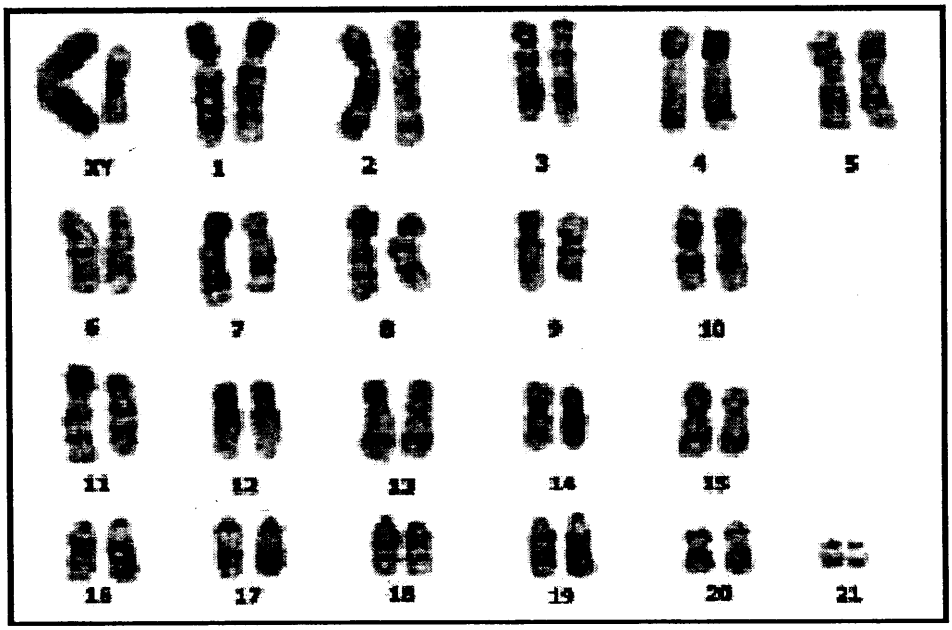
# วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 กันยายน 2547

The Journal of Veterinary Biologics Vol. 14 No. 2 September 2004



เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858 - 1134

# วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 กันยายน 2547

## สารบัญ


♣ กองบรรณาธิการ 9

♣ ผลของการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมต่อเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยที่อุณหภูมิ 4°ซ. 11

วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ จาตุรนต์ พลราช

♣ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่น และปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ 19

นิตยา รักศรี ธนรัตน์ จานุกิจ จันทร์ทิพย์ แสงทอง

♣ เปรียบเทียบการใช้ Van Bekkum Medium ทดแทน Growth Media Suspension สำหรับเป็น maintenance medium ในกระบวนการ Virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension 27

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ จาตุรนต์ พลราช

♣ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 35

อนันต์ ท้าวเพชร คณิตา ภาสะฐิติ

♣ การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 43

คณิตา ภาสะฐิติ อนันต์ ท้าวเพชร

♣ การศึกษาโครโมโซมของแฮมสเตอร์เซลล์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการย้อมสี Giemsa 49

ธนรัตน์ จานุกิจ นิตยา รักศรี วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ ลักขณา หิมะคุณ

# The Journal of Veterinary Biologics

Volume 14 No. 2 September 2004


## Contents


♣ Editorial board 9

♣ Effect of Medium Change to Percentage of Viable $BHK_{21}C_{13}$ Suspension Cells Stored at 4°C 11

Worapong Srivilirit Jaturon Polrach

♣ The Relationship between Optical Density and Bacterial Total Count in Fowl Cholera Vaccine 19

Nittaya Rugsri Thanarat janukit Janthip Sangthong

♣ Comparison of Van Bekkum Medium and Growth Media Suspension as maintenance medium for FMD virus type O cultivation in BHK $_{21}C_{13}$ suspension cell 27

Payont Sinsuwonkwat Jaturon Polrach

♣ Comparison of *Brucella abortus* strain 19 growth in solid and liquid medium 35

Anan Thaopech Kanita Bhasathiti

♣ Studies on optimize time of *Brucella abortus* strain 1119-3 growth in liquid medium 43

Kanita Bhasathiti Anan Thaopech

♣ The study of chromosomal hamster cell using for foot and mouth disease virus production by Giemsa staining 49

Thanarat Janukit Nittaya Rugsri Vorapong Sriwilairit Lakana Himakoun

# วารสารชีวผลิตภัณฑ์

## The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 กันยายน 2547 Volume 14 No. 2 September 2004

### วัตถุประสงค์

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

ฉบับที่ 2 กันยายน 2547 พิมพ์เผยแพร่ ธันวาคม 2547 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

# 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** | Bureau of Veterinary Biologics, |
| | Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand, 30130 |
| **Publications** | twice a year in March and September |

## 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 โดยพิมพ์ความด้วยโปรแกรม 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

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

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

5.3 **ผล** (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

**ตาราง** (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น ๆ

**รูปภาพ** (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น ๆ

5.4 **วิจารณ์** (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

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) หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไลและคณะ, 2532)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Lin และ Lee (981), 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) การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไขน่าสเตรนชนิดผ่านกระต่าย โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชสารสัตวแพทย์ 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 และ บรรณาธิการ) 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 สะดวกแก่การอ่าน และใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ให้ใช้ตัวอักษร Cordia new ขนาด 16 ยกเว้นหัวข้อให้ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ให้ชัดเจน

**กระดาษที่ใช้พิมพ์** ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 mm) ใช้เพียงหน้าเดียว

**การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ**

-ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 1.5 นิ้ว

-ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 1 นิ้ว

**การเว้นระยะในการพิมพ์**

-การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม

-กรณีคำสุดท้ายไม่จบในบรรทัดนั้นๆ 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) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

-กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

-กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ให้ใช้แนวทางข้างต้น

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

จุลชีพ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*

พืช เช่น Oryza sativa หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*

สัตว์ เช่น Spiella inermis หรือพิมพ์ตัวเอน *Spiella inermis*

**การตรวจแก้ไข**

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้ว ให้ผู้เขียนเพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

## จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 เดือนกันยายน 2547 เป็นอีกฉบับที่ต้องออกล่าช้ากว่ากำหนด ต้องมาออกในเดือนธันวาคม 2547 ทั้งนี้ทั้งนั้นก็เนื่องมาจากปัญหาอุปสรรคนานาประการ อาทิเช่น งานวิจัยของนักวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ มีจำนวนน้อย ไม่เพียงพอที่จะรวบรวมให้เป็นรูปเล่มได้ ทำให้เมื่อถึงเวลาจะต้องออกหนังสือประจำงวดก็ไม่สามารถออกได้ แต่อย่างไรก็ดี กองบรรณาธิการก็ได้พยายามจัดการให้สามารถออกเป็นรูปเล่มให้ได้ เพื่อไม่ให้ขาดตอนของหนังสือในแต่ละปี ถึงแม้ในบางฉบับจะออกล่าช้ามากก็ตาม

กองบรรณาธิการหวังว่าสมาชิกทุกท่านคงให้อภัยต่อคณะผู้จัดทำ และคาดว่าหนังสือเล่มนี้คงจะเป็นประโยชน์ต่อท่านผู้อ่าน และสมาชิกทุกท่านบ้างไม่มากก็น้อย

ขอขอบคุณ

(นายพยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์)

บรรณาธิการ

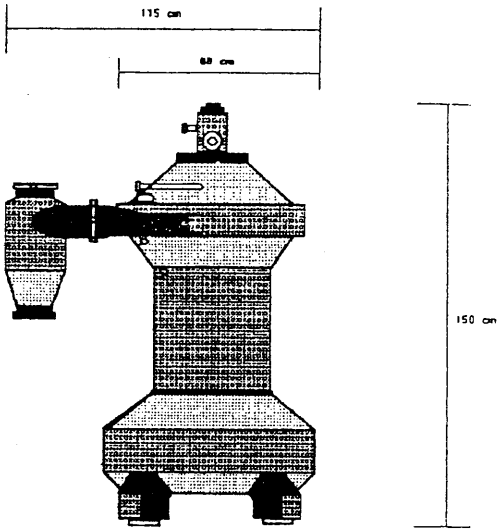
# บริษัท ขอสนับสนุนวิชาการงานวารสารชีวผลิตภัณฑ์

**เป็นตัวแทนเครื่อง Centrifuge และ Ultrafiltration จากยุโรป**

HIGH SPEED CONTINUOUS CENTRIFUGE
ยี่ห้อ **ROBATEL**

CENTRIFUGE BLOW
ยี่ห้อ **ROUSSELET**

ULTRAFILTRATION & CONCENTRATION
ยี่ห้อ *TECH-SEP*




**ROBATEL CHY 1400**

พร้อมให้บริการและจัดจำหน่าย Eqipment ในระบบ Process อุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ
รับบริการจัดหา Sparepart และซ่อมเครื่องมือทุกประเภท
นำเข้าผลิตภัณฑ์ สารเคมี , เครื่องแก้ว และ อื่นๆ


N & A COMMERCIAL CO., LTD.

**บริษัท เอ็น แอนด์ เอ คอมเมอร์เชียล จำกัด**

87/116 เทศบาลสงเคราะห์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900

**โทร. (02) 954-4610-13 แฟก. (662) 591-4033**


NATURAL WHITE TRACING PAPER. SIZE A4. WT SUB. 90-95 gm² ORIGIN OF GERMANY

# ผลของการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมต่อเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต ในการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยที่อุณหภูมิ 4°ซ.

วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์[1] จาตุรนต์ พลราช[1]

## บทคัดย่อ

ในขบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยใช้เวลาประมาณ 20 วัน เริ่มตั้งแต่การเพาะ seed เซลล์ในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 500 มิลลิลิตร, 2 ลิตร, 5 ลิตร และถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 40 ลิตร, 90 ลิตร, 300 ลิตร, 2,000 ลิตร จนถึง 4,000 ลิตร บางครั้งอาจมีปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียหรือเซลล์เจริญเติบโตไม่ดี ดังนั้นการเก็บรักษาเซลล์ไว้ที่ถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 300 ลิตรที่อุณหภูมิ 4°ซ. สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงต่อแทนการเริ่มต้นจาก seed เซลล์ใหม่ทุกครั้ง สามารถประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการเก็บรักษาเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ปริมาณ $2.5 \times 10^6$ เซลล์/มล. ในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 300 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ. พบว่าการเก็บรักษาเซลล์ในถังที่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมจะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตสูงกว่าถังที่ไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมในทุกช่วงเวลาของการทดลอง โดยการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นาน 40 วัน และ 20 วัน ในกรณีที่ต้องการเพาะขยายเซลล์ต่อในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 2,000 ลิตร และ 4,000 ลิตร ตามลำดับ โดยยังมีปริมาณเซลล์มีชีวิตเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อได้

**คำสำคัญ** : การเปลี่ยนถ่ายมีเดียม, เซลล์มีชีวิต, การเก็บรักษา, เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย

---

[1]กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## บทนำ

ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ โดยวิธี suspension cell culture (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1986) โดยนำ seed เซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80°ซ. มาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 500 มล. เพาะขยายไปยังขวด Woulff ขนาด 2 ลิตร และ 5 ลิตร จากนั้นจึงเพาะขยายไปยังถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 40 ลิตร, 90 ลิตร, 300 ลิตร, 2,000 ลิตร ไปจนถึง 4,000 ลิตร จึงเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อผลิตเป็นแอนติเจนสำหรับผสมเป็นวัคซีนต่อไป ขบวนการนี้ต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ seed เซลล์มายังถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 4,000 ลิตร นาน 20 วัน หากมีปัญหาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่นการปนเปื้อนแบคทีเรีย หรือเซลล์เจริญเติบโตไม่ดีจะต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงเซลล์ขึ้นมาใหม่เป็นเวลานาน ทำให้ขบวนการผลิตไวรัสหยุดชะงัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเก็บเซลล์ไว้เพื่อนำไปเพาะขยายในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 4,000 ลิตร ซึ่งเป็นถัง ที่ใช้เพาะขยายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการเก็บเซลล์ในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 300 ลิตร น่าจะมีความเหมาะสม เนื่องจากสามารถนำเซลล์ไปเพาะขยายต่อในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 2,000 ลิตร หรือ 4,000 ลิตรได้ทันที ทำให้ประหยัดเวลาได้ 16-18 วัน และไม่ต้องเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเริ่มต้นจาก seed เซลล์ทุกครั้ง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์มีชีวิต หลังจากเปลี่ยนถ่ายและไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมภายหลังการเก็บรักษาในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 300 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เพื่อปรับปรุงขบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ในขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์ให้มีความสะดวกและต่อเนื่อง

