วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กันยายน 2546 Volume 13 No. 2 September 2003

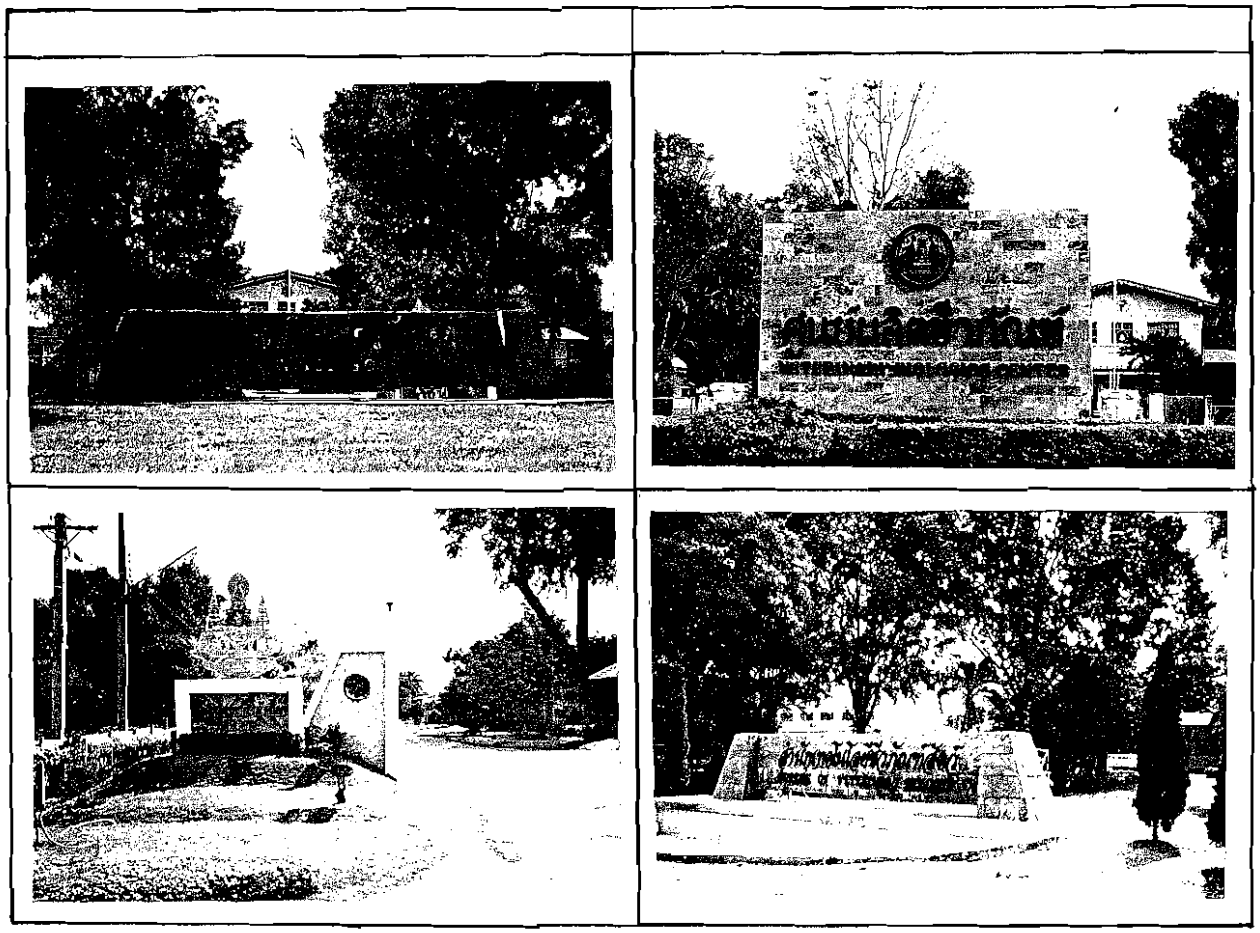
วัตถุประสงค์

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

ฉบับที่ 2 กันยายน 2546 พิมพ์เผยแพร่ ตุลาคม 2547 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กันยายน 2546

The Journal of Veterinary Biologics Vol. 13 No. 2 September 2003



ปก: อดีตสู่ปัจจุบัน กองวัคซีนและเซรุ่ม — กองผลิตชีวภัณฑ์
สู่ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858 - 1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	พยนต์	สินสุวงศ์วัฒน์
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ
กองบรรณาธิการ	สมใจ	กมลศิริพิชัยพร
	ไชยา	สง่าประโคน
	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ
	กฤษดา	ลิมปนานนท์
	เดิมพล	รัตนวงศ์

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ : เดือนมีนาคม และกันยายน
พิมพ์ที่	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

The Journal of Veterinary Biologics

Editor	Payont	Sinsuwonkwat
Assistant editor	Ratchanee	Atthi
Editorial board	Somjai	Kamolsiripichaiporn
	Chaiya	Sangaprakhon
	Sahawatchara	Ungvanijban
	Kritsada	Limpananont
	Dermpol	Ratanawonk

Office	Bereau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand, 30130
Publications	twice a year in March and September

คำนำ
จากบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ฉบับที่ 2 ปีที่ 13 ประจำเดือน กันยายน 2546 ก็เป็นเช่นเดียวกับเล่มก่อนหน้านี้ คือ ออกช้ากว่ากำหนด กล่าวคือวารสารเล่มนี้ควรจะออกตั้งแต่เดือน กันยายน 2546 แต่มาออกเอาจนเดือน ตุลาคม 2547 ทั้งนี้เป็นด้วยเหตุขัดข้องนานาประการ จึงทำให้ต้องออกล่าช้าซึ่งกองบรรณาธิการต้องาราบขออภัยท่านสมาชิกและท่านผู้อ่านทุกท่านมา ณ โอกาสนี้ด้วย

อย่างไรก็ดีในฉบับนี้จะเป็นบทความทางวิชาการ เรียบเรียงโดย น.สพ.แอบ คงทน และ สพ.ญ.สุนีจิต คงทน ซึ่งทางกองบรรณาธิการมีความเห็นว่าเป็นประโยชน์สำหรับนักวิชาการ, นักวิจัย, นิสิต, นักศึกษา จะได้ใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานวิจัย ทั้งด้านสุขภาพสัตว์และสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง จึงได้นำมาจัดพิมพ์เผยแพร่ เพื่อจะได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และกองบรรณาธิการขอกราบขอบพระคุณท่านผู้เรียบเรียงทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง ที่อนุญาตให้นำบทความดังกล่าวมาลงเผยแพร่ในวารสารฉบับนี้

น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
บรรณาธิการ

คำนำ

จากผู้เขียนบทความวิชาการ : การคำนวณและสถิติสำหรับงานวิชาการสุขภาพสัตว์

ผู้เขียนได้รวบรวมประสบการณ์ ที่ได้ปฏิบัติงานที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และกรมปศุสัตว์ นำมาเรียบเรียงเพื่อให้เป็นแนวทางให้ผู้สานต่อการพัฒนาสุขภาพสัตว์ก้าวหน้าต่อไป บทความวิชาการนี้แบ่งออกเป็น 4 ตอน ตอนแรกเกี่ยวกับเลขคณิตที่จำเป็นต้องทราบก่อน ตอนที่สองเกี่ยวกับการทำเจือจางหรือการทำ dilution ตอนที่สามว่าด้วยการคำนวณหา end point จากการทดสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ส่วนตอนสุดท้ายจะเป็นเรื่องของสถิติที่น่าจะทราบสำหรับการปฏิบัติงานทางวิชาการ หรือ วิจัยด้านสุขภาพสัตว์

อนึ่งผู้เขียนขอกล่าวย้ำว่า บทความนี้ได้รวบรวมประสบการณ์ที่ได้ปฏิบัติงานที่ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และกรมปศุสัตว์ นำมาเรียบเรียงเพื่อให้เป็นแนวทางให้ผู้ที่จะสานต่อการพัฒนาสุขภาพสัตว์ให้ก้าวหน้าต่อไป หากประโยชน์หรือความดีที่เกิดขึ้น จากเอกสารวิชาการนี้ ด้วยประการใด ๆ ก็ดี ผู้เขียนขอมอบให้ น.สพ.พินิจ ศุภวิไล และอุทิศให้อดีต น.สพ.ประคัลภ์ สมิตินันทน์ ผู้เป็นบูรพาจารย์ วางรากฐานนักวิชาการภาครัฐให้กับผู้เขียนทั้งสอง

น.สพ. ดร.แอบ คงทน* สพ.ญ.สุนีจิต คงทน**

---

*ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัย (ชีวผลิตภัณฑ์)

**อดีตผู้อำนวยการกองควบคุมยาสัตว์

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน วัตถุประสงค์ เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และหน่วยงานอื่นที่คล้ายกัน งานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

เรื่องที่จะนำลง

1. งานวิจัย (Technical papers) : เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) : เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

3. เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

การส่งเรื่อง

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

ต้นฉบับ

1. ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2. ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ บนกระดาษ A 4 ส่งมาพร้อมกัน Diskkette โดยพิมพ์บทความด้วยโปรแกรม MS.word 95-98 พร้อมสำเนาอีก 1 ชุด มีความยาวไม่เกิน 14 หน้า

การลำดับเรื่อง

1. **ชื่อเรื่อง** (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

2. **ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน** (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่องพร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวกเป็นหมายเหตุ (foot note)

3. **บทคัดย่อ** (Abstract) เขียนสั้นให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผลไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แต่ละภาษาเขียนแยกหน้าต่างหาก

4. **คำสำคัญ** (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 4 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาไทยสะกดทับศัพท์ อยู่ใต้บทคัดย่อ

5. **เนื้อหา** (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ข้างล่างของหน้านั้น

ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลาย ๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือรูปภาพ หรือกราฟ พร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น ๆ

รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น ๆ

วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือที่ได้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

เอกสารอ้างอิง (References)

ก. **กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง 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 ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

กัญญา สุวินทรากร และอนุทิน หาญวีรพล 1991 (2534) การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไซน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่าย โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชชสารสัตวแพทย์ 21(2) : 69-78.

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

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำราให้ระบุชื่อผู้เขียน 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.

การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ให้ใช้ตัวอักษร Cordia new ขนาด 16 ยกเว้นหัวข้อให้ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) แสดงให้ชัดเจน

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 mm) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 1.5 นิ้ว หรือ 3.17 ซม.
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 1 นิ้ว หรือ 2.5 ซม.

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบในบรรทัดนั้น ๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กองผลิตชีวภัณฑ์ ไม่ให้แยกเป็น กองผลิตชีว- ภัณฑ์ เป็นต้น
- หลังเครื่องหมาย . และ , เคาะ 1 เคาะ
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่าง (...) และคำข้างในวงเล็บ

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3..... ที่มุมขวาด้านบน

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไป โดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ให้ใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ หรือ *พิมพ์ด้วยตัวเอน* ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) คือประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific epithet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ตัวอย่าง

จุลชีพ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ตัวเอน

พืช เช่น Oryza sativa L. หรือพิมพ์ตัวเอน

สัตว์ เช่น Spiella inermis หรือพิมพ์ตัวเอน

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้ว ให้ผู้เขียนเพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กันยายน 2546

สารบัญ

บทที่ 1 เลขคณิต..... 1

บทที่ 2 การทำ Dilution..... 9

บทที่ 3 การคำนวณผลการทดสอบ..... 19

บทที่ 4 สถิติ..... 35

การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ..... 40

การคำนวณและสถิติ
สำหรับงานวิชาการสุขภาพสัตว์

ดร.แอบ คงทน สุนีจิต คงทน

บทที่ 1 : เลขคณิต

ในบทแรกนี้ จะกล่าวถึงเลขคณิตที่เห็นว่าสมควรทราบก่อนที่จะศึกษาถึงการคำนวณต่าง ๆ ตามแบบและวิธีการในบทต่อ ๆ ไป

1. Number, factors, and primes

เราใช้สัญลักษณ์ 10 ตัว คือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 เขียนแทนจำนวน (number) จำนวนใด ๆ ก็ตามไม่ว่าจะมากหรือน้อยก็แล้วแต่สามารถที่จะเขียนให้เห็นได้ โดยใช้สัญลักษณ์เหล่านี้เว้นเสียแต่จำนวนซึ่งไม่สามารถแสดงค่าได้แน่นอน (irrational number)

จำนวน (Numbers) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ rational และ irrational number ซึ่ง rational number คือ จำนวนที่มีค่าแน่นอน ถ้าเป็นจำนวนเต็มมักจะเรียกกันว่า integer Integer ส่วนมากสามารถกระจายออกเป็นผลคูณของหลายจำนวนได้ เรียกกันว่า factors เช่น integer 12 อาจจะเขียนได้ดังต่อไปนี้ คือ 2x6 หรือ 2x2x3 หรือ 4x3 เครื่องหมาย 'x' ระหว่างจำนวน หมายถึง การคูณ

Integer ซึ่งไม่สามารถแบ่งออกเป็น factors ได้ เรียกว่า primers เช่น 2, 3, 5, 7, 11, 13, 17, 19, 23, 29, 31, 37, 41 และ 43 เป็นต้น

Irrational numbers คือ จำนวนซึ่งไม่สามารถแสดงค่าแน่นอน ไม่เป็น integer หรือ เศษส่วนแน่นอนไม่เป็นทศนิยมที่มีตำแหน่งหลังทศนิยมแน่นอน เช่น $\sqrt{3}$, $\sqrt{7}$ เป็นต้น

2. Zero and infinity

เมื่อนำศูนย์มารวมกับจำนวนใด ๆ ก็ตาม จะได้ผลเท่ากับจำนวนนั้น ๆ เช่น 5 + 0 = 5 เมื่อคูณเลขจำนวนใด ๆ ก็ตามด้วยศูนย์จะได้ผลเท่ากับศูนย์ เช่น 5 x 0 = 0

เมื่อหารจำนวนที่คงที่ (finite number) ด้วยจำนวนที่มีค่าน้อย (very small number) ผลหาร (quotient) จะมีค่าสูงมาก เช่น 1/0.000001 = 1,000,000 ถ้าตัวหารมีค่าน้อยลงไปอีกจนมีค่าเกือบใกล้ศูนย์ผลหารยิ่งมีค่ามากยิ่งขึ้น จนมีค่าเกือบจะไม่มีที่สิ้นสุด (infinity) ซึ่งใช้สัญลักษณ์ '∞' แทน

ดังนั้น $1/n \longrightarrow \infty$ เมื่อ $n \longrightarrow 0$

หมายความว่า 1 หารด้วย n มีค่าเกือบไม่มีที่สิ้นสุด เมื่อ n มีค่าเกือบจะเป็นศูนย์

3. เศษส่วน ทศนิยม และจำนวนที่มีค่าเป็นลบ (Fraction, decimals and negative number)

เศษส่วน (Fraction) ประกอบด้วย integers 2 ตัว เขียนให้ตัวหนึ่งอยู่บนอีกตัวหนึ่ง ตัวบนเรียกว่า numerator ตัวล่างเรียกว่า denominator ผลหารของ numerator ด้วย denominator คือทศนิยมถ้าผลหารน้อยกว่า 1 จะต้องเขียนสัญลักษณ์ 0 หน้าจุดทศนิยมเสมอ เช่น $\frac{1}{4} = 0.25$

ถ้าจำนวนมีค่าเป็นลบ (negative number) จะต้องเขียนเครื่องหมาย " – " นำหน้าจำนวนนั้นเสมอ แต่ถ้าจำนวนมีค่าเป็นบวก (positive number) มักจะไม่เขียนเครื่องหมายบวก " + " หน้าจำนวนนั้น

ผลคูณของเลขสองจำนวนไม่ว่าจะมีค่าเป็นบวก หรือเป็นลบก็ตาม จะได้ผลเป็นบวกเสมอ

เช่น 3 x 3 = 9 และ (-3) x (-3) = 9

ผลคูณของเลขสองจำนวนซึ่งมีค่าเป็นบวกและเป็นลบจะได้ผลเป็นลบเสมอ

เช่น 2 x (-3) = -6 และ (-2) x 3 = -6

กำลังสองของเลขจำนวนใด ๆ ก็ตาม ไม่ว่าเลขจำนวนนั้นจะมีค่าเป็นบวกหรือเป็นลบ ผลที่ได้จะเป็นบวกเสมอ

เช่น $(2)^2 = 4$ และ $(-2)^2 = 4$

ถ้ามี factors หลาย ๆ ตัวคูณด้วยกัน และมี factors ซึ่งมีค่าเป็นลบอยู่เป็นจำนวนคู่ (even numbers) ผลที่ได้จะมีค่าเป็นบวก แต่ถ้ามี factors ซึ่งมีค่าเป็นลบอยู่เป็นจำนวนคี่ (odd numbers) ผลที่ได้จะเป็นลบ

