heddleston, K.L., Gallagher, J.E., and Rebbers, P.A. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16: 925-936.

Holmgren, J. and Svennerholm, A.M. 1973. Enzyme linked immunosorbent assay for cholera serology. Infect. Immune. 7: 759-763.

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

Lukas,V.S., Ringler,D.H., Chrisp,C.E. and Rush,H.G. 1987. An enzyme linked imunosorbent assay to detect serum Ig G to *Pasteurella multocida* in naturally and experimentally infected rabbits. Lab. Anim. Sci. 37: 60-64.

Neramitmansook,P., Rungvetvuthivitaya,V., Neramitmansook,W. and Carter,G.R. 1990. Development of a serologic test to measure immunity in cattle and buffaloes to haemorrhagic septicemia: Measurement of protective antibodies against *Pasteurella multocida* serotype B in cattlle and buffaloes using and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Proceeding of the 7th Congress of Federation of Asian Veterinary Association. Pattaya, Thailand. p. 481-490.

Pati,U.S., Srivastava,S.K., Roy,S.C. and More,T. 1996. Immunogenicity of outer membrane protein of *Pasteurella multocida* in buffalo calves. Vet. Microbiol. 52: 301-311.

Siegel,J.P. and Remington,J.S. 1983. Comparison of method for quantitating antigen specific immunoglobulin M antibody with a reverse enzyme-linked immunosorbent assay. J.Clin. Microbiol. 18: 63-70.

Vecchio,T.J. 1966. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. New Eng. J. Med. 274: 1171-1173.

Voller,A., Bartlett,A., Bidwell,D.E., Clark,M.F. and Adams,A.N. 1976. The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). Gen. 33: 165-167.

Yolken,R.H. and Leister,F.J. 1981. Enzyme immuno assays for measurement of cytomegalovirus immunoglobulin M antibody. J. Clin. Microbiol. 14: 427-432.

The efficacy of and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for determining the immunity to haemorrhagic septicaemia in cattle

Nittaya Ruksri[1] Ratchanee Atthi[1]

Abstract

The detection of bovine haemorrhagic septicaemia (HS) by an enzyme-linked immunosorbent assay was evaluated using heat extract antigens of *Pasteurella multocida*, serotype B: 2,5 vaccine strain. This antigen was prepared by boiling the bacterial suspension at 100 °C and centrifugation at 10,000 g to collect the supernatant. The optimal protein concentration of the antigen used in this assay was 80 μg/ml. Antibody titers of 70 proven sera from protected and non-protected cattle against HS challenge (51 and 19 cattle, respectively) were detected by serial-dilution method to determine the cut-off value. The result indicated that the sensitivity, specificity and accuracy at the optimal serum dilution of 1:320 were 90.20%, 84.21% and 88.57%, respectively. The cut-off OD value at 492 nm for antibody positivity was 0.14. The test was shown to be able to distinguish immune from susceptible cattle and therefore it is useful as a tool for evaluation of the herd immunity to HS and vaccination effectiveness.

Key words : ELISA, haemorrhagic septicaemia, antibody, heat extract antigen, *Pasteurella multocida*

[1]Veterinary Biologics Division, Pakchong, Nakhornratchasima 30130

เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของแพะอายุ 3 เดือนที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในขนาดต่างกัน

สมเกียรติ เพชรวาณิชกุล[1] ลักษณา นิลฉวี[2]

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ของแพะอายุ 3 เดือน ที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิด 3 ไทป์ (โอ, เอ และ เอเชียวัน) ขนาดต่างๆ กันโดยแบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1, 3 และ 5 ฉีดวัคซีนหนึ่งครั้ง ปริมาณโด๊ส 1, 1.5 และ 2 มล. กลุ่มที่ 2, 4 และ 6 ฉีดวัคซีนสองครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ ปริมาณโด๊ส 1, 1.5 และ 2 มล. ตามลำดับ ตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 3 ไทป์ โดย LP ELISA หลังฉีดวัคซีนในสัปดาห์ที่ 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20 และ 24 พบว่าแพะกลุ่มที่ได้รับวัคซีนหนึ่งครั้งในขนาดที่ต่างกัน มีระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ทั้ง 3 ไทป์ ในทุกสัปดาห์ ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสองครั้งมีระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) ทั้ง 3 ไทป์ ในทุกสัปดาห์ และเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียวและสองครั้งปริมาณโด๊สเดียวกันพบว่า กลุ่มที่ได้รับวัคซีนสองครั้งให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียวอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$)ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการให้วัคซีนในแพะปริมาณโด๊ส 1 มล.ให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกับขนาด 1.5 และ 2 มล. และการให้วัคซีนสองครั้งในปริมาณต่างกันให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันทั้ง 3 ไทป์ ($P>0.05$)

