วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2549

สารบัญ

♣ จากกองบรรณาธิการ 11

♣ การเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่ 10 นาที และ 30 นาที ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ 13

อนงนาฎ พุ่มสุคันธรส พัฒนี สุนามะ

♣ ศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ชนิดเชื้อตายในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ 21

ผดุงวิทย์ รักทอง ภาวสุทธิ์ จันทร์กระจ่าง จารุณี สาตรา

♣ การใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย 27

วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา รังสรรค์ รักษกุลวิทยา

♣ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ ความขุ่น น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ PCV ในแบลคเลกบรอทแบคเทอริน 37

รังสรรค์ รักษกุลวิทยา วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา

♣ ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่อง 45

อนันต์ ท้าวเพชร สุรพัฒน์ เถาหวณิช

♣ เปรียบเทียบการสูญเสียปริมาณ 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในขั้นตอนการทำไวรัสให้บริสุทธิ์ 53

อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์ นพคุณ มูลสิน

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 16 No.1 March 2006

Contents

- **Editorial board** 11
- **The comparison of incubation period between 10 and 30 minutes in formaldehyde content analysis** 13

  Anongnad Pumsukuntaros Patanee Sunama
- **Studies on potency of inactivated fowl cholera vaccine in native chicken and broiler chicken** 21

  Phadungwit Rakthong Phawasuth Chankarchang Jarunee Satra
- **Use of lyophilized heat extract antigen for detecting antibody to Haemorrhagic Septicaemia** 27

  Wiwat Chaichanasiriwithaya Rangsan Ruksakulwithaya
- **Study of relationship among bacterial cell count, dry weight, OD and percent PCV in Blackleg broth bacterin** 37

  Rangsan Rugskulvithaya Wiwat Chaichanasiriwithaya
- **Studies on *Brucella abortus* strain 1119-3 growth by semi-continuous culture** 45

  Anan Thaopech Surapat Laohawanich
- **Comparison of 146S virus lost in FMD virus purification process** 53

  Aree Katsuwannawong Noppakun Moolsin

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

http://www.dld.go.th/biologic

ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2549 Volume 16 No. 1 March 2006

วัตถุประสงค์

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

ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2549 พิมพ์เผยแพร่ กันยายน 2549 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

บรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ	**Editor**	Ratchanee	Atthi
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ	**Assistant editor**	Sahawatchara	Ungvanijban
ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	พยนต์	สินสุวงศ์วัฒน์	**Editorial advisor**	Payont	Sinsuwonkwat
ผู้จัดการวารสาร	ธนรัตน์	จานุกิจ	**Manager**	Thanarat	Janukit
ผู้ช่วยผู้จัดการวารสาร	ไชยา	สง่าประโคน		Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	แอบ	คงทน	**Editorial board**	Ab	Kongthon
	วันเพ็ญ	ชัยคำภา		Wanpenn	Chaikumpa
	สุมนา	ขมวิลัย		Sumna	Khomvilai
	ปานเทพ	รัตนากร		Parntep	Ratanakorn
	นพพร	พัฒนประสิทธิ์		Noppom	Patanaprasit
	วิวัฒน์	ชัยชนะศิริวิทยา		Wiwat	Chaichanasiriwithaya
	มนยา	เอกทัตร์		Monaya	Ekgatat
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	กัญญา	สุวินทรากร		Kunya	Suvintarakorn
	วิไล	ลินจงสุบงกช		Wilai	Linchongsubongkoch
	ลัดดา	ตรงวงศา		Ladda	Trongwongsa
	วีรชาย	ปู่สูงเนิน		Weerachai	Poosungnoen

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130	**Office:**	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ: เดือนมีนาคม และกันยายน	**Publications:**	Twice a year in March and September

จัดพิมพ์โดย:

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน ผลงานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานวิจัย (Technical papers) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวน ไม่เกิน 14 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows และใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด เพื่อให้การจัดพิมพ์ผลงานวิชาการเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามรายละเอียดที่กำหนดให้อย่างเคร่งครัด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การส่งต้นฉบับเพื่อพิจารณาลงวารสารชีวผลิตภัณฑ์

เพื่อให้การพิจารณาผลงานวิชาการและการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ส่งต้นฉบับพร้อมเอกสารการนำส่งผลงานวิชาการ

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 3 ชุด โดยชุดที่ 1 ให้มีรายละเอียดครบตรงตามแบบฟอร์มของวารสารชีวผลิตภัณฑ์ อีก 2 ชุด ไม่ต้องพิมพ์ชื่อเจ้าของผลงานวิชาการและสถานที่ทำงาน และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

การส่งแผ่นบันทึกข้อมูลจะส่งมาให้ก็ต่อเมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากผู้ประเมินผลงานวิชาการแล้วเท่านั้น โดยทางเจ้าหน้าที่จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่ผู้ประเมินผลงานวิชาการให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่ถูกต้องหลังจากมีการแก้ไขจากผู้ประเมินผลงานวิชาการแล้ว ลงใน Diskette ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ.....
ชื่อเจ้าของผลงาน.....
ชื่อไฟล์.....
ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์.....

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้ผู้ประเมินผลงานวิชาการพิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาให้ ทั้ง 3 ชุด ต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

ส่ง
บรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

3.6 ติดต่อสอบถามได้ที่

สัตวแพทย์หญิงรัชนี อัตถิ หรือนายสัตวแพทย์สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122 (สพ.ญ.รัชนี อัตถิ) หรือ ต่อ 427 (น.สพ.สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ)
โทรสาร. 0-4427-9794

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้บรรทัดสุดท้ายของหน้าเป็นหมายเหตุ (foot note)

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แต่ละภาษาเขียนแยกหน้าต่างหาก

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

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

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

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

4.5.5 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่ก็ได้ โดยเขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไลและคณะ, 2532; นริศ และสินสมุทร, 2543)

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

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น .....similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data), ...for other bacteria (A. X. Jones, personal communication)

5. กรณีอ้างเอกสารที่มีสถาบันเป็นผู้แต่งแทรกในเนื้อความ ให้ระบุนามผู้แต่งที่เป็นสถาบันโดยเขียนชื่อเต็มในการอ้างครั้งแรก และถ้ามีชื่อย่อที่เป็นทางการก็ให้ระบุชื่อย่อนั้นหลังเครื่องหมาย , ไว้ด้วย กรณีนี้ในการอ้างครั้งต่อมาให้ใช้ชื่อย่อนั้นได้ ในกรณีที่ไม่มีชื่อย่อ การอ้างครั้งต่อๆมาให้ระบุชื่อสถาบันเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช. 2544. การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 11(1-2): 27-26.

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

กรณีอ้างอิงจากตำราหรือหนังสือ ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง หากเป็นตำราภาษาอังกฤษใช้ p. กรณีอ้างเพียง 1 หน้า ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. ดังตัวอย่าง

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 2543. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 81.

ไพโรจน์ จ่วงพานิช. 2520. โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา. ใน: หลักการทำไร่อ้อย เกษม สุขสถาน และอุดม พูลเกษ บรรณาธิการ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 141-145.

Office International des Epizootics. 2000. Principles of veterinary vaccine production. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 42.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In: Disease of swine, 6th ed. Leman, A. D. ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

จันทรา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึ่งพิศ ดุลยพัชร์. 2541. อาหารจากข้าวโพด. คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา: http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm. 27 มีนาคม 2541.

Dimick, J. B., Welch, H. G. and Birkmeyer, J. D. 18 August 2004, posting {or revision} date. Surgical mortality as an indicator of hospital quality. JAMA. 292. [On line.] http://jama.ama-assn.org/cgi/content/short/292/7/847. {For online journal; page numbers may not be available.}

Sullivan, C. J. (ed.). 1999-2001. Fungi: an evolving electronic resource for the microbiological community. ASM Press. [Online.] http://link.asmusa.de/link/service/books/91090. Accessed 7 September 2001. {For online-only books.}

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่าน และใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana new 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

-ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร

-ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

-การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม

-กรณีคำสุดท้ายไม่จบในบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กองผลิตชีวภัณฑ์ ไม่ให้แยกเป็น กองผลิตชีว-ภัณฑ์ เป็นต้น

-หลังเครื่องหมาย . , ; : และ วงเล็บ เคาะ 1 เคาะ

-ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง

-ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (วิไล และคณะ)

การลำดับหน้า

-ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3..... ที่กึ่งกลางหน้าด้านบน

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยให้มีรายละเอียดดังนี้

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

-กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

-กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ 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*

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 เดือนมีนาคม 2549 ประกอบด้วยผลงานวิชาการ จำนวน 6 เรื่อง เป็นเรื่องเกี่ยวกับการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีน ทั้งผลงานที่เป็นการตรวจสอบความคุ้มโรคในสัตว์หลังได้รับวัคซีน และการทดลองที่สนับสนุนด้านเทคนิค ซึ่งผลงานวิชาการแต่ละเรื่องจะเป็นประโยชน์สำหรับนักวิชาการที่สนใจอย่างยิ่ง และเป็นที่น่ายินดีที่มีนักวิชาการจากหน่วยงานอื่น ให้ความสนใจในการนำผลงานวิชาการด้านชีวภัณฑ์สัตว์มาเผยแพร่ในวารสารหลายเรื่อง ซึ่งบางเรื่องอยู่ระหว่างการพิจารณาของคณะบรรณาธิการผู้ทรงคุณวุฒิ ในนามของกองบรรณาธิการจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งที่จะได้รับความสนใจจากนักวิชาการ เช่นที่แล้วมา และยินดีรับคำติชมเพื่อนำมาแก้ไขปรับปรุงในฉบับต่อ ๆ ไป

(สัตวแพทย์หญิงรัชนี อัตถิ)
บรรณาธิการ

การเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่ 10 นาที และ 30 นาที ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์

อนงนาฎ พุ่มสุคันธรส[1] พัฒนี สุนามะ[1]

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบระยะเวลาในการบ่มเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ของวัคซีนชนิดเชื้อตายโดยวิธี Hantzsch's test ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 นาที และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกันซ้ำ จำนวน 20 ครั้ง พบว่า วัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ได้ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) ของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่บ่มเป็นเวลา 10 และ30 นาที เท่ากับ 0.205$\pm$ 0.007 และ 0.206 $\pm$ 0.005 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% CV) เท่ากับ 3.41 และ 2.43 ตามลำดับ และค่าสถิติ t - test เท่ากับ 0.51 สำหรับวัคซีนแบลคเลก ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) เท่ากับ 0.372 $\pm$ 0.008 และ 0.373 $\pm$ 0.01 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% CV) เท่ากับ 2.15 และ 2.68 ตามลำดับ และค่าสถิติ t - test เท่ากับ 0.34 ซึ่งค่าจากการวิเคราะห์ที่ได้ % CV น้อยกว่า 10 และค่าสถิติ t - test จากการวิเคราะห์น้อยกว่า จากตาราง t - test (df = 19 2.093, P> 0.05) ซึ่งถือว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่ยอมรับในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ดังนั้น จึงสามารถลดระยะเวลาการบ่มในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วยวิธี Hantzsch's test จากระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม 30 นาที เป็น 10 นาทีได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์

คำสำคัญ: เวลาในการบ่ม การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ วัคซีนเชื้อตาย Hantzsch's test

---

[1] กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในการผลิตชีวภัณฑ์สำหรับสัตว์ เพื่อให้ได้ชีวภัณฑ์ที่ดีมีประสิทธิภาพทั้งความปลอดภัยและความคุ้มโรค การทดสอบประสิทธิภาพก่อนนำออกจำหน่ายจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างความมั่นใจให้แก่เกษตรกร กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ ทั้งด้านความปลอดภัย ความคุ้มโรค การทดสอบลักษณะทั่วไป ได้แก่ การตรวจวัดความเป็นกรด - ด่าง ปริมาณโปรตีน ปริมาณความชื้นและสภาพสุญญากาศในวัคซีนเชื้อเป็น การตรวจวัดความเป็นกรด - ด่าง ปริมาณโปรตีน และปริมาณสารฆ่าเชื้อในวัคซีนเชื้อตาย ได้แก่ ฟีนอล ไธเมอโรซอล และฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นต้น (ASEAN Secretariat, 1998) สารฆ่าเชื้อดังกล่าว เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการผลิต จะต้องมีการควบคุมให้ใช้ในปริมาณที่มากพอที่จะต้องฆ่าเชื้อให้หมด และคงเหลืออยู่หลังจากสิ้นสุดกระบวนการผลิต ไม่เกินกว่าที่กำหนดไว้ในมาตรฐาน เช่น ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนเชื้อตายตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานจะต้องไม่เกิน 0.5% (European Pharmacopoeia, 1997) ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การไตเตรตด้วยกรดซัลฟูริค (European Pharmacopoeia, 1980) และ วิธี Hantzsch's test (Nash, 1953) เป็นต้น ปัจจุบันกลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วยวิธี Hantzsch's test โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ฟอร์มาลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับ acetylacetone เกิดสารสีเหลืองของ 3, 5 diacetyl-1, 4-dihydrolutidine นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (OD 415 nm) แต่เนื่องจากวิธี Hantzsch's test เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ กับ acetylacetone ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กในกลุ่ม aldehyde จึงใช้เวลาไม่นานนักในการเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาของ อนงนาฏ และรังสรรค์ (2546) พบว่า การทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์สามารถใช้เวลาในการบ่มสั้นที่สุดคือ 5 นาที ได้โดยไม่กระทบต่อผลการวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ระยะเวลาในการบ่มที่น้อยเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ได้ ถ้าหากอุณหภูมิที่ใช้บ่มยังไม่คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์เพื่อลดระยะเวลาในการบ่ม จึงเลือกใช้ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่ 10 นาที แล้วนำไปเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการบ่มเดิม 30 นาที โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแปลคเลก ทำการทดสอบซ้ำ จำนวน 20 ครั้ง แปลผลจากค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (coefficient of variation, % CV) และค่าสถิติ t - test ซึ่งผลที่ได้จะทำให้สามารถประหยัดเวลาและสารเคมี และสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น การตอบผลเป็นไปอย่างรวดเร็ว เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณได้ในระดับหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างวัคซีน ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2 ชนิด ได้แก่

- วัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ (fowl cholera vaccine)
- วัคซีนแบลคเลก (blackleg vaccine)