เช่น (-2) x 4 x 3 (-4) x (-1) = -96 เพราะมี factors ซึ่งมีค่าเป็นลบอยู่ 3 ตัว

4. Roots

รู้ทสอง (Square root) ของเลขจำนวนใด ๆ คือ จำนวน (quantity) ซึ่งเมื่อคูณด้วยตัวมันเองแล้ว จะมีค่าเท่ากับเลขจำนวนเดิม เช่น รู้ทสองของ 4 คือ 2 หรือ -2 ทั้งนี้เพราะว่าไม่ว่าทั้ง 2 หรือ -2 เมื่อคูณด้วยตัวของมันเองแล้วจะมีค่าเท่ากับ 4 รู้ทสองใช้เครื่องหมาย "$\sqrt{}$" ดังนั้น $\sqrt{4} = \pm 2$

เครื่องหมาย " $\pm$ " หมายความว่า บวกหรือลบ

รู้ทสาม ของจำนวนใด ๆ คือ จำนวน (quantity) ซึ่งเมื่อคูณด้วยตัวมันเอง 3 ครั้ง หรือ 3 factor แล้วจะมีค่าเท่ากับจำนวนเดิม และใช้เครื่องหมาย $\sqrt[3]{}$ เช่น $\sqrt[3]{8} = 2$ เพราะว่า 2 x 2 x 2 = 8

ในทำนองเดียวกัน the n^{th} root ของจำนวนใด ๆ คือ จำนวน (quantity) ซึ่งเมื่อคูณด้วยตัวมันเอง n ครั้ง หรือ n factors แล้วจะมีค่าเท่ากับจำนวนเดิม และใช้เครื่อง '$\sqrt[n]{}$' แทน ดังนั้น $a = \sqrt[n]{X}$ เมื่อ a x a x a x a x a... to n factors = X

5. กำลัง (indices)

ข้อจำกัดของการใช้สัญลักษณ์ 10 ตัว เมื่อใช้แทนจำนวนทางคณิตศาสตร์ จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อนำมาใช้กับจำนวนซึ่งมีค่าสูงมาก เช่น จำนวนโมเลกุล ใน 1 กรัมโมเลกุล (Avogadro's number) 602,000,000,000,000,000,000,000

ซึ่งไม่สะดวกในการเขียน และมองเห็นค่าแท้จริงไม่ชัดเจน แต่ถ้านำเอาจำนวนนี้มากระจายออกเป็น factors หลาย ๆ ตัวและนำเอา factors ซึ่งเหมือนกัน (identical) มาเขียนเป็นเลขกำลัง (index) โดยเขียนเป็น superscript ทางขวาของ factors เช่น $32 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 2^5$

ดังนั้น Avogadro's number ก็เขียนได้ เป็น 6.02×10^{23}

จำนวนใด ๆ ก็ตามเมื่อมีกำลังเป็น 1 จะมีค่าเท่ากับจำนวนนั้น ๆ เช่น $10^1 = 10$

เมื่อเลขจำนวนใด ๆ มีกำลังเป็น negative integral index จะมีค่าเท่ากับส่วนกลับ (reciprocal) ของเลขจำนวนนั้นมีกำลังเป็น positive index เช่น $2^{-5} = \frac{1}{2^5} = \frac{1}{32}$

กำลังซึ่งเป็นเศษส่วน (fractional index) หมายถึงรู้ทของจำนวนนั้น เช่น $8^{1/3} = \sqrt[3]{8}$

กำลังที่เป็นทศนิยมก็หมายถึง รู้ทของจำนวนนั้นเช่นกัน

เช่น $32^{0.2} = 32^{1/5} = \sqrt[5]{32} = 2$

$2^{0.6} = 2^{3/5} = (2^{1/5})^3 = \sqrt[5]{2^3}$

การคูณและหารเลขที่มีกำลัง

ผลคูณของเลขจำนวนเหมือนกันซึ่งต่างก็มีกำลังจะเท่ากับเลขจำนวนนั้นยกกำลังด้วยผลบวกของกำลัง

เช่น $2^3 \times 2^5 = (2 \times 2 \times 2)(2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2)$

$= 256$

$= 2^8 = 2^{(3+5)}$

ผลหาร (quotient) ของเลขจำนวนเหมือนกันซึ่งต่างก็มีกำลัง จะมีค่าเท่ากับเลขจำนวนนั้นยกกำลังด้วยผลต่าง (difference) ของกำลังทั้งสอง

เช่น $\frac{2^5}{2^3} = \frac{2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2}{2 \times 2 \times 2}$

$= 2 \times 2$

$= 2^2 = 2^{(5-3)}$

ถ้า denominator มีกำลังสูงกว่า numerator แล้วผลหารจะเป็น negative index

เช่น $\frac{2^3}{2^5} = \frac{2\times2\times2}{2\times2\times2\times2\times2}$

$= \frac{1}{2\times2}$

$= \frac{1}{2^2}$

$= 2^{-2} = 2^{(3-5)}$

เลขจำนวนใด ๆ ก็ตาม ถ้ามีกำลังเท่ากับศูนย์ จะมีค่าเท่ากับ 1 เสมอ

เช่น $\frac{2^3}{2^3} = \frac{8}{8} = 1$ และ $\frac{2^3}{3^3} = 2^{(3-3)} = 2^0$

จำนวนที่มีค่าเป็นบวก (positive number) ยกกำลังด้วย integer ซึ่งมีค่าบวกหรือเป็นลบก็ตาม ผลที่ได้จะเป็นบวกเสมอ

เช่น $2^4 = 16$ และ $2^{-4} = \frac{1}{2^4} = \frac{1}{16}$

จำนวนซึ่งมีค่าที่เป็นลบ (negative number) ยกกำลังด้วย integer ซึ่งเป็นเลขคู่ ไม่ว่าจะมีค่าเป็นบวกหรือเป็นลบก็ตาม ผลที่ได้จะเป็นบวกเสมอ

เช่น $(-2)^4 = 16$ และ $(-2)^{-4} = \frac{1}{(-2)^4} = \frac{1}{16}$

จำนวนซึ่งมีค่าเป็นลบ (negative number) ยกกำลังด้วย integer ซึ่งเป็นเลขคี่ไม่ว่าจะมีค่าเป็นบวกหรือลบก็ตาม จะได้ผลเป็นลบ

เช่น $(-2)^3 = -8$ และ $(-2)^{-3} = \frac{1}{(-2)^3} = -\frac{1}{8}$

การใช้เลขยกกำลังแสดงค่าที่สูงและต่ำมาก ๆ

ในการแสดงค่าสูงและต่ำมาก ๆ ในรูปของ a x 10^n เมื่อ n เท่ากับ positive หรือ negative integers, a เท่ากับ number ซึ่งมีค่าระหว่าง 1 และ 10 นั้น เราหาค่าของ n ได้จากกฎต่อไปนี้

(1) สำหรับจำนวนซึ่งมีค่าสูงมาก n จะมีค่าเป็น positive integer น้อยกว่าจำนวนเลข ซึ่งอยู่หน้าทศนิยมอยู่ 1

เช่น 602,300 = 6.023×10^5 นั่นคือ n = 6 -1 = 5

(2) สำหรับจำนวนซึ่งมีค่าต่ำมาก n จะมีค่าเป็น negative integer มากกว่าจำนวนเลขศูนย์ซึ่งอยู่หลังและติดกับทศนิยมอยู่ 1

เช่น 0.0073423 = $7.3423\ 10^{-3}$

นั่นคือ n = -(2+1) = -3

6. Logarithms

Logarithms หรือเรียกกันสั้น ๆ ว่า log ของเลขจำนวนใด ๆ คือ เลขกำลังเมื่อใช้กับเลขอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า ฐาน (base) แล้ว ทำให้มีค่าเท่ากับเลขจำนวนเดิม เช่น $10^2 = 100$

ดังนั้น โดยคำจำกัดความข้างบนจึงพูดได้ว่า log ฐาน 10 ของ 100 เท่ากับ 2 จึงเขียนเป็นสัญลักษณ์ได้ดังนี้ คือ $\log_{10} 100 = 2$

อ่านว่า log ของ 100 ฐาน 10 เท่ากับ 2 ฐานของ log เขียนเป็น subscript หลัง log ในทางพีชคณิตเขียนสมการเกี่ยวกับ log ได้ดังนี้

ถ้า $M = a^x$: ดังนั้น $\log_a M = X$

อ่านว่า ถ้า M เท่ากับ a กำลัง X แล้ว log M ฐาน a เท่ากับ X

Systems of logarithm

ระบบของ logarithms นิยมใช้กันมากมีอยู่ 2 ระบบ คือ common logarithms และ natural logarithms ระบบทั้งสองนี้แตกต่างกันเฉพาะจำนวน (number) ซึ่งนำมาใช้เป็นฐานเท่านั้น common logarithms ใช้ 10 เป็นฐาน และใช้สัญลักษณ์ 'log' และไม่ต้องมี 10 เป็น subscript สำหรับ Natural หรือ Naperian logarithms ใช้ irrational number ซึ่งเป็นผลรวมของ series มีสัญลักษณ์ 'e' เป็นฐานและเขียนสัญลักษณ์ดังนี้ 'ln' หรือ '$\log_e$'

การใช้เลขจำนวนอื่นนอกเหนือไปจาก 10 และ 'e' เป็นฐานแล้วไม่นิยมใช้กันมากนัก แต่การปฏิบัติการในทางจุลชีววิทยามีความจำเป็นจะต้องใช้เลขเหล่านี้ เช่น 2, 3, 4, 5 เป็นฐาน สำหรับ log ก็ได้ในบางกรณี ทั้งนี้เพราะว่าในการทำ dilution ซึ่งจะได้กล่าวโดยละเอียดในบทที่สอง จำเป็นจะต้องทำ serial dilution ด้วย fold ต่างกัน และจากการกระทำอันนี้ก็นำเอาผลมาเข้า log ซึ่งมีฐานตาม fold นั้น ๆ ได้ เพื่อสะดวกในการคำนวณ เช่น ถ้าเราทำ serial 2-fold dilution ก็สามารถเปลี่ยนค่า log ได้ดังนี้

Dilution	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32....
Fraction	$\frac{1}{2^1}$	$\frac{1}{2^2}$	$\frac{1}{2^3}$	$\frac{1}{2^4}$	$\frac{1}{2^5}$
2^x	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}
$\log_2$	-1.0	-2.0	-3.0	-4.0	-5.0

สำหรับการใช้เลขอื่นเป็นฐาน คงอนุโลมโดยวิธีเดียวกัน

Log ของเลขจำนวนใด ๆ ก็ตามประกอบด้วย 2 ส่วน คือ integral part ซึ่งเป็นส่วนอยู่หน้าทศนิยมเรียกว่า characteristic อาจจะมีค่าเป็นบวกหรือเป็นลบก็ได้ กับส่วนอยู่หลังทศนิยม เรียกว่า mantissa ซึ่งเป็นตัวเลขในส่วนที่หาได้จากตาราง log (logarithms table) และมีค่าเป็นบวกเสมอ การหาค่า log จากตาราง log กระทำได้ดังนี้

(1) ถ้าเลขจำนวนนั้นมีค่ามากกว่า 1 characteristic จะเป็น positive integer และมีค่าน้อยกว่าจำนวนตัวเลขที่อยู่หน้าทศนิยมของเลขจำนวนนั้นอยู่ 1 เช่น ถ้าเลขจำนวนนั้น คือ 2371 ซึ่งมีตัวเลขอยู่หน้าทศนิยม 4 ตัว ดังนั้น characteristic จึงมีค่าเท่ากับ 3 และจากตาราง logarithm หา mantissa ซึ่งตรงกับ 2371 ได้เท่ากับ 0.3749 ดังนั้น log 2371 = 3.3749 และมีตัวเลขกำลังของเลข 10 คือ $10^{3.3749}$ จะได้ผลเท่ากับ 2371

(2) ถ้าเลขจำนวนนั้นมีค่าน้อยกว่า 1 characteristic จะเป็น negative integer และมีค่ามากกว่าจำนวนเลขศูนย์ที่อยู่หลังและติดกับจุดทศนิยมอยู่ 1 เช่น เลขจำนวน 0.00271 มีเลขศูนย์อยู่หลังและติดกับจุดทศนิยม 2 ตัว ดังนั้น characteristic จะเป็น -3 และเขียนเป็น $\bar{3}$ อ่านว่า บาร์ 3 (bar three) mantissa ของ 271 ซึ่งหาจากตาราง log เท่ากับ 0.4330 ดังนั้น log 0.00271 = $\bar{3}$.4330

การแบ่ง logarithms ออกเป็น characteristic และ mantissa เท่ากับเป็นการแบ่งจำนวนเลขออกเป็น 2 factors คือ factor แรกเป็นเลขจำนวน 10 ยกกำลังด้วย integer และอีกส่วนหนึ่งเป็นเลขระหว่าง 1 และ 10 ซึ่งจะหาค่า log ได้จากตาราง log เช่น

$2{,}371 = 10^3 \times 2.371 = 10^3 \times 10^{0.3749} = 10^{3+0.3749}$

$0.00271 = 10^{-3} \times 2.71 = 10^{-3} \times 10^{0.4330} = 10^{(-3+0.4330)}$

ข้อสังเกต จาก $10^{(-3+0.4330)}$ จะไม่รวมกันเพื่อเป็น $10^{-2.5670}$ แต่ความจริงแล้วเป็น $\bar{3}$ .4330 เพราะว่า mantissa จะต้องเป็นบวกเสมอ

เครื่องคิดเลขอิเล็กโทรนิคสมัยใหม่ บางชนิดใช้หาค่า log และ antilog ได้ ควรระวังในการใช้ถ้าเลขจำนวนนั้นมีค่าน้อยกว่าหนึ่ง หรือเมื่อ characteristic มีค่าเป็นลบ เพราะเครื่องจะรวมเอา characteristic ซึ่งเมื่อลบเข้ากับค่า mantissa ซึ่งเป็นบวก ทำให้ค่าที่แท้จริงของระบบ log ผิดไป

การเปลี่ยนค่า log กลับเป็นเลขธรรมดานั่นคือ การหาค่า antilogarithms ใช้วิธีการกลับกันกับหาค่า log และเราอาจหาได้จากตาราง antilogarithms หรือแม้แต่ตาราง logarithms ก็ตาม การหาค่าจากตาราง antilogarithms ทำได้ดังนี้คือ หาตัวเลขซึ่งตรงกับ mantissa ของค่า log ที่ต้องการหาในตาราง antilog แล้วคูณด้วย 10 ยกกำลังด้วย characteristic ของค่า log นั้น เช่น ต้องการหา antilog ของ 1.1057 นำเอา mantissa คือ 0.1057 เทียบดูในตาราง ซึ่งได้ตัวเลขมาคือ 1,276 ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 1.276 เพราะว่า

Mantissa จะได้มีค่าเป็นบวกเสมอ และอยู่ระหว่าง 0 และ 1 เมื่อเปลี่ยนเป็นค่า antilog แล้วจะมีค่าอยู่ระหว่าง 1 และ 10 เพราะว่า

0 = log 1 และ 1 = log 10

ดังนั้น ค่า antilog ของ 1.1057 จึงเท่ากับ $10^1 \times 1.276$ เท่ากับ 12.76

และตัวอย่างการหาค่า antilog ของ $\bar{2}.6136$ คือ นำ mantissa คือ 0.6136 ไปเทียบหาดูจากตารางจะได้ตัวเลข คือ 4,108 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.108 เพราะว่า antilog ของ mantissa จะมีค่าอยู่ระหว่าง 1 และ 10 นำค่านี้ไปคูณด้วย 10 ยกกำลังด้วย characteristic ซึ่งจะได้ผลดังนี้ คือ

antilog $\bar{2}.6136 = 10^{-2} \times 4.108 = 0.04108$

การหาค่า antilog จากตาราง log ก็ทำได้เช่นเดียวกัน โดยทำตรงกันข้ามกับการหาค่า log จากตาราง ต้องการหาค่า antilog ของ 1.1057 นำเอา mantissa คือ 0.1057 ไปเทียบดูในตารางซึ่งครั้งแรกที่พบใกล้เคียงคือ 1,038 ซึ่งจะตรงกับเลข 127 ซึ่งยังขาดอีก (1057 – 1038) = 19 ซึ่งดูใน difference ค่า 21 จะตรงกับเลข 6 ดังนั้น 0.1057 จะตรงกับเลข 1,276 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.276 เมื่อนำมาคูณด้วย 10 จึงได้ 12.76

Logarithms ในการคูณและหาร

การคูณและการหาร logarithms เป็นไปในทำนองเดียวกับกฎของการคูณและหารเลขยกกำลัง (indices) ดังนี้