คำสำคัญ : แพะ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย LP ELISA

---

1. ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา

2. สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ ปากช่อง นครราชสีมา

บทนำ

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเลี้ยงแพะเพิ่มขึ้น แพะเป็นสัตว์กีบคู่มีโอกาสเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย ได้จึงควรฉีดวัคซีนป้องกันโรค วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสื่อน้ำ(Aqueous vaccine)ชนิด 3 ไทป์ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ แนะนำให้ใช้ขนาดเท่ากับโค กระบือ คือตัวละ 2 มล. แต่ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับการใช้วัคซีนในแพะยังมีน้อย จากการศึกษาของ Mackowiak (1970) รายงานว่าการใช้วัคซีนสามารถลดปริมาณโด๊สได้ จากการฉีดในโค 3 มล. เหลือ 1 มล. ในแกะ โดยให้ระดับแอนติบอดีไม่ต่างกัน หลังจากฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว และ Studem (1980) พบว่าการฉีดวัคซีนสองครั้ง ห่างกัน 4 สัปดาห์ ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าการฉีดเพียงครั้งเดียว จึงเป็นแนวทางที่จะศึกษาการลดปริมาณโด๊สที่ใช้ในแพะ

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีของแพะภายหลังจากได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของกรมปศุสัตว์ในปริมาณโด๊ส 1, 1.5 และ 2 มล. โดยเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนครั้งเดียวและสองครั้ง

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์ผสมซาเนน และ แองโกลนูเบียน (Sanaan และ Angol-Nubain) อายุ 3 เดือน จำนวน 36 ตัว ที่ผ่านการตรวจว่าไม่มีระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อย

วัคซีน

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสื่อน้ำ ชนิด 3 ไทป์ (โอ,เอ และ เอเชียวัน) ของกรมปศุสัตว์ ชุดที่ T 91 B

วิธีการ

ฉีดวัคซีนใต้ผิวหนัง ตามขนาดของแต่ละกลุ่มโดยแบ่งแพะออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1,3 และ 5 ฉีดวัคซีนหนึ่งครั้งปริมาณโด๊ส 1, 1.5 และ 2 มล.ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2,4 และ 6 ฉีดวัคซีนสองครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ ปริมาณโด๊ส 1,1.5 และ 2 มล. ตามลำดับ

การเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่มสำหรับตรวจแอนติบอดี

แยกซีรั่มจากตัวอย่างเลือดแพะทั้ง 6 กลุ่ม หลังฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย 3, 4, 6, 8,12, 16, 20 และ 24 สัปดาห์ นำมาตรวจระดับแอนติบอดี

วิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อย

ตรวจด้วย Liquid phase (LP) ELISA (วิไล และ ธนรัตน์, 2537) โดยวิธี duplicate-well two-fold dilution series โดย coat rabbit anti O, A และ Asia1 ลงบน solid phase ใน ELISA plate ของแต่ละไทป์ โดยใช้ 0.05 M. Carbonate-bicarbonate buffer เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เตรียม virus-serum mixture โดยแยกเตรียมใน u-shape plate โดยเจือจางซีรั่มแบบ two-fold dilution และเตรียมปริมาณไวรัสที่มีความเข้มข้น คงที่ โดยมีความรุนแรงของไวรัสเมื่ออ่านค่า 50% ของ OD_{max} ที่ 450 nm. มีค่า 1.5 โดยใช้ PBS เป็น diluent จากนั้นเตรียมไวรัสและซีรั่มในปริมาณเท่ากัน คือ 50 ไมโครลิตร ขณะเดียวกันให้เตรียม virus control และ strong positive, weak positive และ Negative control serum ในแต่ละเพลท นำเพลทเขย่าค้างคืน ในห้องอุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จากนั้นวันรุ่งขึ้นให้ transfer mixture ของ virus-serum ลงบน plateที่ coat ไว้แล้วนำไป incubate 37 $^{\circ}$C, 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม guinea pig anti O, A และ Asia1 ลงในแต่ละเพลท incubate 37 $^{\circ}$C, 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นเติม Conjugate (anti GP IgG-HRP Conjugate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ทำการเติม substrate ที่ส่วนผสมของ 0.01% Tetrametyl benzidine (TMB) ที่ใช้ H_2O_2 เป็นตัว catalyst ปล่อยไว้ในอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ 450 nm. โดยใช้เครื่องอ่าน Labsystem Multiskan MS นำค่า OD ของแต่ละ dilution มาคำนวณหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ซึ่งได้จากการคำนวณค่า dilution ของซีรั่มที่อยู่ระหว่างค่า 50% ของ OD_{max} และมีค่าอยู่ระหว่าง 1.0-1.5 ตามวิธีการของ Hamlin et al. (1986).

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแตกต่างของระดับแอนติบอดี (Mean Log titer) แพะทดลองของกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) ชนิด CRD (Complete Randomized Design) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Stat Soft,Inc (1995) Statistic for Window (Computer program manual), Tulsa

ผลการทดลอง

จากการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในแพะกลุ่มต่างๆ ตามตารางที่ 1, 2 และ 3 พบว่า

กลุ่มที่ 1, 3 และ 5 ซึ่งฉีดวัคซีนหนึ่งครั้งให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ทั้ง 3 ไทป์ ยกเว้นสัปดาห์ที่ 8 ไทป์ เอ (ตารางที่ 2) กลุ่มที่1 และกลุ่มที่ 5 ให้ระดับแอนติบอดีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่ 1 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 5

กลุ่มที่ 2, 4, และ 6 ซึ่งฉีดวัคซีนสองครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ ให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ทั้ง 3 ไทป์ ยกเว้นสัปดาห์ที่ 4 ไทป์ เอเชียวัน (ตารางที่ 3) กลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 6 ให้ระดับแอนติบอดีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยกลุ่มที่ 6 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 4

กลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งฉีดวัคซีน ขนาด 1 มล. ให้ระดับแอนติบอดีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ในสัปดาห์ที่ 6, 8 และ12 ทั้ง 3 ไทป์ โดยกลุ่มที่ 2 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 1 ยกเว้น สัปดาห์ที่ 8 ไทป์ เอ และเอเชียวัน (ตารางที่ 2 และ 3) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่กลุ่มที่ 2 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งฉีดวัคซีน ขนาด 1.5 มล. ให้ระดับแอนติบอดี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(P<0.05)ในสัปดาห์ที่ 6, 8 และ 12 ทั้ง 3 ไทป์ โดยกลุ่มที่ 4 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 3 ยกเว้นสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ไทป์ เอเชียวัน (ตารางที่ 3) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่กลุ่มที่ 4 ให้ระดับแอนติบอดี สูงกว่ากลุ่มที่ 3

กลุ่มที่ 5 และ 6 ซึ่งฉีดวัคซีน ขนาด 2 มล. ให้ระดับแอนติบอดี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)ในสัปดาห์ที่ 6, 8 และ 12 ทั้ง 3 ไทป์ โดยกลุ่มที่ 6 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ 5

วิจารณ์

ระดับแอนติบอดีของกลุ่มแพะที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสื่อน้ำ ชนิด 3 ไทป์ ที่ฉีดวัคซีนเพียงหนึ่งครั้ง ในปริมาณโด๊สที่ต่างกัน คือ 1, 1.5 และ 2 มล. พบว่าวัคซีนให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 3 ไทป์ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 8 ในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 1 มล. ให้ระดับแอนติบอดีต่อ ไทป์ เอ สูงกว่าในกลุ่มที่ ฉีดวัคซีน 2 มล. อาจเนื่องจากระดับแอนติบอดีของแพะแต่ละตัวในกลุ่มที่ 1 บางตัวมีระดับแอนติบอดีสูงมากทำให้ ค่าเฉลี่ยสูง ส่วนกลุ่มที่ฉีดวัคซีนสองครั้งในปริมาณโด๊สที่ต่างกัน คือ 1, 1.5 และ 2 มล.ให้ระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับการฉีดครั้งที่สองในสัปดาห์ที่ 4 จะให้ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6, 8 และ 12 ทั้ง 3 ไทป์ และจะมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 24

การศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าสามารถใช้วัคซีนปริมาณโด๊ส 1 มล.ได้จากการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีในซีรั่ม แต่ไม่สามารถบอกว่าที่ระดับใดสามารถคุ้มโรคได้ จึงควรทำการศึกษาเกี่ยวกับความคุ้มโรคของวัคซีนในแพะ แต่ไม่สามารถใช้วิธีการตรวจระดับความคุ้มกันโรคได้เหมือนวิธีที่ใช้ในสุกร และโค ซึ่งอาศัยการตรวจวิการเป็นเกณฑ์ตัดสินเนื่องจากวิการที่เป็นตุ่มในปากและเท้าของแพะไม่ชัดเจนและตรวจพบได้ยาก Ghan (1969) จึงควรจะใช้การตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับความคุ้มโรคในแพะ Oral et al. (1968) เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

สรุป

การฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในแพะ ปริมาณโด๊ส 1, 1.5 และ 2 มล. ให้ระดับแอนติบอดี ที่ไม่แตกต่างกัน และการฉีดวัคซีนสองครั้งให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าการฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ แอบ คงทน ที่ให้คำปรึกษา ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ สพ.ญ. วิไล ลินจงสุบงกช และ น.สพ.นพพร พัฒนประสิทธิ์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

วิไล ลินจงสุบงกช และธนรัตน์ จานุกิจ 2537 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีลิควิท เฟส อีไลซ่า ประมวลเรื่องประชุมวิชาการกองผลิตชีวภัณฑ์ หน้า 63-72

Ghana, J. 1969. Relative susceptibility of pig, sheep and goats to type A virus of Foot and Mouth Disease. Sci.9:54-60

Hamblin, C., Barnett, I.T.R and Crowther, J.R. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus.II.Application. J. Immunol. Methods. 93, 123-129

Mackowiak, C. 1970. Foot and Mouth Disease in Sheep. Bull. Off. Int. Epiz. 73 : 703-714

Oral, M. Sutcu, M. and Hayrmoglu, O. 1968. Challenge of Foot and Mouth Disease on sheep. Bull off int. Epiz. 69 (3-4) : 497-508

Studen, M. 1980. Contribution to the knowledge of antibody titer in the blood serum of Sheep vaccinated and revaccinated against Foot and Mouth Disease.Vet.Glasn. 34:657-660

Comparison of Antibody Titer in Three-month old Goats Vaccinated with Different Doses of Foot and Mouth Disease Vaccine

Somkiet Petchvanichkul[1] Lucksana Nilchawee[2]