วิธีการ

1. สุ่มตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ส่งมาทำการทดสอบที่กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ ตัวอย่างละ 1 ขวด วิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วยวิธี Hantzsch's test (Nash, 1953) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 และ 30 นาที ทำการทดสอบซ้ำ จำนวน 20 ครั้ง

2. การเตรียมสารละลายและตัวอย่าง

- เตรียมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 % โดยละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 100 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะทึบแสง

- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate buffer) โดยชั่ง ammonium acetate 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เติม acetic acid 300 ไมโครลิตร และ acetyl acetone 200 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- เตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ นำวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และวัคซีนแบลคเลกไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ตกตะกอน

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดยวิธี Hantzsch's test (Nash, 1953)

เจือจางสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์จากความเข้มข้น 0.1% ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร ความเข้มข้นละ 2 หลอด เจือจางตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อยู่ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยดูดตัวอย่างวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันดูด ใส่หลอดทดลองที่จะทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร 2 หลอด ทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียม อะซิเตต หลอดละ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร สร้างกราฟสารละลายมาตรฐาน ฟอร์มาลดีไฮด์ นำค่า OD ที่วัดได้จากตัวอย่างวัคซีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 20 ครั้ง แปลผลจากการคำนวณค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) ของค่า OD ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (coefficient of variation, % CV) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยค่าสถิติ t - test

ส่วนการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดยการบ่มเป็น เวลา 10 นาที ดำเนินการเช่นเดียวกัน

ผล

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดยวิธี Hantzsch's test ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 นาที และ30 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ดังรูปที่ 1 และวัคซีนแบลคเลก รูปที่ 2

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 นาที และ 30 นาที ได้ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) เท่ากับ 0.205 $\pm$ 0.007 และ 0.206 $\pm$ 0.005 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% CV) เท่ากับ 3.41 และ 2.43 และค่าสถิติ t - test เท่ากับ 0.51 และในวัคซีนแบลคเลก ได้ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) เท่ากับ 0.372 $\pm$ 0.008 และ 0.373 $\pm$ 0.01 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% CV) เท่ากับ 2.15 และ 2.68 ตามลำดับ และค่าสถิติ t - test ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก เท่ากับ 0.51 และ 0.34 แสดงในตารางที่ 1

วิจารณ์และสรุป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก จากการใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 และ 30 นาที พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ SD) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ เท่ากับ 0.205 $\pm$ 0.007 และ 0.206 $\pm$ 0.005 วัคซีนแบลคเลก เท่ากับ 0.372 $\pm$ 0.008 และ 0.373 $\pm$ 0.01 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% CV) วัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ที่ใช้เวลาในการบ่ม 10 นาที จะมีค่ามากกว่าที่ใช้เวลาในการบ่ม 30 นาที คือ 3.41 และ 2.43 ตามลำดับ และ % CV วัคซีนแบลคเลกที่ใช้เวลาในการบ่ม 10 นาที จะมีค่าน้อยกว่าที่ใช้เวลาในการบ่ม 30 นาที เท่ากับ 2.15 และ 2.68 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าการวิเคราะห์ที่ได้จากการใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 นาที ของทั้งสองวัคซีนยังมีค่า % CV $\leq$ 10 (พิพัฒน์, 2542) และค่าทางสถิติ t - test ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด -ไก่ และวัคซีนแบลคเลกที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการบ่ม 30 นาที เท่ากับ 0.51 และ0.34 ซึ่งค่าสถิติ t - test จากการวิเคราะห์ น้อยกว่า ค่าจาก ตาราง t - test (df =19 2.093, P >0.05) (ทิพวรรณ และวันทนีย์, 2548) ซึ่งถือว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเป็นที่ยอมรับในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก ด้วยวิธี Hantzsch's test กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ จึงสามารถลดเวลาในการบ่มจากที่ใช้เวลา 30 นาที เป็น 10 นาที โดยไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ จากการลดเวลาในการปฏิบัติงานจะทำให้สามารถประหยัดเวลาและสารเคมี สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น การตอบผลเป็นไปอย่างรวดเร็ว เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณได้ในระดับหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พนักงานห้องปฏิบัติการฝ่ายจุลชีววิทยา เคมี และชีวเคมี กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ ที่ช่วยให้การปฏิบัติงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย และวันทนีย์ ขำเลิศ. 2548. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบอาหารทางเคมี และทางจุลชีววิทยา. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. หน้า 10.

พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล. 2542. กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ. คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 83.

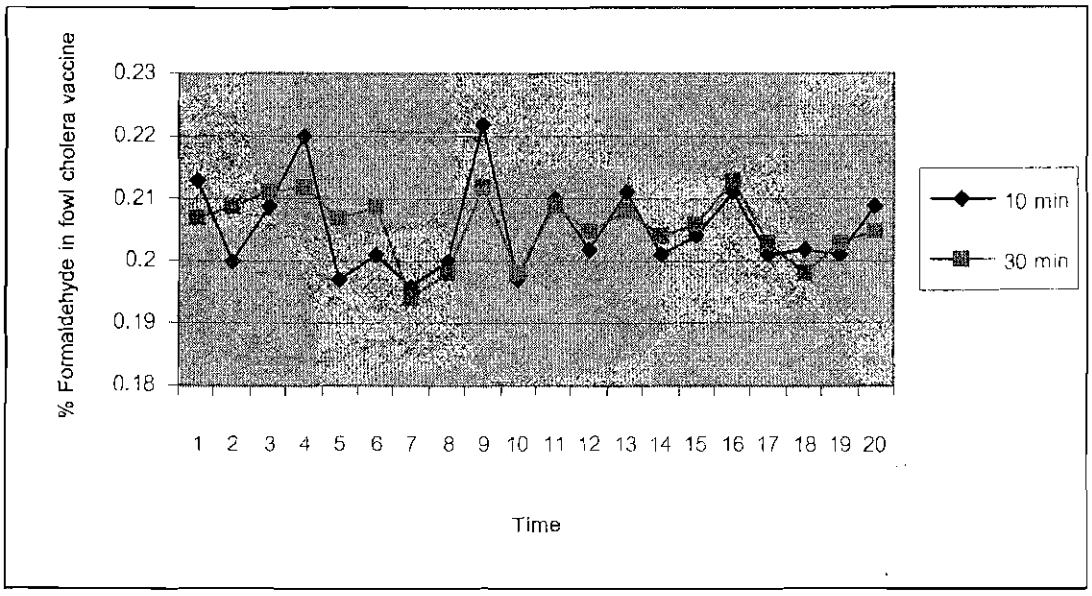
อนงนาฎ พุ่มสุคันธรส และรังสรรค์ รักษกุลวิทยา. 2548. การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการบ่มเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เปื่อย - ไก่ โดยวิธี Hantzsch's test. รายงานการประชุมวิชาการสาขา สัตวบาล/สัตวศาสตร์/สัตวแพทย์ ครั้งที่ 4. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 460 - 466.

ASEAN Secretariat. 1998. General requirements for vetcrinary vaccines. In: Manual of ASEAN standard for animals vaccines, Livestock publication series No. 2A. Penebar Swadaya, Indonesia. pp. 112-113.

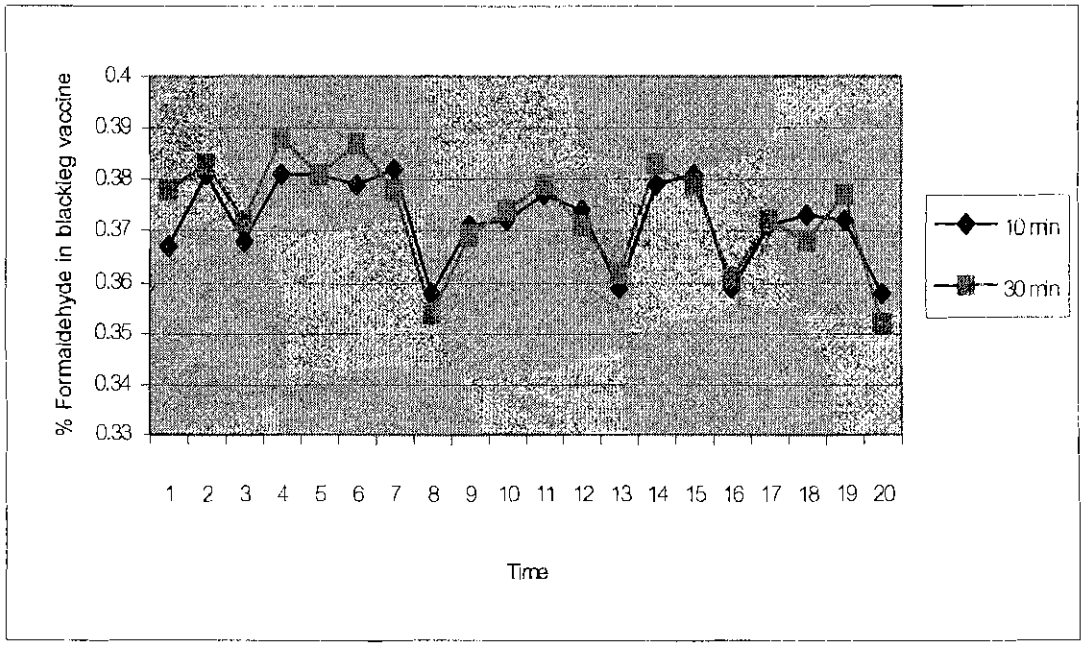
European Pharmacopoeia. 1980. The United Stated Pharmacopoeia National Formulary, USPXX. p. 342.

European Pharmacopoeia. 1997. Vaccines for veterinary use. Published in accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No. 50). p. 1702.

Nash, T. 1953. Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421.



รูปที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 และ 30 นาที



รูปที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนแบลคเลกที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 และ 30 นาที

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และวัคซีนแบลคเลก โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม 10 และ 30 นาที ทำการทดสอบซ้ำ 20 ครั้ง

วัคซีน	ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มต่างกัน				
	10 นาที		30 นาที		
	$\bar{x} \pm SD$	% CV	$\bar{x} \pm SD$	% CV	t - test
อหิวาต์เป็ด - ไก่	0.205 ± 0.007	3.41	0.206 ± 0.005	2.43	0.51
แบลคเลก	0.372 ± 0.008	2.15	0.373 ± 0.01	2.68	0.34

The comparison of incubation period between 10 and 30 minutes in formaldehyde content analysis

Anongnad Pumsukuntaros[1] Patanee Sunama[1]

Abstract

The comparison of an incubation period in the process of formaldehyde content analysis of inactivated vaccines by Hantzsch's test was carried out in fowl cholera and blackleg vaccines by using incubation periods for 10 minutes and 30 minutes at 37^0 C. The test was repeated for twenty times. The mean values for percents of formaldehyde content in fowl cholera vaccine after incubation at 37^0 C for 10 minutes and 30 minutes were 0.205±0.007 and 0.206±0.005, respectively; the coefficient of variation percents (% CV) were 3.41 and 2.43, respectively and t - value was 0.51. The mean values for percents of formaldehyde content in blackleg vaccine after incubation at 37^0 C for 10 minutes and 30 minutes were 0.372±0.008 and 0.373±0.01, respectively; the coefficient of variation percents (% CV) were 2.15 and 2.68, respectively and t - value was 0.34.There was no significant difference ($P > 0.05$).

Key words: Incubation period, Formaldehyde content analysis, Inactivated vaccine, Hantzsch's test

---

[1] Veterinary Biologics Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ ชนิดเชื้อตายในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ

ผดุงวิทย์ รักทอง[1] ภาวศุทธิ์ จันทร์กระจ่าง[1] จารุณี สาตรา[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดเชื้อตายจำนวน 5 ชุดการผลิตในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ โดยทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนแต่ละชุดการผลิตในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ อายุ 4 สัปดาห์ อย่างละ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1, 2 ใช้ไก่พื้นเมืองกลุ่มละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาดตัวละ 1 โด๊ส โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดครั้งเดียวและกลุ่มที่ 2 ฉีดสองครั้ง ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่พื้นเมือง จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน กลุ่มที่ 4, 5 ใช้ไก่เนื้อ กลุ่มละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาดตัวละ 1 โด๊ส โดยกลุ่มที่ 4 ฉีดครั้งเดียว และกลุ่มที่ 5 ฉีดสองครั้ง ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ กลุ่มที่ 6 ใช้ไก่เนื้อ จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ฉีดเชื้อพิษทับให้แก่ไก่ทุกกลุ่มด้วยเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype 8: A ในขนาด 100 LD_{50} พบว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดเชื้อตาย ทั้ง 5 ชุดการผลิตให้ความคุ้มโรคในไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียวเท่ากับ 35%, 65%, 25%, 45% และ 50% ตามลำดับ ในไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีนสองครั้งเท่ากับ 80%, 90%, 85%, 85% และ 80% ตามลำดับ ในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียวเท่ากับ 5%, 10%, 0%, 5% และ 5% ตามลำดับ และในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนสองครั้งเท่ากับ 15%, 15%, 10%, 10% และ 20% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มมีอัตราการตาย 100% แสดงว่าการฉีดวัคซีนให้ไก่พื้นเมืองสองครั้งสามารถให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อ *P. multocida* serotype 8: A ได้ ในขณะที่การฉีดวัคซีนให้ไก่เนื้อทั้งฉีดครั้งเดียวและสองครั้ง ไม่สามารถให้ความคุ้มโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดเชื้อตาย ความคุ้มโรค ไก่พื้นเมือง ไก่เนื้อ