(1) log ของผลคูณของเลข 2 จำนวน เท่ากับผลบวกของ log ของเลข 2 จำนวนนั้น

(2) log ของผลหารของเลข 2 จำนวน เท่ากับผลลบของ log ของเลข 2 จำนวนนั้น

Logarithms ทำให้การคูณการหารง่ายขึ้น โดยการเปลี่ยนจากการคูณและหารเป็นการบวกและลบ เช่น

จงหาค่า $\frac{217.2 \times 0.0075}{33.71}$

จากตาราง log เราจะได้

Log 217.2 = 2.3369, log 0.0075 = $\bar{3}.8751$

Log 33.71 = 1.5277

ดังนั้น $\log \frac{217.2 \times 0.0075}{33.71}$ = log 21.72 + log 0.0075 – log 33.71

= 2.3369 – 3 + 0.8751 – 1.5277

= $\bar{2}.6843$

antilog $\bar{2}.6843$ = 0.04834

ดังนั้น $\frac{217.2 \times 0.0075}{33.71}$ = 0.04834

การเปลี่ยนฐาน (base) ของ logarithms

บางครั้งเรามีความจำเป็นจะต้องเปลี่ยนฐาน log จากฐานหนึ่งเป็นอีกฐานหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลี่ยนจากฐานอื่นเป็นฐาน 10 เช่น ในการคำนวณหาค่าการทดลองซึ่งต้องทำ dilution ซึ่งใช้ 2

fold เมื่อได้ผลมาแล้วต้องการคำนวณกลับไปหาค่าเดิม คือ ordinary value ถ้าเราเปลี่ยนเป็น log ฐาน 10 ได้ ก็จะหาค่า antilog ได้จากตารางซึ่งมีอยู่แล้วได้ การเปลี่ยนฐาน log ทำได้ดังต่อไปนี้

สมมุติว่า M, a และ b เป็น positive numbers

ดังนั้น M = $a^{\log_a M}$, $M = b^{\log_b M}$ และ $b = a^{\log_a b}$

ถ้าแทนค่า b ในสมการสอง จะได้

M = $a^{(\log_a b)(\log_a M)}$

ดังนั้น $\log_a M = (\log_a b)(\log_b M)$

หรือ $\log_b M = \dfrac{\log_a M}{\log_a b}$

ตัวอย่าง ในการคำนวณหาค่าการทดลองอย่างหนึ่งได้เท่ากับ $4^{3.675}$ อยากทราบว่าค่าเดิม (ordinary value หรือ antilog) จะเป็นเท่าไร

วิธีทำ จากสมการ $\log_a M = (\log_a b)(\log_b M)$

จากโจทย์จะได้ M = $4^{3.675}$, a = 10, b = 4

แทนค่า $\log_{10} 4.3675 = (\log_{10} 4)(\log_4 4^{3.675})$

$= 0.602 \times 3.675$

$= 2.2135$

antilog 2.2135 = 163.49

ดังนั้น $4^{3.675}$ = 163.49

บทที่ 2 : การทำ Dilution

ในการทดสอบบางอย่างในห้องปฏิบัติการ เช่น การทดสอบทางเคมีหรือทางจุลชีววิทยา ตัวอย่างที่รับมาทดสอบนั้นมีความเข้มข้น หรือปริมาณสูง ก่อนทดสอบจะต้องนำตัวอย่างเหล่านี้มาทำให้เจือจางจนถึงระยะที่พอเหมาะ วิธีการทำให้เจือจางหรือการทำ dilution จะอธิบายโดยละเอียดในบทนี้

Origin

ตัวอย่างที่รับมานั้น เราเรียกว่า origin หรือตัวอย่างเริ่มต้น ถ้าตัวอย่างนั้นเป็นของเหลวก็ถือว่าตัวอย่างนั้นเป็น undiluted หรือถ้าคิดเป็น dilution เท่ากับ 1 : 1 โดยไม่คำนึงว่าการเตรียมตัวอย่างจะเตรียมมาอย่างไร สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็งถ้านำตัวอย่างนั้นมา 1 กรัม ทำเป็น solution หรือ suspension ใน X ml ก็ถือว่าเราได้ทำ dilution แล้ว 1 : X เช่น ถ้านำตัวอย่างมา 1 กรัม ทำ suspension ใน 10 มล. ก็คือเป็น 10% หรือ dilution 1 : 10 เป็นต้น

การทำให้เจือจางหรือการทำ dilution

การทำให้เจือจางหรือการทำ dilution คือ การเติมตัวทำให้เจือจาง (diluent) ลงในตัวอย่างให้มีปริมาตรมากขึ้น ถ้าเติมแล้วทำให้ปริมาตรเป็นกี่เท่าของตัวอย่างเดิมเราเรียกว่า ทำให้เจือจางเท่านั้นเท่า หรือเรียกว่าทำ dilution 1 ต่อ เท่านั้น เช่น นำตัวอย่างมา 1 ml แล้วเติม diluent ลงไปจนได้ 10 ml ตัวอย่างนั้นจึงถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า เรียกว่าทำ dilution 1 : 10 ถ้าเขียนเป็นเศษส่วน ก็จะได้ 1/10 ถ้า นำเอา dilution 1 : 10 มาจำนวน 1 ml จะมี ingredient 1/10 ของตัวอย่างเดิม หรือถ้านำมา 2 ml ก็จะมี ingredient 1/5 ของตัวอย่างเดิม

ในทำนองเดียวกัน ถ้านำตัวอย่างมา 3 ml เติม diluent จนมีปริมาตร 15 ml ดังนั้นตัวอย่างเดิมจะถูกทำให้เจือจางลง 5 เท่า $\{3/15 = 1/5\}$ เรียกว่าทำ dilution 1 : 5 เป็นต้น

ดังนั้นการทำ dilution คือการเติม diluent ให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าของ origin ซึ่งเขียนเป็นสัญลักษณ์ได้ดังนี้

ถ้า V = ปริมาตรของ origin

n = ส่วนกลับของ dilution

D = diluent

การทำ dilution 1 : n หรือการเติม diluent ใน original V จนครบปริมาตร nV ดังสมการ

$$V \xrightarrow{D} nV$$

แต่ในทางปฏิบัติเราจะเติม diluent ซึ่งมีปริมาตร (n – 1) V ลงใน origin sample (V) ได้ปริมาตรขั้นสุดท้าย nV

$$V + (n - 1)\,D = nV$$

ในทางทฤษฎีการเติมสาร 2 ชนิดที่มีปริมาตร V กับ (n-1) V เข้าด้วยกันอาจจะไม่เป็น nV ก็ได้ เพราะเมื่อสารสองชนิดรวมกันอาจทำให้ปริมาตรลดหรือเพิ่มได้ ดังนั้นหลังการผสมปริมาตรรวมอาจจะมากหรือน้อยกว่า nV ก็ได้ ดังนั้นการเติม diluent จนได้ครบปริมาตรตามต้องการ จึงเป็นการเจือจางที่ถูกต้อง

การทำ dilution เป็นเท่า ๆ เรียกว่า dilution fold เช่น การทำ dilution 1 : 2 และ 1 : 10 เรียกว่าทำ 2-fold และ 10-fold ตามลำดับ dilution fold ที่นิยมใช้กัน คือ 2-, 3-, half log, 4-, 5- และ 10-fold การเลือกใช้ dilution fold เหล่านี้ขึ้นอยู่กับพิสัย (ranges) ที่เราต้องการ ถ้าต้องการพิสัยกว้างก็ต้องใช้ fold สูง ๆ เช่น 10- หรือ 5-folds เป็นต้น แต่ถ้าต้องการพิสัยต่ำ ๆ เช่น การทำ dilution ของเซรุ่มมักนิยมใช้ 2-fold

การทำ Serial dilution

การทำ serial dilution คือ การทำให้เจือจางโดยใช้ dilution fold อย่างใดอย่างหนึ่งติดต่อกันหลายครั้ง ตัวอย่างเช่น เราต้องการทำ serial dilution ของเซรุ่มเพื่อจะทำ serum neutralization test ดังนั้นควรเลือก 2 fold เพื่อจะทำ dilution ดังตัวอย่างข้างล่างนี้

Tube No	1	2	3	4	5	6	7	Etc.
Dilution	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	.....
Diluent (V)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.....
Origin (V)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Final (V)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.....
Fraction	$\frac{1}{2^0}$	$\frac{1}{2^1}$	$\frac{1}{2^2}$	$\frac{1}{2^3}$	$\frac{1}{2^4}$	$\frac{1}{2^5}$	$\frac{1}{2^6}$	.....
2^x	$2^{0.0}$	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}	.....
$\log_2$	0.0	-1.0	-2.0	-3.0	-4.0	-5.0	-6.0	.....

ตารางข้างบนนี้แสดงถึงการเตรียม serial 2-fold dilution ตั้งแต่ 1 : 1 ถึง 1 : 64 โดยการเตรียมหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 7 ครั้งแรกเติม diluent ตั้งแต่หลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 7 หลอดละ V, หลอดแรกไม่เติม diluent เพราะไม่ต้องทำ dilution (1 : 1) นำตัวอย่างซีรั่มใสในหลอดที่หนึ่งและหลอดที่สองหลอดละ V จากหลอดที่สองหลังจากผสมให้เข้ากันแล้ว transfer ส่วนผสม V ไปยังหลอดที่สาม แล้ว

ผสมให้เข้ากัน แล้ว transfer ไปหลอดที่สี่ ทำดังนี้เรื่อยไปจนหลอดสุดท้าย แล้วทิ้งไปเท่ากับ V ดังนั้นทุกหลอดจะเหลือส่วนผสมอยู่หลอดละ V โดยมีชีรั่ม dilution ตั้งแต่ 1 : 1 จนถึง 1: 64 ซึ่งคิดเป็น fraction ตั้งแต่ 1 $\left[\frac{1}{1}\right]$ หรือ $\left[\frac{1}{2^0}\right]$ ถึง $\frac{1}{64}$ $\left[\frac{1}{2^6}\right]$ และคิดเป็นเลขยกกำลังของ 2 จะได้จาก $2^{0.0}$ ถึง 2^{-6} หรือคิดเป็น log ฐาน 2 ได้จาก 0.0 ถึง -6.0

การเลือกใช้ dilution fold อื่นที่สูงขึ้น เหมาะสำหรับการทดสอบ ซึ่งตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงขึ้น จึงต้องทำการ dilution fold ซึ่งห่างมากขึ้น การเตรียมการและการคิดก็ใช้ในทำนองเดียวกันกับการทำ 2-fold dilution ตัวอย่างต่อไปนี้เป็นการทำ 10-fold dilution คือ

Tube No	1	2	3	4	5	6	7	Etc.
Dilution	1:1	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000	1:1,000.000	.....
Diluent (V)	0.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	.....
Origin (V)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fraction 1	$\frac{1}{10^0}$	$\frac{1}{10^1}$	$\frac{1}{10^2}$	$\frac{1}{10^3}$	$\frac{1}{10^4}$	$\frac{1}{10^5}$	$\frac{1}{10^6}$	.....
10^x	$10^{0.0}$	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	.....
$\log_{10}$	0.0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	.....

ในการคำนวณที่เกี่ยวข้องกับ dilution เรามักจะได้ค่าที่เป็น log จากการทำ dilution fold ต่างกันตามที่ได้ยกตัวอย่างมาแล้วจะเห็นว่าวิธีง่ายที่สุดคือ ใช้ dilution fold มาเป็นฐาน เมื่อทำ dilution ครั้งหนึ่งค่า log จะเพิ่มขึ้นเท่ากับ +(-1) เสมอ ไม่ว่าจะเป็น log ฐานอะไร โดยที่ log ของ origin หรือ 1 : 1 เท่ากับ 0.0 เช่น เมื่อทำ 2 fold dilution จาก 1 : 1 เป็น 1 : 2 และ 1 : 4 log เท่ากับ 0.0, -1.0 และ -2.0 ตามลำดับ ถ้าทำ 5 fold dilution จาก 1 : 1 เป็น 1 : 5 และ 1 : 25 ก็จะได้ log เท่ากับ 0.0 และ -1.0 และ -2.0 เหมือนกัน การใช้ dilution fold อื่น ๆ ก็ทำ และคิดคำนวณเหมือนกัน

การคำนวณเมื่อใช้เลขอื่นนอกไปจาก 10 เป็นฐานของ log เมื่อได้ผลแล้วนำกลับมาหา antilog ไม่ได้โดยการใช้ตาราง log เพราะตาราง log มีเฉพาะ ฐาน 10 เท่านั้น ดังนั้นจะต้องเปลี่ยน log นี้ให้เป็น log ฐาน 10 เสียก่อน การเปลี่ยนเป็น log ฐาน 10 นี้อาจจะเปลี่ยนเมื่อได้ผลหลังจากการคำนวณแล้ว ซึ่งได้แสดงโดยละเอียดในบทที่ 1 หรือการเปลี่ยนเป็น log ฐาน 10 ทันที ถึงแม้จะใช้ dilution fold อะไรก็ตามแล้วคำนวณต่อไปโดยใช้ log ฐาน 10 ไปเลย การเปลี่ยนฐาน log ได้บรรยายไว้แล้วในบทที่ 1 ในที่นี้จะขอกล่าวซ้ำและยกตัวอย่างการเปลี่ยน log ฐาน 2 เป็น log ฐาน 10 นั่นคือ การเปลี่ยน 2-fold dilution เป็นส่วนของ 10-fold dilution

จากสูตร $\log_a M = (\log_a b)(\log_b M)$

ในที่นี้ $M = 2^{-1.0}$; $a = 10$; $b = 2$

ดังนั้น $\log_{10}2^{-1.0} = (\log_{10}2)(\log_2 2^{-1.0})$

$= 0.301 \times -1.0$

$= -0.3$ โดยประมาณ

นั่นคือการทำ 2 flod dilution ครั้งหนึ่ง จะทำให้ค่า log ฐาน 10 เพิ่มขึ้นเท่ากับ -0.3 ถ้าทำ serial 2-fold dilution แต่ละครั้ง log ฐาน 10 ก็จะเพิ่มขึ้นครั้งละ -0.3 เสมอไป เช่น

Dilution	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Fraction	$\frac{1}{10^{0.0}}$	$\frac{1}{10^{0.3}}$	$\frac{1}{10^{0.6}}$	$\frac{1}{10^{0.9}}$	$\frac{1}{10^{1.2}}$	$\frac{1}{10^{1.5}}$
10^x	$10^{0.0}$	$10^{-0.3}$	$10^{-0.6}$	$10^{-0.9}$	$10^{-1.2}$	$10^{-1.5}$
$\log_{10}$	0.0	-0.3	-0.6	-0.9	-1.2	-1.5

การทำ dilution fold อื่น ๆ และใช้ fold เหล่านี้เป็นฐาน ก็เปลี่ยนเป็นฐาน 10 ได้ในทำนองเดียวกัน ตารางต่อไปนี้แสดงถึง dilution fold ต่าง ๆ ที่นิยมกัน และค่า dilution factor เมื่อเปลี่ยนเป็น log ฐาน 10

Dilution fold	Dilution	Log dilution factor (Approx)
2 – fold	1 : 2	-0.30
3 – fold	1 : 3	-0.48
Half – log	1 : 3.16	-0.50
4 – fold	1 : 4	-0.6
5 – fold	1 : 5	-0.7
10 – fold	1 : 10	-1.0

ตัวอย่างข้างล่างนี้แสดงการทำ serial five fold dilution และการคิดคำนวณ log ฐาน 5 และเปลี่ยนเป็น log ฐาน 10

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7
Dilution	1 : 1	1 : 5	1 : 25	1 : 125	1 : 625	1 : 3,125	1 : 15,625
Diluent (V)	0.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Origin (V)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fraction	$\frac{1}{5^{0.0}}$	$\frac{1}{5^{1}}$	$\frac{1}{5^{2}}$	$\frac{1}{5^{3}}$	$\frac{1}{5^{4}}$	$\frac{1}{5^{5}}$	$\frac{1}{5^{6}}$
5^x	$5^{0.0}$	$5^{-1.0}$	$5^{-2.0}$	$5^{-3.0}$	$5^{-4.0}$	$5^{-5.0}$	$5^{-6.0}$

$\log_5$	0.0	-1.0	-2.0	-3.0	-4.0	-5.0	-6.0
$\log_{10}$	0.0	-0.7	-1.4	-2.1	-2.8	-3.5	-4.2

การเปลี่ยน dilution fold ใน series เดียวกัน

ในการทำ dilution ตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้นสูงในการปฏิบัติเราก็ต้องเลือก fold สูง ๆ เช่น 10 fold เป็นต้น แต่พอถึงระยะที่จะถึง end point เราต้องการผลให้ละเอียดใกล้ความเป็นจริงมากที่สุด เราก็สามารถเปลี่ยนเป็น fold ต่ำ ๆ ได้ การเปลี่ยน log dilution อาศัยการผสมกฎต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วได้ เช่น ตัวอย่างข้างล่าง