Abstract

Comparison of antibody titer in three-month old goats vaccinated with different doses of trivalent Foot and Mouth Disease vaccine. Goats were randomly allocated into 6 groups. Group 1, 3 and 5 were vaccinated once with 1, 1.5 and 2 ml of the vaccine, whereas group 2, 4 and 6 were vaccinated with 1, 1.5 and 2 ml. of the vaccine respectively and were boostered with the same dose 4 weeks later. The antibody titer was evaluated at week 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20 and 24 after the first vaccination. It was found that the antibody titer in group 1, 3 and 5 were not statistical significantly difference ($P>0.05$) in every week evaluated. The same result was detected in group 2, 4 and 6. The antibody titer of booster groups were higher than those of non-booster groups ($P<0.05$). In conclusion, the antibody titer of goats vaccinated with 1 ml was not difference from the antibody titer detected from goats vaccinated with 1.5 and 2 ml ($P>0.05$). Among booster groups, the antibody titer of goats vaccinated 1 ml. was not significantly difference ($P>0.05$) from the others for all 3 types of the virus.

Key words : Goat, FMD Vaccine, LP ELISA

1. Foot and Mouth Disease Center, Division of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima
2. Pakchong Livestock Station, Animal Husbandry Division, Pakchong, Nakhonratchasima

ตารางที่ 1 ระดับแอนติบอดี(Mean log titer ± SD)ของแพะต่อวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ

ขนาดฉีด / หลังฉีด(สัปดาห์)	1 มล.		1.5 มล.		2 มล.		หมายเหตุ
	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ 6	
3	2.723 ± 0.420	2.673 ± 0.258	2.685 ± 0.389	2.785 ± 0.197	2.673 ± 0.467	3.015 ± 0.188	
4	2.443 ± 0.455	2.413 ± 0.351	2.355 ± 0.316	2.537 ± 0.369	2.204 ± 0.330	2.734 ± 0.239	
6	2.119 ± 0.286 ^{A}	3.107 ± 0.190 ^{B}	2.204 ± 0.269 ^{C}	3.288 ± 0.343 ^{D}	2.204 ± 0.269 ^{E}	3.408 ± 0.301 ^{F}	AและB,CและD,EและFแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)
8	2.144 ± 0.392 ^{G}	2.806 ± 0.190 ^{H}	1.903 ± 0.190 ^{J}	2.746 ± 0.252 ^{K}	2.304 ± 0.311 ^{L}	3.142 ± 0.227 ^{M}	GและH,JและK,LและMแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
12	1.783 ± 0.269 ^{N}	2.585 ± 0.230 ^{O}	1.702 ± 0.155 ^{P}	2.505 ± 0.369 ^{Q}	1.853 ± 0.227 ^{R}	2.385 ± 0.165 ^{S}	NและO,PและQแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง RและSแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(P<0.05)
16	1.722 ± 0.269	1.803 ± 0.246	1.552 ± 0.352 ^{T}	2.204 ± 0.301 ^{U}	1.803 ± 0.365	2.325 ± 0.165	TและUแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
20	1.903 ± 0.213	2.104 ± 0.246	1.753 ± 0.316	2.024 ± 0.269	1.953 ± 0.227	2.204 ± 0.213	
24	1.241 ± 0.252	1.452 ± 0.415	1.552 ± 0.296	1.662 ± 0.252	1.542 ± 0.135	1.903 ± 0.246	

ตารางที่ 2 ระดับแอนติบอดี(Mean log titer ± SD)ของแพะต่อวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ เอ

ขนาดฉีด / หลังฉีด(สัปดาห์)	1 มล.		1.5 มล.		2 มล.		หมายเหตุ
	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ 6	
3	2.505 ± 0.504	2.656 ± 0.530	2.405 ± 0.365	2.254 ± 0.227	2.505 ± 0.334	2.555 ± 0.518	
4	2.154 ± 0.400	2.054 ± 0.252	2.405 ± 0.453	1.953 ± 0.227	2.054 ± 0.165	2.304 ± 0.411	
6	1.963 ± 0.252 ^{A}	2.957 ± 0.369 ^{B}	1.953 ± 0.352 ^{C}	2.927 ± 0.457 ^{D}	1.953 ± 0.296 ^{E}	2.987 ± 0.624 ^{F}	AและB,CและD,EและFแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)
8	2.385 ± 0.165	2.806 ± 0.190	2.003 ± 0.246 ^{G}	2.746 ± 0.252 ^{H}	1.787 ± 0.285 ^{J}	3.047 ± 0.330 ^{K}	GและH,JและK แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
12	1.963 ± 0.330 ^{L}	2.605 ± 0.365 ^{M}	1.753 ± 0.165 ^{N}	2.445 ± 0.252 ^{O}	1.853 ± 0.123 ^{P}	2.626 ± 0.269 ^{Q}	LและM,NและO,PและQแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
16	1.361 ± 0.252	1.702 ± 0.246	1.351 ± 0.296	1.662 ± 0.135	1.552 ± 0.227	1.843 ± 0.135	
20	1.783 ± 0.343	1.832 ± 0.419	1.652 ± 0.227	1.783 ± 0.269	1.652 ± 0.296	2.144 ± 0.392	
24	1.542 ± 0.252	1.502 ± 0.365	1.452 ± 0.316	1.722 ± 0.269	1.783 ± 0.165	2.054 ± 0.174	

ตารางที่ 3 ระดับแอนติบอดี(Mean log titer ± SD)ของแพะต่อวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ เอเชียวัน