## อุปกรณ์และวิธีการ

**เซลล์**

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากไตของตัวอ่อนหนู Hamster (Nardelli and Panina, 1976)

**มีเดียม**

5% calf serum[1] ใน GMS[2] สำเร็จรูป

---

[1]Biotec®, USA-Lot no. B00546

[2]Moregate®, Australia-Lot no. 297001

**การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเฟอร์เมนเตอร์และการเก็บตัวอย่าง**

อุ่น seed เซลล์ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ. นำมาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 500 มล. แล้วเพาะขยายไปยังขวด Woulff ขนาด 2 ลิตร และ 5 ลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ. โดยให้อากาศ 0.5-1.0 ลิตร/นาที ปั่นด้วยความเร็ว 400 รอบ/นาที เพาะขยายเซลล์ไปยังถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 40 ลิตร และ 90 ลิตร ตามลำดับ โดย pH ของมีเดียมตั้งต้นเท่ากับ 7.2 ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ. ให้อากาศ 0.5-1.0 ลิตร/นาที ปั่นด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณเซลล์ $2.5x10^6$ เซลล์/มล. จึงนำเซลล์ 60 ลิตร เพาะเลี้ยงในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 300 ลิตร โดยเติมมีเดียม 240 ลิตร รวมเป็นปริมาตรทั้งสิ้น 300 ลิตร โดย pH ของ มีเดียมตั้งต้นเท่ากับ 7.2 ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ. ให้อากาศ 5 ลิตร/นาที ปั่นด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เพาะเลี้ยง 1 วัน จะได้ปริมาณเซลล์ $1.0 \times 10^6$ เซลล์/มล. จึงแบ่งเซลล์ 150 ลิตร ไปเพาะเลี้ยงในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 300 ลิตร อีกถังหนึ่ง เติมมีเดียมอีก 150 ลิตร ลงในถังเฟอร์เมนเตอร์ทั้ง 2 ถัง ทำให้มีเซลล์เริ่มต้น $0.5 \times 10^6$ เซลล์/มล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน จะได้ปริมาณเซลล์ $2.5 \times 10^6$ เซลล์/มล. แล้วลดอุณหภูมิภายในถังเฟอร์เมนเตอร์ทั้ง 2 ถัง ลงมาที่ 4°ซ. โดยถังที่ 1 ปั่นด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที (ตลอดระยะเวลาการทดลอง) เก็บตัวอย่าง 150 มล. นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer[3] ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นเก็บตัวอย่างตามวิธีเดิมทุก ๆ 5 วัน จนครบ 40 วัน ส่วนถังที่ 2 หยุดปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์เป็นเวลา 2 วัน แล้วถ่ายมีเดียมเก่าออกจำนวน 250 ลิตร คิดเป็น 83.33% ของปริมาตรทั้งหมด เติมมีเดียมใหม่ลงไปแทน ปั่นผสมด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับถังที่ 1 รวบรวมข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

**ผล**

จำนวนเซลล์มีชีวิตของ $BHK_{21}C_{13}$ ในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 300 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ทั้ง 2 ถัง ลดลงตามระยะเวลาการเก็บ แต่ในถังที่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมในปริมาตร 250 ลิตร มีอัตราการลดลงต่ำกว่าในถังที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียม (Figure 1) โดยในถังที่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตสูงกว่าในถังที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมในทุกช่วงเวลา (Table 1)

---

[3]BOECO®, Germany

**Figure 1**: Comparison of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell number after storage at 4°C with and without medium change

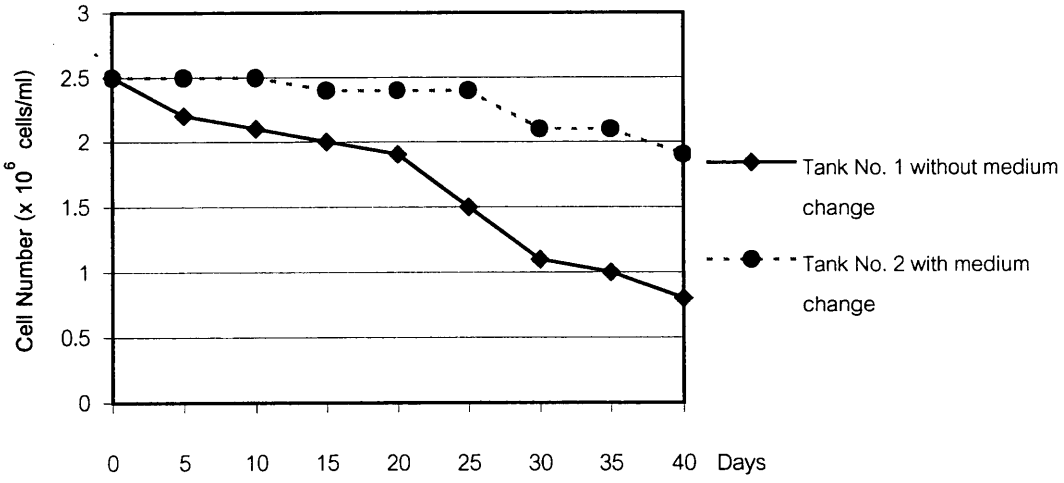



**Table 1**: Comparison of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell number after storage at 4°C with and without medium change

| Day | Tank No. 1 | | Tank No. 2 | |
|---|---|---|---|---|
| | Viable cells ($\times 10^6$ cells/ml) | % Viable cells | Viable cells ($\times 10^6$ cells/ml) | % Viable cells |
| 0 | 2.5 | 100 | 2.5 | 100 |
| 5 | 2.2 | 88 | 2.5 | 100 |
| 10 | 2.1 | 84 | 2.5 | 100 |
| 15 | 2.0 | 80 | 2.4 | 96 |
| 20 | 1.9 | 76 | 2.4 | 96 |
| 25 | 1.5 | 60 | 2.4 | 96 |
| 30 | 1.1 | 44 | 2.1 | 84 |
| 35 | 1.0 | 40 | 2.1 | 84 |
| 40 | 0.8 | 32 | 1.9 | 76 |

Tank No. 1 Without medium change (n = 4)

Tank No. 2 With medium change (n = 4)

## วิจารณ์

จำนวนเซลล์มีชีวิต $BHK_{21}C_{13}$ ในถังที่มีการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมปริมาตร 250 ลิตร มากกว่าในถังที่ไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมที่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่เท่ากัน เนื่องจากของเสียต่าง ๆ เช่น lactic acid และ $CO_2$ ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ และมีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ได้ถูกกำจัดออกไปบางส่วน โดย $CO_2$ ทำให้มีไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีไฮโดรเจนอิออนปริมาณมากในมีเดียม ทำให้ pH ลดลงเหลือ 6.6-6.9 ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ส่วนมีเดียมใหม่มี pH ประมาณ 7.2 ซึ่งเป็น pH ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (พยนต์ และเชิงชาย, 2534) น่าจะเหมาะสมต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ นอกจากนี้ในมีเดียมใหม่มีสารอาหารและซีรั่มใหม่ ซึ่งซีรั่มนี้มีผลช่วยในการมีชีวิตอยู่ของเซลล์เพาะเลี้ยง (Maurer, 1992) การเพาะเลี้ยงเซลล์จากถังเฟอร์เมนเตอร์ 300 ลิตร เพื่อเพาะขยายเซลล์ไปยังถังเฟอร์เมนเตอร์ 2,000 และ 4,000 ลิตร ต้องการเซลล์ตั้งต้นที่ $1.67 \times 10^6$ เซลล์/มล. และ $2.22 \times 10^6$ เซลล์/มล.ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองนี้พบว่าสามารถเก็บรักษาเซลล์ที่ 4°ซ. ในถังที่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมได้นาน 40 วัน และ 25 วัน ตามลำดับ และในถังที่ไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมได้นาน 20 วัน และ 5 วัน ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของเซลล์ในการเจริญเติบโต และคุณสมบัติของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

## สรุป

การเก็บรักษาเซลล์ในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาดความจุ 300 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ. หากเปลี่ยนถ่ายมีเดียมสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานกว่าไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียม โดยการเปลี่ยนถ่ายมีเดียมสามารถเก็บรักษาได้นาน 40 วัน และไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมสามารถเก็บรักษาได้นานเพียง 20 วัน ในกรณีที่ต้องการเพาะขยายเซลล์ไปยังถังขนาดความจุ 2,000 ลิตร แต่ในกรณีที่ต้องการเพาะขยายเซลล์ไปยังถังขนาดความจุ 4,000 ลิตร การเปลี่ยนถ่ายมีเดียมสามารถเก็บรักษาได้นาน 25 วัน ส่วนไม่เปลี่ยนถ่ายมีเดียมสามารถเก็บรักษาได้นานไม่เกิน 5 วัน

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ที่ช่วยให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขต้นฉบับ

## เอกสารอ้างอิง

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ และเชิงชาย จันทรัศมี 2534 การเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบซัสเปนชั่นด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ 25(2): 200-205.

Maurer, H.R. 1992. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In : Animal cell culture, A practical approach 2nd ed., Freshney, R.I. ed. Oxford University Press. New York. p.14-45.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, 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.

Nardelli, L. and Panina, G.F. 1976. The use of suspension cultures for FMD vaccine production. Criteria for the evalution of cells, virus and vaccine. Develop. Biol. Standard. 35 : 9-25.

# Effect of Medium Change to Percentage of Viable $BHK_{21}C_{13}$ Suspension Cells Stored at 4°C

Worapong Srivilirit[1] Jaturon Polrach[1]

## Abstract

Large scale cultivation of $BHK_{21}C_{13}$ cells for FMDV production takes about 20 days starting from growing seed cells in a 500-ml culture glass bottle to 2 L and 5 L Woulff bottle, then 40 L, 90 L, 300 L, 2,000 L and 4,000 L fermentors. Thus storage of $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells in a 300-L fermentor at 4°C about $2.5 \times 10^6$ cells/ml would reduce the re-cultivation time in case bacterial contamination or poor cell growth problem occurs. In this study change of the old medium helped sustain the viability of the stored suspension cells. To maintain enough viable cell number required for cultivation in 2,000 L and 4,000 L fermentors, the suspension cells can be kept up to 40 and 20 days, respectively.

**Key words** : medium change, viable cell, storage , $BHK_{21}$ $C_{13}$ suspension cells

---

[1]Veterinary Biologics Factory Sub-division, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

# Leading in the chemical, instruments and supplies

CRITERION

Dehydrated Culture Media

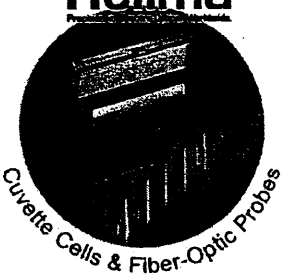
VWR INTERNATIONAL BDH

Analytical Reagents & Apparatus

Whatman®

Filtration and Life Science Products

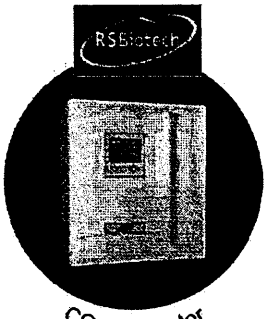
Hellma®



Cuvette Cells & Fiber-Optic Probes

NALGENE®

Plasticware



$CO_2$ Incubator

ELGA

Water Purifier

KUBOTA

Centrifuges

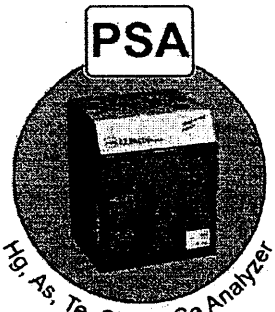
CHINA

Glassware & Microscope

AES

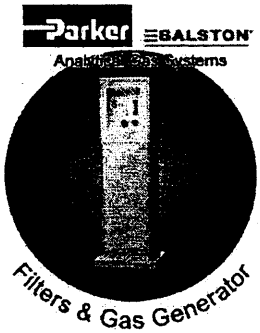
Microbiological Products

PSA



Hg, As, Te, Sb, Bi, Se Analyzer

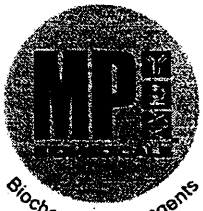
Parker BALSTON



Filters & Gas Generator

FASTER

Safety Cabinet

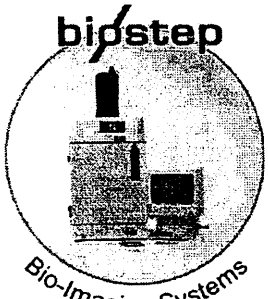


Biochemical &Reagents

SECOMAM

Spectrophotometer

biostep



Bio-Imaging Systems

KERN

Weighing Balances

**Bang Trading 1992 Co.,Ltd.**
4th Floor, V.A.T.Building, 999/99 Rama 9 Rd., Suanluang, Bangkok 10250 Thailand
TEL: (662) 718-3333, FAX: (662) 718-3962 (LCA), 718-3577 (SIS)
E-mail: lca@bangtrading.com, sis@bangtrading.com URL: www.bangtrading.com

# ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่น และปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

นิตยา รักศรี[1] ธนรัตน์ จานุกิจ[1] จันทร์ทิพย์ แสงทอง[1]

## บทคัดย่อ

ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นและปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้ Petroff Hausser bacteria counter นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวัดความขุ่น (optical density, OD) วัคซีน ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณเชื้อที่นับได้ พบว่า ปริมาณเชื้อในตัวอย่างวัคซีนมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความขุ่นที่วัดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ปริมาณเชื้อที่นับได้มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ $7.08 \times 10^9$ cells/ml ความขุ่นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.47 กราฟนี้สามารถนำไปใช้ประมาณจำนวนเชื้อในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ได้ โดยนำค่าความขุ่นที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

**คำสำคัญ :** ความขุ่น, ปริมาณเชื้อ, วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## บทนำ

วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ (fowl cholera vaccine) ซึ่งผลิตโดยกรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนแบคทีเรียเชื้อตาย ที่เตรียมจากเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 วิธีการผลิตตลอดจนการปรับมาตรฐานเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อตามที่กำหนดของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ เป็นไปตามวิธีของ Office International des Epizooties (OIE) ปี 2000 ในขบวนการผลิตวัคซีนที่มีคุณภาพ ปริมาณเชื้อหรือแอนติเจนของวัคซีนแต่ละชุดต้องเท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน เนื่องจากปริมาณแอนติเจนมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรค ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนเชื้อเป็น (Layton and Sandhy, 1984) หรือวัคซีนเชื้อตาย (Layton, 1984) การปรับมาตรฐานวัคซีนแบคทีเรียเชื้อตาย วิธีใช้ค่าน้ำหนักแห้งของวัคซีนเป็นวิธีหนึ่งที่เชื่อถือได้และเป็นที่ยอมรับทั่วไปในการผลิตวัคซีน (Bain et al., 1982) ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ด้วยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ ซึ่งสามารถผลิตเชื้อได้จำนวนมาก การปรับมาตรฐานวัคซีนแบคทีเรียเชื้อตาย เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อตามที่กำหนด ใช้วิธีวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ค่า OD ที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกแต่เป็นวิธีการวัดโดยทางอ้อม (วัฒนาลัย และสรวง, 2536) ไม่สามารถทราบปริมาณเชื้อที่แน่นอนได้ ปัจจุบันโรงงานผลิตชีวภัณฑ์ต้องเข้าสู่ระบบมาตรฐาน good manufacturing practice (GMP) การผลิตของชีวภัณฑ์ทุกชนิดต้องกำหนดปริมาณเชื้อเพื่อเป็นมาตรฐานการผลิตของชีวภัณฑ์แต่ละชนิด วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่กำหนดปริมาณเชื้อหลังปรับมาตรฐานเป็นวัคซีนเท่ากับ $10^9$ cells/ml ซึ่งเท่ากับ $2PD_{50}$ (รัชนี และคณะ, 2535) และผลความคุ้มโรคดี ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD และปริมาณเชื้อหลังปรับมาตรฐานเป็นวัคซีนแล้ว โดยวิธี direct count ใช้อุปกรณ์จำเพาะสำหรับนับเชื้อแบคทีเรีย (bacterial counting chamber) ชนิด Petroff Hausser bacteria counter นับเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopic count) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD และปริมาณเชื้อที่นับได้ เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานหาปริมาณเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ที่ผ่านการทดสอบคุณภาพวัคซีน ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 30 ตัวอย่าง

2. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)[1]
3. หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร
4. ไมโครไปเปต ขนาด 10 และ 1000 ไมโครลิตร และ ไมโครไปเปตทิป
5. สไลด์นับเซลล์แบคทีเรียชนิด Petroff Hausser bacteria counter เป็นสไลด์ที่มีความหนา ตรงส่วนกลางสไลด์เรียกว่า platform ใช้สำหรับนับเชื้อแบคทีเรีย ตารางที่อยู่บน platform เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสยาวด้านละ 3 มม. แต่ละช่องยาวด้านละ 1 มม. ภายในสี่เหลี่ยมนี้แบ่งออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสย่อยๆ อีก 25 ช่อง สังเกตได้โดยแต่ละด้านประกอบด้วยเส้นคู่ แต่ละช่องของสี่เหลี่ยม 25 ช่อง ยาวด้านละ 1/5 มม. ความลึกเท่ากับ 1/50 มม.
6. กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast
8. เครื่องนับจำนวน
9. เครื่อง centrifuge[2]

**สารเคมี**

normal saline solution (NSS)

**วิธีการ**

**การวัดค่าความขุ่น (optical density)**

แบ่งตัวอย่างวัคซีนใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นแยกเชื้อและ supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 g นำ supernatant มาเจือจางตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ให้มีปริมาณเป็น 1/3 เท่า วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ($OD_{540}$) ใช้ supernatant เป็น blank

**การนับปริมาณเชื้อโดยวิธี total count**

เจือจางตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ด้วย NSS ให้มีปริมาณเป็น 1/40 เท่า ดูดตัวอย่างวัคซีนที่เจือจางแล้วด้วยไมโครไปเปต 5 ไมโครลิตร โดยให้ปลายทิปทำมุม $35^{\circ}$ กับสไลด์ Petroff Hausser bacteria counter ที่มี cover slip วางอยู่กลาง counting chamber ค่อยๆ ปล่อยตัวอย่างที่เจือจางไหลเข้าไปใน chamber ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง ตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิด Phase contrast โดยใช้กำลังขยายต่ำ (X10) เพื่อหาตารางที่จะนับ เริ่มนับด้วยกำลังขยายสูง (X40) นับเชื้อใน 5 ช่องจาก 25 ช่องเล็กของสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ที่อยู่ตรงกลาง ช่อง 5 ช่อง

---

[1] Biowave, model S2100, UK [2]Sigma, model 3K18, Germany

ที่ใช้นับจะเลือกใช้ช่วงที่อยู่ในเส้นทะแยงมุมด้านในด้านหนึ่ง เมื่อนับครบ 5 ช่องแล้ว นำปริมาณเชื้อทั้ง 5 ช่อง มารวมกัน แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร

**การคำนวณปริมาณเชื้อ**

คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้ : ปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่ตรวจ เท่ากับ 25X x $10^4$ x dilution factor มีหน่วยเป็น cells/ml ขณะที่ X = จำนวนเชื้อที่นับได้ใน 5 ช่อง ปริมาตร 5 ช่องที่ใช้นับ = (1/5 x 1/5 x 1/50) x 5 $mm^3$ = 1/250 $mm^3$

**วิธีวิเคราะห์**

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD และปริมาณเชื้อที่นับได้และคำนวณค่า standard deviation วิเคราะห์ความถูกต้อง และความแม่นยำของวิธี

## ผล

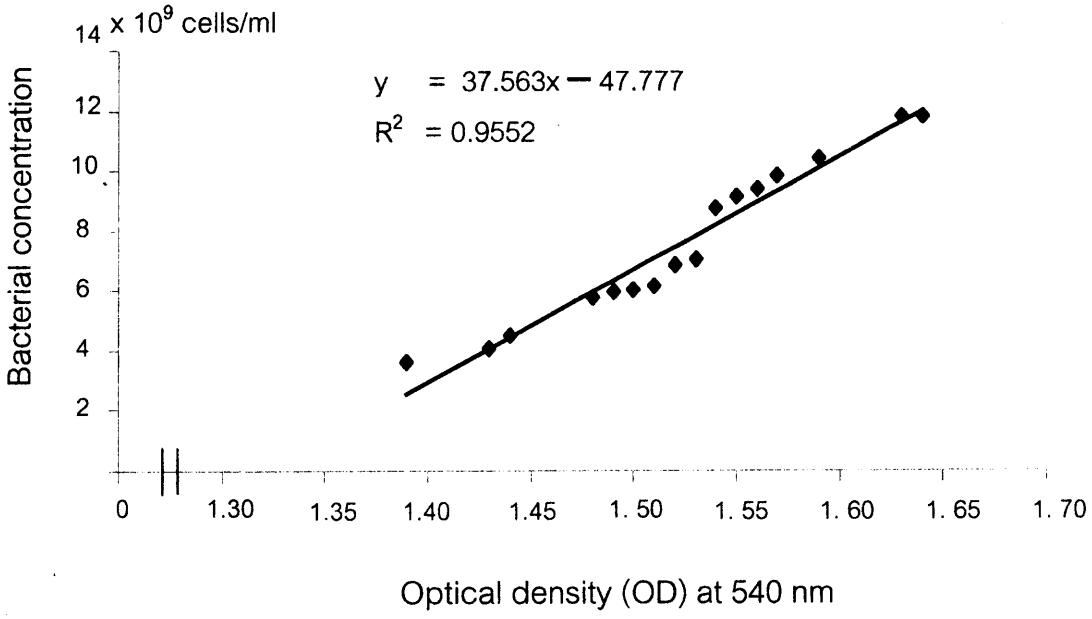
ผลการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณเชื้อหลังปรับมาตรฐานของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ด้วยวิธี total count โดยใช้ตัวอย่างวัคซีนจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าค่าความขุ่นของวัคซีน มีค่า 1.34 -1.59 คิดเป็นค่าเฉลี่ย 1.47 $\pm$ 0.12 ปริมาณเชื้อหลังปรับมาตรฐานของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ มีค่า 3.58x$10^9$ - 11.81x$10^9$ cells/ml คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7.08 $\pm$ 4.60 x$10^9$ cells/ml ตามตารางที่ 1 และได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นและปริมาณเชื้อดังภาพที่ 1

**ตารางที่ 1**: แสดงค่าความขุ่นที่ 540 นาโนเมตร ($OD_{540}$) และปริมาณเชื้อหลังปรับมาตรฐานของตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

| ตัวอย่างที่ | ค่าความขุ่น ($OD_{540}$) | ปริมาณเชื้อ (cells/ml) |
|---|---|---|
| 1 | 1.39 | 4.21 x $10^9$ |
| 2 | 1.39 | 4.47 x $10^9$ |
| 3 | 1.58 | 11.80 x $10^9$ |
| 4 | 1.44 | 5.94 x $10^9$ |
| 5 | 1.44 | 6.00 x $10^9$ |
| 6 | 1.52 | 9.85 x $10^9$ |
| 7 | 1.46 | 6.07 x $10^9$ |

**ตารางที่** 1: (ต่อ)

| ตัวอย่างที่ | ค่าความขุ่น ($OD_{540}$) | ปริมาณเชื้อ (cells/ml) |
|---|---|---|
| 8 | 1.46 | $6.16 \times 10^9$ |
| 9 | 1.52 | $10.25 \times 10^9$ |
| 10 | 1.59 | $11.81 \times 10^9$ |
| 11 | 1.47 | $6.71 \times 10^9$ |
| 12 | 1.47 | $6.81 \times 10^9$ |
| 13 | 1.43 | $5.29 \times 10^9$ |
| 14 | 1.49 | $7.64 \times 10^9$ |
| 15 | 1.49 | $8.74 \times 10^9$ |
| 16 | 1.51 | $9.38 \times 10^9$ |
| 17 | 1.43 | $5.30 \times 10^9$ |
| 19 | 1.50 | $8.90 \times 10^9$ |
| 20 | 1.42 | $5.26 \times 10^9$ |
| 21 | 1.54 | $10.36 \times 10^9$ |
| 22 | 1.49 | $7.08 \times 10^9$ |
| 23 | 1.49 | $7.41 \times 10^9$ |
| 24 | 1.38 | $4.03 \times 10^9$ |
| 25 | 1.34 | $3.58 \times 10^9$ |
| 26 | 1.34 | $3.70 \times 10^9$ |
| 27 | 1.45 | $6.00 \times 10^9$ |
| 28 | 1.45 | $6.03 \times 10^9$ |
| 29 | 1.48 | $6.82 \times 10^9$ |
| 30 | 1.48 | $7.05 \times 10^9$ |
| Mean $\pm$ 2SD | $1.47 \pm 0.12$ | $7.08 \times 10^9 \pm 4.60 \times 10^9$ |




**รูปที่** 1: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่น (optical density, OD) และปริมาณเชื้อในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

## วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดลองเมื่อนำค่าความขุ่นและปริมาณเชื้อที่นับได้มาทดสอบค่าทางสถิติ พบว่ามีค่าการกระจายตัวอยู่ในเกณฑ์ $\overline{X} \pm 2SD$ ตามหลักสถิติถือว่า 95% ของค่าที่ตรวจพบนั้นอยู่ในเกณฑ์และเป็นที่ยอมรับ (ทัสสนี และเติมศรี, 2541) ตัวอย่างวัคซีน 30 ตัวอย่าง ที่นำมาศึกษาได้ผ่านการทดสอบคุณภาพและความคุ้มโรคของวัคซีน ตามตารางที่1 พบว่าปริมาณเชื้อในตัวอย่างวัคซีนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความขุ่น เมื่อความขุ่นมากขึ้นปริมาณเชื้อมากขึ้นตาม ค่าเฉลี่ยความขุ่นของวัคซีนเท่ากับ 1.47 อยู่ในช่วงที่กำหนดของห้องปฏิบัติการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ปริมาณเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $7.08 \times 10^9$ cells/ml จะเห็นว่าวัคซีนที่ผ่านการทดสอบความคุ้มโรคมีค่าความขุ่นระหว่าง 1.34-1.59 ปริมาณเชื้อเท่ากับ $3.58 \times 10^9$-$11.81 \times 10^9$ cells/ml ซึ่งสอดคล้องตาม รายงานของรัชนีและคณะ (2535) ปริมาณเชื้อในวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรค 90% มีค่ามากกว่า $3.25 \times 10^9$ cells/ml โดยการเปรียบเทียบค่าความขุ่นของวัคซีนที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $OD_{540}$ และค่า viable count ที่สร้างขึ้นจากการเปรียบเทียบค่าทั้งสองของเชื้อ *P. multocida* ภายหลังจากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ 37°C เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งไม่ได้เป็นปริมาณเชื้อทั้งหมด เพราะนับได้เฉพาะเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้น จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นและปริมาณเชื้อในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่จากการทำ total count จะเห็นว่า $R^2 = 0.9552$ มีค่าเข้า

ใกล้ 1 ซึ่งถือว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการ Y = 37.563X – 47.777 ในการประมาณหรือคาดคะเนจำนวนเชื้อในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ได้จากค่า $OD_{540}$ ที่วัดได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อขบวนการผลิตทำให้ได้วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ที่มีปริมาณเชื้อเป็นไปตามมาตรฐาน

## เอกสารอ้างอิง


รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และนิเทศ เลิศลิมชลาลัย 2535 การหาขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(2): 18-23.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ 2536 คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ " เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม " เล่ม 1 สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ หน้า 1.7-1.13.

ทัสสนี นุชประยูร และเติมศรี ชำนิจารกิจ 2541 สถิติในงานวิจัยทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 258-293.

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

Layton, H. W. 1984. Efficacy of broth-grown *Pasteurella multocida* bacterins in ducking. Avian Dis. 28: 1086-1095.

Layton, H. W. and Sandhy, T. S. 1984. Protection of duckings with a broth grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Dis. 28: 716-726.

Office International des Epizooties. 2000. Fowl Cholera. In : Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Fourth Edition. Office International des Epizooties, Paris, France. p. 740-746.

# The Relationship between Optical Density and Bacterial Total Count in Fowl Cholera Vaccine

Nittaya Rugsri[1] Thanarat janukit[1] Janthip Sangthong[1]

## Abstract

The purpose of this study is to find the relationship between optical density (OD) and bacterial total count of fowl cholera vaccine (FC). Thirty samples of FC vaccine were tested for the number of total bacteria and OD value at 540 nm. Petroff Hausser bacteria counter method was employed to examine the bacterial total count and a spectrophotometer was used to test the OD. The results were evaluated by constructing the scatter diagram and applying the statistical methods. The average number of bacterial total count was $7.08 \times 10^9$ cells/ml and the OD value was 1.47. The finding indicated that the number of bacterial total count in FC vaccine significantly related to the OD value of fowl cholera vaccine ($P>0.05$). Therefore, the graph produced from this study can be used as a standard graph to estimate the number of bacterial total count from the OD of FC vaccine.

**Key words :** optical density, bacterial total count, fowl cholera vaccine

---

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

# เปรียบเทียบการใช้ Van Bekkum Medium ทดแทน Growth Media Suspension สำหรับเป็น maintenance medium ในกระบวนการ Virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์[1] จาตุรนต์ พลราช[1]

## บทคัดย่อ

การทดลองเปรียบเทียบการใช้ Van Bekkum Medium (VBM) และ Growth Media Suspension (GMS) สำหรับเป็น maintenance medium ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในกระบวนการ virus culture ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ พบว่าเกิด CPE เท่ากับ Mean ± SD 91.18 ± 2.83% ปริมาณ 146S particle เท่ากับ Mean ± SD 3.19 ± 0.46 µg/ml โดยการใช้ VBM และเกิด CPE เท่ากับ Mean ± SD 93.40 ± 1.80% ปริมาณ 146S particle เท่ากับ Mean ± SD 3.15 ± 0.37 µg/ml โดยการใช้ GMS จากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$) ดังนั้นจึงสามารถใช้ VBM ทดแทน GMS สำหรับเป็น maintenance medium ในกระบวนการ virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ได้ ซึ่งจากผลการทดลองนี้จะสามารถปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ในกรณีที่ใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในขั้นตอนกระบวนการผลิตไวรัส เนื่องจาก VBM สามารถลดการสูญเสียจากการอุดตันของไส้กรองมีเดียมขนาด 0.2 ไมครอนได้เป็นจำนวนมาก รวมทั้งสามารถลดเวลาในการกรองและการเตรียมผสมมีเดียมลงได้ อีกทั้งสามารถลดต้นทุนการผลิตลงเพราะ VBM มีราคาถูกกว่า GMS นอกจากนี้การใช้ VBM จะทำให้มีโอกาสลดโปรตีนที่ไม่ต้องการในวัคซีนได้ เพราะ VBM มีส่วนประกอบของโปรตีนน้อยชนิดกว่า GMS

**คำสำคัญ** : มีเดียม Van Bekkum Medium, มีเดียม Growth Media Suspension, maintenance medium, เซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ suspension, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ.

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## บทนำ

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี suspension cell culture (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1982) ซึ่งวิธีเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจะใช้ได้กับเซลล์ชนิดที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในขณะที่ลอยตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ราตรี, 2533) ในปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้เซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ และเซลล์ $IFFA_3$ (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1982) โดยกระบวนการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ใช้น้ำยา Growth Media Suspension ที่มีซีรั่ม 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น growth medium ในขั้นตอน cell culture (สุรพล และวรพงษ์, 2543) สำหรับกระบวนการผลิตไวรัสที่ใช้เซลล์ $IFFA_3$ จะใช้มีเดียม Basal Medium Eagle ที่มีซีรั่ม 5 เปอร์เซ็นต์เป็น Growth medium ในขั้นตอน cell culture (สายพิณ และสินสมุทร, 2542) หลังจากได้ปริมาณเซลล์พอเพียงจากการเพาะเลี้ยงแล้ว จึงเปลี่ยนมีเดียมจาก growth medium เป็น maintenance medium ซึ่งเป็นมีเดียมที่มีสารโปรตีนเสริมน้อยมาก เพื่อเลี้ยงเซลล์ให้คงสภาพมีชีวิตอยู่โดยไม่มีการเร่งการเพิ่มจำนวนอีกเพื่อจะ infect ไวรัส (ราตรี, 2533) หลังจาก infect ไวรัสในเซลล์ ไวรัสจะเกิดขบวนการ multiplication ในเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส หลังจากนั้นไวรัสจะ release ออกจากเซลล์ที่ถูก infect ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเซลล์เรียกว่า cytopathic effect (CPE) (Mohanty and Dutta, 1981) สำหรับคุณสมบัติของ maintenance medium จะต้องมีน้ำและ inorganic ions พอเพียงสำหรับ metabolism ที่จำเป็นพื้นฐานของเซลล์และมี buffers เพื่อคงสภาพ physiological pH ranges นอกจากนี้ต้องเป็นสารละลายที่รักษาสภาพ tonicity ของเซลล์ไม่ให้ผิดปกติได้ (Parker, 1950) ซึ่งในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจะใช้ GMS เป็น maintenance medium สำหรับเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1982) และใช้ VBM เป็น maintenance medium สำหรับเซลล์ $IFFA_3$ (Rhone merieux, section 3, 1988) ในการปฏิบัติงาน งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการใช้มีเดียม VBM และ GMS ในกระบวนการ virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ โดยวัดผลการเกิด CPE และปริมาณ 146S particle ซึ่งเป็นอนุภาคสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี sucrose density gradient (พิศมัย และคณะ, 2535) ผลการทดลองที่ได้จะนำมาปรับปรุงและพัฒนาในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

Seed FMD virus type O passage ที่ 8 จากตู้เก็บ –80°C นำมาละลายใน water bath ที่ 37°C

### ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension passage ที่ 35 จากถังเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 4°C ในกระบวนการ cell culture

### ชนิด maintenance medium

1. มีเดียม Van Bekkum Medium (VBM) (Rhone merieux, section 1,1988)
2. มีเดียม Growth Media Suspension (GMS) (สุรพล และวรพงษ์, 2543)

### กระบวนการ virus culture

ตกตะกอนเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัชรี และคณะ, 2539) ถ่ายน้ำยาเพาะเลี้ยงออกแล้วแบ่งเซลล์ออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกเติมน้ำยา VBM และกลุ่มที่สองเติมน้ำยา GMS โดยคำนวณให้เซลล์มีความเข้มข้น 3.0 x $10^6$ cell/ml และนำเซลล์ทั้งสองกลุ่มไปบรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ suspension ขนาด 10 ลิตร โดยเซลล์แต่ละกลุ่มบรรจุจำนวน 11 ขวด ๆ ละ 9 ลิตร ละลาย seed FMD virus type O จากตู้เก็บ –80°C ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C และเติม seed virus ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์เป็นน้ำยา VBM จำนวน 10 ขวด และน้ำยา GMS จำนวน 10 ขวด โดยใช้ปริมาณ seed virus เท่ากับ 2.6 µg/ml จำนวน 10 ml ต่อเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ suspension $10^9$ cell เหมือนกันทุกขวด ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมไวรัสใช้เป็นขวดควบคุม (control) กลุ่มละ 1 ขวด นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C ปั่นที่ความเร็วรอบ 500 rpm ใช้ $O_2$ 9 litre/hour โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในแต่ละขวดจำนวน 10 ml ในแต่ละกลุ่มเพื่อตรวจนับ CPE โดยใช้กล้องจุลทรรศน์และสไลด์นับเซลล์ และตรวจวัดหาค่าปริมาณไวรัสโดยวัดปริมาณ 146S particle โดยวิธี sucrose density gradient (พิศมัย และคณะ, 2535) ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้นอีกจำนวน 4 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยแล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม โดยวิธีทางสถิติ the independent-sample *t* test (Grimm, 1993)

## ผล

หลังจากเติม seed FMD virus type O ลงในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ทั้ง 20 ตัวอย่าง แล้ว นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลการทดลองที่เกิดขึ้นพบว่าขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำยา VBM เกิด CPE เฉลี่ยเท่ากับ Mean ± SD 91.18 ± 2.83% และปริมาณ 146S particle เฉลี่ยเท่ากับ Mean ± SD 3.19 ± 0.46 µg/ml ดังตารางที่ 1 ส่วนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้น้ำยา GMS เกิด CPE เฉลี่ยเท่ากับ Mean ± SD 93.40 ± 1.80% และปริมาณ 146S particle เฉลี่ยเท่ากับ Mean ± SD 3.15 ± 0.37 µg/ml ดังตารางที่ 2 ส่วนชุดควบคุมของมีเดียมทั้ง 2 ชนิด ไม่พบการเกิด CPE และไม่พบ 146S particle เมื่อนำค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ใช้มีเดียมทั้ง 2 ชนิด โดยวิธี the independent-sample t test (Grimm, 1993) พบว่าน้ำยา VBM และ GMS เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ suspension ได้ผล CPE และ 146S particle ที่ไม่แตกต่างกัน (P = 0.01)

**ตารางที่** 1: ผล virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่ใช้ VBM เป็น maintenance medium

| ตัวอย่างที่ | เปอร์เซ็นต์ CPE* (%) | ปริมาณอนุภาค 146S** (µg/ml) |
|---|---|---|
| 1 | 88.0 | 3.8 |
| 2 | 91.6 | 2.6 |
| 3 | 94.0 | 2.6 |
| 4 | 92.0 | 3.5 |
| 5 | 96.0 | 3.4 |
| 6 | 86.0 | 3.0 |
| 7 | 92.3 | 3.9 |
| 8 | 90.0 | 3.0 |
| 9 | 91.3 | 2.9 |
| 10 | 90.6 | 3.2 |
| **ค่าเฉลี่ย(Mean ± SD)** | **91.18± 2.83** | **3.19±0.46** |