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution fold	1	10	10	10	2	2	2	2
Fraction	$\frac{1}{10^0}$	$\frac{1}{10^1}$	$\frac{1}{10^2}$	$\frac{1}{10^3}$	$\frac{1}{10^{3.3}}$	$\frac{1}{10^{3.6}}$	$\frac{1}{10^{3.9}}$	$\frac{1}{10^{4.2}}$
Log_{10}	0.0	-1.0	-2.0	-3.0	-3.3	-3.6	-3.9	-4.2

จะเห็นได้ว่าเมื่อเราทำ dilution โดยใช้ fold อะไรอยู่ก็ตามเมื่อเปลี่ยนเป็น fold อื่น เราก็เปลี่ยน dilution factor ไปตาม fold ใหม่ และวิธีที่สะดวกที่สุดโดยการเปลี่ยน dilution factor เป็น log ฐาน 10 ด้วยกันทั้งหมด

ตัวอย่างระคน ถ้าเราได้รับตัวอย่างหนึ่งมา ซึ่งมี dilution 1 : 6580 และเราจะต้องทำ titration เราจะมีวิธีการอย่างไร

การจะทำ titrate ตัวอย่างซึ่งมี dilution 1 : 6,580 เราสามารถทำได้ดังนี้ คือ เลือก dilution fold ตามที่เห็นสมควร เช่น ten-fold สำหรับไวรัส เป็นต้น การทำ dilution อาจจะทำได้ 2 อย่าง คือ ทำ serial ten-fold dilution จากตัวอย่าง 1 : 6,580 ซึ่งเท่ากับ $10^{-3.8182}$ จากตาราง log เมื่อเราทำ serial ten fold dilution ก็จะได้ดังนี้

Tube No.	0	1	2	3	4	5
Log dilution	-3.8182	-4.8182	-5.8182	-6.8182	-7.8182	-8.8182

หรือเรานำตัวอย่างซึ่งมี dilution 1 : 6,580 มาทำเป็น dilution 1 : 10,000 (หรือ $10^{-4.0}$) ได้ดังนี้ ถ้านำตัวอย่างซึ่งมี dilution 1 : 6,580 มาจำนวน 6,580 ส่วน เติม diluent จำนวน 3,420 ส่วน ก็จะได้ตัวอย่างซึ่งมี dilution 1 : 10,000 ดังนี้

นำตัวอย่างมา 6,580 ส่วน ต้องเพิ่ม diluent 3,420 ส่วน

นำตัวอย่างมา 6.58 ส่วน ต้องเพิ่ม dilutent 3.42 ส่วน

ดังนั้น การทำ dilution 1 : 10000 หรือ 10^{-4} จากตัวอย่างข้างบนก็สามารถที่จะทำได้ง่าย ๆ โดยการนำตัวอย่าง 6.58 มล. แล้วเติม diluent 3.42 มล. ต่อไปก็ทำ serial ten-fold dilution ซึ่งเราก็จะได้ dilution ดังต่อไปนี้

Tube No.	0	1	2	3	4	5
Log dilution	-3.8182	-4.0	-5.0	-6.0	-7.0	-8.0

การทำ dilution ซึ่งใช้ fold ต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วทั้งหมดนั้น จะเห็นว่าระยะห่างแต่ละ fold เมื่อเทียบกับ $\log_{10}$ แล้ว ten-fold จะห่างที่สุดคือ 1.0 log แล้วค่อย ๆ แคบลงมาจาก 5, 4, half log, 3, และ 2-fold คือ 0.7, 0.6, 0.5, 0.48 และ 0.3 log ตามลำดับ จึงเห็นได้ชัดว่าการทำ dilution โดยวิธีกล่าวแล้ว เราสามารถทำได้แคบที่สุดคือ 0.3 log หรือ 2-fold เท่านั้นเอง แต่การทดสอบบางอย่างเราต้องการทำ dilution ให้ละเอียดยิ่งขึ้นไปอีก เช่น การตรวจหาชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นต้น ซึ่งเราจะต้องใช้การทำ dilution ซึ่งมี dilution factor 0.15 และ 0.1 log เป็นต้น

การทำ dilution ซึ่ง factor 0.1 และ 0.15 log นี้ เราจะทำในช่วงจำกัด ปกติและมักจะทำอยู่ในช่วง 1.0 log จาก dilution ที่ทำไว้ก่อนแล้ว จากตาราง log เราคำนวณ dilution fold ได้ เมื่อต้องการจะทำ dilution ต้องมี dilution factor เท่ากับ 0.1 log ดังตารางที่แสดงไว้ข้างล่างนี้

Log dilution	Dilution (Approx)	Origin (V)	Diluent (V)
0.0	1 : 1	1.0	0.00
-0.1	1 : 1.25	1.0	0.25
-0.2	1 : 1.6	1.0	0.60
-0.3	1 : 2.0	1.0	1.00
-0.4	1 : 2.5	1.0	1.50
-0.5	1 : 3.2	1.0	2.20
-0.6	1 : 4	1.0	3.00
-0.7	1 : 5	1.0	4.00
-0.8	1 : 6.4	1.0	5.40
-0.9	1 : 8	1.0	7.00
-1.0	1 : 10	1.0	9.00

ถ้าเราต้องการทำ dilution จาก $10^{-3.1}$ ถึง $10^{-4.0}$ โดยต้องการให้มีระยะห่างกัน 0.1 log เราก็ทำได้ โดยครั้งแรกทำ serial ten-fold dilution ก่อน ซึ่งได้ดังนี้คือ log dilution 0.0, -1.0, -2.0 และ -3.0 ต่อจากนั้นก็ทำ dilution log -3.1 ถึง $10^{-4.0}$ โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 ส่วน และ diluent ซึ่งมีปริมาตรต่าง ๆ กัน ตามที่แสดงไว้ในตารางข้างบนหลังจากนำอัตราส่วนมาเตรียมให้ได้ปริมาณที่พอสมควรดังนี้

Log dilution	Origin (-3.0) ml	Diluent (ml)
-3.1	2.0	0.5
-3.2	2.0	1.2
-3.3	1.5	1.5

-3.4	1.0	1.5
-3.5	1.0	2.2
-3.6	1.0	3.0
-3.7	0.5	2.0
-3.8	0.5	2.7
-3.9	0.5	3.5
-4.0	0.5	4.5

ถ้าต้องการเริ่มจาก dilution อื่น เช่น -4.4 ถึง -5.3 เราก็ทำได้โดยเตรียมตัวอย่างให้มี dilution -4.0 และ -5.0 แล้วก็นำไปเตรียม -4.4 ถึง -4.9 และ 5.1 ถึง 5.3 ตามที่ต้องการได้ ตารางต่อไปจะเป็นตารางสำเร็จรูปซึ่งนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาตรของตัวอย่างและ dilution ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง และสามารถนำไปปรับปรุงใช้เตรียม dilution ตามที่ต้องการได้อีกนอกเหนือไปจากที่แสดงไว้อีกด้วย

Origin	-1	-1.1	-1.2	-1.3	-1.4	-1.5	-1.6	-1.7	-1.8	-1.9
(log dilution)	-2	-2.1	-2.2	-2.3	-2.4	-2.5	-2.6	-2.7	-2.8	-2.9
	-3	-3.1	-3.2	-3.3	-3.4	-3.5	-3.6	-3.7	-3.8	-3.9
Sample		**2.0**	**1.0**	**1.0**	**1.0**	**0.5**	**0.5**	**0.5**	**0.5**	**0.5**
Diluent		0.5	0.6	1.0	1.5	1.1	1.5	2.0	2.7	3.5
Sample		**3.0**	**2.0**	**1.5**	**1.5**	**1.0**	**1.0**	**0.75**	**0.75**	**0.6**
Diluent		0.75	1.2	1.5	2.25	2.2	3.0	3.0	4.05	4.2
Sample		**4.0**	**3.0**	**2.0**	**2.0**	**1.5**	**1.25**	**1.0**	**1.0**	**0.7**
Diluent		1.0	1.8	2.0	3.0	3.3	3.75	4.0	5.4	4.9
Sample		**5.0**	**4.0**	**2.5**	**2.5**	**2.0**	**1.5**	**1.25**	**1.25**	**0.8**
Diluent		1.25	2.4	2.5	3.75	4.4	4.5	5.0	6.75	5.6
Sample		**6.0**	**5.0**	**3.0**	**2.5**	**1.75**	**1.5**	**1.5**	**1.5**	**0.9**
Diluent		1.5	3.0	3.0	4.5	5.5	5.25	6.0	8.1	6.3
Sample		**7.0**	**6.0**	**3.5**	**3.5**	**3.0**	**2.0**	**1.75**	**1.75**	**1.0**
Diluent		1.75	3.6	3.5	5.25	6.6	6.0	7.0	9.45	7.0
Sample		**8.0**	**7.0**	**4.0**	**4.0**	**3.5**	**2.25**	**2.0**	**2.0**	**1.1**
Diluent		2.0	4.2	4.0	6.0	7.7	6.75	8.0	10.8	7.7
Sample		**9.0**	**8.0**	**4.5**	**4.5**	**4.0**	**2.5**	**2.25**	**2.25**	**1.2**
Diluent		2.25	4.8	4.5	6.75	8.8	7.5	9.0	12.15	8.4

Sample	**10.0**	**9.0**	**5.0**	**5.0**	**4.5**	**2.75**	**2.5**	**2.50**	**1.3**
Diluent	2.5	5.4	5.0	7.5	9.9	8.25	10.0	13.5	9.1
Sample	**11.0**	**10.0**	**5.5**	**5.5**	**5.0**	**3.0**	**2.75**	**2.75**	**1.4**
Diluent	2.75	6.0	5.5	8.25	11.0	9.0	11.0	14.85	9.8

การเตรียม dilution โดยให้มี log dilution 0.15 log อาจจะเตรียมได้ 2 วิธี คือ วิธีแรกอาศัยหลักการเช่นเดียวกันกับการเตรียม dilution ที่มี dilution factor 0.1 log โดยการหาค่า dilution จากตาราง log เป็น log dilution ฐาน 10 ซึ่งพอสรุปได้ดังในตารางต่อไปนี้

Log dilution	Dilution (Approx)	Origin (V)	Diluent (V)
0.0	1 : 1	1.0	0.00
-0.15	1 : 1.4	1.0	0.40
-0.3	1 : 2	1.0	1.00
-0.45	1 : 2.8	1.0	1.80
-0.6	1 : 4	1.0	3.00
-0.75	1 : 5.6	1.0	4.6
-0.9	1 : 8.0	1.0	7.0

ตารางข้างล่างนี้เป็นตารางสำเร็จเตรียม dilution ซึ่งมี dilution factor 0.15 log

Origin	-1	-1.15	-1.3	-1.45	-1.6	-1.75	-1.9
(log diltion)	-2	-2.15	-2.3	-2.45	-2.6	-2.75	-2.9
	-3	-3.15	-3.3	-3.45	-3.6	-3.75	-3.9
Sample		**0.4**	**1.0**	**0.5**	**0.5**	**0.5**	**0.5**
Diluent		1.0	1.0	0.9	1.5	2.3	3.5
Sample		**0.8**	1.5	**1.0**	**1.0**	**0.75**	**0.6**
Diluent		2.0	1.5	1.8	3.0	3.45	4.2
Sample		**1.2**	**2.0**	**1.5**	**1.25**	**1.0**	**0.7**
Diluent		3.0	2.0	2.7	3.75	4.6	4.9
Sample		**1.6**	**2.5**	**2.0**	1.5	**1.25**	**0.8**
Diluent		4.0	2.5	3.6	4.5	5.75	5.6
Sample		**2.0**	**3.0**	**2.5**	**1.75**	**1.50**	**0.9**
Diluent		5.0	3.0	4.5	5.25	6.9	6.3
Sample		**2.4**	**3.5**	**3.0**	**2.0**	**1.75**	**1.0**
Diluent		6.0	3.5	5.4	6.0	8.05	7.0

Sample	2.8	4.0	3.5	2.25	2.0	1.1
Diluent	7.0	4.0	6.3	6.75	9.2	7.7
Sample	3.2	4.5	4.0	2.5	2.25	1.2
Diluent	8.0	4.5	7.2	7.5	10.35	8.4
Sample	3.6	5.0	4.5	2.75	2.50	1.3
Diluent	9.0	5.0	8.1	8.25	11.5	9.1
Sample	4.0	5.5	5.0	3.0	2.75	1.4
Diluent	10.0	5.5	9.0	9.0	12.65	9.8

การเตรียม dilution ซึ่งมี dilution factor 0.15 log อีกวิธีหนึ่ง อาศัยหลักการทำ 2-fold dilution 2 series ซึ่งเริ่มต้นจาก 100% และ 75% ตามลำดับ เมื่อนำเอา 2 series เรียงสลับกันก็จะได้ dilution series ซึ่งเท่ากับ 0.15 log

Series A (0.3 log)	100	50	25	12.5	6.25
Series B (0.3 log)	75	37.5	18.75	9.375	

เมื่อนำมาเรียงกันก็จะได้เป็นเปอร์เซ็นต์ตามลำดับดังนี้ คือ 100, 75, 50, 37.5, 25, 18.75, 12.5, 9.375, 6.25 ตามลำดับ ซึ่งแต่ละ dilution ห่างกัน 0.15 log

หรือโดยการนำ undiluted sample มาผสมกับ diluent ตามอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ดังข้างบนก็จะได้ dilution ซึ่งมี factor 0.15 log เช่นเดียวกัน ตารางข้างล่างนี้เป็นตารางสำเร็จเพื่อเตรียมตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์ตามต้องการ

Percent Conc.	70	50	35	25	17.5	12.5	8.75	6.25
Sample	0.7	0.5	0.35	0.25	0.35	0.25	0.35	0.25
Diluent	0.3	0.5	0.65	0.75	1.65	1.75	3.65	3.75
Sample	1.4	1.0	0.7	0.5	0.7	0.5	0.7	0.5
Diluent	0.6	1.0	1.3	1.5	3.3	3.5	7.3	7.5
Sample	2.1	1.5	1.4	0.75	1.05	0.75	1.05	0.75
Diluent	0.9	1.5	2.6	2.25	4.95	5.25	10.95	11.25
Sample	2.8	2.5	1.75	1.0	1.4	1.0		
Diluent	1.2	2.5	3.25	3.0	6.6	7.0		
Sample	3.5	3.0	2.1	1.25	1.75	1.25		
Diluent	1.5	3.0	3.9	3.75	8.25	8.75		
Sample	4.2	4.0	2.45	1.5				
Diluent	1.8	4.0	4.55	4.5				

Sample	**4.9**	**5.0**	**2.8**	1.75
Diluent	2.1	5.0	5.2	5.25
Sample	**5.6**	**6.0**	**3.15**	**2.0**
Diluent	2.4	6.0	5.85	6.30
Sample	**6.3**	**7.0**	**3.5**	**2.25**
Diluent	2.7	7.0	6.5	6.75
Sample	**7**	**8.0**	**4.2**	**2.5**
Diluent	3	8.0	7.8	7.5

บทที่ 3
การคำนวณผลการทดสอบ

ในบทนี้จะกล่าวถึง การคำนวณผลจากการทดสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ที่เห็นว่า มีความจำเป็นสำหรับผู้ปฏิบัติงานวิชาการด้านสุขภาพสัตว์ ส่วนเหตุผลและขั้นตอนการปฏิบัติของการทดสอบนั้น ๆ จะไม่กล่าวถึงในที่นี้

1. การหา Median Effective Dose (MED หรือ ED_{50})

ในสมัยก่อนการหาผล (effectiveness) ของตัวกระตุ้น (stimulus) ต่อ biological subject ซึ่งตอบสนองในรูปแบบของ quantal response จะอยู่ในรูปแบบของปริมาณ stimulus ที่น้อยที่สุด ที่ทำให้เกิดผลบวกใน subject ทั้งหมด เรียกว่า minimum effective dose หรือที่ใช้กันกว้างขวางว่า minimum lethal dose (MLD) แต่การหาโดยวิธีนี้ในทางปฏิบัติแล้วเป็นไปได้ยากมาก ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการเน้นการหาปริมาณของ stimulus ที่ทำให้เกิดผล 50% นั่นคือทำให้เกิดผลใน population ครึ่งหนึ่ง โดยอาศัยการคำนวณจากข้อมูลที่ทำให้เกิดผลก่อนและหลัง 50% ในที่นี้จะกล่าวถึงการหา MED ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