ขนาดฉีด / หลังฉีด(สัปดาห์)	1 มล.		1.5 มล.		2 มล.		หมายเหตุ
	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	ฉีดครั้งเดียว	ฉีด 2 ครั้ง	
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ 6	
3	2.443 ± 0.278	2.363 ± 0.264	2.673 ± 0.400	2.464 ± 0.366	2.639 ± 0.305	2.677 ± 0.484	
4	2.204 ± 0.466	2.204 ± 0.330	2.304 ± 0.365	2.154 ± 0.296	2.308 ± 0.187	2.822 ± 0.505	
6	2.043 ± 0.315 [A]	3.208 ± 0.246 [B]	2.204 ± 0.381 [C]	3.167 ± 0.135 [D]	2.254 ± 0.123 [E]	3.107 ± 0.213 [F]	AและB,CและD,EและFแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)
8	2.264 ± 0.495	2.806 ± 0.330	2.405 ± 0.453	3.010 ± 0.254	2.204 ± 0.269[G]	3.167 ± 0.252[H]	GและH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.05)
12	1.662 ± 0.135[J]	2.183 ± 0.310[K]	1.953 ± 0.443	2.445 ± 0.252	1.903 ± 0.190[L]	2.626 ± 0.165[M]	JและKแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ LและM แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
16	1.542 ± 0.252	1.853 ± 0.227	1.401 ± 0.411[N]	1.963 ± 0.392[O]	2.003 ± 0.246	2.144 ± 0.135	NและOแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
20	1.843 ± 0.330	2.083 ± 0.147	1.803 ± 0.311	2.024 ± 0.269	1.803 ± 0.411	2.084 ± 0.165	
24	1.602 ± 0.426	1.452 ± 0.495	1.652 ± 0.400	2.084 ± 0.269	1.783 ± 0.165	2.054 ± 0.174	

ผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

สินสมุทร นิลฉวี[1] สายพิณ ขุมทรัพย์[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในถังเพาะเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร โดยใช้ Basal Medium Eagle ที่มี pH เริ่มต้นต่างกันจำนวน 28 และ 32 ครั้งตามลำดับ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตดีที่ pH เริ่มต้น 6.90 - 7.09 และ 6.90 – 6.99 ตามลำดับ ถ้า pH เริ่มต้นมากกว่านี้การเจริญเติบโตจะลดลง

คำสำคัญ : เซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย pH Basal Medium Eagle

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

คำนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ได้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบเซลล์แขวนลอยตั้งแต่ปี ค.ศ.1978(Makarasen and Sinsuwonkwat,1986) และนำเซลล์ IFFA-3 มาใช้เมื่อ ค.ศ.1989 ซึ่งการผลิตเซลล์จะต้องขยายเซลล์ให้ได้จำนวนมากเพียงพอเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัสให้ได้แอนติเจนจำนวนมาก สำหรับการผลิตวัคซีน

ในการผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณและคุณภาพนั้นมีปัจจัยหลายประการเช่น ความสมบูรณ์ของเซลล์ คุณภาพของสารอาหารรูปแบบอุปกรณ์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ตลอดจนความรู้และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นการรวบรวมข้อมูลของแต่ละหน่วยงานในฝ่ายผลิตวัคซีนเพื่อการวิเคราะห์และแก้ไขในระหว่างการปฏิบัติงานโดยสม่ำเสมอจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้งานของฝ่ายผลิตวัคซีนประสบความสำเร็จมากขึ้น

เนื่องจากในการเจริญเติบโตของ เซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย ต้องการ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในช่วงที่เป็นกรดอ่อน ๆ (pH 6.8-6.9) แต่ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง (Medium) ใช้ถังผสม Medium ขนาดความจุ 3,800 ลิตร ปริมาณของ Medium ที่เตรียมจะมีผลต่อ pH เพราะเมื่อเตรียมปริมาณน้อย เช่น 800 ลิตร pH จะอยู่ระหว่าง 6.90-7.30 เพราะมีอากาศช่วงบน Medium ในถังผสมมาก แต่เมื่อเตรียมปริมาณมาก เช่น 2,200 ลิตร อากาศช่วงบน Medium ในถังผสมมีน้อยลง pH จะอยู่ในช่วงแคบ ๆ เพียง 6.80-7.00 เท่านั้น ดังนั้นการเตรียม Medium แต่ละครั้งจะได้ค่า pH ที่แตกต่างกัน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลจาก pH ของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 1,400 ลิตร และ 3,200 ลิตร โดยวัดผลการเจริญเติบโต ของเซลล์หลังเพาะเลี้ยง 18, 24, 44 และ 50 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปใช้ในการผลิตเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพและปริมาณตามต้องการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เซลล์ IFFA-3

เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนู Hamster passage ที่ 37-44 ในสภาพแขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยง Basal Medium Eagle (BME) ก่อนเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 10 x 40

2. สารอาหารเพาะเลี้ยง

ใช้ BME ที่มีส่วนผสมของ Yeast extract 0.1%, Meat Peptone 0.2%, Dihydro streptomycin 0.005%, Penicillin G 0.012% และ Bovine calf serum 2% โดยให้มี pH อยู่ในช่วง 6.80 - 7.29 โดยเตรียมและทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านไส้กรองชนิด Cartridge ขนาด Pore size 0.2 ไมครอน