---

[1] กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A (Carter and Runnel, 1975) ซึ่งพรเพ็ญ และคณะ (2528) รายงานว่าเป็นสาเหตุสำคัญในสัตว์ปีกที่เป็นโรคอหิวาต์ในประเทศไทย โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่แพร่กระจายติดต่อได้ง่ายสามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งเป็ด ไก่ ห่าน และสัตว์ปีกอื่นๆ เป็นโรคที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมาก ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งอุตสาหกรรม การเลี้ยงสัตว์ปีกในฟาร์มและสัตว์ปีกที่เลี้ยงตามหลังบ้าน (เชิดชัย, 2543) ซึ่งการฉีดวัคซีนเป็นวิธีการสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Zander et al., 1997) ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงได้ผลิตวัคซีนขึ้นมาเพื่อใช้ในการป้องกันโรคนี้ ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดบรอทแบคเทอริน (broth bacterin) โดยทำการทดสอบความคุ้มโรคในเป็ดกากีแคมเบล ซึ่งผดุงวิทย์ และสวนีย์ (2547) ได้ทำการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด -ไก่ชนิดเชื้อตาย พบว่าเป็ดกากีแคมเบลที่ให้วัคซีนเพียงครั้งเดียวมีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 85% ส่วนเป็ดเนื้อสายพันธุ์บราวเวอร์ที่ให้วัคซีนเพียงครั้งเดียวมีความคุ้มโรคไม่เกิน 65% แต่เมื่อให้วัคซีนสองครั้งมีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 85% และตามมาตรฐานอาเซียนกำหนดให้ทดสอบความคุ้มโรคในสัตว์ปีก (fowl) โดยวัคซีนที่จะผ่านการทดสอบต้องให้ความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 80% ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนต้องมีอัตราการตายไม่ต่ำกว่า 80% (ASEAN Secretariat, 1998) แต่จากคู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน (กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์, 2543) แนะนำให้ใช้วัคซีนฉีดป้องกันโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่สำหรับสัตว์ปีก ได้แก่ เป็ด ไก่ และห่าน โดยฉีดวัคซีนซ้ำทุก 3 เดือน จึงได้ทำการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดเชื้อตายในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ โดยเปรียบเทียบการฉีดวัคซีนครั้งเดียวเมื่ออายุ 4 สัปดาห์และสองครั้ง เมื่ออายุ 4 และ 6 สัปดาห์ ใช้ตัวอย่างวัคซีนจำนวน 5 ชุดการผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดบรอทแบคเทอริน (broth bacterin) ที่ผลิตจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ขนาดบรรจุขวดละ 100 โด๊ส ได้แก่ชุดการผลิตที่ 51/47, 71/47, 72/47, 25/48 และ ชุด 26/48 จำนวนชุดละ 1 ตัวอย่าง

2. เชื้อที่ใช้ในการฉีดพิษทับ เป็นเชื้อ *P. multocida* serotype 8: A ซึ่งแยกได้จากพื้นที่และมีความรุนแรงต่อเป็ดและไก่ได้รับมาจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยนำเชื้อที่เก็บในรูปทำแห้งมาทำการเพาะเชื้อใน blood agar plate ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ. นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว นำลงไปเพาะใน tryptose phosphate broth (TPB) ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ. นาน 6 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อโดยวิธี viable count (สุภาพร และคณะ, 2530) และเจือจางเชื้อให้มีปริมาณ 100 - 1,000 CFU/มล. โดยปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดพิษทับไม่ต่ำกว่า 100 lethal dose 50% (LD_{50}) ต่อตัว

3. ไก่ที่ใช้ในการทดลอง มีอายุ 4 สัปดาห์ ได้จากฟาร์มที่ปลอดโรคโดยคัดเลือกไก่ที่มีสุขภาพดีแข็งแรง เกิดจากพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่ไม่เคยทำวัคซีน เป็นไก่พื้นเมือง จำนวน 250 ตัว และไก่เนื้อสายพันธุ์ AV43 จำนวน 250 ตัว

วิธีการ

ในการทดสอบวัคซีนจำนวน 5 ชุด แต่ละชุดการผลิตได้ทำการแบ่งไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1, 2 ใช้ไก่พื้นเมืองกลุ่มละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาดตัวละ 1 โด๊ส โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดครั้งเดียว และกลุ่มที่ 2 ฉีดสองครั้ง ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่พื้นเมือง จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน

กลุ่มที่ 4, 5 ใช้ไก่เนื้อ กลุ่มละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาดตัวละ 1 โด๊ส โดยกลุ่มที่ 4 ฉีดครั้งเดียวและกลุ่มที่ 5 ฉีดสองครั้ง ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

กลุ่มที่ 6 ใช้ไก่เนื้อ จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน

หลังฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ทำการฉีดพิษทับให้ไก่ทุกตัวด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype 8: A ในขนาด 100 LD_{50} โดยฉีดเข้ากล้ามตัวละ 1 มล. หลังจากนั้นสังเกตอาการต่ออย่างน้อย 14 วัน โดยไก่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 80% ส่วนกลุ่มควบคุมจะต้องมีอัตราการตายอย่างน้อย 80% วัคซีนจึงจะผ่านการทดสอบ (ASEAN Secretariat, 1998)

ผล

ผลการฉีดพิษทับด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype 8: A ในไก่ที่ได้รับวัคซีนชุดที่ 51/47, 71/47, 72/47, 25/48 และ 26/48 พบว่าไก่พื้นเมืองในกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับวัคซีนครั้งเดียว มีความคุ้มโรค ต่ำกว่า 80% ในขณะที่ไก่พื้นเมือง กลุ่มที่ 2 ซึ่งได้รับวัคซีนสองครั้ง มีความคุ้มโรค $\geq$ 80% โดยไก่เนื้อในกลุ่มที่ 4 ซึ่งได้รับวัคซีนครั้งเดียว และไก่เนื้อในกลุ่มที่ 5 ซึ่งได้รับวัคซีนสองครั้งมีความคุ้มโรคต่ำกว่า 80 % ในขณะที่ไก่พื้นเมืองในกลุ่มที่ 3 และไก่เนื้อในกลุ่มที่ 6 ซึ่งไม่ได้ให้วัคซีนและเป็นกลุ่มควบคุมมีอัตราการตาย 100% (ตารางที่ 1)

วิจารณ์และสรุป

ผลการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ เชื้อตายชนิดบรอทแบคเทอริน ในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ พบว่าความแตกต่างของสายพันธุ์ไก่ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อ *P. multocida* serotype 8: A ต่างกัน โดยไก่พื้นเมืองที่ให้วัคซีนสองครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ มีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 80% ในขณะที่ไก่เนื้อถึงแม้จะให้วัคซีนสองครั้ง ก็มีความคุ้มโรคไม่เกิน 20% คงต้องทำการศึกษาในรายละเอียดของไก่แต่ละสายพันธุ์ต่อไปถึงเหตุแห่งความแตกต่าง รวมถึงสภาวะแวดล้อมการเลี้ยงดูไก่ก่อนการให้วัคซีนครั้งแรกก็อาจจะมีผลกระทบได้ อย่างไรก็ตามการฉีดวัคซีนสองครั้งจะให้ความคุ้มโรคสูงกว่าการฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว ซึ่งจากคู่มือการใช้วัคซีนและ

แอนติเจน (กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์, 2543) แนะนำให้ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ฉีดป้องกันโรคในไก่ด้วย และวัคซีนที่นำเข้าจากต่างประเทศก็แนะนำให้ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในไก่ด้วย ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในไก่ด้วย และควรปรับปรุงคำแนะนำการใช้วัคซีนให้ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายในไก่พื้นเมือง โดยจะต้องทำการฉีดวัคซีนซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ และไม่ควรแนะนำให้ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เพื่อป้องกันโรคในไก่เนื้อ เว้นแต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดนั้นจะผ่านการทดสอบความคุ้มโรคในไก่สายพันธุ์ดังกล่าวแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ที่ให้การสนับสนุนเชื้อที่ใช้ในการฉีดพิษทับ และขอขอบคุณข้าราชการและพนักงานของกลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ ที่ช่วยในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์. 2543. คู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. หน้า 55-56.

เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล. 2543. โรคของเป็ด (Diseases of ducks). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 4-10.

ผดุงวิทย์ รักทอง และสวนีย์ ตระการรังสี. 2547. การศึกษาผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ในเป็ด 2 สายพันธุ์. การประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19 วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2547. หน้า 133-134.

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ ทิพา ตันติเจริญยศ สมาน พิพิธกุล และนิดารัตน์ ไพรดณะฮก. 2528. การศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อพาสเจอเรลล่า มัลโตไซด้า. สัตวแพทยสาร. 36: 385-394.

สุภาพร จ๋วงพานิช นิเทศ เลิศลิมชลาลัย และองอาจ พรหมศร. 2530. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype 8: A. สัตวแพทยสาร. 38 (3): 20-24.

ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for inactivated fowl cholera vaccine. In: Manual of ASEAN standard for animal vaccine, Livestock publication series No. 2A. Penebar Swadaya, Indonesia. pp. 22- 23.

Carter, G.R. and Runnel, S.W. 1975. Identification of type A strain of *Pasteurella multocida* using *Staphylococcal hyaluronidase*. Vet. Rec. 96: 434 - 438.

Zander, D.V., Bermudez, A.J. and Mallison, E.T. 1997. Principle of disease prevention: diagnosis and control. In: Disease of poultry, 10th ed. Iowa State University Press. pp. 21-25.

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype 8: A ในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ ที่ให้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดบรอทแบคเทอรินครั้งเดียวหรือสองครั้ง และอัตราการตายของไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ให้วัคซีน

หมายเลขชุดวัคซีน	ไก่พื้นเมือง			ไก่เนื้อ		
	% ความคุ้มโรคในไก่กลุ่มที่ให้วัคซีน (จำนวนไก่ที่รอด/จำนวนไก่ที่ฉีดพิษทับ)		% การตายในไก่กลุ่มควบคุม (จำนวนไก่ที่ตาย/จำนวนไก่ที่ฉีดพิษทับ)	% ความคุ้มโรคในไก่กลุ่มที่ให้วัคซีน (จำนวนไก่ที่รอด/จำนวนไก่ที่ฉีดพิษทับ)		%การตายในไก่กลุ่มควบคุม (จำนวนไก่ที่ตาย/จำนวนไก่ที่ฉีดพิษทับ)
	กลุ่มที่ 1[1]	กลุ่มที่ 2[2]	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4[1]	กลุ่มที่ 5[2]	กลุ่มที่ 6
51/47	35%(7/20)	80%(16/20)	100%(10/10)	5%(1/20)	15%(3/20)	100%(10/10)
71/47	65%(13/20)	90%(18/20)	100%(10/10)	10%(2/20)	15%(3/20)	100%(10/10)
72/47	25%(5/20)	85%(17/20)	100%(10/10)	0%(0/20)	10%(2/20)	100%(10/10)
25/48	45%(9/20)	85%(17/20)	100%(10/10)	5%(1/20)	10%(2/20)	100%(10/10)
26/48	50%(10/20)	80%(16/20)	100%(10/10)	5%(1/20)	20%(4/20)	100%(10/10)

[1] ให้วัคซีนครั้งเดียว

[2] ให้วัคซีนสองครั้ง

Studies on potency of inactivated fowl cholera vaccine in native chicken and broiler chicken

Phadungwit Rakthong[1] Phawasuth Chankarchang[1] Jarunee Satra[1]

Abstract

Five batches of inactivated fowl cholera vaccine were tested for potency in native and broiler chickens, aged 4 weeks. Each breed was divided in three groups. Group I and II comprising of twenty native chickens each were intramuscularly vaccinated with one dose; group I received once vaccination and group II received twice vaccination, the second vaccination received at 6 weeks of age. Group III comprising of ten native chickens was not vaccinated and served as control group. Group IV and V comprising of twenty broiler chickens each were intramuscularly vaccinated with one dose; group IV received one vaccination and group V received two vaccinations, the second vaccination received at 6 weeks of age. Group VI comprising of ten broiler chickens was not vaccinated and served as control group. Two weeks after the final vaccination, all groups were challenged with *Pasteurella multocida* serotype 8: A at the amount of 100 LD_{50}. It was found that five batches of inactivated fowl cholera vaccine could enhance the protection in native chicken received one vaccination. The protections were 35%, 65%, 25%, 45% and 50% respectively. In native chicken received two vaccinations, the protections were 80%, 90%, 85%, 85% and 80% respectively. In broiler chicken received one vaccination the protections were 5%, 10%, 0%, 5% and 5% respectively. In broiler chicken received two vaccinations, the protections were 15%, 15%, 10%, 10% and 20% respectively, whereas mortality rate of both control groups was 100%. The results showed that the two vaccinations with inactivated fowl cholera vaccine in native chickens could protect them against *P. multocida* serotype 8: A whereas either one or two vaccination in broiler chicken could not protect them against *P. multocida* serotype 8: A.

Key words: Fowl cholera vaccine, Inactivated, Potency test, Native chicken, Broiler chicken

---

[1]Veterinary Biologics Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา[1] รังสรรค์ รักษกุลวิทยา[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาประเมินประสิทธิภาพของวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยใช้แอนติเจนที่สกัดด้วยความร้อนในสภาพทำแห้ง (freeze-dried heat extract antigen) ทดสอบกับซีรั่มโคจำนวน 60 ตัวอย่าง ที่ทราบผลความคุ้มโรคด้วยวิธี passive mouse protection test ในหนูขาว เป็นซีรั่มจากโคที่มีความคุ้มโรค 40 ตัวอย่าง และโคไม่มีความคุ้มโรค 20 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณความเข้มข้นโปรตีนของแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเท่ากับ 10 μg/ml ประเมินประสิทธิภาพของวิธี ELISA ในการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในซีรั่มโคที่เจือจางเป็นลำดับขั้น ได้ค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องเป็นร้อยละ 92.50, 90.00 และ 91.67 ตามลำดับ ผลทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยทดสอบตัวอย่างเดียวกันซ้ำ จำนวน 20 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.564 ± 0.028 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 0.90% แสดงว่าความแม่นยำของวิธีสูง เพราะผลทดสอบในแต่ละครั้งให้ค่าใกล้เคียงกันมาก เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนสภาพทำแห้งและแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบัน พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้น สามารถใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งแทนแอนติเจนที่ใช้ปัจจุบัน ทำให้ง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง

คำสำคัญ: แอนติเจนในสภาพทำแห้ง ภูมิคุ้มกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบสูง อ่านผลง่าย มีความแน่นอนและสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก (Johnson et al., 1989; Natalia et al., 1993; Chandrasekaran et al., 1994) รวมทั้งตรวจสอบความคุ้มโรคของฝูงสัตว์และประเมินประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนในท้องที่แทนวิธี passive mouse protection test (PMPT) (Natalia et al., 1993; Neramitmansook et al., 1993) ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียโดยใช้แอนติเจนที่สกัดด้วยความร้อน (heat extract antigen) เตรียมจากเชื้อ *P. multocida* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำมาล้างเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C นาน 1 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 *g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เก็บส่วนใสเติมสารคงสภาพ (sodium azide) ก่อนนำไปใช้งานต่อไป (นิตยา และรัชนี, 2543) เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบันอยู่ในรูปสารละลาย ยากต่อการเก็บรักษาและการขนส่งไปสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย จึงศึกษาพัฒนาแอนติเจนในสภาพทำแห้ง (freeze-dried) เพื่อสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา และยังเป็นแนวทางการพัฒนาชุดทดสอบภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียสำเร็จรูปต่อไป

การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาการใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งสำหรับตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียโดยเปรียบเทียบคุณภาพและคุณสมบัติกับแอนติเจนที่ใช้ปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

ซีรั่ม

ซีรั่มจำนวน 60 ตัวอย่าง จากโคที่มีประวัติได้รับการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาวด้วยวิธี PMPT (รัชนี และคณะ, 2538) เป็นซีรั่มจากโคมีความคุ้มโรค 40 ตัวอย่าง และไม่มีความคุ้มโรค 20 ตัวอย่าง

Positive control serum เป็น antiserum ที่เก็บรวบรวมจากโคที่ฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 ml หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ฉีดด้วยเชื้อ *P. multocida* จำนวน 10^8 CFU ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้โคที่ไม่ได้รับวัคซีนตาย ภายใน 24 ชั่วโมง เจาะเลือดหลังฉีดเชื้อพิษ 2 สัปดาห์ เก็บซีรั่มใช้เป็น positive control

Negative control serum เป็นซีรั่มรวมจากโคที่ไม่เคยเป็นโรค ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อนและไม่มีความคุ้มโรคเมื่อทดสอบในหนูขาวด้วยวิธี PMPT

การเตรียมแอนติเจนในสภาพทำแห้ง และ การทดสอบแยก positive และ negative serum

เตรียมแอนติเจนตามวิธีของ Heddleston et al. (1972) โดยละลายเชื้อ *P. multocida* B: 2, 5 ที่เก็บในสภาพทำแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (dextrose starch agar) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชม. เลือกโคโลนีที่เหมาะสมเพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (tryptose phosphate broth) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชม.

หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชม. ล้างเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.15 M PBS (pH 7.2) ต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C นาน 1 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 *g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เก็บส่วนใส และผสม 5% skim milk อัตราส่วน 1:1 แบ่งส่วนผสมใส่ขวดแก้วใส ขวดละ 2 ml เก็บในตู้แช่แข็งที่ -40°C นาน 18 ชม. นำเข้าเครื่องดูดแห้งเพื่อเก็บแอนติเจนในสภาพทำแห้ง ตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951) แล้วนำไปหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเคลือบเพลตด้วยการทำ chequerboard titration ตามวิธีดัดแปลงจาก Voller et al. (1976) โดยเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนในสภาพทำแห้งที่มีระดับความเข้มข้นโปรตีน 10, 20, 40, 80 และ 160 μg/ml และนำมาทำปฏิกิริยากับ positive และ negative serum ที่ทำให้เจือจางแบบ serial two-fold dilution ตั้งแต่ 1:40 จนถึง 1:1280

เปรียบเทียบการใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งและแอนติเจนที่ใช้ปัจจุบันในการตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

ตรวจซีรั่มด้วยวิธี ELISA ตามวิธีของ นิตยา และรัชนี (2543) โดยละลายแอนติเจนในสภาพทำแห้งด้วย coating buffer (0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) ปริมาตร 1 ml จากนั้นเจือจางแอนติเจนในสภาพทำแห้งและแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบันด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้นโปรตีนเป็น 10, 20, 40, 80 และ 160 μg/ml ตามลำดับ เติมลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตชนิดก้นแบน[1] หลุมละ 100 μl เก็บในกล่องที่มีความชื้นที่ 4°C นาน 1 คืน ล้างเพลต 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.15 M PBS + 0.05% Tween 20 (PBST) เติมสารละลาย 0.5% gelatin ใน PBST หลุมละ 200 μl อบที่ 37°C นาน 1 ชม. ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรก เติมตัวอย่างซีรั่มโคที่เจือจางแบบ serial two-fold dilution ตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:5120 อบที่ 37°C นาน 1 ชม. ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรก เติม horseradish peroxidase rabbit anti-bovine IgG[2] เจือจาง 1:7000 ด้วย 0.5% gelatin ใน PBST หลุมละ 100 μl อบที่ 37°C นาน 1 ชม. ล้างเพลตเช่นเดียวกับครั้งแรกแล้วเติม tetramethyl benzidine substrate[3] หลุมละ 100 μl อบที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N H_2SO_4 หลุมละ 25 μl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (OD_{450}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อ่านค่าไตเตอร์ของซีรั่มที่ความเจือจางสุดท้ายที่มีค่า OD_{450} มากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่าของ OD_{450} ของซีรั่มรวมของโคที่ไม่มีความคุ้มโรค (negative control serum) แต่ละตัวอย่างทำ duplicate ในเพลตเดียวกันและทุกเพลตมี positive control serum และ negative control serum

การทดสอบความแม่นยำ (precision)

ทดสอบตัวอย่างซีรั่มโค 1 ตัวอย่างซ้ำจำนวน 20 ครั้ง เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธี (เติมศรี, 2541)

การคำนวณประสิทธิภาพของวิธี ELISA

ประเมินประสิทธิภาพของวิธี ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในซีรั่มโคที่เจือจางเป็นลำดับขั้น โดยใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้ง คำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy) (ทัสสนี, 2541) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้ง

---

[1] Nunc, USA [2] Sigma, Germany [3] KPL, USA

และแอนติเจนที่ใช้ปัจจุบันในการทดสอบ โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) (เติมศรี, 2541)

ผล

เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนในสภาพทำแห้งสำหรับการตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA โดยเตรียมแอนติเจนระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 20, 40, 80 และ 160 μg/ml ทำปฏิกิริยากับซีรั่มเจือจางแบบ serial two-fold dilution ตั้งแต่ 1:40 ถึง 1:1280 พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นแอนติเจนให้ผลทดสอบแตกต่างชัดเจนระหว่าง positive และ negative serum จึงเลือกใช้ความเข้มข้นแอนติเจนที่ 10 μg/ml ในการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 1) การทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยทดสอบซีรั่มจำนวน 1 ตัวอย่าง ซ้ำ 20 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD เท่ากับ 1.564 ± 0.028 ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.90 (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA ในซีรั่มโคทั้ง 60 ตัวอย่าง โดยใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้ง พบว่า ซีรั่มโคที่มีความคุ้มโรคจำนวน 40 ตัวอย่าง มีการกระจายตัวของไตเตอร์ตั้งแต่ 1:160 ถึง 1:2560 ส่วนซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรคจำนวน 20 ตัวอย่าง มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:640 (ภาพที่ 2) เมื่อทดสอบระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้ง พบว่า ซีรั่มโคที่มีความคุ้มโรค จำนวน 40 ตัวอย่าง และซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD เท่ากับ 1.706 ± 0.378 และ 0.346 ± 0.148 ตามลำดับ เมื่อทดสอบโดยใช้แอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบัน ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD เท่ากับ 1.600 ± 0.358 และ 0.251± 0.420 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ประเมินประสิทธิภาพของวิธีโดยใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้ง คำนวณค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของวิธี เป็นร้อยละ 92.50, 90.00 และ 91.67 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA โดยเปรียบเทียบแอนติเจน 2 ชนิดคือ แอนติเจนในสภาพทำแห้งและแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบัน พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน ผลทดสอบเมื่อใช้ ซีรั่มโคที่มีความคุ้มโรค จำนวน 40 ตัวอย่าง ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบันและแอนติเจนในสภาพทำแห้ง ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD เท่ากับ 1.600 ± 0.358 และ 1.706 ± 0.378 ตามลำดับ และเมื่อใช้ซีรั่มโคที่ไม่มีความคุ้มโรค จำนวน 20 ตัวอย่างทดสอบ ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD เท่ากับ 0.251± 0.420 และ 0.346 ± 0.148 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) การทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยทำการทดสอบซีรั่มจำนวน 1 ตัวอย่างซ้ำ 20 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ย OD ± 2SD

เท่ากับ 1.564 ± 0.028 ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ร้อยละ 0.90 (ตารางที่ 2) แสดงว่าความแม่นยำของวิธีสูง เพราะค่าที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทดสอบใกล้เคียงกันมาก (เติมศรี, 2541)

ประสิทธิภาพของวิธี ELISA เมื่อใช้แอนติเจนสภาพทำแห้งในการทดสอบ คำนวณค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบเป็นร้อยละ 92.50, 90.00 และ 91.67 ตามลำดับ ที่จุดตัด 1:320 มีความผิดพลาดให้ผลบวกเท็จ 10 % และผลลบเท็จ 7.50 % (ตารางที่ 3) ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้แอนติเจนในปัจจุบันทดสอบ โดยค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของวิธี เป็นร้อยละ 90.2, 84.21 และ 88.87 ตามลำดับ ที่จุดตัด 1:320 (นิตยา และรัชนี, 2543) ดังนั้นสามารถใช้แอนติเจนในสภาพทำแห้งแทนแอนติเจนที่ใช้ในปัจจุบันได้ ทำให้ง่ายต่อการเก็บรักษาและสะดวกในการขนส่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. รัชนี อัตถิ สำหรับคำแนะนำ และนางนิตยา รักศรี ที่ให้ความช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

เติมศรี ชำนิจารกิจ. 2541. การใช้สถิติในการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการ. ใน: สถิติในวิจัยทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 2 ทัสสนี นุชประยูร และเติมศรี ชำนิจารกิจ บรรณาธิการ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 257-295.

ทัสสนี นุชประยูร. 2541. หลักการ และการพิจารณาใช้การตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคและการตรวจคัดกรองโรค. ใน: สถิติในวิจัยทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 2 ทัสสนี นุชประยูร และเติมศรี ชำนิจารกิจ บรรณาธิการ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 297-313.

นิตยา รักศรี และรัชนี อัตถิ. 2543. การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมราฮิกเซพติซีเมียในโค ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ heat extract antigen. สัตวแพทยสาร. 51(1-2): 1-9.

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

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

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

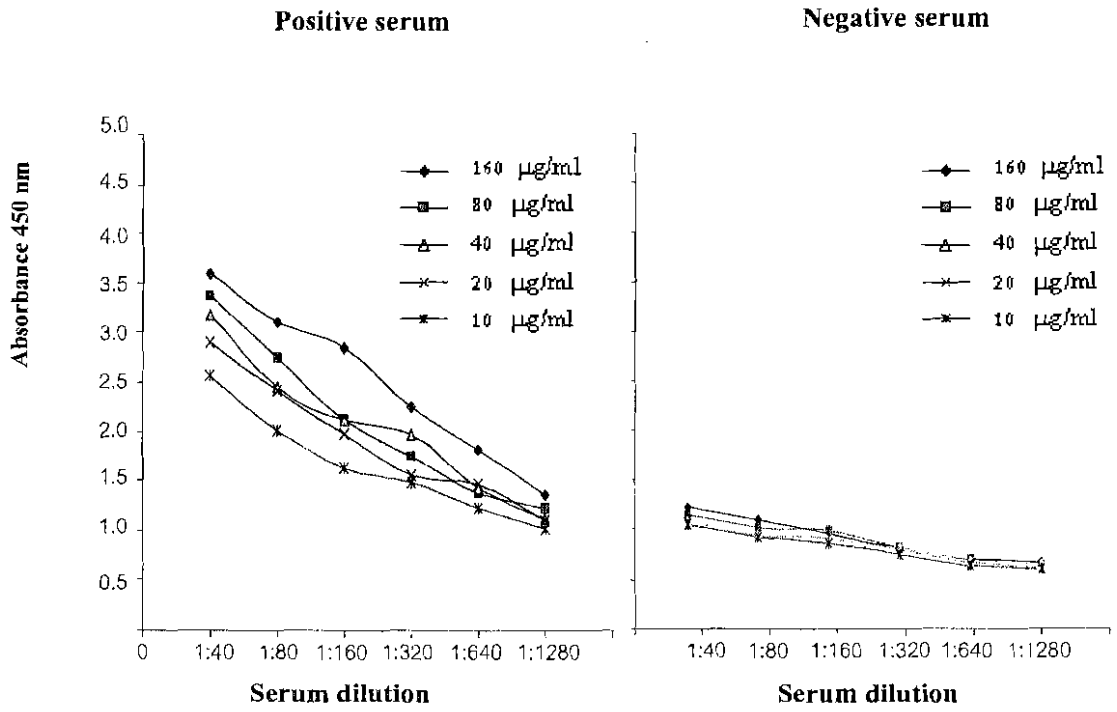
Johnson, R.B., Dawkins, H.J.L., Spencer, T.L., Saharee, A.A., Bahaman, A.R., Ramdani, and Patten, B.E. 1989. Evaluation of bovine antibody responses to haemorrhagic septicaemia vaccine. Res. Vet. Sci. 47: 277-279.

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

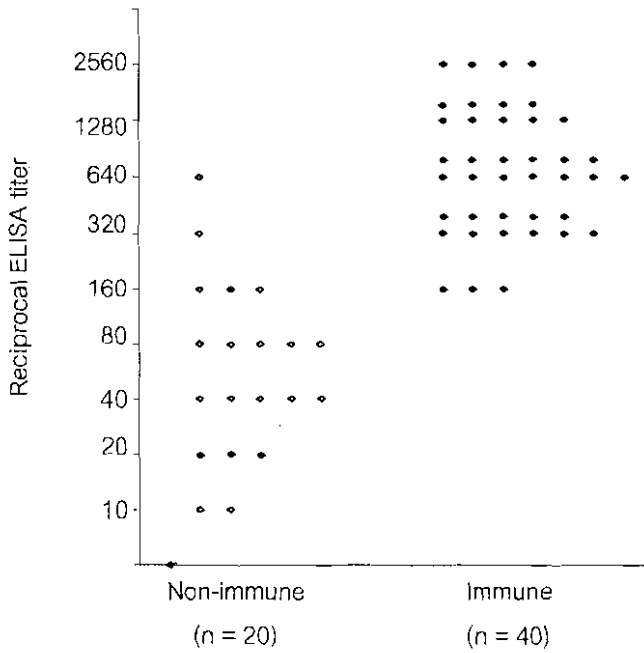
Natalia, L., Patten, B. and Syamsudin, A. 1993. Evaluation of bovine antibody responses to haemorrhagic septicaemia vaccine using ELISA and PMPT. In: Pasteurellosis in production animals. B.E. Patten, T.L. Spencer, R.B. Johnson, D. Hoffmann and L. Lehane, ed. ACIAR Proceedings No. 43. pp. 219-223.