ขอนำผลการทดสอบ (ตารางที่ 1) มาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อคำนวณตามวิธีการต่าง ๆ ต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ stimulus ต่อ biological unit

Column			
1 Log dil	2 Total number tested	3 Number positive	4 Number negative
-5	22	22	0
-6	24	21	3
-7	22	8	14
-8	23	1	22

ในตัวอย่างนี้ได้ทำการทดสอบตัวอย่างโดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 4 ระดับ คือ Log dilution ตั้งแต่ -5 ถึง -8 (column 1) ทำการทดสอบใน experimental unit ความเข้มข้นละ 22, 24, 22 และ 23 หน่วยตามลำดับ (column 2) และได้ผล positive และ negative ตาม column 3 และ 4

ต่อไปจะได้นำผลอันนี้ไปคำนวณหา ED_{50} ตามวิธีต่าง ๆ ที่นิยมใช้กันต่อไป

1.1 การหา ED_{50} โดยวิธี Reed and Muench

สูตร Log ED_{50} = Log dil ± d (proportionate distance)

ซึ่ง Log dil = Log dil ก่อนหรือหลัง cumulative 50%

d = Log dil factor

Proportionate Distance = สัดส่วนของระยะระหว่าง cumulative ก่อนหรือหลัง 50% กับ 50% ต่อระยะระหว่าง cumulative positive ก่อนและหลัง 50% การหา ED_{50} โดยวิธี Reed and Muench นี้ จึงทำได้ 2 วิธี คือ

(A) Log ED_{50} = Log dil ก่อน cumulative positive 50% + d (สัดส่วนของระยะระหว่าง cumulative positive ก่อน 50% กับ 50% ต่อระยะระหว่าง cumulative positive ก่อนและหลัง 50%)

(B) Log ED_{50} = Log dil หลัง cumulative positive 50% - d (สัดส่วนของระยะระหว่าง cumulative positive 50% กับหลัง 50% ต่อระยะระหว่าง cumulative positive ก่อนและหลัง 50%)

นำผลการทดสอบจากตารางที่ 1 มาคำนวณต่อเพื่อหา percent cumulative positive ดังข้างล่างนี้

Log dil	Number Positive	Number Negative	Cumulative Positive	Cumulative Negative	Cumulative % Positive
-5	22	0	52	0	100
-6	21	3	30	3	90.9
-7	8	14	9	17	34.6
-8	1	22	1	39	2.5

ดังนั้น (A) Log ED_{50} $= -6 + (-1)\frac{(90.9 - 50)}{90.9 - 34.6}$

$= -6 - \frac{40.9}{56.3} = -6 - 0.726$

$= -6.726$ *Ans*

ดังนั้น (B) Log ED_{50} $= -7 - (-1)\frac{(50 - 34.6)}{90.9 - 34.6}$

$= -7 + \frac{15.4}{56.3} = -7 + 0.274$

$= -6.726$ *Ans*

1.2 การหา ED_{50} โดยวิธี Arithmetic Method

สูตร Log ED_{50} = Log dil $-\frac{1}{2}\ d\ \left\{\frac{(A-B)(C+D)}{AD-BC}\right\}$

ซึ่ง Log dil = Log dil ก่อน 50%

d = Log dil factor

A, C = Cumulative Positive

B, D = Cumulative Negative

สมการนี้จะ Valid เมื่อ $A > B$ และ $C < D$

นำผลการทดสอบจากตารางที่ 1 มาคำนวณต่อเพื่อหา Cumulative Positive และ Negative เพื่อทำการหาค่าของ A, B, C และ D ดังต่อไปนี้

Log dil	Number Postive	Number Negative	Cumlative Positive	Cumulative Negative
-5	22	0	52	0
-6	21	3	30	3
-7	8	14	9	17
-8	1	22	1	39

หา Cumulative Positive ทำได้โดยรวมจำนวน Positive สะสมจาก -8 ถึง -5 ซึ่งจะได้ 1, 9, 30 และ 52 ตามลำดับ การหา Cumulative Negative ก็ทำได้โดยทำนองเดียวกัน จาก -5 ถึง -8 คือ 0, 3, 17 และ 39 ตามลำดับ

เมื่อได้ค่า Cumulative Positive และ Negative แล้ว กำหนดค่า A, B, C และ D ซึ่ง 50% จะอยู่ระหว่าง A กับ C หรือ B กับ D

ในที่นี้มีตำแหน่งเดียวซึ่ง $A > B$ และ $C < D$ คือ $A = 30, B = 3, C = 9$ และ $D = 17$

ดังนั้น Log ED_{50} $= -6 - \frac{1}{2} \times 1 \frac{(30-3)(9+17)}{(30\times17)-(3\times9)}$

$= -6 - 0.5 \frac{(27\times26)}{483}$

$= -6.727$ *Ans*

1.3 การหา ED_{50} โดยวิธี Spearman - Karber

สูตร Log ED_{50} = $x_{p=1} + \frac{1}{2}\ d - d\ \varepsilon P$

$x_{p=1}$ = Log dil สูงสุดที่ให้ผล 100% positive

d = Log dil factor

P = proportion positive ของแถว = Log dil

εP = ผลรวมของค่า P ตั้งแต่ $x_{p=1}$ และทุก ๆ dil ที่สูงขึ้นไป

นำผลการทดสอบจากตารางที่ 1 มาคำนวณต่อเพื่อหาค่า ED_{50} โดยวิธี Spearman-Karber ดังนี้

Log dil	Number in gr.(n)	Number Positive	Proportion Positive
-8	23	1	0.043
-7	22	8	0.364
-6	24	21	0.875
-5	22	22	1.000
		εP =	2.282

ดังนั้น $\text{Log } ED_{50}$ = -5 + 0.5 X 1 – 2.282

= -5 + 0.5 – 2.282

= -6.782

1.4 การหา ED_{50} โดยวิธี Probit transformation

1.4.1 หาค่า Probit (probability unit) จาก table

Log dil	Number in group	Number Positive	Percent Positive	Probit*
-5	22	22	100	0
-6	24	21	87.5	6.15
-7	22	8	36.4	4.65
-8	23	1	4.3	3.28

จากผลการทดสอบจากตารางที่ 1 นำมาคำนวณหา percent positive เท่ากับ 87.5, 36.4 และ 4.3 ใน dil -6, -7 และ -8 ตามลำดับ แล้วนำ percent positive นี้ไปหาค่า probit ในตาราง Transformation of percentages to probits จากหนังสือที่พิมพ์ไว้ซึ่งจะได้เท่ากับ 6.15, 4.65 และ 3.28 ตามลำดับ

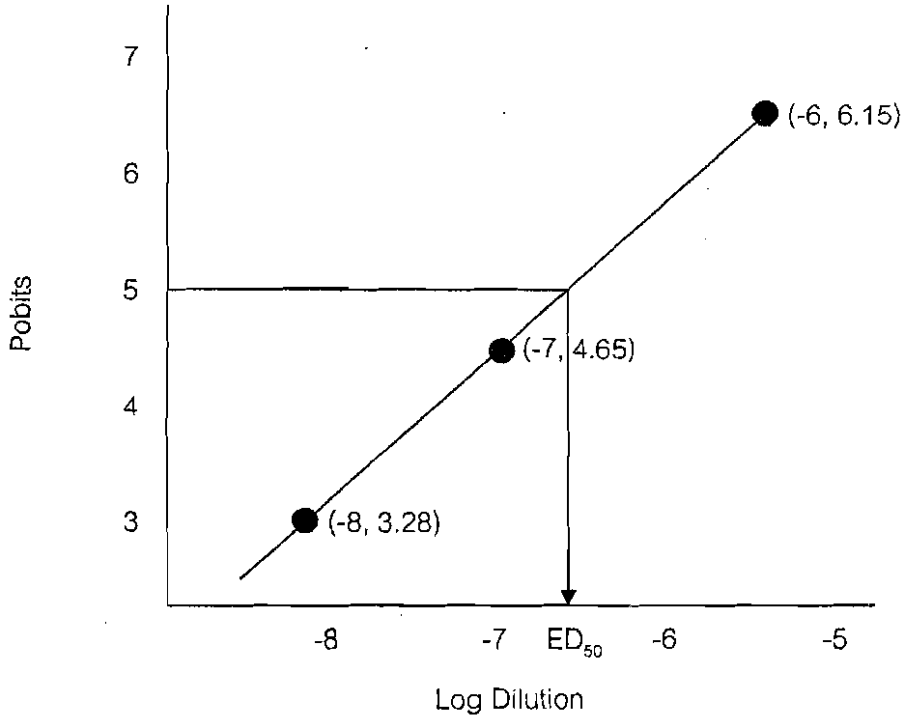
1.4.2 ต่อไปหาค่า ED_{50} จากค่า probits เหล่านี้

เพราะค่า 50% จะตรงกับ probit เท่ากับ 5.00

ซึ่งสามารถหาได้ 2 วิธี คือ

(A) นำค่า probits ไป plot graph กับ log dilution ซึ่งมี coordinates ดังนี้ คือ (-8, 3.28) (-7,4.65) และ (-6, 6.15) แล้วหาเส้นตรงระหว่าง coordinates ทั้ง 3 จากนั้น ลากเส้นตรงจาก probit 5 ขนานกับแกน X ตัด regression line จาก

รูปที่ 1 แสดงการหา ED_{50} โดยวิธีเขียนกราฟ



จุดนี้ลากเส้นตรงตั้งฉากและตัดแกน X ณ จุดตัดนี้ คือ Log ED_{50} ซึ่งจะได้เท่ากับ -6.8 (รูปที่ 1) ความถูกต้องของการหาค่าโดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับการเขียนเส้นตรงระหว่าง coordinates ทั้ง 3 จุด

(B) คำนวณหาค่า correlation coefficient (r), slope (b) และ regression equation ($y = a + bx$) ของ linear regression

สัญลักษณ์ที่จะใช้และการแทนค่าต่อไปนี้ สำหรับข้อ (B) เท่านั้น

r = correlation coefficient (ค่าสหสัมพันธ์) จะเป็นตัวบ่งชี้ว่า ตัวแปรตาม (dependent variables) จะมีสหสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระ (independent variables) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่โดยเทียบค่า r ที่หาได้กับค่า r ใน Table ที่ได้ตีพิมพ์ไว้

b = slope หรือค่าของ Y เมื่อ X มีค่าเท่ากับ 1

S = sum

X = independent variable คือ log dil

Y = dependent variable คือ probit

M = mean

N = จำนวนของค่าสังเกต ในตัวอย่างนี้เท่ากับ 3

สูตร $r = \dfrac{S(XY) - S(X)S(Y)/N}{\sqrt{[\{S(X^2) - S^2(X)/N\}\{S(Y^2) - S^2(Y)/N\}]}}$

$B = \dfrac{S(XY) - S(X)S(Y)/N}{S(X^2) - S^2(X)/N}$

$Y = \overline{Y} - b\overline{X} + bx$

นำค่า Log dil และ probit จากข้อ 1.4.1 มาคำนวณต่อเพื่อหา ED_{50} ต่อไป

	X	X^2	Y	Y^2	XY
	-6	36	6.15	37.8225	-36.9
	-7	49	4.65	21.6225	-32.55
	-8	64	3.28	10.7584	-26.24
S	-21	149	14.08	70.2034	-95.69
M	-7		4.6933		
N	3		3		

จากค่า X และ Y คำนวณค่าของ X^2, Y^2, XY, S และ M ได้ตามตารางข้างบน ส่วน N มีค่าเท่ากับ 3 ทั้ง X และ Y และนำค่าเหล่านี้ไปใช้ในสูตรก็จะได้

$$r = \frac{-95.69 - (-21)(14.08)/3}{\sqrt{[\{(149) - (-21^2)/3\}\{70.2034) - (14.08^2)/3\}]}}$$

$$= \frac{-95.69 - (-98.56)}{\sqrt{[\{149 - 147\}\{(70.2034 - 66.0821)\}]}}$$

$$= \frac{2.87}{\sqrt{2 \times 4.1213}} = \frac{2.87}{\sqrt{8.2426}}$$

$$= \frac{2.87}{2.871} = 0.9997 \quad Ans$$

นั่นคือ ค่า r = 0.9997 เมื่อตรวจสอบกับตารางค่า r แล้ว พบว่าค่า r ที่ได้มากกว่า 0.997 ที่ 5% level of significance และ degree of freedom เท่ากับ 1 หรือ (n-2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ค่า probit (y) มีสหสัมพันธ์ log dil (x) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ต่อไป หาค่า slope b ตามสูตร

$$b = \frac{-95.69 - (-21)(14.08)/3}{149 - (-21^2)/3}$$

$$= \frac{-95.69 + 98.56}{149 - 147}$$

$$= \frac{2.87}{2}$$

$$= 1.435$$

ความหมายของ b = 1.435 คือ เมื่อค่า log dil เพิ่มขึ้น 1 เช่น จาก -8 เป็น -7 (-8 + 1) ค่า probit จะเพิ่มขึ้น 1.435

ต่อไปนำค่า b ไปแทนใน regression equation

$y = 4.6933 - \{1.435 \times (-7)\} + 1.435x$

$= 4.6933 + 10.045 + 1.435x$

$= 14.7383 + 1.435x$

จะได้สมการ regression คือ

$Y = 14.7383 + 1.435x$

เราก็หาค่า ED_{50} ได้โดย 50% response จะมีค่าตรง Y = 5 นำมาแทนค่าก็จะได้

$1.435x = 5 - 14.7383$

$$x = \frac{-9.7383}{1.435}$$

$= -6.786$

นั่นคือ Log ED_{50} = -6.786

2. การหา Virus titer จากวิธี plaque technique

วิธีนี้สามารถนำมาใช้กับ Virus titration โดย Plaque technique, plaque reduction test และสามารถนำมาใช้กับการนับ bacterial colony ได้

จากการทดสอบข้อมูลต่อไปนี้จำเป็นสำหรับการคำนวณ คือ

1. dilution ของตัวอย่างที่ใช้
2. inoculum
3. จำนวน plate หรือ petri dish ที่ใช้ต่อ dilution

2.1 การหา titer โดย conventional method

ตัวอย่างที่ 1 แสดงไว้ข้างล่างนี้โดยมี inoculum = 0.2 ml

Log dil	Plaque per dish	Average plaque per dish	Log pfu per 0.2 ml	Titer Log pfu/0.2 ml
-5.6	20-24-12	18.67	6.87	6.84
-5.9	5-6-10	7.0	6.75	
-6.2	3-5-4	4.0	6.8	
-6.5	2-3-3	2.67	6.93	

จากตัวอย่างนี้เป็นการ titrate virus โดยใช้ two-fold dilution ตั้งแต่ -5.6 ถึง -6.5 มี inoculum = 0.2 ml และใช้ 3 plate/dil ใน column ที่ 2 จะเป็นจำนวน plaque ที่นับได้ใน 3 plate ของ

แต่ละ dilution Column ที่ 3 จะเป็น average plaque/dish ในแต่ละ dilution เช่นที่ -5.6 = (20 + 24 + 12)/3 = 18.67 ใน column ที่ 4 เป็นการหา log pfu (plaque forming unit) ต่อ inoculum ในแต่ละ dilution เช่นที่ -5.6

Log pfu/0.2 ml = -5.6+ (-log 18.67)

= -5.6 – 1.27

= -6.87

ในทำนองเดียวกับหาค่า log pfu/0.2 ml. ของ log dil -5.9, -6.2 และ -6.5 ได้เท่ากับ 6.75, 6.8 และ 6.93 ตามลำดับ

การหา titer ของไวรัส log pfu/0.2 ml ดังแสดงไว้ใน column ที่ 5 โดยหาค่า average ของค่าใน column ที่ 4 ทั้ง 4 ค่า นั่นคือ (6.87 + 6.75 + 6.8 + 6.93) /4 = 6.84 จึงเป็น virus titer $10^{6.84}$ pfu/0.2 ml

ตัวอย่างที่ 2 เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1 แต่ใช้ ten-fold dilution ซึ่งจะได้ virus titer $10^{7.15}$ pfu/0.2ml

Log dil	Plaque per dish	Average plaque per dish	Log pfu per 0.2 ml	Titer Log pfu/0.2 ml
-5	112-108-98	106	7.025	
-6	11-13-9	11	7.041	7.15
-7	2-3-2	2.33	7.368	

2.2 การคำนวณ Virus titer โดยใช้ weighted mean factor

ตัวอย่างที่ 3 (inoculum = 0.2 ml)

Log dil	Plaque per dish	T	M
-5.6	20-24-12	97	32.33
-5.9	5-6-10		
-6.2	3-5-4		
-6.5	2-3-3		