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1 ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร

ขนาดของถัง 1,400 ลิตร มีความสูง 2,600 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1,100 มิลลิเมตร ความสูงของใบพัดจากก้นถังประมาณ 170 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.32-0.42x 10^6 เซลล์/มล. ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 1,000 ลิตร ให้ Dissolved oxygen (D.O.) 30% โดยเครื่อง Automatic oxygen regulator และปล่อยให้อากาศเข้าถัง ปริมาณ 20 ลิตร/ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 35.5°C. ความเร็วรอบการหมุนของ Agitator เท่ากับ 80 rpm แยก pH ของสารอาหารเพาะเลี้ยงออกเป็น 4 ช่วงดังนี้ 6.90-6.99, 7.00-7.09, 7.10-7.19 และ 7.20-7.29 เก็บตัวอย่างจำนวน 5 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง

3.2 ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร

ขนาดของถัง 1,400 ลิตร มีความสูง 2,400 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1,400 มิลลิเมตร ความสูงของใบพัดจากก้นถังประมาณ 175 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยมีปริมาณ 0.28x10^6 เซลล์/มล. ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 2,600 ลิตร โดยปรับให้มีมีสภาพเช่นเดียวกับถังเพาะเลี้ยงขนาด 1,400 ลิตร แยก pH ของสารอาหารเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ช่วงดังนี้ 6.80-6.89 และ 6.90-6.99 เก็บตัวอย่างจำนวน 5 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ 18, 24, 44 และ 50 ชั่วโมง

4. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลการนับจำนวนเซลล์เป็นค่า Cell concentration ต่อ มล. แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนเท่าของการแบ่งตัว (Multiplication rate) โดยคำนวณจากจำนวนเซลล์ที่เพาะได้ต่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเปรียบเทียบ Multiplication rate ของแต่ละช่วง pH ด้วยวิธี Student t-test

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 1,400 ลิตร จำนวน 28 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24 และ 44 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 1 ผลการเปรียบเทียบ Multiplication rate ของเซลล์ IFFA-3 ที่ 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า pH เริ่มต้นให้ผลไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ที่ 44 ชั่วโมงพบว่าช่วง pH 6.90 – 6.99 มีค่า Multiplication rate สูงกว่าในช่วง pH อื่น โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับช่วง pH 7.00 - 7.09 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับ pH 7.11 - 7.19 และ 7.21 - 7.29 (Table 1)

ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 3,200 ลิตร จำนวน 32 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 18, 24, 44 และ 50 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 2 ผลการเปรียบเทียบค่า Multiplication rate ที่ 24 ชั่วโมงแรก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ที่ 44 และ 50 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Figure 1 Cell concentration per ml at 0, 18, 24 and 44 hours of culture (Mean) in 1,400 litre tank

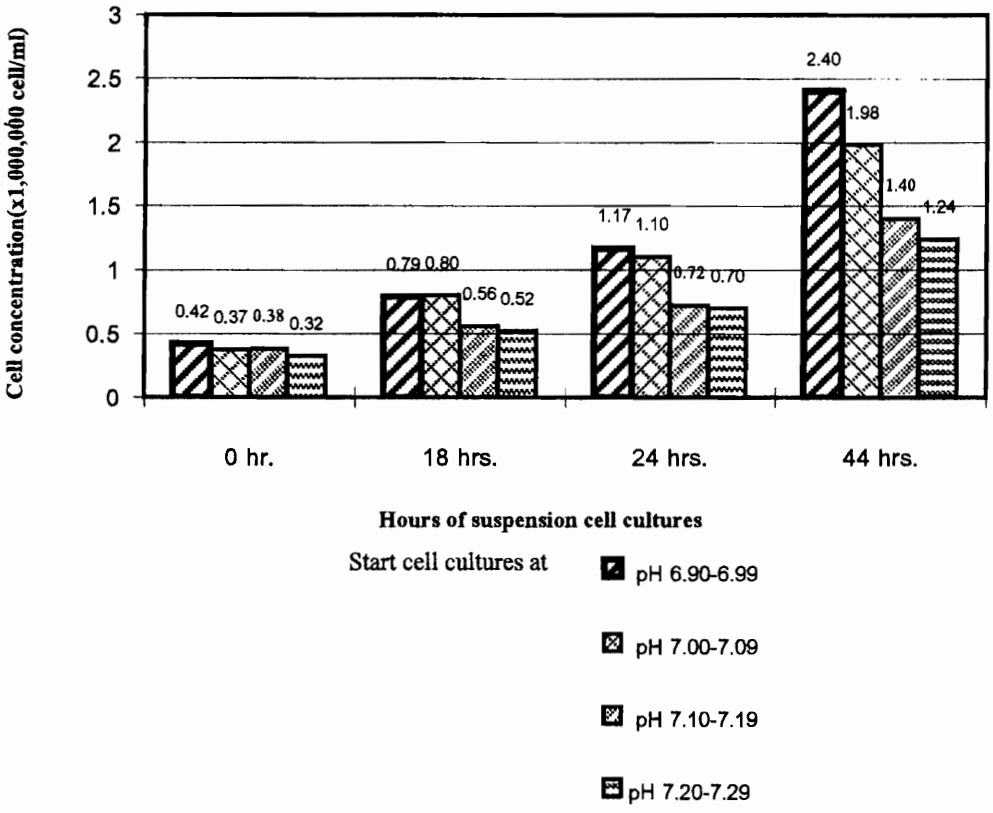


Table 1 Multiplication rate of IFFA-3 cell culture at 18, 24 and 44 hours in 1,400 lite tank