* เก็บตัวอย่างหลังจากเติม seed virus ในกระบวนการ virus culture ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ปั่นที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วตรวจนับ CPE โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

** เก็บตัวอย่างหลังจากเติม seed virus ในกระบวนการ virus culture ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ปั่นที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดปริมาณ 146S particle โดยวิธี sucrose density gradient

**ตารางที่ 2** : ผล virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่ใช้ GMS เป็น maintenance medium

| ตัวอย่างที่ | เปอร์เซ็นต์ CPE* (%) | ปริมาณอนุภาค 146S (μg/ml)** |
|---|---|---|
| 1 | 94.6 | 3.3 |
| 2 | 94.2 | 3.5 |
| 3 | 96.6 | 2.9 |
| 4 | 95.6 | 3.7 |
| 5 | 93.3 | 2.7 |
| 6 | 91.6 | 2.7 |
| 7 | 92.3 | 2.7 |
| 8 | 93.0 | 3.3 |
| 9 | 91.0 | 3.4 |
| 10 | 92.0 | 3.3 |
| **ค่าเฉลี่ย**(Mean ± SD) | 93.40±1.80 | 3.15±0.37 |

* เก็บตัวอย่างหลังจากเติม seed virus ในกระบวนการ virus culture ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ปั่นที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วตรวจนับ CPE โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

** เก็บตัวอย่างหลังจากเติม seed virus ในกระบวนการ virus culture ในเซลล์ $BHK_{21}$ $C_{13}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ปั่นที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดปริมาณ 146S particle โดยวิธี sucrose density gradient

## วิจารณ์และสรุป

จากการทดลองผลการเปรียบเทียบ CPE และปริมาณ 146S particle ใน VBM และ GMS พบว่ามีค่าเฉลี่ย (mean ± SD) ของ CPE และปริมาณ 146S particle เท่ากับ 91.18 ± 2.83% และ 3.19 ± 0.46 μg/ml ใน VBM ตามลำดับ และเท่ากับ 93.40 ± 1.80% และ 3.15 ± 0.37 μg/ml ใน GMS ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณทางสถิติโดยวิธี the independent-sample t test (Grimm, 1993) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$) แสดงว่าการ infect ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ที่ใช้ VBM เป็น maintenance medium ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ปกติเหมือนกับการใช้ GMS และเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ สามารถคงสภาพใน VBM ได้ เนื่องจากไม่พบเซลล์ตายหรือเซลล์ที่เกิดความผิดปกติอย่างอื่น นอกจากเซลล์ที่เกิด CPE แสดงว่าสามารถใช้ VBM แทน GMS สำหรับเป็น maintenance medium ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ได้ ซึ่งจะทำให้เกิดผลดีคือ สามารถลดการ

สูญเสียไส้กรองมีเดียมขนาด 0.2 ไมครอนได้เป็นจำนวนมาก รวมทั้งสามารถลดเวลาในการกรองมีเดียมลงได้ เนื่องจาก VBM มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า จึงทำให้ VBM มี Flow rate สูงกว่า GMS และทำให้เกิดการเกาะติดของโมเลกุลโปรตีนที่ผิวการกรองของไส้กรองน้อยกว่า GMS โดยปกติการกรอง VBM จะเกิดการอุดตันของไส้กรอง หลังจากเริ่มกรองมีเดียมแล้วประมาณ 3,600 L ขณะที่ GMS เกิดการอุดตันที่ 1,500 L และ VBM มีขั้นตอนการเตรียมน้อยกว่า GMS จึงสามารถลดเวลาการเตรียมมีเดียมลงได้ อีกทั้งสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้เพราะ VBM มีส่วนประกอบของสารเคมีและโปรตีนน้อยกว่า GMS จึงทำให้มีราคาถูกกว่า นอกจากนี้การใช้ VBM จะทำให้มีโอกาสลดโปรตีนที่ไม่ต้องการในวัคซีนลงได้ เพราะ VBM มีส่วนประกอบของโปรตีนน้อยชนิดกว่า GMS ซึ่งการใช้ VBM แทน GMS จะสามารถนำไปปรับปรุงและพัฒนาในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในอนาคตต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

พิศมัย เลียมจรัสกุล เชิงชาย จันทรัศมี และเฉลิมศักดิ์ พิธรัตน์ 2535 การปรับปรุงวิธีหาปริมาณ 140 เอส พาร์ทิเคิ้ลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีซูโครสเดนซิตี้เกรเดี้ยน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1) : 42-52.

ราตรี วงษ์วัชรดำรง 2533 การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทางไวรัสวิทยา ปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 54-76.

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ สุรพล ขุมทรัพย์ และวรากิจ จันทรัศมี 2539 ศึกษาการตกตะกอนของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ Suspension ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6(2) : 26-32.

สายพิณ ขุมทรัพย์ และสินสมุทร นิลฉวี 2542 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูปและมีเดียมที่เตรียมขึ้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9(1-2) : 19-27.

สุรพล ขุมทรัพย์ และวรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ 2543 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยในมีเดียมผงสำเร็จรูป และมีเดียมที่เตรียมขึ้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2) : 9-18.

Grimm, G.L. 1993. Statistical Applications for the Behavioral Sciences. John Wiley & Sons Inc. p. 292-307.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1982. Vaccine and Vaccine Production. Third Country Training Program on Foot and Mouth Disease Control (Group Training Course). February 24 - March 16, Bangkok, Thailand. p. 180-201.

Mohanty, S.B. and Dutta, S.K. 1981. Effect of virus on the host cells. Veterinary virology. Lea & Febiger. Philadelphia. p. 47-59.

Parker, R.C. 1950. Diluting fluids, pH Determinations and Osmotic pressure. Methods of tissue culture 2nd ed. Paul B. & Hoeber Inc. New York. p. 75-86.

Rhone merieux. 1988. Technique for production of foot and mouth disease vaccine. Section 1 : Culture media. (ลิขสิทธิ์) p. 167-170.

Rhone merieux. 1988. Technique for production of foot and mouth disease vaccine. Section 3 : Virus production. (ลิขสิทธิ์) p. 1-25.

# Comparison of Van Bekkum Medium and Growth Media Suspension as maintenance medium for FMD virus type O cultivation in BHK $_{21}C_{13}$ suspension cell

Payont Sinsuwonkwat[1] Jaturon Polrach[1]

## Abstract

Two maintenance media Van Bekkum Medium (VBM) and Growth Media Suspension (GMS) were used for Foot and Mouth Disease (FMD) virus type O culture in cell $BHK_{21}C_{13}$. The culture using VBM had the values (mean ± SD) 91.18 ± 2.83% of CPE and 3.19 ± 0.46 μg/ml of 146S particle, respectively. When GMS was used, the values were (mean ± SD) 93.40 ± 1.80% of CPE and 3.15 ± 0.37 μg/ml of 146S particle, respectively. The difference between both sets of values showed no statistically significant (P = 0.01). Therefore, VBM can be used to substitute GMS for FMD virus type O culturing in $BHK_{21}C_{13}$ cell. There are advantages of using VBM over GMS. First, it minimizes the loss of 0.2 micron filters during filtration process and increases flow rate. Second, production cost is lower because VBM is cheaper. Moreover, VBM contains lower protein component, thus the quantity of unnecessary protein in finished vaccine is decreased.

**Key words :** Van Bekkum Medium, Growth Media Suspension, maintenance medium, $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell, FMD virus type O

---

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

# การเจริญเติบโตของเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

อนันต์ ท้าวเพชร[1] คณิตา ภาสะฐิติ[1]

## บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในขวดเพาะเชื้อจำนวน 50 ขวด และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในเฟอร์เมนเตอร์ ปริมาตร 10 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดความเข้มข้นเป็น Packed cell volume และปริมาณของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณอาหาร และระยะเวลาที่เท่ากัน พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวได้ปริมาณเชื้อที่จะนำไปผลิตวัคซีนมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยที่คุณภาพของวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 วิธียังคงเท่าเทียมกัน

**คำสำคัญ** : *Brucella abortus* strain 19, % PCV, อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง, อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## บทนำ

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนป้องกันโรคแท้งติดต่อในโค-กระบือโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Alton et al.,1988) ตามมาตรฐานของ WHO และOIE แล้วนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคแท้งติดต่อในโค-กระบือ โรคบรูเซลโลซีสในสัตว์เกิดขึ้นกับสัตว์ได้หลายสปีชีย์ ทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียจีนัส Brucella นอกจากนี้โรคดังกล่าวยังมีความสำคัญคือ เป็นโรคติดต่อจากสัตว์ไปสู่คน (zoonosis) เชื้อ *Brucella abortus* strain 19 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง cocco-bacillus ลักษณะโคโลนีโปร่งแสงและจัดเป็น facultative intracellular parasite เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ จึงได้มีความพยายามที่จะป้องกันโรคโดยใช้วัคซีน (Nicoletti, 1990) สำหรับประเทศไทยได้มีมาตรการควบคุมป้องกันและกำจัดโรคนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2499 เป็นต้นมา (มนยา, 2546)

การเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ให้ได้ปริมาณมาก และคุณภาพดี มีปัจจัยหลายประการ ขั้นตอน วิธีการ และเทคนิคเป็นปัจจัยหนึ่งทีทำให้ได้เชื้อปริมาณมากขึ้น แต่ในทางปฏิบัติมีหลายปัจจัยที่เป็นอุปสรรค ปัญหาเรื่องวิธีการในการเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยใช้ Roux bottles ชนิดขวดแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต้องใช้บุคลากรหลายคน และต้องใช้ความชำนาญในการตรวจและคัดแยกกรณีเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการซึ่งอาจเกิดความผิดพลาด และทำให้สูญเสียวัคซีนชุดผลิตนั้น อย่างไรก็ดียังมีทางเลือกอื่นคือการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีข้อดีกว่าในเรื่องใช้บุคลากรน้อยกว่า แต่ได้เชื้อปริมาณมากกว่า

การทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ และคุณภาพวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปพิจารณาเลือกวิธีการผลิตวัคซีนให้เหมาะสม

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ละลาย tryptose[1] 200 กรัม yeast extract[1] 50 กรัม NaCl[2] 50 กรัม dextrose[3]50 กรัม agar[4] 250 กรัม ด้วยน้ำกลั่น10 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 บรรจุลงขวด Roux bottle ขวดละ 200 มล. จำนวน 50 ขวด แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

---

[1]Lab M, UK [2]UNIVAR, Australia [3]BDH, UK [4]Wendtchemie, Germany

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว**

เตรียมเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 14 ลิตร[5] ให้ปราศจากเชื้อก่อนโดยการนึ่งพร้อม antifoam[6] 10 มล. ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วละลายส่วนประกอบต่างๆ คือ tryptose 300 กรัม yeast extract 100 กรัม $Na_2HPO_4$[1] 33 กรัม $NaH_2PO_4$[7] 90 กรัม dextrose 300 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 ลิตรให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.3 แล้วกรองผ่านไส้กรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน

**การเตรียม working seed สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ**

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 จาก seed ในรูปดูดแห้ง (เป็นstrainที่ได้รับการคัดเลือกจาก USDA แล้วว่าไม่จำเป็นต้องใช้ $CO_2$ ในการเพาะเลี้ยง และได้รับการลดคุณสมบัติการก่อโรคมาอย่างเหมาะสม (Alton et al., 1988) โดยการละลายด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 6.3 (Love and Mingle, 1941) แล้วเพาะบน dextrose starch agar 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อใน tryptose broth 20 มล. อีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใน Roux bottle จำนวน 4 ขวด อีก 48 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างเชื้อด้วย PBS pH 6.3 ขวดละ 20 มล. รวมเป็น 80 มล. แบ่ง working seed เพื่อใช้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและชนิดเหลว อย่างละ 40 มล.

**การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง**

นำ working seed จำนวน 40 มล. มาเจือจางด้วย PBS pH 6.3 ปริมาตร 460 มล. แบ่งเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ขวดละ 10 มล. จำนวน 50 ขวด เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วล้างเก็บเชื้อด้วยสเตบิไลเซอร์ (ซึ่งมีส่วนประกอบคือ pancreatic digest of casein[1] 25 กรัม sucrose[1] 50 กรัม sodium glutamate[8] 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการผ่านไส้กรองขนาด 0.2 ไมครอน) ขวดละ 20 มล. นำเชื้อที่ได้จากทั้ง 50 ขวด มารวมกันแล้ววัดปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อที่ได้โดยการปั่นที่ 2,800 g นาน 75 นาที และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ด้วยการเติมสเตบิไลเซอร์

**การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว**

นำ working seed จำนวน 40 มล. เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ปริมาตร 10 ลิตร ด้วยเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 14 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปล่อยให้อากาศเข้าถังปริมาณ 8 ลิตร/นาที ควบคุมอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของ agitator เท่ากับ 300 รอบ/นาที จนครบ 48 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมาถ่ายลงขวดสำหรับปั่นแยกเชื้อขวดละ 800 มล. จำนวน 12 ขวด แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนที่ตกตะกอน ล้างเชื้อออกจากขวดด้วยสเตบิไลเซอร์ขวดละ 300 มล.