สูตร virus titer/inoculum = $\frac{M \times W}{d}$ *pfu*

T = total number of plaque counted

N = number of dishes per dilution

$$M = \frac{T}{n}$$

W = weighted mean factor

d = lowest dilution counted

Weighted mean factor for two fold dilution of virus

For count over a range of 4 dil it is 8 + 4 + 2 + 1 = 15 W = 8/15

For count over a range of 3 dil it is 4 + 2 + 1 = 7 W = 4/7

For count over a range of 2 dil it is 2 + 1 = 3 W = 2/3

For count over a range of 1 dil it is 1 = 1 W = 1

จากตัวอย่างข้างบนเราคำนวณ T (จำนวน plaque ที่นับได้ทั้งหมด) เท่ากับ 97 และคำนวณ M ได้ (97/3) เท่ากับ = 32.33

ดังนั้น virus titer/0.2 ml $= \frac{32.33 \times 8}{15 \times 10^{-5.6}}$

$= 17.243 \times 10^{5.6}$

$= 10^{1.237} \times 10^{5.6}$

$= 10^{6.84}$

ตัวอย่างที่ 4 (inoculum = 0.2 ml)

Log dil	Plaque per dish	T	M
-5.0	112-108-98		
-6.0	11-13-9	358	119.33
-7.0	2-3-2		

Weighted mean factor for ten fold dilution of virus

For count over a range of 3 dil it is 100 + 10 + 1 = 111 W = 100/111

For count over a range of 2 dil it is 10 + 1 = 11 W = 10/11

For count over a range of 1 dil it is 1 = 1 W = 1

สูตร virus titer/inoculum $= \frac{M \times W}{d}$

$= 119.3 \times \frac{100}{111} \times \frac{1}{10^{-5}}$

$= 107.75 \times 10^{5}$

$= 10^{2.03} \times 10^{5}$

$= 10^{7.03}\ pfu$

2.3 **การคำนวณ** virus titer **ด้วยตารางตัว** constants

ในการคำนวณหา virus titer นอกเหนือจากจำนวน plaque ที่นับได้แล้ว ตัวแปรอื่น ๆ ประกอบด้วย

1. จำนวน dish ต่อ dilution
2. จำนวน dilution ที่ใช้ในการนับ plaque
3. lowest dilution ที่นับ plaque
4. Volume ซึ่งคงที่เฉพาะเทคนิคใดเทคนิคหนึ่ง

เราสามารถเตรียมตาราง constants สำหรับ ข้อ 1, 4 และ weighted factor เพื่อความรวดเร็วในการคำนวณ titer

ให้ Total number of plaque count = T

Log constant = K

Lowest dilution = d

สูตร Log_{10} virus titer (pfu/ml) = $\text{Log}_{10}\, T + K + \log d$

การเตรียม Table of constants (K)

ให้ W = weighted mean factor

V = volume of inoculum

d = lowest dilution

T = total number of plaques counted

n = number of dishes per dil

จากสูตร การหา virus titer/ml โดย weighted mean factor

$$\text{Virus titer/ml} = \frac{M \times W}{V \times d}$$

แต่ $$M = \frac{T}{N}$$

ดังนั้น virus titer/ml $$= \frac{T}{n} \times \frac{W}{V \times d}$$

$$= \frac{T}{n} \times \frac{W}{V} \times \frac{1}{d}$$

$$= T \times \frac{W}{n \times V} \times \frac{1}{d}$$

$$\text{Log virus titer/ml} = \log T + \log\left[\frac{W}{n \times V}\right] + \log\frac{1}{d}$$

$term\ \frac{W}{n \times V}$ ประกอบด้วยตัวแปรต่าง ๆ สำหรับการคำนวณค่า constants :

สำหรับ weighted mean factor ได้กล่าวไว้ในตอนต้นแล้ว การคำนวณค่า constant เพื่อเตรียมเป็น Table ทำได้โดยคำนวณหาค่า K ตามตัวแปรต่าง ๆ เช่น การทดสอบที่ใช้ 3 dishes/dil ใช้ 4 dilution inoculum = 0.2 ml, 2 fold dilution

จากสูตร $K = \frac{W}{n \times V} = \frac{1}{n} \times W \times \frac{1}{V}$

$n = 3$

$W = \frac{8}{15}$ (นับ plaque 4 dilution)

$V = 0.2$

$K = \frac{1}{3} \times \frac{8}{15} \times \frac{1}{0.2} = 0.88889$

$\text{Log } K = -0.051$

Table of Log K for two fold dilution of virus (0.2 ml inoculum)

No of dishes Per dil	No of dilution over which plaques were counted			
	1	2	3	4
1	0.699	0.523	0.456	0.426
2	0.398	0.222	0.155	0.125
3	0.222	0.046	-0.021	-0.051
4	0.097	0.079	-0.146	-0.176

Table of log K for ten fold dilution of virus (0.2 ml inoculum)

No of dishes Per dil	No of dilution over which plaques were counted		
	1	2	3
1	0.699	0.658	0.654
2	0.398	0.357	0.353
3	0.222	0.180	-0.177
4	0.097	0.056	-0.052

ตัวอย่าง นำข้อมูลจากตัวอย่างที่ 3 ข้อ 2.2 มาคำนวณหา titer โดยใช้ K

$\text{Log pfu/ml} = Log\ T + \log K + \log \frac{1}{d}$

$= Log\ 97 + (-0.051) + 5.6$

$$= \quad 1.987 + 5.6 - 0.051$$

$$= \quad 7.54$$

ตัวอย่าง นำข้อมูลจากตัวอย่างที่ 4 ข้อ 2.2 มาคำนวณหา titer โดยใช้ K

$$\text{Log pfu/ml} = Log\ T + \log K + \log \frac{1}{d}$$

$$= \quad Log\ 358 + 0.177 + 5.0$$

$$= \quad 2.55 + 0.177 - 5.0$$

$$= \quad 7.73$$

2.4 การคำนวณ virus titer ด้วย weighted mean number

สูตร Log virus titer pfu/inoc = Log D+log T-log εW

เมื่อ D = highest dilution counted

T = Total plaque counted

W = weighted number

Weighted mean number คือ จำนวน dishes/dil X จำนวนเท่าของความเข้มข้นต่อ D

ตัวอย่างที่ 1 (inoculum = 0.2ml)

Log virus dill	Plaque per dish	T	W	εW
-5.6	20-24-12	97	24	45
-5.9	5-6-10		12	
-6.2	3-5-4		6	
-6.5	2-3-3		3	

เราคำนวณคา weighted mean number ในแต่ละ dil ได้ดังนี้คือ นำเอาจำนวน dish/dil ซึ่งเท่ากับ 3 มาคูณด้วยจำนวนเท่าของความเข้มข้นของ dil นั้นกับ highest dil (D) เช่นที่ log dil -5.6 จะมีความเข้มข้น 8 เท่า ของ D ดังนั้น W สำหรับ log dil -5.6 คือ 3 x 8 = 24 ในทำนองเดียวกับ W สำหรับ -5.9 คือ 3 x 4 = 12 สำหรับ -6.9 คือ 3 x 2 = 6 และสำหรับ -6.5 คือ 3 x 1 = 3 จากนั้นรวมค่า W ทั้งหมดจะเป็น εW = 45

ดังนั้น Log pfu/0.2 ml = 6.5 + log 97 - log 45

= 6.5 + 1.99 - 1.65

= 6.84

ตัวอย่างที่ 2 (Inoculum = 0.2 ml)

Log virus dil	Plaque per dish	T	W	εW
-5	112-108-98		300	
-6	11-13-9	358	30	333
-7	2-3-2		3	

หาค่า T, W และ εW เช่นเดียวกับตัวอย่างที่แล้ว

ดังนั้น Log pfu/0.2 ml = 7 + log 358 - log 333

= 7 + 2.55 - 2.52

= 7.03

2.5 การคำนวณ virus titer โดยใช้ table of constants

เตรียมจาก weighted mean number จากสูตร

Log pfu/0.2 ml = Log D + log T - log εW

จะเห็นได้ว่าตัวแปรคือ จำนวน dish/dil (n) และจำนวน dilution ที่นับ plaque เราสามารถเตรียมค่า constant (K) ได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ให้ K = log εW

สมมติใช้ two fold dilution ใช้ 3 dilution และ dilution ละ 3 dishes

εW = 3 + 6 + 12 = 21

ดังนั้น log εW (K) = 1.322

ตาราง constant (K) ซึ่งเตรียมจาก weighted mean number สำหรับ two fold dil และ Inoculum = 0.2 ml

No of dishes Per dil	No of dilution over which plaques were counted			
	1	2	3	4
1	0.000	0.477	0.845	1.176
2	0.301	0.778	1.146	1.477
3	0.477	0.954	1.322	1.653
4	0.602	0.079	1.447	1.778

ตัวอย่าง ข้อมูลจากตัวอย่างที่ 1 ข้อ 2.4

Log virus titer/0.2 ml = log D + log T - K

= 6.5 + log 97 - 1.653

= 6.5 + 1.986 - 1.653

= 6.834

ในทำนองเดียวกันเราสามารถเตรียม table of constants (K) สำหรับ ten fold dil โดยมี Inoculum 0.2 ml

No of dishes Per dil	No of dilution over which plaques were counted		
	1	2	3
1	0.000	1.041	2.045
2	0.301	1.342	2.346
3	0.477	1.519	2.522
4	0.602	1.643	2.647

ตัวอย่าง นำข้อมูลจากตัวอย่างที่ 2 ข้อ 2.4

Log virus titer/0.2 ml = log D + log T - K

= 7 + log 358 - 2.522

= 7 + 2.55 - 2.522

= 7.028

3. การหาค่า SN_{90} ของ Plaque reduction test

ในการทดลองนี้ต้องมี virus stock ซึ่งได้ titrate และทราบ titer แล้ว นำมา dilute เพื่อให้ได้ working virus ตามที่ต้องการใช้ในการทดสอบ จาก working virus นี้ นำมาทดสอบหาระดับ Antibody โดย plaque reduction test ขณะเดียวกัน titrate ไวรัส เพื่อหา titer ที่แท้จริงด้วย

ตัวอย่างต่อไปนี้แสดงการหา SN_{90} โดย Plaque reduction test

ตารางข้างล่างนี้เป็นการ titrate working virus ซึ่ง dilute $10^{-4.7}$ จาก stock virus

Log dil	Plaque per dish	Average plaque per dish	Log pfu/0.2 ml of undil virus	Titer Log pfu/0.2 ml
-5.6	20-24-12	18.6	6.9	6.8
-5.9	5-6-10	7.0	6.7	
-6.2	3-5-4	4.0	6.8	
-6.5	2-3-3	2.6	6.9	

ตารางข้างล่างนี้เป็นการแสดงผลการอ่าน plaque จาก virus serum mixture และแสดงการคำนวณหา serum titer (SN_{90})

Log serum dil (X)	Plaque per dish	Average plaque per dish	Log surving V. pfu/0.2 ml (Vs)	Log Vs/Vo (Y)
-2.9	2-3-0	1.67	0.22	-1.58
-3.2	4-4-8	5.33	0.73	-1.07
-3.5	10-6-16	10.67	1.03	-0.77
-3.8	14-10-6	10.0	1.00	-0.80
-4.1	28-24-25	25.67	1.41	-0.39

ในแต่ละ Log serum dilution คำนวณหา Log Vs/Vo ได้ดัง ตัวอย่าง ที่ -2.9 colum ที่ 3 จะเป็น average plaque per dish (2 + 3 + 0)/3 = 1.67 นำค่า 1.67 นี้เปลี่ยนเป็น log10 จะได้ 0.22 ลบด้วย 1.8 จะได้ log Vs/Vo เท่ากับ -1.58

สำหรับ log Vs/Vo นี้เป็นผลหารของ log virus survive จาก neutralization (column 4) กับ log ของไวรัสที่ใช้ผสมกับ serum dilution เป็น final virus concentration ใน virus serum mixture โดย working virus จะมี titer (6.8 – 4.7) = 2.1 เมื่อผสมกับ serum ในปริมาณเท่ากัน final virus conc. จะเหลือ (2.1 – 0.3) = 1.8 ซึ่งจะเป็น Log Vo จึงใช้เป็นตัวลบออกจาก Vs ของแต่ละ Serum dilution

เมื่อคำนวณครบแล้ว ตามตารางข้างบนนี้ ก็จะได้ Column ที่ 1 ซึ่งเป็น log serum dil และ log Vs/Vo (column 5) เป็นตัวแปร x และ y ของ linear regression จึงสรุปให้เห็นได้ชัดเจนอีกครั้งคือ

Log serum dil (x)	Log Vs/Vo (Y)
-2.9	-1.58
-3.2	-1.07
-3.5	-0.77
-3.8	-0.80
-4.1	-0.39

จากนี้หาค่า SN_{90} ซึ่งเป็นค่า x เมื่อ y = -1 ซึ่งทำได้ 2 วิธี คือ

1. โดยการเขียนกราฟ ตามรูปที่ 2 โดยลากเส้นตรงสำหรับ coordinates ทั้ง 5 คือ (-2.9, -1.58), (-3.2, -1.07), (-3.5, -0.77), (-3.8, -0.80) และ (-4.1, -0.39) จากนั้นหาค่า x เมื่อ Y = -1.0 ซึ่งจะได้ -3.42 จะสังเกตเห็นว่าการลากเส้น regression line ในตัวอย่างนี้ไม่ง่ายเลยถ้าเปรียบเทียบกับรูปที่ 1

2. โดยการคำนวณหา regression equation

$y = a+bx$

ตามข้อ 1.4.2 (B) จะได้

a = -4.01

b = -0.98

r = -0.95

ถ้า $y = -1x = \frac{4.01-1}{-0.88}$

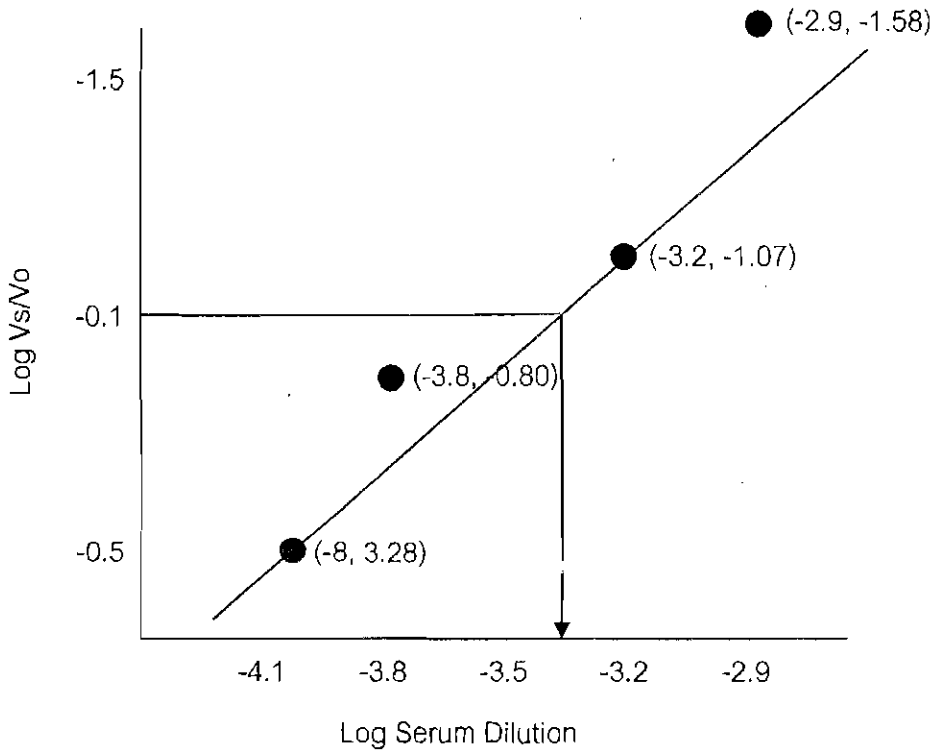
$= -3.42$

นั่นคือ $SN_{90} = 10^{-3.42}$ หรือ $\frac{1}{10^{3.42}}$

= 1/2,630 (1 : 2,630)

จากตาราง correlation coefficient ที่ 5% Level of significance df(3) ค่า r = 0.878

รูปที่ 2 แสดงการหา SN_{90} โดยวิธีเขียนกราฟ



บทที่ 4
สถิติ

ในบทนี้จะได้กล่าวถึงสถิติที่ใช้บ่อย ๆ ในงานวิชาการสุขภาพสัตว์ การเสนอจะเป็นไปในรูปแบบที่แสดงเหตุผลที่จำเป็นเท่านั้น สำหรับรายละเอียดอื่น ๆ จะไม่แสดงไว้ในที่นี้ แต่จะเน้นวิธีการคำนวณเป็นเรื่องสำคัญ