Start culture pH	Multiplication rate (Mean ± SD)			Number of Observation
	18 hours	24 hours	44 hours	
6.90 – 6.99	0.9840 ± 0.3334	1.8910 ± 0.5669[a]	5.0017 ± 1.3871	9
7.00 - 7.09	1.1113 ± 0.6188	1.9057 ± 0.7919	4.2775 ± 1.1097	8
7.10 - 7.19	0.5609 ± 1.0355	1.0095 ± 0.7819[b]	2.9930 ± 1.7860	5
7.20 - 7.29	0.6382 ± 0.7439	1.2993 ± 0.9946[c]	3.1216 ± 1.5644	6
Total Number of Observation				28

[a] and [b] : Significantly different ($P < 0.05$)

[a] and [c] : Significantly different ($P < 0.05$)

Figure 2 Cell concentration per ml at 0, 18, 14 and 44 hours of culture (Mean) in 3,200 litre tank

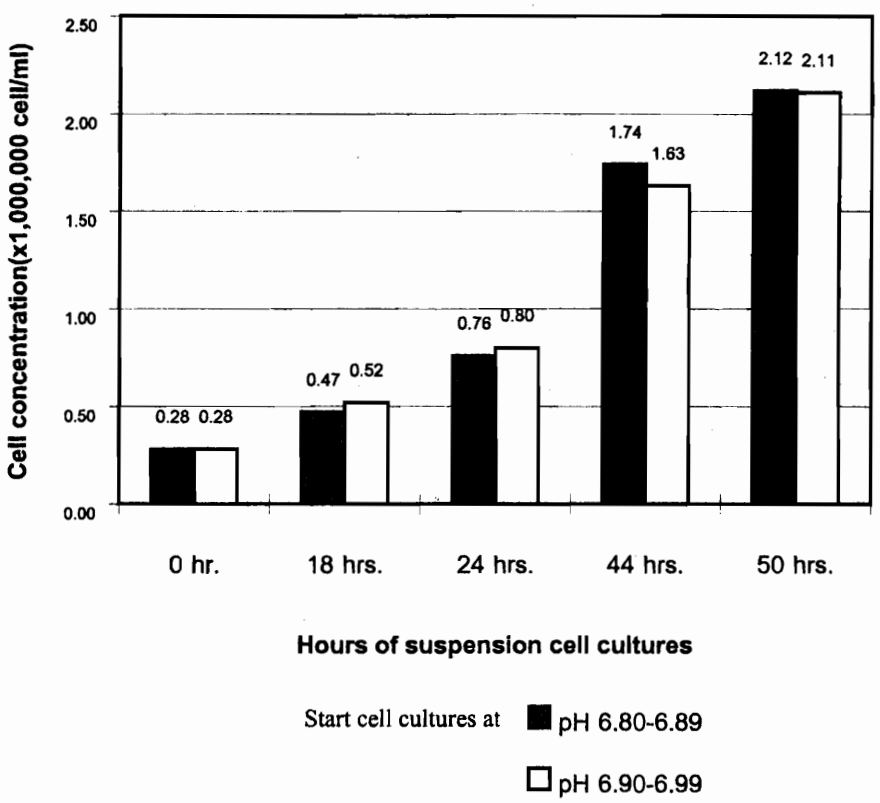


Table 2 Multiplication rate of IFFA-3 Cell at 18, 24, 44 and 50 hours in 3,200 litre tank

Start culture pH	Multiplication rate (Mean ± SD)				Number of Observation
	18 hours	24 hours	44 hours	50 hours	
6.80 - 6.89	0.6519 ± 0.0431[a]	0.6941 ± 0.1878[c]	5.1949 ± 2.0704	6.5948 ± 2.4872	19
6.90 - 6.99	0.8585 ± 0.2134[b]	1.9378 ± 0.9129[d]	4.7727 ± 2.2485	6.5514 ± 3.0713	13
Total Number of Observation					32

[a] and [b] : Significantly different ($P < 0.05$)

[c] and [d] : Significantly different ($P < 0.05$)