Neramitmansook, P., Neramitmansook, W. and Carter, G.R. 1993. Comparison of enzyme-linked Immunosorbent assay and a passive mouse protection test for measuring protective antibodies against *Pasteurella multocida* serotype B in cattle and buffaloes. In: Pasteurellosis in production animals. B.E. Patten, T.L. Spencer, R.B. Johnson, D. Hoffmann and L. Lehane, ed. ACIAR Proceedings No. 43. pp 224-225.

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



ภาพที่ 1 ค่า OD ของ positive และ negative control serum เมื่อทดสอบกับแอนติเจนในสภาพทำแห้งที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี ELISA



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียจากซีรั่มโค กลุ่มที่มีความคุ้มโรค (immune) จำนวน 40 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ไม่มีความคุ้มโรค (non immune) 20 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรั่มโคที่มีความคุ้มโรคและไม่มีความคุ้มโรค เมื่อทดสอบโดยเปรียบเทียบการใช้แอนติเจนที่ใช้ปัจจุบันและแอนติเจนในสภาพทำแห้ง

ซีรั่ม	จำนวนตัวอย่าง	แอนติเจนที่ใช้ปัจจุบัน (Mean ± 2SD)	แอนติเจนในสภาพทำแห้ง (Mean ± 2SD)
โคที่มีความคุ้มโรค	40	1.600 ± 0.358	1.706 ± 0.378
โคที่ไม่มีความคุ้มโรค	20	0.251 ± 0.420	0.346 ± 0.148

ตารางที่ 2 ทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ

จำนวนครั้งที่ทดสอบ	Mean± 2SD	% CV
20	1.564 ± 0.028	0.90

ตารางที่ 3 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ

ผลการทดสอบ	ซีรั่มโค		รวม
	มีความคุ้มโรค	ไม่มีความคุ้มโรค	
ให้ผลบวก	37 (a)	2 (b)	39
ให้ผลลบ	3 (c)	18 (d)	21
รวม	40 (a+c)	20 (b+d)	60

ค่าความไว	a / (a+c) x 100	=	92.50 %
ค่าความจำเพาะ	d / (b+d) x 100	=	90.00 %
ค่าความถูกต้อง	(a+d) / (a+c) + (b+d) x 100	=	91.67 %
ผลบวกเท็จ	b / (b+d) x 100	=	10.00 %
ผลลบเท็จ	c / (a+c) x 100	=	7.50 %

Use of lyophilized heat extract antigen for detecting antibody to haemorrhagic septicaemia

Wiwat Chaichanasiriwithaya[1] Rangsan Ruksakulwithaya[1]

Abstract

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using lyophilized heat extract antigen as the coating antigen was standardized for the detection of bovine antibody against haemorrhagic septicaemia (HS). Serum samples, collected from sixty vaccinated cattle and tested for immunity against HS by passive mouse protection test, were forty immune sera and twenty non-immune sera. The optimal protein concentration of the lyophilized heat extract antigen that showed clear difference between positive and negative control sera used in this study was 10 μg/ml. The precision of the test revealed mean ± 2SD being 1.564 ± 0.028 with 0.90 % CV, indicating that the test has high precision. Evaluation of the test validity showed that the sensitivity, specificity and accuracy of the test were 92.50 %, 90.00 % and 91.67 %, respectively. Comparison of ELISA results using lyophilized heat extract antigen and heat extract antigen in detecting bovine antibody against HS showed no statistically significant difference ($p>0.05$). Thus the lyophilized heat extract antigen prepared as described in this study can be used as the coating antigen for ELISA testing of bovine antibody against HS. This will benefit concerned parties in production, transportation and storage of the antigen for HS-antibody ELISA.

Key words: Lyophilized heat extract antigen, Haemorrhagic septicaemia antibody

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

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ ความขุ่น น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ PCV ในแบลคเลกบรอทแบคเทอริน

รังสรรค์ รักษกุลวิทยา[1] วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา[1]

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น (Optical density, OD) ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) เปอร์เซ็นต์ packed cell volume (% PCV) ในแบลคเลกบรอทแบคเทอริน โดยเตรียมตัวอย่าง บรอทแบคเทอรินจำนวน 20 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 1x 10^8 ถึง 20 x 10^8 เซลล์/มล. วัดค่าความขุ่น ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วัดความเข้มข้นเป็น % PCV ด้วยหลอด Hopkins ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 *g* นาน 75 นาที หาน้ำหนักแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 90 °ซ. นาน 3 วัน เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น ค่าน้ำหนักแห้ง และ ค่า % PCV พบว่าค่าต่างๆ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression, r^2) โดยมีค่า r^2 ใกล้เคียง 1 แสดงความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรงในทางเดียวกัน สามารถนำกราฟเหล่านี้ไปใช้ปรับปริมาณเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนแบลคเลกได้ เมื่อทราบค่า OD หรือ % PCV หรือค่าน้ำหนักแห้ง อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นการลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน รวมถึงเป็นแนวทางในการวางแผนปรับปรุงกระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลก และกำหนดเป็นมาตรฐานการผลิตวัคซีนแบลคเลกต่อไป

คำสำคัญ: แบลคเลกบรอทแบคเทอริน ความขุ่น packed cell volume น้ำหนักแห้ง

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

กระบวนการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์ที่มีคุณภาพ ปริมาณเชื้อหรือแอนติเจนของวัคซีนแต่ละชุดต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (Office International des Epizooties, OIE, 2000) เนื่องจากปริมาณแอนติเจนมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรค ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนเชื้อเป็น (Layton and Sandhy, 1984) หรือเป็นวัคซีนเชื้อตาย (Layton, 1984) วิธีการหาปริมาณแบคทีเรียเชื้อตายที่เชื่อถือได้ และเป็นที่ยอมรับทั่วไปตามหลักจุลชีววิทยา ได้แก่การหาค่าน้ำหนักแห้ง การหาค่าเปอร์เซ็นต์ packed cell volume (% PCV) การวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) ซึ่งเป็นการวัดโดยทางอ้อม และการนับจำนวนเชื้อโดยตรงวิธี total cell count โดยใช้สไลด์สำหรับนับเชื้อแบคทีเรีย (Petroff Hauser counting chamber) (Collins and Lyne, 1970) ปัจจุบันวัคซีนแบลคเลก ซึ่งผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนแบคทีเรียเชื้อตายเตรียมจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* เพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 20-22 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน คำนวณหาปริมาณเชื้อด้วยวิธีวัดค่า % PCV โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 *g* นาน 75 นาที แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ตามตำรับเพื่อผลิตเป็นวัคซีนต่อไป ซึ่งการวัดค่า % PCV ต้องใช้เวลานาน การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อในแบลคเลกบรอทแบคเทอริน โดยวิธีหาค่าความขุ่น ค่าน้ำหนักแห้ง ค่า % PCV สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น ค่าน้ำหนักแห้ง และค่า % PCV สำหรับประมาณการหรือคาดคะเนปริมาณเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนแบลคเลก เพื่อลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน รวมถึงเป็นแนวทางในการวางแผนปรับปรุงกระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลก และกำหนดเป็นมาตรฐานการผลิตวัคซีนแบลคเลกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมบรอทแบคเทอริน

เพาะเลี้ยง *Clostridium chauvoei* สายพันธุ์ท้องถิ่นในหลอดทดลอง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth ในสภาพไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 20 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในเฟอร์เมนเตอร์[1] ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37° ซ. pH 7.2 ความเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที นาน 20 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลิน 0.5% โดยปริมาตรเพื่อฆ่าเชื้อ หลังจากนั้น 2 ชั่วโมง เก็บเชื้อเพื่อทำการศึกษาต่อไป

การหาปริมาณเชื้อโดยวิธี total cell count

นำตัวอย่างบรอทแบคเทอริน เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนผสม 5 µl ถ่ายลงสไลด์นับเชื้อแบคทีเรีย คำนวณปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร ดังนี้

---

[1]B. Braun, Germany

ปริมาณเชื้อที่นับได้ใน 5 ช่อง = X เซลล์

ปริมาตร 5 ช่องที่ใช้นับ = (1/5 x 1/5 x 1/50) x 5 มล.

= 1/250 มล.

ปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่ตรวจ = $X \times 25x10^4$ x dilution factor เซลล์/มล.

เจือจางแบลคเลกบรอทแบคเทอรินให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งแต่ $1x10^8$, $2x10^8$ ถึง $20x10^8$ เซลล์/มล. รวม 20 ตัวอย่างๆ ละ 10 มล. เพื่อศึกษาความขุ่น น้ำหนักแห้ง และ % PCV ต่อไป

การวัดค่าความขุ่น

นำตัวอย่างส่วนผสมของแบลคเลกบรอทแบคเทอรินที่เจือจางแล้วตามข้อ 2 ตัวอย่างละ 1 มล. ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

การหา % PCV

นำตัวอย่างส่วนผสมของแบลคเลกบรอทแบคเทอรินที่เจือจางแล้วตามข้อ 2 ตัวอย่างละ 5 มล. ใส่หลอด Hopkins ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 *g* นาน 75 นาที อ่านปริมาณเชื้อที่ตกตะกอน คำนวณค่า % PCV ใน 1 มล.

การหาค่าน้ำหนักแห้ง

นำตัวอย่างส่วนผสมของแบลคเลกบรอทแบคเทอรินที่เจือจางแล้วตามข้อ 2 ตัวอย่างละ 1 มล. ใส่ลงในกระทงฟอล์ยที่ชั่งน้ำหนักกระทงเปล่าไว้แล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 90° ซ. ใน hot air oven นาน 3 วัน ชั่งน้ำหนัก หักน้ำหนักกระทงเปล่าออกจากน้ำหนักที่ชั่งได้

การวิเคราะห์ทางสถิติ

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นกับค่าน้ำหนักแห้ง และค่า % PCV และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งกับ % PCV หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression, r^2) และวิเคราะห์ทางสถิติ

ผล

เมื่อนำตัวอย่างแบลคเลกบรอทแบคเทอรินที่เจือจางให้มีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 1×10^8 ถึง 20×10^8 เซลล์/มล. จำนวน 20 ตัวอย่าง วัดค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง พบว่า ค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณเชื้อจาก 1.23 จนถึง 19.89 ค่า % PCV เพิ่มจาก 0.20 จนถึง 4.00 และน้ำหนักแห้งเพิ่มจาก 1×10^3 มก./มล. เป็น 8.64×10^3 มก./มล. (ตารางที่ 1) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกันของปริมาณเชื้อ ค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่า

ความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง ค่า r^2 เท่ากับ 0.9955, 0.9990 และ 0.9936 ตามลำดับ (รูปที่ 1) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นกับ % PCV และน้ำหนักแห้ง ค่า r^2 เท่ากับ 0.9951 และ 0.9937 ตามลำดับ (รูปที่ 2) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งกับ % PCV ค่า r^2 เท่ากับ 0.9938 (รูปที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

จากการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้งในตัวอย่างแบลคเลกบรอทแบคเทอรินที่เจือจางให้มีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 1×10^8 ถึง 20×10^8 เซลล์/มล. พบว่าค่าต่างๆ แปรผันตามปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกับค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง รวมทั้งกราฟระหว่างค่าความขุ่นกับค่า % PCV ค่าความขุ่นกับน้ำหนักแห้ง และค่าน้ำหนักแห้งกับ % PCV พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง แต่ละกราฟให้ค่า r^2 ใกล้เคียงกับ 1 แสดงว่า การหาปริมาณเชื้อด้วยวิธีต่างๆ มีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรงในทางเดียวกัน (เติมศรี, 2541)

ดังนั้นสามารถใช้กราฟความสัมพันธ์เหล่านี้ในการประมาณหรือคาดคะเนปริมาณเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนแบลคเลก เมื่อทราบค่าความขุ่น หรือ ค่า % PCV หรือค่าน้ำหนักแห้ง อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งการใช้ค่าความขุ่นเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก หากนำมาแทนวิธีวัดค่า % PCV ที่ใช้ปัจจุบันจะเป็นการลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน ประหยัดเวลาและมีความถูกต้องมากขึ้น รวมถึงเป็นแนวทางในการวางแผนปรับปรุงกระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลกเพื่อลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานและกำหนดเป็นมาตรฐานการผลิตวัคซีนแบลคเลกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เติมศรี ชำนิจารกิจ. 2541. การใช้สถิติในการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการ. ใน: สถิติในวิจัยทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 2 ทัสสนี นุชประยูร และเติมศรี ชำนิจารกิจ บรรณาธิการ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 257-295.

Collins, C.H. and Lyne, P.M. 1970. Microbiological. In: Laboratory techniques series, 3rd ed. Butterworth and Co. (Publisher) Ltd. London. p. 454.