<u>พื้นฐานสถิติ</u>

ค่าสังเกต (Observation) คือ ค่าของผลจากการสังเกตจากการทดลองหรือจากการสำรวจ เช่น ในการเตรียม chick embryo fibroblast เมื่อ cell เจริญเต็มพื้นขวดเพาะแล้วนับจำนวนเซลล์ 4 ขวดได้เซลล์จำนวน $2.56x10^7$, $4.87x10^7$, $1.49x10^8$ และ $3.65x10^7$ ตามลำดับ จำนวนเซลล์แต่ละค่านี้คือค่าสังเกตแต่ละค่านั่นเอง

กลุ่มค่าสังเกตในการทดลองหนึ่ง ๆ เรียกว่า ข้อมูล (data) มีลักษณะคือ ความผันแปร (variation) ค่าสังเกตที่มีความผันแปรนี้ เรียกว่า Variables ซึ่งเราใช้สัญลักษณ์ X แทน เช่น

X_1 = $2.56x10^7$ (Cell/bottle)

X_2 = $4.87x10^7$ (Cell/bottle)

X_3 = $1.49x10^8$ (Cell/bottle)

X_4 = $3.65x10^7$ (Cell/bottle)

ตัวแปรมีสองชนิดคือ ตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) เช่น ค่าซึ่งได้จากการชั่งตวงวัดเป็นต้น ซึ่งค่าเหล่านี้จะมีค่าใดๆ ก็ได้ภายในพิสัย (range) นั้นๆ และตัวแปรไม่ต่อเนื่อง (discontinuous variables) เช่น จำนวนจุดบนหน้าลูกเต๋า ซึ่งมีได้เพียง 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เท่านั้น เป็นต้น

ความกระจาย (distribution) ตัวแปรหนึ่งย่อมมีค่าต่าง ๆ กัน และแต่ละค่าจะปรากฏในประชากรเป็นปริมาณมากน้อยต่าง ๆ กัน การปรากฏมากน้อยในประชากรเรียกว่า ความถี่ (Frequency) ลักษณะการปรากฏขึ้นในประชากรโดยมีความถี่มากน้อยต่าง ๆ กันของตัวแปรหนึ่งเรียกว่า ความกระจาย (distribution) ซึ่งแสดงให้เห็นความถี่ต่างๆ ของค่าทั้งหมดของตัวแปรหนึ่ง

วิธีวัดความโน้มหาศูนย์ (Central tendency) ข้อมูลประกอบด้วยค่าสังเกตมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของการทดลอง ท่ามกลางความแตกต่างของค่าสังเกตในแต่ละข้อมูล จะมีค่าหนึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนมากของค่าทั้งหมดใกล้เคียงกับค่านี้ ซึ่งเป็นตัวชี้ให้เห็นศูนย์กลางของข้อมูลนั้น ซึ่งหาได้โดยหาค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเฉลี่ยที่ใช้กันบ่อย ๆ คือ เฉลี่ยเลขคณิต (Arithmetic mean) ซึ่งคำนวณได้จากผลรวมของค่าสังเกตทั้งหมดหารด้วยจำนวนค่าสังเกตนั้น ๆ

ในวิชาสถิติเราใช้สัญลักษณ์

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตใน data นั้น ๆ

ตัวอย่างค่าเฉลี่ย $(\overline{X})$ จากค่าสังเกต 4 ค่า ข้างบนนี้ คำนวณได้ดังนี้

$\overline{X}$ = S(X)/N

$\overline{X}$ = $(2.56x10^7+4.87x10^7+14.9x10^7+3.65x10^7)/4$

= $\frac{25.98}{4} x10^7 = 6.495x10^7$

ความแตกต่างระหว่างค่าสังเกตแต่ละค่ากับค่าเฉลี่ย เรียกว่า Sample deviate หรือ deviation ซึ่งมีเครื่องหมายบวกหรือลบอยู่ด้วย

เช่น ค่า d = deviation

$d = (X_i - \overline{X})$

subscript i เป็นเลขที่ของค่าสังเกต

ดังนั้น $d_1 = (2.56x10^7 - 6.495x10^7) = -3.935x10^7$

$d_2 = (4.87x10^7 - 6.495x10^7) = -1.625x10^7$

$d_3 = (1.49x10^8 - 6.495x10^7) = +8.405x10^7$

$d_4 = (3.65x10^7 - 6.495x10^7) = -2.845 x10^7$

คุณสมบัติที่น่าสนใจของเฉลี่ยเลขคณิต คือ ผลรวมของ deviate จะเท่ากับ 0

นั้นคือ $d_1 + d_2 + d_3 + d_4 = 0$

$(- 3.935 - 1.625 + 8.405 - 2.845) x 10^7 = 0$

$0 x 10^7 = 0$

$0 = 0$

นอกจากค่าเฉลี่ยเลขคณิตแล้ว ยังมีค่าเฉลี่ยอื่น ๆ ที่แสดงความโน้มหาศูนย์ คือ Median หมายถึง เมื่อเรียงค่าสังเกตจากต่ำตามลำดับไปหาค่าสูงแล้ว ค่านั้นจะตกอยู่ตรงกลาง คือ จะมีค่าต่ำกว่าและสูงกว่าอย่างละครึ่ง ถ้าหากค่าสังเกตนั้นมีจำนวนเป็นเลขคู่ median จะเท่ากับเฉลี่ยของค่าซึ่งอยู่ตรงกลางสองค่า เช่น มีข้อมูลดังนี้ 4, 6, 8 และ 10 median เท่ากับ (6+8)/2 = 7 จากกรณีนี้จะเห็นว่าถึงตัวเลขหน้าและหลังจะเปลี่ยนไปอย่างไร ค่า median จะยังคงเท่าเดิม เช่น ถ้าข้อมูลเปลี่ยนเป็น 5,6,8 และ 30 median ก็ยังคง 7 เท่าเดิม ถ้าค่าสังเกตมีจำนวนเป็นเลขคี่ median จะเท่ากับค่าสังเกตที่อยู่ตรงกลาง เช่น ข้อมูล 1, 3, 6, 8, 9 median จะเท่ากับ 6

Median จะบอกถึงความโน้มหาศูนย์ได้ดีต่อเมื่อมีค่าสมภาพ (Symmetrical) ทั้งค่าสูงและต่ำ

Mode เป็นค่าแสดงความโน้มหาศูนย์อีกวิธีหนึ่ง หมายถึง ค่าที่เกิดขึ้นบ่อยที่สุด เช่น ข้อมูล 1, 2, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 6, 7 จะได้ mode เท่ากับ 4 เพราะ 4 ปรากฏขึ้นบ่อยที่สุด

ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean) เหมาะสำหรับค่าสังเกตที่เป็นบวกและมีค่าเป็นสัดส่วน

สูตร $G = \sqrt[n]{X_1 X_2 ... X_n}$

Geometric mean (G) = n^{th} root ของผลคูณของค่าสังเกตทั้งหมด

ตัวอย่าง เราหา serum titer ได้ 5 ตัวอย่าง ซึ่งมีดังนี้คือ 1:12, 1:17, 1:23, 1:45 และ 1:9 ต้องการหา geometric mean

ดังนั้น $G = \sqrt[5]{\frac{1}{2} \times \frac{1}{17} \times \frac{1}{23} \times \frac{1}{45} \times \frac{1}{9}}$

$= \sqrt[5]{\frac{1}{1,900,260}}$

$= \frac{1}{18.02}$

Harmonic mean (H) คือ จำนวนค่าสังเกต หารด้วยผลบวกของส่วนกลับของของค่าสังเกตที่ได้แต่ละค่า เช่น

สูตร $H = n / s(\frac{1}{x_1})$

เช่น จากข้อมูลที่มีค่าสังเกต 1, 2, 3, 4 และ 5

Harmonic mean (H) $= \frac{5}{1+\frac{1}{2}+\frac{1}{3}+\frac{1}{4}+\frac{1}{5}}$

$= \frac{5}{\frac{60+30+20+15+12}{60}}$

$= \frac{5}{\frac{137}{60}} = \frac{5 \times 60}{137}$

$= 2.19$

จากข้อมูลเดียวกันการหา mean โดยต่างวิธีกันอาจจะได้ค่าไม่เท่ากัน ฉะนั้นการแสดงค่า mean ต้องบอกไปด้วยว่าเป็นค่า mean ชนิดไหน

Variance คือ ผลบวกของกำลังสองของความแตกต่างแต่ละค่าสังเกตกับค่าเฉลี่ย หารด้วยขั้นแห่งความอิสระ (degree of freedom) หรือ จำนวนซึ่งน้อยกว่าจำนวนค่าสังเกตทั้งหมดหนึ่ง (n-1)

สูตร Variance (V) $= \frac{(x_i - \bar{x})^2 ... + (x_n - \bar{x})^2}{(n-1)}$

V $= S(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)$

หรือใช้บ่อยในรูปของ V = $\frac{s(x^2)}{N-1} - \frac{S^2(x)}{N(N-1)}$

เช่น เรามีข้อมูลซึ่งมีค่าสังเกต 4, 3, 3, 5 (N = 4)

$$V = \frac{(4^2+3^2+3^2+5^2}{3} - \frac{(4+3+3+5)^2}{4\times 3}$$

$$= \frac{59-56.25}{3}$$

$$= 0.9167$$

Standard deviation หรือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวณได้จาก variance

$$s = \sqrt{S(X_i - X)^2/(n-1)}$$

$$= \sqrt{V}$$

จากตัวอย่างข้างบน $s = \sqrt{0.9167}$

$$= 0.957$$

ในการรายงานค่าเฉลี่ยของ ค่าสังเกต 4 ค่า ดังกล่าวมักจะรายงานในรูปแบบของ

$$= \overline{X} \pm S.D$$

เช่น $= 3.75 \pm 0.957$

Standard error คือ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเฉลี่ยคำนวณได้จากสูตร

$$S.E. = \sqrt{\frac{V}{N}} = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

จากตัวอย่างข้างบนนี้ $S.E. = \frac{0.9574}{\sqrt{4}}$

$$= 0.4787$$

ในการรายงานผลเฉลี่ยของ data บางครั้งใช้ S.E. แทน S.D.

เช่น $= \overline{X} \pm S.E. = 3.75 \pm 0.4787$

Limits of error of a mean e_m

Limit of error $= \pm \frac{te_m}{\sqrt{N}}$

จากตัวอย่างข้างบนนี้ $e_m = 0.4787; N = 4$

t = 3.18 (โดยการเปิด *table* ที่ $df = 3, P = 0.95$)

ดังนั้น Limit of error $= \pm 3.18 \times 0.4787 \div \sqrt{4}$

$$= \pm 0.76$$

Confidence interval = $\overline{X} \pm$ limit of error

$$= \quad 3.75 \pm 0.76$$

$$= \quad (3.75 - 0.76) - (3.75 + 0.76)$$

$$= \quad 2.99 - 4.51$$

การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ

ถ้าเรามีค่าเฉลี่ย (mean) สองค่าที่แตกต่างกัน ทางสถิติแล้วเป็นไปได้ 2 ทฤษฎีคือ มันอาจจะเป็นเนื่องจาก experimental error (หรือเรียกว่า null hypothesis) หรือ เกิดเพราะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับของความแตกต่างสามารถหาได้จาก test of significance ในตอนนี้จะได้กล่าวถึงวิธีการนี้ที่ใช้กันบ่อย ๆ

Normal deviate test

การทดสอบที่ใช้เพื่อชี้ให้เห็นว่า sample mean (m) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก Known Universe mean (μ) หรือไม่ ในกรณีนี้ Universe Standard deviation (o') ต้องทราบแล้วด้วย

สูตร $\mu_1 = \dfrac{m-\mu}{o'/\sqrt{N}}$

μ_1 = normal deviate

m = sample mean

o' = Universe standard deviation

N = number of observation

ถ้าค่า normal deviate (μ_1) ที่คำนวณได้น้อยกว่า 1.960 ($p < 0.95$) sample mean จะไม่แตกต่างจาก universe mean อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าได้ค่า μ_1 มากกว่า 1.96 ($p > 0.95$) sample mean นั้นจะแตกต่างจาก universe mean อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอย่าง

ได้มีการทดสอบปริมาณ nitrogen ของผลิตภัณฑ์เป็นเวลานานและได้ mean เท่ากับ 4.02% และมี S.D.เท่ากับ 0.06% ในการผลิต 4 ครั้งหลังสุดได้ mean เท่ากับ 4.20% ถามว่ามี การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ nitrogen อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

จากสูตร $\mu_1 = \dfrac{m-\mu}{o'/\sqrt{N}}$

ในที่นี้ $m = 4.20$

$\mu = 4.02$

$o' = 0.06$

$N = 4$

$\mu_1 = \dfrac{4.20-4.02}{0.06/\sqrt{4}}$

$= 6.0$

μ_1 มีค่าสูงกว่า 1.96 (P = 0.95) หรือแม้แต่ 2.576 (P = 0.99) แสดงว่าปริมาณของ nitrogen ในผลิตภัณฑ์ 4 ชุดหลังนี้แตกต่างจากปริมาณปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

The t Test

เป็นการทดสอบเพื่อชี้ว่า sample means 2 ตัว แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยไม่จำเป็นต้องทราบ universe mean หรือ standard deviation

สูตร $t = \frac{m_A - m_B}{S\sqrt{1/N_A + 1/N_B}}$

t = t valve

m_A = mean of N_A

m_B = mean of N_B

N_A = number of observation in data A

N_B = number of observation in data B

ถ้าค่า t ที่หาได้สูงกว่าค่า P = 0.05 ในตาราง Value of t (ตาม degree of freedom $N_A + N_B$-2) แล้ว ค่า mean ทั้งสองนั้นจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าค่า t ที่ได้น้อยกว่าแล้วความแตกต่างของค่า mean ทั้งสองเกิดขึ้นเนื่องจาก experimental error หรือ by chance

ตัวอย่าง technician 2 คน ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของเหล็กในตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลแตกต่างกันนั้น เนื่องจากเทคนิคของ technician ทั้งสองหรือความแตกต่างเป็นไปโดย chance คือ ความแตกต่างมีนัยสำคัญหรือไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของการทดสอบ

Sample	X_A	X_A^2	X_B	X_B^2
1	4.40	16.3600	4.62	21.3444
2	4.62	21.3444	4.57	20.8849
3	4.43	19.6249	4.58	23.5225
4	4.60	21.1600	4.94	24.4036
5	4.55	20.7025	4.67	21.8089
6	4.43	19.6249	4.50	20.2500
7	4.46	19.8916	4.55	20.7025
8	4.39	19.2721	4.35	18.9225
9	4.75	22.5625	4.90	24.0100
10	4.71	22.1841	4.80	23.4256

	$S(X_A) = 45.34$ $m_A = 4.534$	$S(X_A^2)$ 205.7278	$S(X_b) = 46.79$ $m_B = 4.679$	$S(X_B^2 =$ 219.2749
$S^2(X)/N$		205.5716	218.9340	
$S(X^2) - S^2(X)/N$		0.1554	0.3445	

สูตร $V = \dfrac{S(X_A^2) - S(X_A)/N_A + S(X_B^2) - S^2(X_B)/N_B}{N_A + N_B - 2}$

จากค่า X_A และ X_B คำนวณค่า X_A^2, X_B^2 คำนวณค่า $S(X_A), S(X_B)$ หาค่า m_A, m_B คำนวณหาค่า $S^2(X_A)N_A$, $S^2(X_B)/N_B$ แล้วคำนวณค่า $S(X_A^2) - S^2(X_A)/N_A$, $S(X_B^2)S^2(X_B)/N_B$

นำค่าที่ได้มาแทนในสูตร

$$V = \frac{0.1554 + 0.3445}{18} = 0.02777$$

$$s = \sqrt{V} = \sqrt{0.02777}$$

$$= 0.1666$$

ดังนั้น $t = \dfrac{4.679 - 4.534}{0.166\sqrt{\frac{1}{10} - \frac{1}{10}}} = 1.95$

ตรวจดูค่า t ใน valve of t ที่ degree of freedom เท่ากับ $18(N_A + N_B - 2)$ $P = 0.05$ จะได้ 2.10 ค่า t ที่ได้ 1.95 จึงน้อยกว่า จึงสรุปได้ว่า ความแตกต่างเกิดเนื่องจาก chance ไม่ใช่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Variance ratio test

เป็นวิธีใช้เปรียบเทียบ ratio ของ variance 2 ค่า (ค่ามากหารด้วยค่าน้อยเสมอ) variance ratio test นี้เรียกว่า ค่า F ถ้า Sample มีจำนวนค่าสังเกตไม่เท่ากันค่า F ต้องอ่านจาก degree of freedom ทั้ง 2 sample