---

[5]New Bruswick Scientific, USA [6]Km 72,ShinEtsu, Japan [7]Sigma, USA [8]Merck,Germany

นำเชื้อที่ได้มารวมกัน แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ด้วยการเติมสเตบิไลเซอร์ ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นเท่ากับเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดแข็ง

นำส่วนประกอบของเชื้อและสเตบิไลเซอร์ที่ได้ บรรจุลงในขวดแก้วสำหรับทำแห้งขนาด 12 มล. ปริมาตรขวดละ 2 มล. แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งวัคซีน

**การทดสอบคุณภาพวัคซีน**

นำวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาทดสอบคุณภาพตามมาตรฐาน โดยทดสอบความเป็นสูญญากาศของวัคซีนที่ผ่านการทำแห้งแล้วโดยใช้เครื่อง vacuum leak detector ตรวจทดสอบการละลายของวัคซีน โดยละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลาย 10 มล. วัคซีนต้องละลายหมดภายใน 2-3 นาที ทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีนว่าไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน โดยการย้อมสีแกรม เพาะลงใน tryptose agar slant และ dextrose Andrade's broth ทดสอบหาจำนวนเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่หลังทำแห้งแล้ว ต้องมีจำนวน 40 – 120 x $10^9$ CFU/โด๊ส (Alton et al., 1988) test for dissociation เพื่อตรวจสอบปริมาณ rough colony ซึ่งต้องไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภา โดยหาระดับแอนติบอดี จากซีรั่มหนูตะเภาด้วยวิธี tube agglutination test ซึ่งจะต้องไม่เกิน 1,000 IU/มล. และหาจำนวนเชื้อ *Brucella abortus* ที่พบในม้ามหนูตะเภา ซึ่งจะต้องมีจำนวนไม่เกิน 5 x $10^5$ Brucella organisms/กรัม (OIE, 2000)

## ผล

ผลการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อที่ได้เป็น packed cell volume (%PCV) จากการปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,800 g นาน 75 นาที ด้วย Fitch Hopkins tube และปรับความเข้มข้นให้เท่ากันที่ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวได้ปริมาณเชื้อมากกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง ทำให้สามารถนำมาผลิตวัคซีนได้มากกว่าประมาณ 3.7 เท่า (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของวัคซีนโดยการทดสอบความเป็นสุญญากาศของวัคซีน ทดสอบการละลายของวัคซีน ทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน ทดสอบหาจำนวนเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากที่วัคซีนได้ผ่านการทำแห้งแล้ว test for dissociation เพื่อตรวจสอบปริมาณ rough colony รวมทั้งทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภา พบว่าวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธีมีคุณภาพไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบความปลอดภัยของวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธีโดยการทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภาพบว่าระดับแอนติบอดี มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่จำนวนเชื้อที่พบในม้ามของหนูที่ได้รับวัคซีนจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว มีค่ามากกว่าในหนูที่ได้รับวัคซีนจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 1** : เปรียบเทียบปริมาณเชื้อและจำนวนโด๊สของวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธี

| ครั้งที่ | อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง | | อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว | |
|---|---|---|---|---|
| | ปริมาณเชื้อ (มล.) | จำนวนวัคซีน (โด๊ส)* | ปริมาณเชื้อ (มล.) | จำนวนวัคซีน (โด๊ส)* |
| 1 | 1,000 | 2,500 | 3,920 | 9,800 |
| 2 | 1,028 | 2,570 | 3,800 | 9,500 |
| 3 | 1,032 | 2,580 | 3,880 | 9,700 |
| 4 | 1,028 | 2,570 | 3,920 | 9,800 |

* วัคซีน 1 โด๊ส ใช้ปริมาณเชื้อ 0.4 มล. ($40 - 120 \times 10^9$)

**ตารางที่ 2** : เปรียบเทียบการทดสอบคุณภาพวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธี

| การทดสอบ | วัคซีนเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง | | | | วัคซีนเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 |
| ความสามารถในการละลาย | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน |
| สภาพสุญญากาศ | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน |
| ความบริสุทธิ์ของวัคซีน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน |
| ความปลอดภัยในหนูตะเภา | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน |
| ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ( $\times 10^9$ CFU/dose) | 92 | 90 | 70 | 82 | 90 | 98 | 71 | 83 |
| Test for dissociation | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน | ผ่าน |

**ตารางที่ 3** : เปรียบเทียบการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธี

| การทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภา | วัคซีนเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง | | | | วัคซีนเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 |
| ระดับแอนติบอดี (IU/มล.) | 400 | 400 | 200 | 200 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| จำนวนเชื้อที่พบในม้าม (CFU/กรัม) | 15,306 | 5,208 | 14,627 | 12,434 | 59,707.5 | 44,444 | 40,204 | 16,008 |

## วิจารณ์และสรุป

จากผลการศึกษานี้การเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณอาหารและระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่เท่ากัน พบว่าปริมาณเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวได้ปริมาณเชื้อมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งประมาณ 3.7 เท่า (ตารางที่ 1) เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดแข็งใน Roux bottle มีพื้นที่ผิวจำกัด เชื้อไม่สามารถนำอาหารที่อยู่ลึกลงไปมาใช้ได้ การเจริญจึงเป็นเพียงการใช้อาหารบริเวณผิวหน้าเท่านั้น แต่การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดเหลวที่มีการกวนใบพัดทำให้อากาศที่เติมเข้าไปมีการกระจายตัวดี เชื้อสามารถนำสารอาหารที่ละลายอยู่มาใช้ได้ดีกว่าจึงขยายตัวได้ปริมาณเชื้อมากกว่า ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณวัคซีนที่ผลิตได้ เมื่อทดสอบคุณภาพ และความปลอดภัยของวัคซีนที่ได้จากทั้งสองวิธี พบว่ามีคุณภาพ และความปลอดภัยไม่ต่างกัน (ตารางที่ 2 และ 3) แต่เมื่อคำนวณจำนวนปริมาณเชื้อที่พบภายหลังการฉีดหนูตะเภา พบว่าในกลุ่มวัคซีนจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดเหลว มีปริมาณเชื้อมากกว่ากลุ่มวัคซีนจากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดแข็งอย่างชัดเจน (ตารางที่ 3) อาจเนื่องจากขนาดหนูที่ใช้ทดสอบ มีขนาดไม่เท่ากันทำให้ขนาดม้ามแตกต่างกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดง) อย่างไรก็ตามระดับปริมาณเชื้อในม้ามที่พบก็อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตามมาตรฐาน OIE ที่กำหนดไว้ ไม่เกิน 500,000 CFU/กรัม (OIE, 2000)

การทดลองนี้แสดงว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นการใช้อาหารที่คุ้มค่ากว่า ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในเรื่องวัตถุดิบในการผลิตวัคซีน ลดจำนวนบุคลากร สะดวกต่อการตรวจสอบ และควบคุมการปนเปื้อนรวมทั้งคุณภาพของวัคซีนที่ได้ก็ไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งจะได้นำไปปรับใช้ในงานผลิตวัคซีนให้คุ้มค่า (cost effective) ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. รัชนี อัตถิ และ น.สพ. ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนให้การทดลองนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

มนยา เอกทัตย์ 2546 โรคบรูเซลโลซีส หนังสือประกอบการฝึกอบรม zoonosis โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 98-108.

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institute National De La Recherche Agronomique, Paris. p.143-156.

Love, E.I. and Mingle, C.K. 1941. Factors affecting the viability of strain 19 Brucella vaccine. Proc. US Livest. Sanit. Assoc. 45 : 65-72.

OIE. 2000. Bovine brucellosis. In: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 4th ed. Office International des Epizootics, Paris, France. p. 328-345.

Nicoletti, P. 1990. Vaccination. In : Animal Brucellosis, Nielsen, K., Duncan, J.R. ed. CRC Press. Boca Raton. p. 284 – 299.

# Comparison of *Brucella abortus* strain 19 growth in solid and liquid medium

Anan Thaopech[1] Kanita Bhasathiti[1]

**Abstract**

The growth of *Brucella abortus* strain 19 on solid medium was compared with liquid medium. The bacterium was propagated on solid medium in 50 Roux bottles and in 10 litres of liquid medium in a fermenter.The cell concentration corresponding to percent pack cell volume ( % PCV ) was measured at 48 hours after inoculation.The results showed that a remarkably higher yield was achieved in liquid medium than solid medium under same conditions of cultivation.Comparison of quality of vaccines produced from the two types of growth media was not significantly different.

**Key words** : *Brucella abortus* strain 19, % PCV, solid medium, liquid medium

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

# การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

คณิตา ภาสะฐิติ[1] อนันต์ ท้าวเพชร[1]

## บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 โดยเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทำการเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงมาตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อโดยวิธีอ่านการอัดแน่นของเชื้อ (% PCV) พบว่าจะได้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 3.6% หลังการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 38 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งหากสามารถปรับกำหนดเวลาการเก็บเชื้อเพื่อผลิตแอนติเจนมาเป็นชั่วโมงที่ 38 แทน ชั่วโมงที่ 48 ตามวิธีปฏิบัติในปัจจุบัน จะประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก

**คำสำคัญ** : ระยะเวลาที่เหมาะสม; *Brucella abortus* strain 1119-3, อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## บทนำ

โรคบรูเซลโลซีส หรือโรคแท้งติดต่อ เป็นโรคติดต่อชนิดเรื้อรังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโรคหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ เนื่องจากทำให้ผลผลิตลดลง จากการเป็นหมัน ผสมไม่ติด นอกจากนี้ยังเป็นโรคที่สามารถติดต่อสู่คนได้ สัตว์ที่ป่วยจะมีอาการไม่ชัดเจนและเป็นตัวแพร่โรคที่สำคัญ การแยกสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่ได้รับเชื้อแต่ไม่แสดงอาการออกจากฝูง ก็เป็นวิธีหนึ่งในการจำกัดการแพร่กระจายของโรค การตรวจวินิจฉัยต้องอาศัยการตรวจหลายวิธีร่วมกัน คือ rapid plate test, Rose Bengal plate test, EDTA – serum agglutination test (EDTA-SAT), วิธี complement fixation test (CF) และวิธีอีไลซ่า (ELISA) ทำให้ต้องใช้แอนติเจนเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตแอนติเจนบรูเซลล่าโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (tryptose agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Alton et al.,1988) ตามมาตรฐานของ WHO และ OIE ซึ่งเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 เป็น strain ที่ได้รับการคัดเลือกจาก USDA แล้วว่าไม่จำเป็นต้องใช้ $CO_2$ ในการเพาะเลี้ยง และได้รับการลดคุณสมบัติการก่อโรคมาอย่างเหมาะสม แล้วนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาเตรียมเป็นแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก และแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบในหลอดแก้ว สำหรับใช้ทดสอบกับซีรั่มโค กระบือ เพื่อวินิจฉัยโรคแท้งติดต่อที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Brucella abortus*

การทดลองนี้เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปพัฒนาวิธีการผลิตแอนติเจนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นส่งผลให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียม seed สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 จาก seed ในรูปดูดแห้งจาก USDA โดยการละลายด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 6.4 (Love and Mingle, 1941) แล้วเพาะบน dextrose starch agar 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อใน tryptose broth อีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใน Roux bottle อีก 48 ชั่วโมง จึงจะได้ working seed เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป

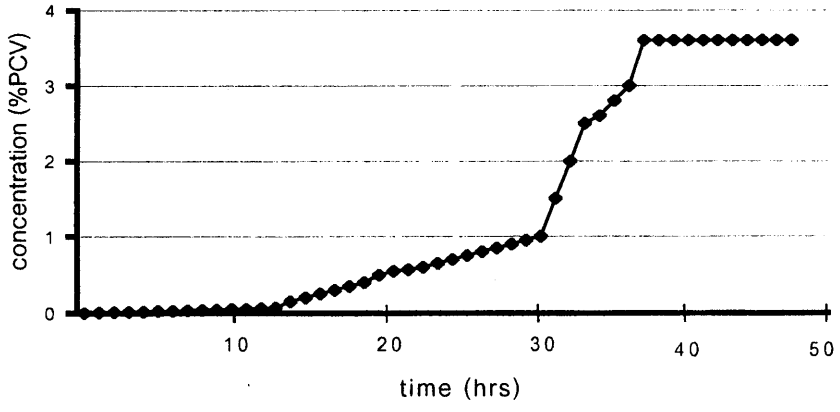
### การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำ working seed 1x $10^{12}$ เซลล์/มล. ปริมาณ 120 มล. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ปริมาตร 25 ลิตร ซึ่งเตรียมโดยการละลาย tryptose[1] 750 กรัม yeast extract[1] 250 กรัม $Na_2HPO_4$[2] 83 กรัม $NaH_2PO_4$[1] 225 กรัม antifoam[3] 25 มล. และ dextrose[4] 750 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 25 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.4 ในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร[5] แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในระหว่างการเลี้ยงเติมอากาศเข้าถังปริมาณ 8 ลิตร/นาที ควบคุมอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่ 37°C ความเร็วรอบการหมุนของ agitator เท่ากับ 300 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มล. ทุก 1 ชั่วโมงเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อ (%PCV) จนครบ 48 ชั่วโมง โดยบันทึกความเข้มข้นของเชื้อเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ packed cell volume (%PCV) ด้วย Fitch Hopkins tube (Alton et al., 1988) โดยเครื่อง centrifuge ปั่นที่ความเร็ว 3,100 รอบ/นาที นาน 75 นาที

## ผล

จากการศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร โดยการอ่านความเข้มข้นที่ได้แล้วนำมาบันทึกเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับเวลา พบว่าช่วงชั่วโมงที่ 0-14 เชื้อมีการแบ่งตัวในอัตราต่ำ ช่วงชั่วโมงที่ 15-31 เชื้อเริ่มมีการแบ่งตัวด้วยอัตราที่สูงขึ้น จนได้ความเข้มข้น 1% PCV ที่ 31 ชั่วโมง และเชื้อมีอัตราการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 32-38 จนได้ความเข้มข้นสูงสุด 3.6% PCV ในชั่วโมงที่ 38 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 1




**รูปที่1** : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 กับเวลา

---

[1]Lab M, UK [2]Sigma, USA [3]Km 72, Shin Etsu, Japan [4]BDH, UK

[5]New Brunswick Scientific, USA

## วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119–3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวด้วยถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร โดยวัดความเข้มข้นของเชื้อทุกชั่วโมงพบว่าในช่วง 14 ชั่วโมงแรก เชื้อจะเพิ่มจำนวนในอัตราต่ำ เป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว หลังจากชั่วโมงที่ 15 เชื้อจะมีอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้นไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้นสูงสุด 3.6 % ในชั่วโมงที่ 38 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสอดคล้องกับไคเนติกส์ของการหมัก ในช่วงแรกเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว เรียกระยะนี้ว่า lag phase หลังจากนั้นเชื้อจะมีอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้นไปเรื่อยๆซึ่งเป็นระยะ exponential phase จนได้ความเข้มข้นสูงสุดและคงที่ในระยะ stationary phase (สมใจ, 2545) ปัจจุบันจะเก็บเชื้อเพื่อนำไปผลิตแอนติเจน หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 48 ชั่วโมง (Alton et al., 1988) จากการศึกษานี้แสดงว่าสามารถเก็บเชื้อได้เร็วขึ้นเป็นเวลา 10 ชั่วโมง คือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 38 ซึ่งเชื้ออยู่ในระยะ late log phase และเข้าสู่ stationary phase เชื้อน่าจะมีคุณสมบัติดีกว่าที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้ออยู่ในระยะ stationary phase มาแล้วเป็นเวลา 10 ชั่วโมง และหากสามารถปรับกำหนดเวลาเก็บเชื้อให้เร็วขึ้นได้ ก็จะเป็นการประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายต่างๆ โดยเฉพาะพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการเดินเครื่องอุปกรณ์ไฟฟ้า

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. รัชนี อัตถิ และน.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีสและแอนติเจนทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนให้การทดลองนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

สมใจ ศิริโภค 2545 ไคเนติกส์ของการหมัก จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บริษัทพิมพ์ดีจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 159 – 178.

Alton, G.G., Jones L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institute National De La Recherche Agronomique. Paris. p. 63-71.

OIE. 2000. Bovine brucellosis. In: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 4th ed. Office International des Epizootics, Paris, France. p. 328-345.

Love, E.I. and Mingle, C.K. 1941. Factors affecting the viability of strain 19 Brucella vaccine. Proc. US Livest. Sanit. Assoc. 45 : 65-72.

# Studies on optimize time of *Brucella abortus* strain 1119-3 growth in liquid medium

Kanita Bhasathiti[1] Anan Thaopech[1]

**Abstract**

A Study to determine the optimal time of *Brucella abortus* strain 1119-3 growth was done by propagating of *Brucella abortus* strain 1119-3 in liquid medium in a 40 liters fermenter for 48 hours. During incubation a 10-ml sample was taken every hour and measured the concentration by packed cell volume method(%PCV). The result showed that the highest concentration(3.6%) was achieved after 38 hours of incubation and stable until 48 hours. Thus if the harvest time is changed to 38-h after incubation instead of 48-h as normally practiced,expenses can be decreased.

**Key words** : optimize time, *Brucella abortus* strain 1119-3, liquid medium

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

อภินันทนาการ

จาก

# บริษัท ภาวิวัฒน์ จำกัด

104 ซอยดำเนินกลางใต้ ถนนราชดำเนิน แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร

กรุงเทพฯ 10200

with the Complement of

# PAVIWAT COMPANY LIMITED

104 SOI DAMNOEN KLANG TAI, RATCHADAMNOEN ROAD,

BOWONNIWET, PHANAKORN BKK 10200

Tel. 0–2246–6217-8 Fax. : 0–2224-1010

# การศึกษาโครโมโซมของแฮมสเตอร์เซลล์ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการย้อมสี Giemsa

ธนรัตน์ จานุกิจ [1] นิตยา รักศรี [1] วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ [2] ลักขณา หิมะคุณ [3]

## บทคัดย่อ

ศึกษาโครโมโซมของแฮมสเตอร์เซลล์ 5 ชนิด ที่ใช้ในการผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างและจำนวนโครโมโซม โดยการย้อมสี Giemsa พบว่า เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด suspension, ชนิด monolayer (ML), ชนิด monolayer (WRL) มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ เป็น 44 แท่ง สำหรับเซลล์ $IFFA_3$ ชนิด suspension มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ 43 แท่ง และเซลล์ $BHK_{21}$ ชนิด monolayer (Tm) มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ 68 แท่ง ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมจะได้มีการศึกษาต่อไป

**คำสำคัญ :** โครโมโซม, แฮมสเตอร์เซลล์, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย, สี Giemsa

---

[1] กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

[2] กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

[3] ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พญาไท กรุงเทพมหานคร 10400

## บทนำ

ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เริ่มใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด suspension ในการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำ (alum) สำหรับโค กระบือ ตั้งแต่ปี 2521 และเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer ในการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำสำหรับสุกร ตลอดจนใช้ตรวจวินิจฉัยและแยกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากท้องที่ ใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณไวรัสสำหรับงานวิจัย และในการทดสอบคุณภาพของวัคซีนอีกด้วย ต่อมาปีพ.ศ. 2533 มีการขยายโครงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโครงการ 2 โดยใช้เซลล์ $IFFA_3$ หรือ NIL-2 ชนิด suspension เพื่อผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน (oil adjuvant) สำหรับสุกรในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งวัคซีนชนิดน้ำมันนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้สูงและยาวนานกว่าวัคซีนชนิดน้ำแบบเดิม

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ เป็นเซลล์ที่เตรียมจากไตของแฮมสเตอร์แรกเกิดอายุ 1 วัน (Macpherson and Stoker,1962) ส่วนเซลล์ $IFFA_3$ เตรียมจากตัวอ่อนของแฮมสเตอร์ ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย นิยมใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ (Capstic et al., 1962, Amadori et al.,1997) และเซลล์ $IFFA_3$ ชนิด suspension นี้ (Nardelli and Panina, 1976) ปัจจุบันก็ยังคงใช้เซลล์ทั้ง 2 ชนิดอยู่ เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ที่ใช้อยู่มีแหล่งที่มาหลากหลาย เพื่อให้การบันทึกข้อมูลการใช้และการจัดเก็บเซลล์ได้มาตรฐานยิ่งขึ้น ในปีพ.ศ. 2541 นักเซลล์พันธุศาสตร์ แนะนำให้ตรวจดูลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมของเซลล์ว่ายังคงลักษณะเหมือนเซลล์ต้นแบบหรือไม่ โครโมโซมของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร การศึกษาลักษณะรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม เรียกว่า cytogenetic

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นถึงข้อมูลของแฮมสเตอร์เซลล์ที่มีอยู่ในสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ข้อมูลที่ได้จะรวบรวมเก็บเป็นฐานข้อมูลของเซลล์ เพื่อจัดตั้งเป็นธนาคารเซลล์ การศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนของโครโมโซมของเซลล์จะช่วยควบคุมการผลิตเซลล์ให้มีคุณภาพ เป็นผลให้ได้ไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีคุณภาพดี และได้มาตรฐานอีกแนวทางหนึ่ง เพื่อเตรียมความพร้อมที่จะเข้าสู่ระบบ GMP (Good Manufacturing Practice) ซึ่งจะต้องมีการควบคุมคุณภาพเซลล์ด้วย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด suspension, เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer ($ML_{11}$), เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer ($WRL_{44}$), เซลล์ $BHK_{21}$ ชนิด monolayer ($Tm_{14}$) และ เซลล์ $IFFA_3$ ชนิด suspension เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Li et al., 1982) เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะที่มีการแบ่งตัวมากที่สุด

### การเตรียมโครโมโซม

สำหรับเซลล์แขวนลอย (เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension และ $IFFA_3$) ใช้เซลล์ปริมาตร 5 ml ใส่หลอด centrifuge ชนิดก้นแหลม เติมสารละลาย colchicine (ความเข้มข้น 2.5 µg/ml) ผสมให้เข้ากัน เก็บในตู้ 37°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟส ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย hypotonic solution (KCl 0.075 M) ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน เพื่อทำให้เซลล์บวม ปั่นซ้ำอีกครั้งหนึ่ง แล้วเติมสารละลายคงสภาพ (fixative solution, Methanol : Acetic acid = 3 : 1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน ปั่น แล้วทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บเข้าตู้เย็น 1 ชั่วโมง

สำหรับเซลล์ชนิด monolayer เติมสารละลาย colchicine (ความเข้มข้น 2.5 µg/ml) ลงในเซลล์แต่ละชนิด เก็บเข้าตู้ 37°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ย่อยเซลล์ด้วย 0.1% versene trypsin นำมาใส่หลอดเซนติฟิวแล้วทำการเตรียมโครโมโซมเช่นเดียวกับการเตรียมจากเซลล์แขวนลอย

### การหยดโครโมโซมลงบนสไลด์และย้อมสี

ล้างสไลด์ให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ เช็ดสไลด์ให้แห้ง หยดโครโมโซมที่เตรียมไว้ ลงบนสไลด์ 1 หยด ทิ้งไว้สักครู่พอหมาด ตามด้วยสารละลายคงสภาพ 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสไลด์แห้ง ย้อมด้วยสี 10% Giemsa ใน Weise buffer นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้สไลด์แห้งที่อุณหภูมิห้อง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจดูลักษณะและนับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเมตาเฟสเซลล์ จำนวน 100 เมตาเฟส

## ผล

จากการนับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเมตาเฟสเซลล์ของเซลล์แต่ละชนิดพบว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด suspension, เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer (ML), เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer (WRL) มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่แบบ diploid 2n เป็น 44 ซึ่งยังคงลักษณะเหมือนเซลล์ต้นแบบ ส่วนเซลล์ $IFFA_3$ ชนิด suspension มีจำนวนโครโมโซม 43 แท่งเป็นส่วนใหญ่ และเซลล์

$BHK_{21}$ ชนิด monolayer (Tm) มีจำนวนโครโมโซม 68 แท่ง เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงใน Figure 1 (A-E ตามลำดับ) การกระจายตัวของจำนวนโครโมโซม แสดงดัง Figure 2