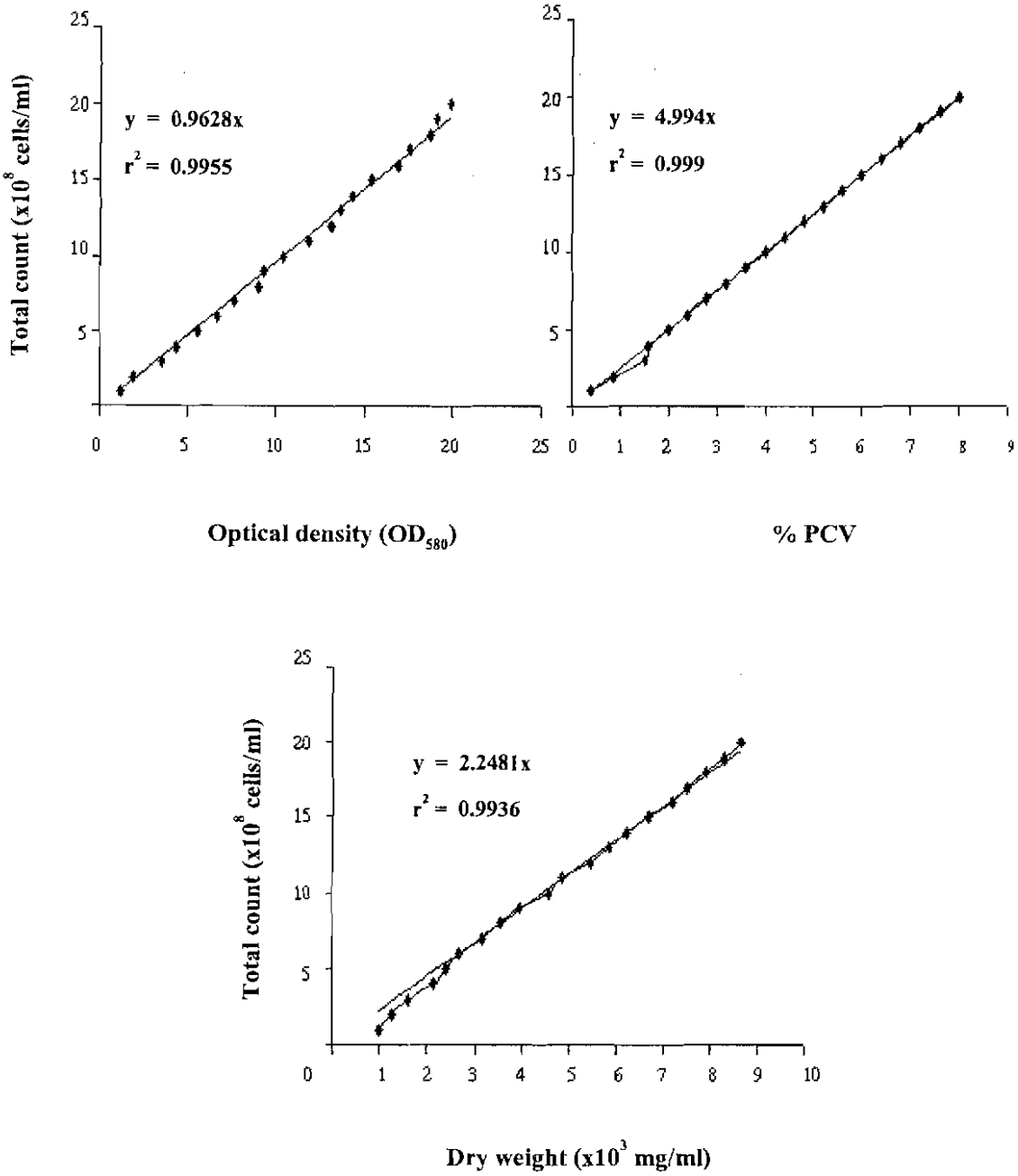
Layton, H.W. 1984. Efficacy of broth-grown *Pasteurella multocida* bacterins in duckling. Avian Dis. 28: 1086-1095.

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

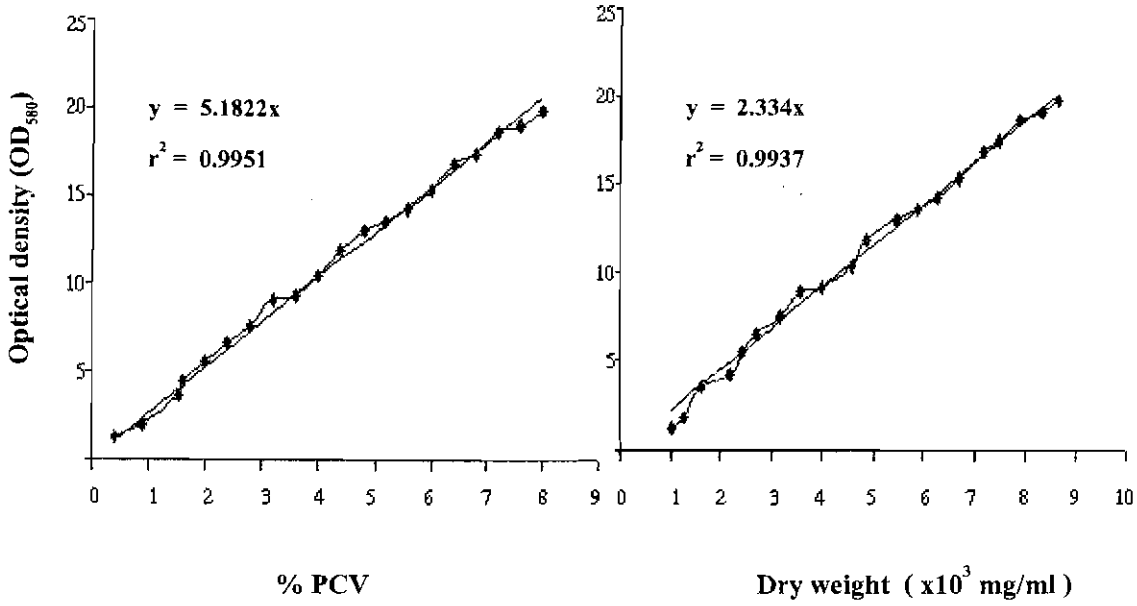
Office International des Epizooties. 2000. Principles of veterinary vaccine production. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. pp. 42-52.

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *Clostridium chauvoei* ค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง

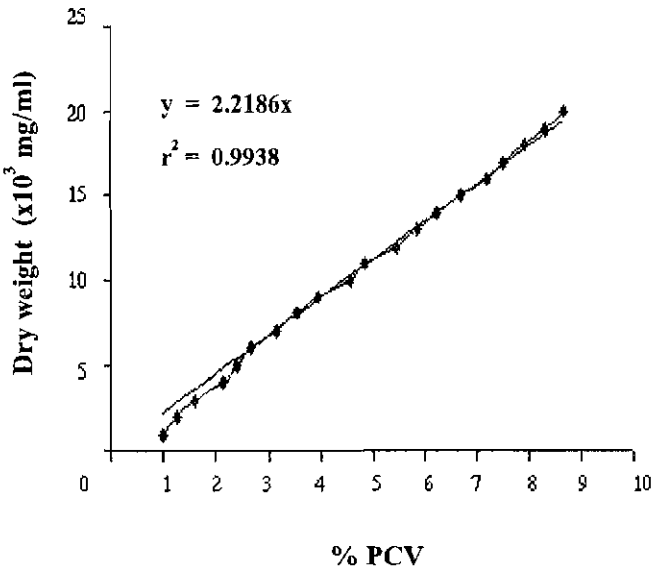
ปริมาณเชื้อ ($\times 10^8$ เซลล์/มล.)	ค่าความขุ่น (OD_{580})	ค่า % PCV	ค่าน้ำหนักแห้ง ($\times 10^3$ มก./มล.)
1	1.23	0.20	1.00
2	1.91	0.44	1.25
3	3.56	0.76	1.60
4	4.37	0.80	2.15
5	5.56	1.00	2.42
6	6.68	1.20	2.67
7	7.64	1.40	3.18
8	8.97	1.60	3.56
9	9.26	1.80	3.97
10	10.42	2.00	4.58
11	11.89	2.20	4.87
12	13.13	2.40	5.45
13	13.68	2.60	5.86
14	14.34	2.80	6.24
15	15.41	3.00	6.69
16	16.89	3.20	7.18
17	17.52	3.40	7.47
18	18.71	3.60	7.89
19	19.12	3.80	8.31
20	19.89	4.00	8.64



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *Clostridium chauvoei* กับค่าความขุ่น ค่า % PCV และค่าน้ำหนักแห้ง



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่น กับค่า % PCV และ ค่าน้ำหนักแห้งของเชื้อ *Clostridium chauvoei*



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้ง กับ ค่า % PCV ของเชื้อ *Clostridium chauvoei*

Study of relationship among bacterial cell count, dry weight, OD and percent PCV in blackleg broth bacterin

Rangsan Rugskulvithaya[1] Wiwat Chaichanasiriwithaya[1]

Abstract

Relationship among bacterial cell count, dry weight, optical density (OD) and percent packed cell volume (% PCV) was studied. Twenty dilutions of *Clostridium chauvoei* culture starting from 1 x 10^8 to 20 x 10^5 cells/ml were measured with a spectrophotometer for turbidity and read as OD values. Each preparation was studied further for % PCV by centrifugation at 1,000 *g* for 75 min in Hopkins tubes and dry weight by incubating at 90° C for 3 days. Construction of curves among bacterial cell count, dry weight, OD and % PCV showed a linear regression, r^2, close to 1, meaning that they had a positive relationship. These curves facilitate the estimation of bacterial cells in Blackleg vaccine production process if a value of OD or dry weight or % PCV is known.

Key words: Blackleg broth bacterin, Optical density, Packed cell volume, Dry weight

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

ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่อง

อนันต์ ท้าวเพชร[1] สุรพัฒน์ เลาหวณิช[1]

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous culture) โดยเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 ลิตรในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อ 24 ลิตร เหลือเชื้อไว้ปริมาณ 1 ลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 24 ลิตรเข้าไปเลี้ยงเชื้อต่ออีก จนถึงชั่วโมงที่ 72 เก็บเชื้อ และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เช่นเดิม เลี้ยงเชื้อต่ออีกจนถึงชั่วโมงที่ 96 เก็บเชื้อทั้งหมด ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง มาตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์ packed cell volume (% PCV) พบว่าจะได้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 3.6% หลังการเลี้ยงเชื้อชั่วโมงที่ 38 ชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 นำเชื้อจากการเก็บชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 และเชื้อจากการนำทั้งสามตัวอย่างรวมกัน เตรียมเป็นแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก และแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) กับซีรั่มเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตโดยเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (batch culture) พบว่าคุณภาพของแอนติเจนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียวและกึ่งต่อเนื่องเท่าเทียมกัน

คำสำคัญ: *Brucella abortus* strain 1119-3 % PCV การเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่อง

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก และแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ตามวิธีมาตรฐานของ Office International des Epizooties, OIE, (2000) สำหรับใช้ทดสอบกับซีรั่มโค กระบือ เพื่อวินิจฉัยโรคแท้งติดต่อที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Brucella abortus* โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบคราวเดียว (batch culture) ซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่เชื้อที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก (สมใจ, 2545) การผลิตแอนติเจนบรูเซลล่า ใช้เวลาในการเตรียม seed สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ 8 วัน และเลี้ยงเชื้อในถังนาน 48 ชั่วโมงต่อชุด ซึ่งในการเลี้ยงแต่ละครั้งได้แอนติเจนปริมาณน้อย ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงเชื้อหลายๆ ชุด เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติเจนเพียงพอสำหรับการผลิต 1 ชุดบรรจุ และในการเลี้ยงแต่ละชุดจำเป็นต้องเตรียม seed ใหม่ และเตรียมถังเลี้ยงเชื้อให้ปราศจากเชื้อ (sterile) ทุกครั้ง

การทดลองนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งคล้ายการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture แต่เมื่อความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในระดับที่ต้องการแล้ว เก็บเชื้อประมาณ 24/25 แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเท่าเดิม โดยมีเชื้อปริมาณ 1/25 ที่เหลือเป็นเชื้อเริ่มต้น วิธีการนี้นิยมกับการศึกษาจุลินทรีย์โดยไม่จำเป็นต้องเตรียม seed และถังเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้ง (บุษบา, 2540) ซึ่งเป็นการประหยัดพลังงาน แรงงานและเวลา

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของแอนติเจนที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว และแบบกึ่งต่อเนื่อง ผลการทดลองที่ได้จะนำไปปรับปรุงกระบวนการผลิตแอนติเจนให้ต่อเนื่อง และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม working seed สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ละลาย seed เชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในรูปทำแห้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 6.4 เพาะบน dextrose starch agar 37^{O} ซ. เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อใน tryptose broth อีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงเลี้ยงต่อบน tryptose agar ใน Roux bottle อีก 48 ชั่วโมง จึงจะได้ working seed เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมโดยการละลาย tryptose[1] 750 กรัม yeast extract[1] 250 กรัม Na_2HPO_4[2] 83 กรัม NaH_2PO_4[1] 225 กรัม antifoam[3] 5 มล. และdextrose[4] 750 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 25 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.4 ในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร[5] แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121^{O} ซ. นาน 15 นาที ปรับเครื่องให้ควบคุมอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้ 37^{O} ซ.

---

[1]Lab M, UK [2]Sigma, USA [3]Km 72,Shin Etsu, Japan [4]BDH, UK [5]New Brunswick Scientific, USA

การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเก็บตัวอย่าง

นำ working seed 1 x 10^{12} เซลล์/มล. ปริมาตร 120 มล. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 ลิตร นาน 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อปริมาณ 24 ลิตร เหลือเชื้อไว้ 1 ลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 ลิตร เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 72 เก็บเชื้อ 24 ลิตร เหลือเชื้อไว้ 1 ลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อต่อจนถึงชั่วโมงที่ 96 เก็บเชื้อทั้งหมด ในระหว่างการเลี้ยงเติมอากาศเข้าถังปริมาณ 8 ลิตร/นาที ควบคุมอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่ 37^{o}ซ. ความเร็วรอบการหมุนของใบพัดเท่ากับ 300 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มล. ทุก 2 ชั่วโมงเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อ (% packed cell volume; % PCV) ด้วย Fitch Hopkins tube (Alton et al., 1988) โดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 2,800 g นาน 75 นาที

การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อที่เก็บชั่วโมงที่ 48, 72 และ96 ไปปั่นเพื่อแยกเชื้อที่ความแรง 2,800 g นาน 90 นาที และปั่นล้างด้วย 0.5% phenol saline solution 2 ครั้ง inactivate เชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95^{o} ซ. นาน 60 นาที นำเชื้อที่เก็บในชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และเชื้อจากการนำสามตัวอย่างรวมกัน เตรียมเป็นแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก และแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว นำไปทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับตัวอย่างซีรั่มจำนวน 8 ตัวอย่าง นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบคุณภาพแอนติเจน

- การทดสอบแอนติเจนชนิดโรสเบงกอลโดยวิธี The Rose Bengal (RB) test (Alton et al., 1988)
- การทดสอบแอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจกโดยวิธี The buffered plate agglutination test (Alton et al., 1988)
- การทดสอบแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้วโดยวิธี The USDA tube agglutination test (Alton et al., 1988)

ผล

ความเข้มข้นของเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ระยะแรกช่วงชั่วโมงที่ 0-14 จะต่ำมาก แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 15-31 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 32-38 จนได้ความเข้มข้นสูงสุด 3.6% PCV ในชั่วโมงที่ 38 หลังชั่วโมงที่ 48 ความเข้มข้นจะลดลงเนื่องจากทำการเก็บเชื้อ เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ และเพาะเลี้ยงต่อไป ความเข้มข้นก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 หลังจากนั้นความเข้มข้นจะลดลง เนื่องจากทำการเก็บเชื้อและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปใหม่ครั้งที่สอง แล้วความเข้มข้นก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่1)

ผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (A) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่48, 72, 96 และรวม) พบว่าคุณภาพของแอนติเจนให้ผลเหมือนกัน (ตารางที่ 1) เมื่อทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก ที่ได้

จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (B) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และรวม) พบว่าคุณภาพของแอนติเจนให้ผลเหมือนกัน (ตารางที่ 2) เมื่อทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (C) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่48, 72, 96 และรวม) พบว่าคุณภาพของแอนติเจนให้ผลเหมือนกัน (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119 –3 แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยวัดความเข้มข้นของเชื้อทุก 2 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 14 ชั่วโมงแรก เชื้อจะเพิ่มจำนวนในอัตราต่ำ เป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว หลังจากชั่วโมงที่ 15 เชื้อจะมีอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้นไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้นสูงสุด 3.6% ในชั่วโมงที่ 38 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 (คณิตา และอนันต์, 2547) หลังการเก็บเชื้อครั้งแรก (ชั่วโมงที่ 48) ความเข้มข้นของเชื้อสามารถขึ้นถึงจุดสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 ภายหลังการเก็บเชื้อครั้งที่ 2 ซึ่งทำให้สามารถเก็บเชื้อได้เร็วกว่าปกติ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่เหลืออยู่ในถังเป็นเชื้อที่อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง ไม่ต้องเสียเวลาในการเริ่มต้นในระยะ lag phase ใหม่ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่อง และจากการทดลองพบว่าคุณภาพของแอนติเจนที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงแบบคราวเดียว และแบบกึ่งต่อเนื่องให้ผลเท่าเทียมกัน โดยพิจารณาจากผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก และแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ที่เตรียมจากการการเพาะเลี้ยงแบบคราวเดียว กับเตรียมจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่อง (การเก็บเชื้อในชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และเชื้อจากการนำสามตัวอย่างมารวมกัน)

ปัจจุบันฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตแอนติเจนโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว ทำให้ต้องใช้เวลาในขั้นตอนการผลิตค่อนข้างนาน เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเตรียม seed และการเตรียมถังเลี้ยงเชื้อในแต่ละชุด เป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน แรงงาน และเวลา ดังนั้นเมื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่องแล้ว คาดว่าจะสามารถผลิตแอนติเจนได้เพียงพอและทันต่อความต้องการเพราะสามารถลดขั้นตอนการเตรียม seed ลดขั้นตอนในการเตรียมถังเลี้ยงเชื้อ เพิ่มผลผลิตต่อหน่วยเวลาให้สูงขึ้นเป็นการลดต้นทุนการผลิต และยังเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตแอนติเจนให้มีประสิทธิภาพในขั้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เจ้าหน้าที่งานผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีส และแอนติเจนทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนให้การทดลองนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

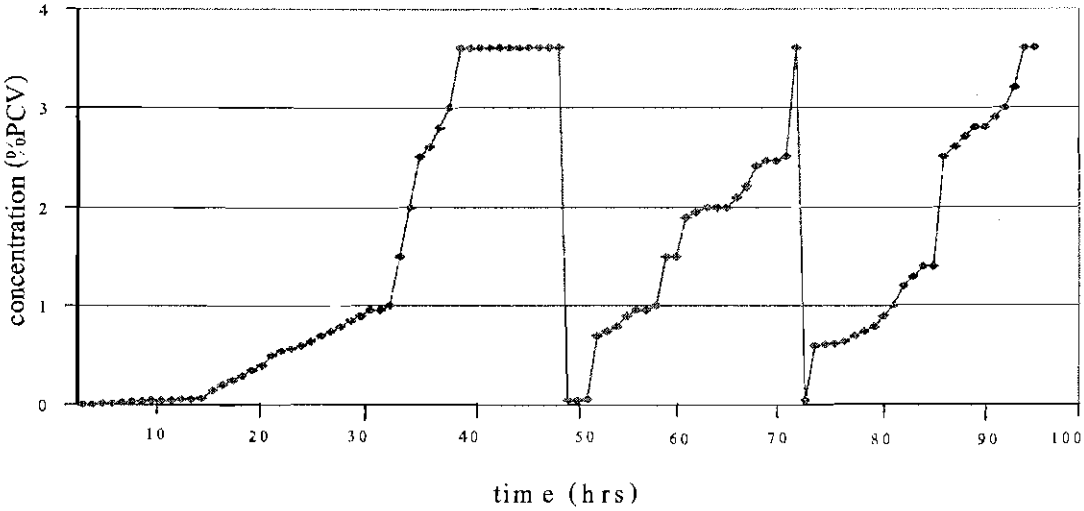
คณิตา ภาสะฐิติ และอนันต์ ท้าวเพชร. 2547. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 14(2): 42-47.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. หลักการพื้นฐานของกระบวนการหมักของจุลินทรีย์. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 79-116.

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. pp. 63-71.

Office International des Epizooties. 2000. Bovine brucellosis. In: Manual of standards for diagnostic test and vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. pp. 328-345.



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 กับเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (A) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และรวม)

ตัวอย่างซีรั่ม	ครั้งที่ 1					ครั้งที่ 2					ครั้งที่ 3				
	A	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	A	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	A	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

\- ไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (B) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และรวม)

ตัวอย่างซีรั่ม	ครั้งที่ 1					ครั้งที่ 2					ครั้งที่ 3				
	B	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	B	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	B	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม
1	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
2	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
3	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
4	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
5	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
6	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+1 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 1 ช่อง (ระดับแอนติบอดี 25 IU/มล.)
+2 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 2 ช่อง (ระดับแอนติบอดี 50 IU/มล.)
+3 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 3 ช่อง (ระดับแอนติบอดี 100 IU/มล.)
+4 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 4 ช่อง (ระดับแอนติบอดี 200 IU/มล.)
- ไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (C) กับแบบกึ่งต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่ 48, 72, 96 และรวม)

ตัวอย่างซีรั่ม	ครั้งที่ 1					ครั้งที่ 2					ครั้งที่ 3				
	C	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	C	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม	C	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	รวม
1	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
2	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
3	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
4	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
5	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
6	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+1 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 1 หลอด (ระดับแอนติบอดี 25 IU/มล.)
+2 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 2 หลอด (ระดับแอนติบอดี 50 IU/มล.)
+3 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 3 หลอด (ระดับแอนติบอดี 100 IU/มล.)
+4 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 4 หลอด (ระดับแอนติบอดี 200 IU/มล.)
+5 เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม 5 หลอด (ระดับแอนติบอดี 400 IU/มล.)
- ไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

Studies on *Brucella abortus* strain 1119-3 growth by semi-continuous culture

Anan Thaopech[1] Surapat Laohawanich[1]

Abstract

A study on *Brucella abortus* strain 1119-3 growth by semi-continuous culture was done by propagating of *Brucella abortus* strain 1119-3 in liquid medium in a 40 liters fermenter for 48 hours. First harvesting the bacterial growth, drained 24 liters of culture and kept 1 liter of culture in the fermenter. Added 24 liters of fresh medium into the fermenter and incubated until 72 hours. Second harvesting the bacterial growth, drained 24 liters of culture and kept 1 liter of culture. Added 24 liters of fresh medium into the fermenter and incubated until 96 hours. Third harvesting the bacterial growth, drained 25 liters of culture. During incubation a 10-ml sample was taken every 2 hours and measured the concentration by packed cell volume method (%PCV). The result showed that the highest concentration (3.6%) was achieved after 38 hours, 72 hours and 96 hours of incubation. Rose Bengal antigen, Plate agglutination antigen and Tube agglutination antigen was prepared from 48 hrs, 72 hrs, 96 hrs and mixed culture. Comparison of agglutination of antigen produced from batch culture and the semi-continuous culture was not significantly different.

Key words: *Brucella abortus* strain 1119-3, %PCV, Semi-continuous culture

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

เปรียบเทียบการสูญเสียปริมาณ 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในขั้นตอนการทำไวรัสให้บริสุทธิ์

อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์[1] นพคุณ มูลสิน[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำไวรัสที่มีความเข้มข้นต่ำ ($\overline{X}$ = 23.10 x) และความเข้มข้นสูง ($\overline{X}$ = 40.17 x) จำนวน 30 ชุด พบว่าวิธีการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์แบบน้ำไวรัสเข้มข้นต่ำ มีการสูญเสียปริมาณของ 146S และความบริสุทธิ์ของ 146S เท่ากับ 32.49 $\pm$ 16.22 และ 96.14 $\pm$ 1.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์แบบน้ำไวรัสเข้มข้นสูงมีการสูญเสียปริมาณของ 146S และความบริสุทธิ์ของ 146S เท่ากับ 72.36 $\pm$ 8.29 และ 93.53 $\pm$ 4.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณของ 146S จากการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: การสูญเสียปริมาณของ 146S ความบริสุทธิ์ของ 146S การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension cell culture) (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1982) โดยเริ่มกระบวนการผลิตจากการนำ seed cell มาเพาะขยายหลังจากนั้นจึงนำ seed virus เพิ่มปริมาณในเซลล์ (virus multiplication) เมื่อได้จำนวนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามต้องการแล้ว จึงทำการ clarification และทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ และนำแอนติเจนที่ได้มาผลิตเป็นวัคซีนต่อไป (Makarasen, 1984)

จากกระบวนการผลิตวัคซีนดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ขั้นตอนที่สำคัญและมีผลต่อปริมาณไวรัสคือ การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ซึ่งประกอบด้วยการทำเข้มข้นด้วยเครื่อง ultrafiltration (Carbocep[1]) และสารเคมี ethylene oxide polymer ซึ่งในกระบวนการผลิตมักพบว่ามีการสูญเสียปริมาณ 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยบางส่วนไปในขั้นตอนของการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์โดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะลดการสูญเสียปริมาณของ 146S ในขั้นตอนของการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์โดยศึกษาแยกเป็น 2 วิธี คือ ความเข้มข้นของน้ำไวรัสสูง และความเข้มข้นของน้ำไวรัสต่ำ แล้ววัดการสูญเสียปริมาณของ 146S และเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S จากการผลิตทั้ง 2 วิธี ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปปรับปรุงและพัฒนาวิธีการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ ในงานผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเซลล์และไวรัส จำนวน 30 ชุด

ทำการเพาะเซลล์ IFFA-3 ซึ่งผลิตขึ้นตามมาตรฐานของงานผลิตเซลล์ (APHIS-US Department of Agriculture, 1989) ด้วย basal medium eagle ในถังเพาะเซลล์ขนาด 3,500 ลิตร จนได้จำนวนเซลล์ 2.00 x 10^6 เซลล์/มล. หลังจากนั้นทำการขยายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ seed batch O 189 6P F4.6 ลงในเซลล์ IFFA-3 ที่เพาะไว้ incubate 37.5° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบูรณ์

2. การทำ clarification

นำน้ำไวรัส (virus fluid) และเซลล์ IFFA-3 จากข้อ 1 มาทำการสลัดกากเซลล์ออกโดยวิธี continuous centrifuge ด้วยเครื่อง Robatel[2] ที่ 6,800 รอบ/นาที ความดัน 4.5 บรรยากาศ อัตราการ centrifuge ผ่าน 600 ลิตร/ชั่วโมง แล้วจึงกรองด้วยเครื่องกรองแบบ cartridge pore size 2 µm นำน้ำไวรัสที่ได้เข้าสู่ถังพักขนาด 2,500 ลิตร เพื่อทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์

---

[1]Model ET 136 บริษัท Tech-Sep, France [2]Model CHV 1400 บริษัท Robatel SLPI, France

3. การทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์

3.1 การทำเข้มข้นไวรัสด้วยเครื่อง Carbocep

3.1.1 การทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นสูง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำไวรัสปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลอง ก่อนทำเข้มข้นด้วยเครื่อง Carbocep ซึ่งมีอัตราการกรอง 500 ลิตร/ชั่วโมง ความดัน 5 บรรยากาศ อัตราการไหลเวียน 1,200 ลิตร/ชั่วโมง จนได้น้ำไวรัสเข้มข้นประมาณ 40 เท่า นำน้ำไวรัสเข้าสู่ถังพักขนาด 60 ลิตร ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 ml เพื่อตรวจปริมาณของ 146S โดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณ 146S ไวรัส ตามวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation (Doel et al., 1982; มนตรี และเชาวฤทธิ์, 2535; ไชยา และนพพร, 2543) และตรวจค่าความบริสุทธิ์ของ 146S โดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณโปรตีนตาม Lowry's method (Lowry et al., 1951)

3.1.2 การทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นต่ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำไวรัสปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลอง ก่อนทำเข้มข้นด้วยเครื่อง Carbocep เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 จนได้น้ำไวรัสเข้มข้นประมาณ 23 เท่า ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 ml เพื่อตรวจปริมาณของ 146S และค่าความบริสุทธิ์ของ 146S ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.2 การทำเข้มข้นด้วยสารเคมี ethylene oxide polymer

3.2.1 การทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นสูง

ทำการเติม ethylene oxide polymer ลงในน้ำไวรัสซึ่งบรรจุอยู่ในถังพักขนาด 60 ลิตร โดยเติม 3% w/v เพียงครั้งเดียวต่อชุดการผลิต แล้วจึงนำไป centrifuge ด้วยเครื่อง Rousellet[3] ทำการเก็บตะกอน ethylene oxide polymer

3.2.2 การทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นต่ำ

ทำการเติม ethylene oxide polymer ลงในน้ำไวรัส ซึ่งบรรจุอยู่ในถังพักขนาด 60 ลิตร โดยเติม 3% w/v แบ่งเติมจำนวน 2 ครั้งต่อชุดการผลิต เนื่องจากน้ำไวรัสมีปริมาณมาก แล้วจึงนำไป centrifuge ด้วยเครื่อง Rousellet ทำการเก็บตะกอน ethylene oxide polymer

4. การทำ elution และ inactivated virus

นำตะกอน ethylene oxide polymer จากข้อ 3.2 มาทำ elution ด้วย elution medium จำนวน 7.5 ลิตร/กก. ทำการปั่น elution medium ที่ 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมา centrifuge ด้วยเครื่อง Rousellet เพื่อสกัดตะกอน ethylene oxide polymer ออก นำน้ำไวรัสที่ได้ไป inactivated ด้วย binary ethylenemine 10% เก็บตัวอย่างน้ำไวรัสจากการผลิตทั้ง 2 แบบปริมาตร 10 ml เพื่อตรวจปริมาณของ 146S และความบริสุทธิ์ของ 146S ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

5. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลปริมาณของ 146S เป็น μg/ml และค่าความบริสุทธิ์ของ 146S เป็น mg/ml นำผลการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์และสรุปผล เปรียบเทียบข้อมูลทั้ง 2 แบบ ด้วย t-test

---

[3]Model DRC 60 บริษัท Rousellet CIESA, France

ผล

จากการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ทั้ง 2 วิธี พบว่าปริมาณน้ำไวรัส เมื่อ inactivated แล้ว แบบเข้มข้นสูงมีปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 9.63 ± 0.26 ลิตร ต่อชุดการผลิต แบบเข้มข้นต่ำมีปริมาตรเฉลี่ย 19.91 ± 1.45 ลิตร ต่อชุดการผลิต (ตารางที่ 1) ในขั้นตอนการทำเข้มข้นด้วยเครื่อง Carbocep วิธีทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นสูง มีการสูญเสียปริมาณของ 146S เท่ากับ 64.69 ± 11.16% แบบเข้มข้นต่ำ มีการสูญเสียปริมาณของ 146S เท่ากับ 19.31 ± 14.61% (ตารางที่ 2) และเมื่อผ่านการทำเข้มข้นด้วย ethylene oxide polymer แบบเข้มข้นสูง สูญเสียเพิ่มเป็น 72.36 ± 8.29% แบบเข้มข้นต่ำสูญเสียเพิ่มเป็น 32.49 ± 16.22% ในส่วนของค่าความบริสุทธิ์ของ 146S แบบเข้มข้นสูง เมื่อผ่านเครื่อง Carbocep เท่ากับ 28.98 ± 19.55% เมื่อผ่านการทำเข้มข้นด้วย ethylene oxide polymer แล้ว มีค่าเท่ากับ 93.53 ± 4.99% และแบบเข้มข้นต่ำมีค่าความบริสุทธิ์ของ 146S เมื่อผ่านเครื่อง Carbocep เท่ากับ 77.53 ± 5.18% เมื่อผ่านการทำเข้มข้นด้วย ethylene oxide polymer แล้วเท่ากับ 96.14 ± 1.26% (ตารางที่ 3) ซึ่งผลจากการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ทั้ง 2 แบบ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งปริมาณของ 146S และค่าความบริสุทธิ์ของ 146S

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่าการทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นสูง มีการสูญเสียปริมาณของ 146S เมื่อสิ้นสุดการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์ ค่อนข้างมาก โดยมีปริมาณสูญเสียเฉลี่ยอยู่ที่ 72.36 ± 8.29% ขณะที่การทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นต่ำจะมีการสูญเสียปริมาณของ 146S น้อยกว่ามาก โดยมีปริมาณสูญเสียเฉลี่ยเท่ากับ 32.49 ± 16.22% (ตารางที่ 2) ทั้งนี้การสูญเสียไวรัสในการทำเข้มข้นด้วยเครื่อง Carbocep นั้น อาจเกิดขึ้นจากสาเหตุ 2 ประการ สาเหตุประการแรก อาจเนื่องมาจากแรงเสียดทานที่เกิดจากการกรองผ่าน (mechanical filtration) ของเครื่อง Carbocep ซึ่งต้องใช้แรงดันในการกรองผ่านประมาณ 5 บรรยากาศ มีอัตราการกรองผ่าน 500 ลิตร/ชั่วโมง และอัตราการไหลเวียนของน้ำไวรัส 1,200 ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งเมื่อกรองแบบเข้มข้นสูงจะต้องใช้เวลาในการกรองนานกว่าแบบเข้มข้นต่ำ แรงดัน และแรงเสียดทานที่เกิดขึ้นในระบบเป็นเวลานาน อาจมีผลทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณของ 146S ได้ ส่วนสาเหตุประการที่ 2 นั้น อาจเนื่องมาจากการตกค้างของไวรัสในเครื่อง Carbocep ซึ่งมีความจุทั้งระบบ 60 ลิตร เมื่อทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นสูง จะเหลือปริมาณน้ำไวรัสในระบบของเครื่องเพียง 50.50 ± 3.43 (ตารางที่ 1) ซึ่งจะทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นในระบบ และมีผลทำให้เกิดการตกค้างของไวรัสในเครื่อง Carbocep และท่อส่งน้ำไวรัสได้ ขณะที่การกรองแบบเข้มข้นต่ำซึ่งเหลือน้ำไวรัสในระบบเฉลี่ย 82.67 ± 7.20 ลิตร จะไม่เกิดฟองอากาศ การตกค้างของไวรัสในท่อส่งน้ำไวรัสน่าจะน้อยกว่าการทำเข้มข้นสูง

ในส่วนของการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์โดย ethylene oxide polymer ความสูญเสียที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากการตกค้างของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสาร ethylene oxide polymer ซึ่งในวิธีการ

ทำไวรัสแบบเข้มข้นต่ำจะใช้สาร ethylene oxide polymer มากกว่าความเข้มข้นสูง และมีการสูญเสียปริมาณของ 146S ในขั้นตอนนี้มากกว่าเช่นกัน (ตารางที่ 2)

ในส่วนของค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S ของ inactivated virus แบบเข้มข้นสูง เท่ากับ 93.53 $\pm$ 4.99% แบบเข้มข้นต่ำเท่ากับ 96.14 $\pm$ 1.26% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ทั้ง 2 ค่า โดยค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S ที่ยอมรับได้ของงานผลิตไวรัสอยู่ที่ระดับ 80% ขึ้นไป (ตารางที่ 3)

สรุป

จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้บริสุทธิ์โดยวิธีการทำน้ำไวรัสแบบเข้มข้นต่ำจะมีการสูญเสียปริมาณของ 146S น้อยกว่าแบบเข้มข้นสูง ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ทั้ง 2 วิธี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.ไชยา สง่าประโคน และเจ้าหน้าที่งานทดสอบคุณภาพไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย รวมทั้งผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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

มนตรี มนต์มธุรพจน์ และเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต. 2535. การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 3 (1): 31-41.

APHIS-US Department of Agriculture. 1989. Results of the IFFA-3 cell quality control. APHIS-US Department of Agriculture. Hyattsville, Maryland. pp. 1-8.

Doel, T.R., Flettom, B.W. and Stepple, R.F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradient. Develop. Biol. Standard. 50: 209-209.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Lewis, F.A. and Rondall, R.T. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Makarasen, P. 1984. Vaccine and vaccine production. Third country training program on foot and mouth disease control (Group training course), February 20 - March 9, Bangkok, Thailand. pp. 141-156.

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. pp. 180-183.

ตารางที่ 1 ปริมาณและความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตแบบเข้มข้นสูงและเข้มข้นต่ำ

Step	high concentration		low concentration	
	volume (litre) (mean ± SD)	concentration (x)	volume (litre) (mean ± SD)	concentration (x)
raw virus	1,971.83 ±286.93	1	1,895.97 ±199.70	1
conc. Carbocep	50.50 ± 3.43	40.17 ± 4.99	82.67 ± 7.20	23.10 ± 3.10
inactivated virus	9.63 ± 0.26	212.27 ± 28.23	19.91 ± 1.45	93.50 ± 19.91

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการสูญเสียปริมาณ 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตแบบเข้มข้นสูงและเข้มข้นต่ำ

step	high concentration		low concentration	
	146S (µg/ml)		146S (µg/ml)	
	mean ± SD	percent lost	mean ± SD	percent lost
raw virus	2.55 ± 0.65	-	1.96 ± 0.91	-
conc. Carbocep	32.13 ± 13.45	64.69 ± 11.16[1]	37.13 ± 19.56	19.31 ± 14.61[1]
inactivated virus	145.30 ± 56.69	72.36 ± 8.29[2]	128.90 ± 59.01	32.49 ± 16.22[2]

[1] raw virus - conc. Carbocep

[2] raw virus - inactivated virus

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตแบบเข้มข้นสูงและเข้มข้นต่ำ

step	high concentration		low concentration	
	protein (mg/ml) (mean ± SD)	% 146S purity	protein (mg/ml) (mean ± SD)	% 146S purity
raw virus	0.95 ± 0.20	-	3.31 ± 0.51	-
conc. Carbocep	26.49 ± 11.29	28.98 ± 19.55[1]	16.82 ± 4.73	77.53 ± 5.18[1]
inactivated virus	11.28 ± 4.94	93.53 ± 4.99[2]	14.65 ± 14.88	96.14 ± 1.26[2]

[1] raw virus - conc. Carbocep

[2] raw virus - inactivated virus

Comparison of 146S virus lost in FMD virus purification process

Aree Katsuwannawong [1] Noppakun Moolsin[1]

Abstract

Study on purification process of FMD virus by comparing virus fluid at low ($\overline{X}$ = 23.10 x) and high ($\overline{X}$ = 40.17 x) concentration (n = 30) was carried out. Percents of 146S lost and 146S purity were 32.49 ± 16.22 and 96.14 ± 1.26, respectively for low concentration virus fluid and 72.36 ± 8.29 and 93.53 ± 4.99, respectively for high concentration virus fluid. The values were statistically significant different ($p < 0.05$).

Key words: 146S lost, 146S purity, Purification of FMD virus

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

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

เขียนที่.....

วันที่.....

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

ถนน.....แขวง.....เขต.....

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

ยินดีให้ความอุปการะจัดพิมพ์ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" จำนวน.....เล่ม

เป็นเงินจำนวน.....บาท (.....)

☐ ปีที่..... เล่มที่..... เดือน.....

โดยการลงโฆษณา ข้อความที่แนบมาด้วยแล้วในส่วนของ

☐ เต็มหน้าในเล่ม (ขาว – ดำ) 4,000 บาท

ข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าโฆษณาแจ้งข้อความกับเจ้าหน้าที่ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่นำใบเสร็จรับเงิน และหนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" มาให้ข้าพเจ้าเป็นจำนวน 3 เล่ม เมื่อหนังสือได้พิมพ์เสร็จเรียบร้อยแล้ว

ลงนาม .....

(.....)

ตำแหน่ง .....

ขอขอบคุณ

ผู้ให้การสนับสนุนการพิมพ์เผยแพร่ในครั้งนี้

บริษัท ขอสนับสนุนการเผยแพร่งานวิชาการ ด้วยความยินดียิ่ง

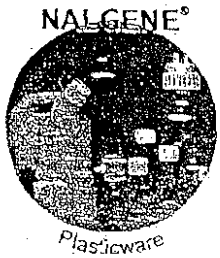
Leading in the chemical, instruments and supplies

Dehydrated Culture Media

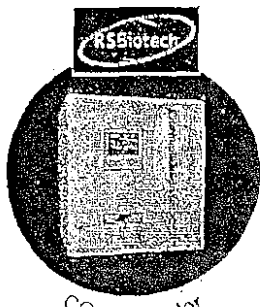
Analytical Reagents & Apparatus

Filtration and Life Science Products

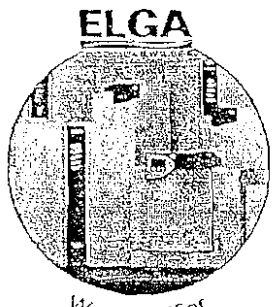
Cuvette Cells & Fiber-Optic Probes



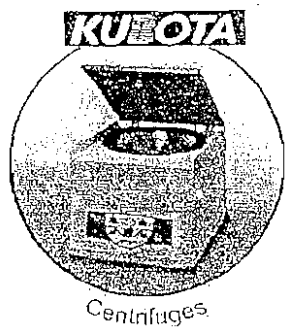
Plasticware



CO_2 incubator

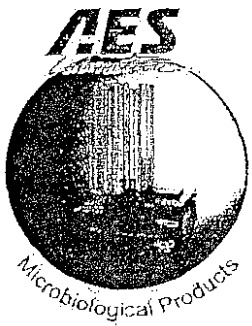


Water Purifier

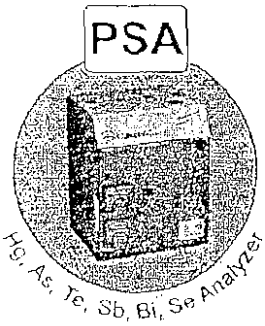


Centrifuges

Glassware & Microscope

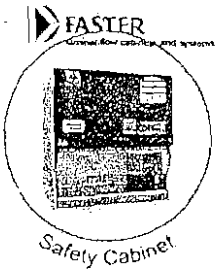


Microbiological Products



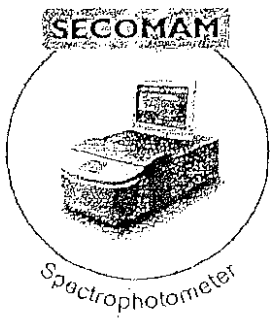
Hg, As, Te, Sb, Bi, Se Analyzer

Filters & Gas Generator

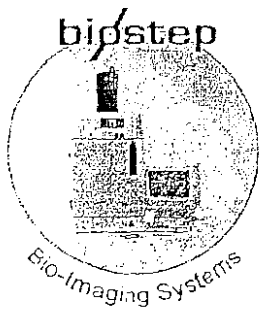


Safety Cabinet

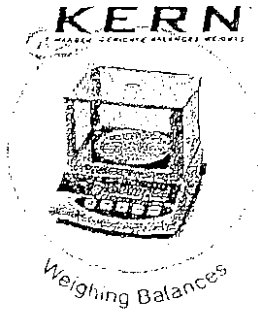
Biochemical &Reagents



Spectrophotometer



Bio-Imaging Systems



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

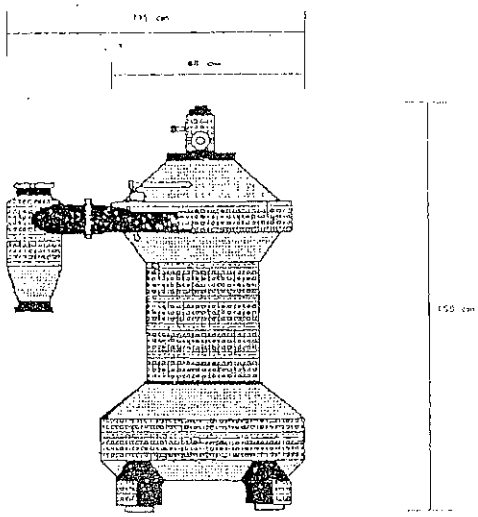
บริษัท ขอสนับสนุนวิชาการงานวารสารชีวผลิตภัณฑ์

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 แฟ็ก. (662) 591-4033