จากผลการตรวจตัวอย่างของ technician ทั้ง 2 คน นำมาคำนวณหาค่า F ได้ดังนี้

$$V_A = S(X_A^2) - S^2(X_A)/N_A = \frac{0.1554}{9}$$

$$V_B = S(X_B^2) - S^2(X_B)/N_B = \frac{0.3445}{9}$$

Variance ratio F (larger/smaller) $= \dfrac{0.3445}{0.1554} = 2.22$

หาค่า F จากตาราง Points for the distribution of F ที่ P = 0.05 และ degree of freedom ที่ 9 ทั้ง 2 ทางได้ค่า คือ 3.18 ดังนั้น ค่า F ที่ได้จากการคำนวณจากตัวอย่างข้างบน 2.22 ซึ่งน้อยกว่า ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าความแตกต่างระหว่าง V_A และ V_B ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

Analysis of Variance

Analysis of Variance บางครั้งใช้แปลผลของ biological assay โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เพื่อที่จะประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบใหม่ ๆ

ใน biological assay เราใช้ dose ขนาดต่างๆ ทดสอบในกลุ่มของสัตว์ทดลอง แล้วสรุปผลการตอบสนองใน ideal situation ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มควรเหมือนกัน ยิ่งไปกว่านั้น การตอบสนองต่อ dose ขนาดต่าง ๆ ควรจะเป็น linear function ของ log dose, Ideal situation นี้จะไม่มีพบเลย ดังนั้น ในการทดลองจริงจำเป็นต้องตรวจสอบว่าการตอบสนองที่แตกต่างนั้นเกิด เนื่องจากการเพิ่ม dose หรือ เกิดเนื่องจาก animal variation ถ้าการทดสอบได้ผลว่า การตอบสนองต่อการเพิ่ม dose แตกต่างจากมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ back ground of animal variation ถ้า back ground of animal variation เป็นส่วนใหญ่ของ total variation วิธีการทดสอบนั้นไม่เหมาะสมและไม่สมควรนำมาใช้เป็นงานประจำ เนื่องจากการตอบสนองไม่ใช่ผลรวมแท้จริงของการเพิ่ม dose

Analysis of variance ยังบอกได้อีกว่าการตอบสนองของ log dose จะเป็นเส้นตรง (linear) ภายใต้ limits ของ animal variation

ในการนี้เราจะใช้ค่า F (Variance vatio) เป็นค่าในการเปรียบเทียบซึ่งเราจะสรุป สูตรที่จะใช้ดังตารางข้างล่างนี้

Sum of square	Symbol	Formula	Degree of freedom	Variance
Total	S_1	$S(Y^2)-S^2(Y)/N$	$N-1$	$S_1/(N-1)$
Between column	S_2	$\frac{N}{n}S(Z^2)-S^2(Y)/N$	$n-1$	$S_2/(n-1)$
Within column	S_3	S_1-S_2	$N-n$	$S_3(N-n)$
About regression	S_4	S_2-S_5	$n-2$	$S_4(N-2)$
Due to regression	S_5	$\frac{N}{n}\left[\frac{\{S(XZ)-S(X)S(Z)/n\}^2}{S(X^2)-S^2(X)/n}\right]$		S_5

X = log dose ในแต่ละ group

Y = individual response

Z = Average response ในแต่ละ group

N = Total number of response (# gr x # unit)

n = number of dose group

S = Sum

S_i = Sum of the square of the deviation

V = Variance

df = degree of freedom

ตัวอย่าง ได้ทำการหา FMDV titer ในลูกหนูขาวไม่หย่านม โดยใช้ dilution ตั้งแต่ –5 ถึง –8 และใช้ลูกหนูขาว 5 ตัวต่อ dil ดังตารางข้างล่างนี้ (Number of response)

Expt. Animal	Log dose				
# -8	-7	-6	-5		
1	0	1	1	1	
2	0	0	1	1	
3	0	0	1	1	
4	0	0	0	1	
5	0	0	0	1	
Y	0	1	3	5	$S(Y) = 9$
Mean (Z)	0	0.2	0.6	1.0	$S(Z^2) = 1.4$

$S(Y^2) = 9$ $\qquad N(4 \times 5) = 20, n = 4$

$N/n = 5$

สูตร Total $S_1 = S(Y^2) - S^2(Y)/N$

$$= 9 - \frac{9^2}{20} = 9 - 4.05 = 4.95(df = N - 1)$$

S_1 นี้ประกอบด้วย sum of squares between dose group (S_2) และ sum of squares of animal variation within dose group (S_3)

หรือ $(S_2) = S_1 - S_3$

ต่อไปหาค่า S_2

จากสูตร $S_2 = \frac{N\,S(Z^2)}{n} - \frac{S^2(Y)}{N}$

$$= 5 \times 1.4 - 4.05 = 2.95(df = n - 1)$$

$$S_3 = 4.95 - 2.95 = 2.0(df - N - n)$$

ค่า $V = s/df$

ดังนั้น $V_2 = 2.95/3 = 0.98$

$$V_3 = 2/16 = 0.125$$

$$F = V_2 / V_3 = 0.98/0.125 = 7.84(df = 3,16)$$

เปิดค่าในตาราง Theoretical F ที่ 5% probability โดยมี df 3 และ 16 ได้ 3.24 ดังนั้นค่า F ที่ได้ (7.84) สูงกว่า Theoretical F (3.24) แสดงว่า Variance ซึ่งเกิดขึ้นโดย dose difference สูงกว่า variance ของ animal variation วิธีการทดสอบนี้บ่งชี้ว่า เราใช้หนูขาวมาทำการทดสอบได้ แต่ถ้า V_3 สูงกว่า V_2 นั่นคือ animal variation สูง เราก็จะใช้หนูขาวทดสอบไม่ได้

ต่อไปหาว่าวิธีการทดสอบนี้เหมาะสมที่จะใช้หรือไม่ โดยวิเคราะห์ regression เพื่อจะรู้ว่า mean group response (Z) มี linear function ต่อ log dose group (X) หรือไม่ S_2 แบ่งออกเป็น sum of square deviation ของจุด X, Z on regression line (S_4) และ sum of square deviation from the mean of theoretical responses คำนวณจากเส้นนี้

S_4 เรียกว่า sum of square about regression ซึ่งวัดการกระจายของจุด X, Z ใน regression line

S_5 เรียกว่า sum of square about regression ซึ่งวัด square deviation จาก group mean

ในการคำนวณหา Variance ratio V_4 / V_3 ต้องดำเนินการดังนี้ (1) หา S_5 จากสูตร (2) หา $S_4 = S_2 - S_5$ (3) และ V_3 ตามลำดับ ซึ่งดำเนินการได้ดังต่อไปนี้

จากข้อมูลข้างบนนำมาจัดรูปแบบใหม่เพื่อสะดวกในการคำนวณได้ดังนี้

Log dose	X^2	Z	XZ
-8	64	0	0
-7	49	0.2	-1.4
-6	36	0.6	-3.6
-5	25	1.0	-5.0
$S(X)/n = -26$	$S(X^2) = 174$	$S(Z) = 1.8$	$S(XZ) = -10.0$

$$S^2(X)/n = 169 \qquad S(X)S(Z)/n = \frac{(-26)\times 1.8}{4} = -11.7$$

$$N = 20 \qquad n = 4 \qquad N/n = 5$$

ดังนั้น $$S_5 = 5\left[\frac{\{-10-11.7\}^2}{174-169}\right] = \frac{2.89}{5}\times 5 = 2.89$$

$$S_4 = 2.95 - 2.89 = 0.06$$

ดังนั้น $$V_4 = \frac{0.06}{2} = 0.03$$

ดังนั้น $$F(V_4 / V_3) = \frac{0.03}{0.125} = 0.24$$

เมื่อเทียบกับในตารางแล้ว ค่า F ที่ได้ คือ 0.24 น้อยกว่า Theoretical F ที่ $P' = 0.05$ $df = 2$ และ 16 (3.24) แสดงว่า V_4 และ V_3 sample variance มาจาก distribution เดียวกัน ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ความแตกต่างเกิดเนื่องจาก animal variation จึงสรุปได้ว่าการ response ต่อ log dose เป็น linear function แต่ถ้า F ที่คำนวณได้มากกว่า 3.24 แสดงว่าการตอบสนองของ log dose ไม่เป็นเส้นตรง (non-linear)

หรือเราอาจจะหาความสัมพันธ์ของ Y และ X ได้จากสูตรของ Corelation coefficient (r) จากการคำนวณใน linear regression คือ

$$r = \frac{S(XY) - S(X)S(Y)/N}{\sqrt{[\{S(X^2) - S^2(X)/N\}\{S(Y^2) - S^2(Y)/N\}]}}$$

จากตัวอย่างข้างบนได้เปลี่ยนสัญลักษณ์จาก Z เป็น Y และจัดรูปแบบใหม่เพื่อสะดวกในการคำนวณดังนี้

X	X^2	Y	Y^2	XY
-8	64	0	0	0
-7	49	0.2	0.04	-1.4
-6	36	0.6	0.36	-3.6
-5	25	1.0	1.00	-5.0
$S(X) = -26$	$S(X^2) = 174$	$S(Y) = 1.8$	$S(Y^2) = 1.4$	$S(XY) = -10.0$

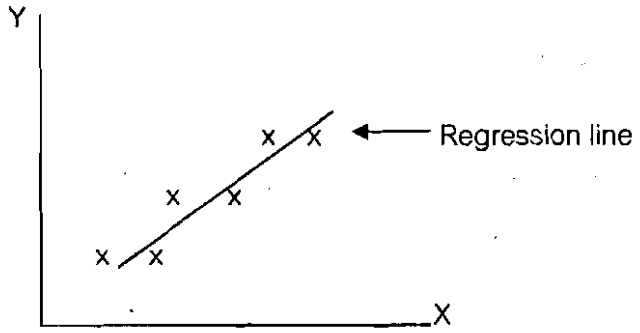
$N = 4$

ดังนั้น
$$r = \frac{-10 - (-26)(1.8)/4}{\{174 - (-26^2)/4\}\{1.4 - (1.8^2)4\}}$$
$$= \frac{1.7}{\sqrt{(174-169)(1.4-0.81)}}$$
$$= \frac{1.7}{\sqrt{5 \times 0.59}}$$
$$= \frac{1.7}{\sqrt{1.72}}$$
$$= 0.988 \quad df = n - 2 = 4 - 2 = 2$$

ดูในตารางที่ 5 % level of significance, $df = 2$ ได้ $r = 0.950$ ดังนั้น ค่าที่อ่านได้คือ 0.988 ซึ่งสูงกว่าแสดงว่า ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของหนูขาวกับ log dose ของไวรัสมีนัยสำคัญทางสถิติ

Linear regression

เป็นวิธีใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว ตัวแปรตัวหนึ่งเป็นตัวแปรอิสระ (independent variables, X) อีกตัวหนึ่งเป็นตัวแปรตาม (dependent variables, Y) ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการ treatment ด้วยตัวแปรอิสระ ถ้าตัวแปรตามไม่มี experiment error แล้ว การเขียนกราฟจุด Y against X เราจะได้เส้นตรง แต่ถ้า Y มี error เราจะได้จุดกระจัดกระจาย ดังรูปข้างล่าง



การวิเคราะห์ regression ทำให้ทราบว่า

(1) จุด (X,Y) ต่าง ๆ ที่กระจายกันอยู่นั้น เป็นผลของ experimental error หรือไม่ ถ้าเกิดเนื่องจาก experimental error ปกติของ Y แล้ว ตัวแปรทั้งสองตัวนั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการหาค่า

$$\text{Correlation coefficient } (r) = \frac{S(XY) - S(X)S(Y)/N}{\sqrt{[\{S(X^2) - S^2(X)/N\}\{S(Y^2) - S^2(Y)/N\}]}}$$

ถ้าค่า r ที่คำนวณได้สูงกว่า theoretical r ในตารางตาม df $(n-2)$ และ $P' = 0.95$ แล้ว ตัวแปรทั้งสองจะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอย่างจะเห็นได้จากการคำนวณหาค่า r ในหัวข้อ analysis of variance (2) หา best fitting line หรือ regression line ซึ่งจะเป็นเส้นตัวแทนที่ผ่านจุด (XY) ทั้งหมด ซึ่งจะหาได้โดย regression equation

$$Y = a + bx$$

โดย x, y เป็นค่าสังเกต (independent, dependent variables)

a = y intercept หรือค่าของ Y เมื่อ $X = 0$

b = ค่าของ y เมื่อ x เท่ากับ 1 (slope)

จากตัวอย่าง การคำนวณค่า r ในหัวข้อ analysis of variance หาค่า slope (b) ได้จากสูตร

$$b = \frac{S(XY) - S(X)S(Y)/N}{S(X^2) - S^2(X)/N}$$

$$= \frac{-10.0-(-26)(1.8)/4}{174-(-26)^2/4}$$

แทนค่า b ใน regression equation จะได้ สูตร $y = \overline{Y} + b(x - \overline{X})$

จากตัวอย่าง $\overline{X} = -(8+7+6+5)4 = -6.6$

$$\overline{Y} = (0+0.2+0.6+1.0)4 = 0.45$$

$$y = 0.45+0.34[x-(-6.5)]$$

$$= 0.45+0.34\ x\ +2.21$$

$$= 2.66+0.34\ x$$

Regression equation (Y = 2.66+0.34 x) นี้ เป็นสมการทำนาย คือ ถ้ารู้ค่า x เราก็หาค่า y ได้ หรือโดยกลับกัน ต้องการหาค่า y จากค่าของ x เช่น จากตัวอย่างข้างบนนี้เราต้องการ ED_{50} (50% response) จะตรงกับ ค่า x เท่าไร ค่า y ที่กำหนดคือ 0.5 (50% response)

ดังนั้น 0.5 = 2.66+0.34x

$$x = \frac{0.5-2.66}{0.34} = -6.353$$

Regression analysis นี้ มีประโยชน์มากในการวิจัยด้านสุขภาพสัตว์ เช่น เรามี reference หรือ Standard method อยู่และได้พัฒนาวิธีการใหม่ขึ้นมา ดังนั้นในการเปรียบเทียบวิธีการใหม่ว่าใช้แทนวิธีการเดิมได้หรือไม่ เช่น การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน วิธี Standard ที่ใช้กันอยู่คือฉีดวัคซีนในสัตว์ทดลองแล้วฉีดพิษทับ อ่านผลตัวที่คุ้มโรคได้ แต่เราได้พัฒนาวิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดี้แทน วิธีการเปรียบเทียบคือ ในสัตว์ทดลองที่ได้ฉีดวัคซีนไว้แล้วก่อนฉีดพิษทับเจาะเลือดแล้วหาระดับแอนติบอดี้ ดังนั้นในสัตว์ทดลองตัวที่ 1 ก็จะได้ความเข้มข้นของวัคซีนหรือจำนวน PD_{50} ที่ใช้เป็นค่า x_1 และระดับแอนติบอดี้จากเซรั่มสัตว์ทดลองตัวที่ 1 เป็นค่า y_1 ตัวต่อไปก็ดำเนินการในทำนองเดียวกัน

เมื่อได้ค่า x y ...เป็นจำนวนมากพอควร นำมาวิเคราะห์หา correlation coefficient ถ้า ค่า r ที่คำนวณได้สูงกว่า theoretical r แล้ว วิธีการใหม่ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าค่า r ที่คำนวณได้น้อยกว่าแสดงว่าวิธีการใหม่ไม่มีความสัมพันธ์กับวิธีการเดิมนำมาใช้ไม่ได้และไม่สมควรดำเนินการหา regression equation อีกต่อไป

ในกรณีที่วิธีการใหม่มีความสัมพันธ์กับวิธีการเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก็ให้หา regression equation เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

หนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

เขียนที่ .....

วันที่ .....

ข้าพเจ้าในนาม บริษัท / ห้างหุ้นส่วน .....เลขที่.....

ถนน .....แขวง .....เขต .....

จังหวัด.....โทรศัพท์ ..... โทรสาร..... มือถือ .....

ยินดีให้ความอุปการะจัดพิมพ์ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" จำนวน .....เล่ม เป็นจำนวนเงิน ..... บาท (.....).

☐ ปีที่ ..... เล่มที่ ..... เดือน .....

โดยการลงโฆษณา ข้อความที่แนบมาด้วยแล้วในส่วนของ

☐ เต็มหน้าในเล่ม (ขาว – ดำ) 4,000 บาท

ข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าโฆษณาแจ้งความกับเจ้าหน้าที่ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ที่นำใบเสร็จรับเงินและหนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" มาให้ข้าพเจ้าเป็นจำนวน 3 เล่ม เมื่อหนังสือพิมพ์เสร็จเรียบร้อยแล้ว

ลงนาม .....

(.....)

ตำแหน่ง .....