วิจารณ์

จากผลการศึกษานี้พบว่าในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตรซึ่งเก็บตัวอย่างที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง พบว่าที่ pH 6.90-6.99 และ 7.00-7.09 จะมีค่า Multiplication rate ที่สูงกว่า pH 7.10-7.19 และ 7.20-7.29 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ จะพบว่าเมื่อ pH สูงขึ้น Multiplication rate ก็จะลดลง โดยจะแตกต่างกันทั้งที่ 18, 24 และ 44 ชั่วโมง แต่ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3,200 ลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างที่ 18, 24, 44 และ 50 ชั่วโมง พบว่าที่ pH 6.80-6.89 จะมีค่า Multiplication rate ที่ต่ำกว่า pH 6.90-6.99 ที่ 18 และ 24 ชั่วโมง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ แต่ที่ 44 และ 50 ชั่วโมงจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การที่ในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1,400 ลิตร pH ในช่วง 6.90-6.99 ให้ Multiplication rate สูงกว่า pH 7.10-7.29 นั้น เนื่องจากยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอย เพราะถ้า pH เปลี่ยนแปลงไปจากช่วงที่เหมาะสมก็จะมีผลต่อ Activity ของเซลล์ (Willmer, 1965) รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ก็ยังขึ้นกับ pH ด้วย (อาภัสรา, 2533) แต่ pH เริ่มต้นก็ไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้การที่เราปล่อยให้อากาศเข้าถังก็มีผลต่อ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงในระหว่างการเจริญเติบโตด้วย ดังจะพบได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังขนาด 3,200 ลิตร จะเห็นว่าที่ 24 ชั่วโมงแรก แม้ pH เริ่มต้นจะห่างกันไม่มากนัก แต่ก็เห็นความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 18 และ 24 ชั่วโมง แต่ที่ 44 และ 50 ชั่วโมง จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า pH เริ่มต้นจะมีบทบาทใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นอาจจะมีการจะปรับตัวเข้าสมดุลย์ทำให้ไม่เห็นความแตกต่างกันในช่วงหลัง

อีกปัจจัยหนึ่งที่น่าจะนำมาพิจารณาคือ pH ของ Medium ที่ส่งมายังถังเพาะเซลล์ เพราะเป็นปัจจัยที่สามารถแก้ไขปรับปรุงได้ จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับถัง 1,400 ลิตร คือ 6.90-7.09 และสำหรับถัง 3,200 ลิตร คือ 6.90-6.99 ดังนั้นถ้าในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสามารถปรับ pH ก่อนการกรองให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ pH หลังการกรองตามต้องการ ก็จะเป็นการช่วยให้ระบบสู่สมดุลย์ได้ง่าย และจะทำให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพและปริมาณตามต้องการ

สรุป

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของการเพาะเซลล์ IFFA-3 แบบแขวนลอยในถังขนาด 1,400 ลิตร คือ pH 6.90-7.09 และถังขนาด 3,200 ลิตร คือ 6.90-6.99 ถ้า pH เริ่มต้นสูงกว่านี้พบว่าทำให้ Multiplication rate ลดลง

เอกสารอ้างอิง

กัลยา วานิชย์บัญชา 2539 หลักสถิติ โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พิมพ์ครั้งที่ 2 หน้า 46 - 252

อาภัสรา ชมิดท์ 2533 สรีรเคมี ชีวโมเลกุล ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 2 หน้า 1-11

Emil, L. 1983. Principle of Biochemistry General Aspects, 7th ed., Fong and Song Printers Pte., Ltd., Singapore. p. 317.

Makarasen, P. and Sinsuwongwat, S. 1986. Vaccine and Vaccine Production, The Report of Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. p. 180-183.

Results of the IFFA-3 Cell Quantity Control. 1989. APHIS-US Department of Agriculture Hyattsville, Maryland. p. 1-8.

Willmer, E.N. 1965. Cell and Tissue in Culture Method, Biology and Physiology Volume 1, Physiological Laboratory University of Cambridge, England. p. 25.

Effect of pH on IFFA-3 Cell Suspension Growth in an Industrial Scale Cultivation

Sinsamut Nilchavee[1] Saipin Khumsab[1]

Abstract

The IFFA-3 cell suspension culture in 1,400 litres and 3,200 litres fermenter tanks with Basal Medium Eagle at different initial pH were studied for 28 and 32 replicate respectively. The result showed that IFFA-3 cell could grow well at the initial pH 6.90 – 7.09 and 6.90 – 6.99 respectively. The multiplication rate of IFFA-3 cell decrease significantly when the initial pH increase.

Key words : IFFA-3 suspension cell, pH, Basal Medium Eagle

[1]Foot and Mouth Disease Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130.

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ฉบับนี้เป็นการรวบ 2 ฉบับรวมกัน เนื่องจากหลายปีที่ผ่านมา แต่ละฉบับออกช้ากว่ากำหนด จึงสะสมวันช้ารวมเกินกว่า 2 ปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับนักวิชาการทุกท่านด้วย เพราะเรื่องของท่านคือหนังสือของเรา ส่วนทางกองบรรณาธิการได้แก้ไขรูปแบบบางอย่างให้ดีขึ้น และพิเศษในฉบับนี้ได้นำการโฆษณาเข้ามาเพื่อลดภาระผู้เป็นเจ้าของเรื่อง

ในฉบับนี้เป็นผลงานทดลองที่น่าสนใจ จำนวน 5 เรื่อง มีผลการใช้วัคซีนเฮโมรายิกเซพติ-ซีเมียในท้องที่ รวมทั้งการนำ ELISA มาตรวจหาภูมิคุ้มกันของเชื้อนี้ ทางด้านวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีผลทดลองการใช้ในแพะอายุ 3 เดือน และผลการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ที่ใช้ผลิตวัคซีนในหลายปัจจัย สมควรติดตามได้ทุกเรื่อง

กองบรรณาธิการ