จากการศึกษาลักษณะ รูปร่างและการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer (ML) และชนิด monolayer (WRL) มีลักษณะเรียวยาว (fibroblast cell) การเรียงตัวขนานกัน (parallel orientation) และจะหยุดเจริญเมื่อเซลล์โตเต็มพื้นที่ (contraction inhibition) สามารถเพาะขยายได้ 3 ถึง 4 เท่า มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์ $BHK_{21}$ ชนิด monolayer (Tm) ส่วนเซลล์ $BHK_{21}$ ชนิด monolayer (Tm) มีลักษณะเซลล์ที่สั้นกว่า การเรียงตัวเป็นอิสระและจะซ้อนทับกันเมื่อเซลล์โตเต็มพื้นที่ (random distribution, overlapping) การเจริญเติบโตเร็วสามารถเพาะขยายได้ 10 ถึง 12 เท่า และใช้ปริมาณ serum ต่ำ

## วิจารณ์และสรุป

ในการนับจำนวนโครโมโซมจะต้องดูที่ตำแหน่ง centromere ของโครโมโซมเป็นหลัก ปกติเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่แบบ diploid (2n=44) (Hay,1994) สำหรับเซลล์ $IFFA_3$ หรือ NIL-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เตรียมจากตัวอ่อนของแฮมสเตอร์ เซลล์ชนิด suspension เป็น transformed cell (Diamond, 1967) พบว่าใน suspension จะมีการเปลี่ยนแปลง karyotype ในระหว่างการ establish และที่ passage สูงๆ เซลล์แสดง hypokaryotype (Nardelli and Panina, 1976) ซึ่งสอดคล้องกับการนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ $IFFA_3$ ที่นับได้ส่วนใหญ่ที่นับได้เป็น 43 เป็นแบบ hypodiploid

จากการศึกษาลักษณะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีความแตกต่างกันของโครโมโซม ดังนั้นเซลล์ $BHK_{21}$ ชนิด monolayer (Tm) น่าจะเป็น continuous cell line เพราะสามารถเพาะเลี้ยงง่าย และกระตุ้นให้แบ่งตัวตลอดไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Macpherson (1963) และ สมศักดิ์ (2521) ที่กล่าวว่าเซลล์ที่เปลี่ยนสภาพและคุณสมบัติ (transformation) คล้ายเซลล์มะเร็ง คุณสมบัติต่างๆ เปลี่ยนไปจากเดิม ส่วนรูปร่างจะไม่เหมือนเดิม และคุณสมบัติทางชีวเคมีอาจเปลี่ยนไปจากเดิม ส่วนมากจำนวนโครโมโซมอาจจะมากกว่าหรือน้อยกว่าเดิม (aneuploid) โดยทั่วไป $BHK_{21}C_{13}$ cell line มีด้วยกันหลายสเตรน และมี genotype แตกต่างกัน (Nardelli and Panina, 1976) เซลล์ $BHK_{21}$ ที่ถูก transformation ด้วย polyoma virus มีคุณสมบัติต่างจากเซลล์ปกติ คือเจริญได้ดีและเจริญไม่หยุดยั้งในบริเวณที่มีเซลล์หนาแน่นแล้ว ซึ่งมีข้อแตกต่างจากเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ปกติที่หยุดเจริญแบ่งตัว เมื่อเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการควบคุมคุณภาพของเซลล์โดยการนับจำนวนและดูลักษณะของโครโมโซมเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและประหยัด เมื่อพบความแตกต่างจากโครโมโซมต้นแบบจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปจากเดิม ส่วนลักษณะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มี

โครโมโซมจำนวนต่างกันจะได้มีการศึกษาทาง cytogenetic ของเซลล์เมื่อมีการเพาะเลี้ยงในระยะยาวนานพร้อมกับเปรียบเทียบปริมาณและคุณสมบัติของไวรัสที่ผลิตได้จากเซลล์แต่ละชนิดควบคู่กันต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. แอบ คงทน สำหรับคำแนะนำและแก้ไขข้อมูลให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา 2521 ไวรัสวิทยาทั่วไป โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ หน้า 166-167.

Amadori, M., Volpe, G., Defilippi, P. and Berncri, C. 1997. Phenotypic Features of BHK-21 Cells used for production of foot and mouth disease vaccines. Biologicals. 25 : 65-73.

Capstic, P.B., Telling, R.C., Chapman, W.G. and Stewart, L.D. 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. Nature. (Lond.) 195 : 1163-1164.

Diamond, L. 1967. Two spontaneously transformed cell line derived from the same hamster embryo culture. Int. J. Cancer, 2 : 143-150.

Hay, R. 1994. ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. Rockville. ATCC. CCL-10.

Li, S., Pathak, S. and Hsu, T. C. 1982. High resolution G-banding patterns of Syrian hamster chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 33 : 295-302.

Macpherson, I. 1963. Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus. J. Nat. Cancer Inst. 30 (4) : 795-815.

Macpherson, I and Stoker, M. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones an investigation of genetic factor affecting cell competence. Virology 16 : 147-151.

Nardelli, L. and Panina, G. F. 1976. The use of suspension cultures for FMD vaccine production. Criterria for the evaluation of cells, virus and vaccine. Develop. Bio. Standard. 35 : 9-25.

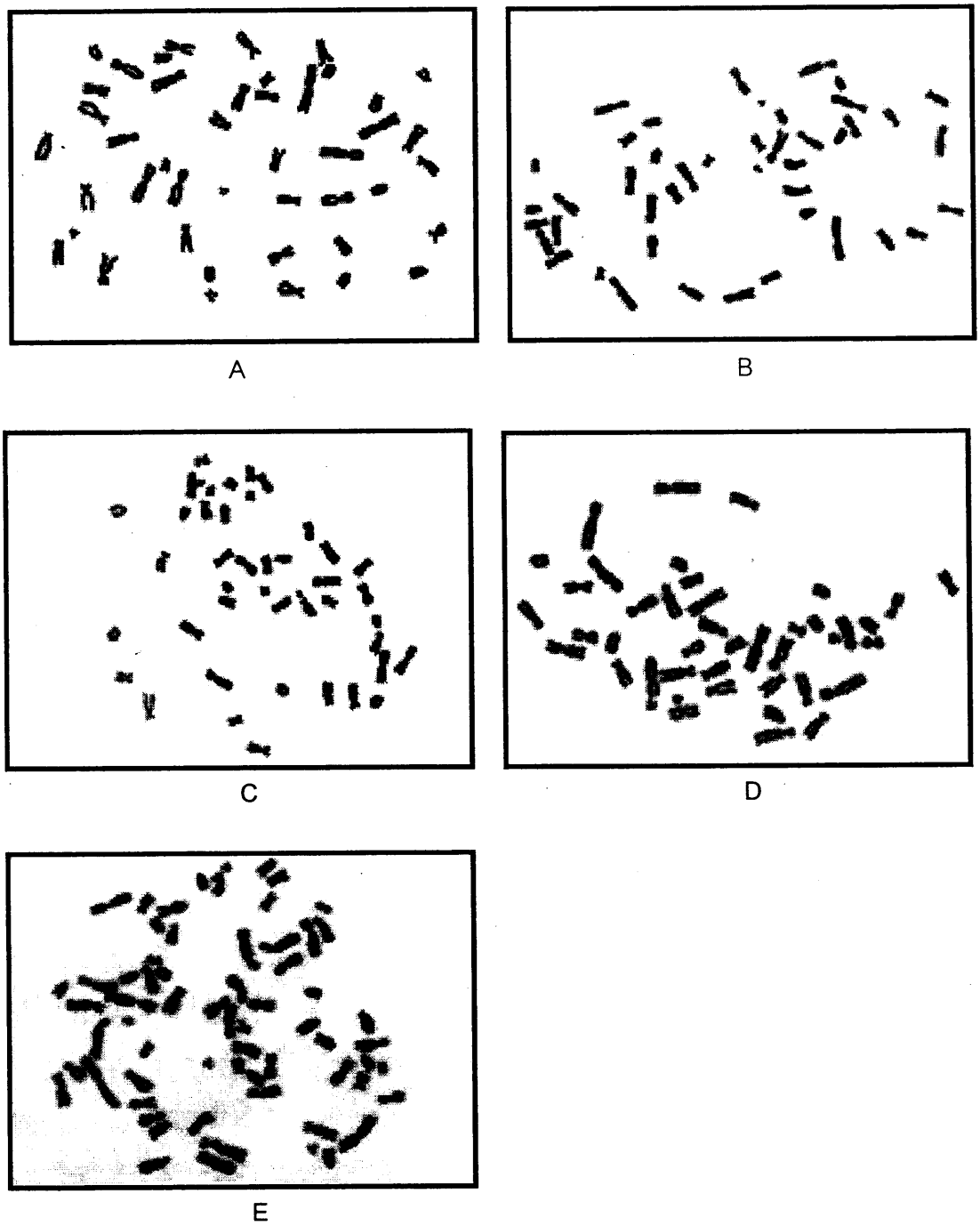



**Figure 1:** (A-E) Metaphase chromosome of hamster cells stained with 10 % Giemsa, X100

A. $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell

B. $BHK_{21}C_{13}$ monolayer(ML) cell

C. $BHK_{21}C_{13}$ monolayer(WRL) cell

D. $IFFA_3$ suspension cell

E. $BHK_{21}$ monolayer (Tm) cell

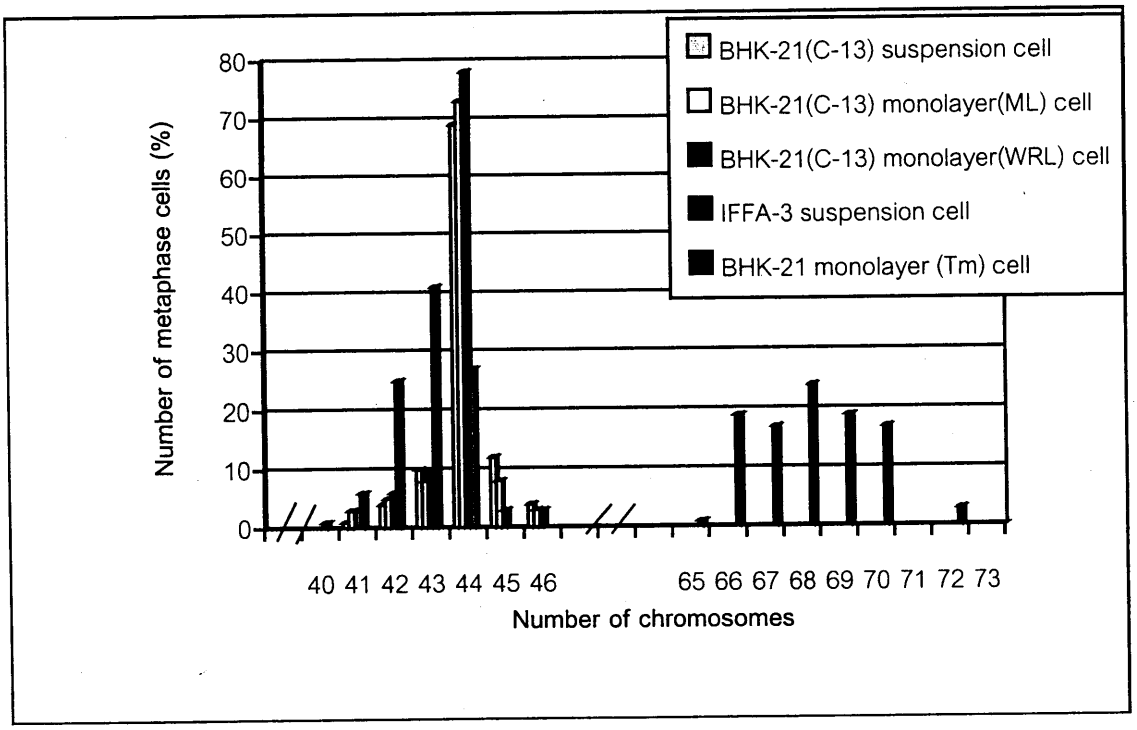



Figure 2 : Distribution pattern of chromosome numbers of hamster cells

# The study of chromosomal hamster cell using for foot and mouth disease virus production by Giemsa staining

Thanarat Janukit [1] Nittaya Rugsri [1] Vorapong Sriwilairit [2] Lakana Himakoun [3]

## Abstract

The comparison of chromosome number and morphology of five hamster cell lines used for foot and mouth disease virus production was done by Giemsa staining and microscopy. The result revealed that $BHK_{21}C_{13}$ suspension cell, $BHK_{21}C_{13}$ monolayer (ML) cell, $BHK_{21}C_{13}$ monolayer (WRL) cell had the chromosome numbers of 44, $IFFA_3$ suspension cell 43 and $BHK_{21}$ monolayer (Tm) cell 68. Growth pattern and karyological examination will be studied further.

**Key words :** chromosome, hamster cell , foot and mouth disease virus, Giemsa staining

---

[1] Veterinary Biologics Research and Development Sub-division, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

[2] Vaccine production Sub-division, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

[3] Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai, Bangkok 10400