

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2562

สารบัญ

- จากกองบรรณาธิการ 5
- การหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียโดยวิธี Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
อารีรัตน์ สุดโต ภูวนาถ เปาปราโมทย์ 6
- การเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6
กังวาน จิ้งธิรพานิช ดิถี ประเสริฐสุวรรณ 18
- ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน
วรพร ปุ่สูงเนิน วีรชาย ปุ่สูงเนิน 26
- เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันและผลกระทบต่อการให้นมของโคนมหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาและเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (needle free)
อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์ วชิรินทร์ หินอ่อน รัชภูมิ เขียวสนาม 41
- วิธีการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยผ่านสายการบินระหว่างประเทศ
วิไล ลินจงสุบงกช 49

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 28 No. 1 March 2019

Contents

- The editorial 5

- Determination of endotoxin in Haemorrhagic septicaemia vaccine by
Limulus Amebocyte Lysate test 6
Areerat Sutto Puvanat Paopramote

- The preparation of virulent classical swine fever virus from SK6 cells
culture 18
Kungwan Jungtheerapanich Ditee Prasertsuwan

- Efficacy of oil adjuvant fowl cholera vaccine 26
Woraporn Poosungnoen Weerachai Poosungnoen

- Comparison of antibody titer levels and the effect on lactation in dairy
cow after FMD vaccination by needle and needle-free injection 41
Aree Katsuwannawong Watcharin Hinon Ratchaphum Khiaosanam

- Protocol sample submission to Regional Reference Laboratory for FMD
in South East Asia via International Airline 49
Wilai Linchongsubongkoch

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

<http://biologic.dld.go.th>

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านชีวผลิตภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ชีวผลิตภัณฑ์
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	เชาวฤทธิ์	บุญมาทิต	Advisory board	Chaowarit	Bunmatid
บรรณาธิการ	ไชยา	สง่าประโคน	Editor	Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	ฐิตวัฒน์	จันทวร	Editorial board	Thitawat	Janthawon
	ร่มพฤษ์	อุศล		Rompkrue	Udon
	อนันต์	ท้าวเพชร		Anan	Thaopech
	สายพิน	ชุมทรัพย์		Saipin	Khumsab
	วรพร	ปู่สูงเนิน		Woraporn	Poosungnoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	Manager	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 1123 โทรสาร 0-4431-5931	Office:	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130 Tel. 0-4431-1476 extension 1123 Fax. 0-4431-5931
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน	Publications:	Twice a year in March and September

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

- 1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัย อันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ
- 1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจน โดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน
- 1.3 บทความปริทัศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่ง โดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
- 1.4 เรื่องอื่นๆ ที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

- 2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น
- 2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ
 - 2.2.1 ตัวพิมพ์ ใช้ตัวอักษร TH SarabunPSK แบบปกติ ขนาด 16 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตารางรูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 16
 - 2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวน 10-14 หน้า
 - 2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบน ด้านซ้าย ด้านขวาและด้านล่างที่ 2.54 ซม.
 - 2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3.... ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติขนาด 16
 - 2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้
 - ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
 - รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง
 - 2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบ ทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella* spp.

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

- 3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์
- 3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง
กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 1123 โทรสาร 0-4431-5931
- 3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ
- 3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน
- 3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

- 4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี
- 4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงบรรทัด
- 4.3 บทคัดย่อ (Abstract) สั้นได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองความยาวไม่ควรเกิน 15 บรรทัด ภาษาไทยและภาษาอังกฤษเขียนแยกหน้า
- 4.4 คำสำคัญ (Keywords) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ
- 4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย
 - 4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งควรมีการทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ
 - 4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงบรรทัด
 - 4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ
 - 4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์
 - 4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่าย
 - 4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

- 1) วารสารหรือหนังสือ เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิลและคณะ, 2532; Kumakai *et al.*, 1961) กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a, b, c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
- 2) บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Layton, R. B. and Weathers, C. C., unpublished data),for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)
- 3) เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (.) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยานุชนของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับ ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

- 1) วารสาร ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง เช่น
 สายพิน ชุมทรัพย์ สุรพล ชุมทรัพย์ และจตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ
 วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35
 Johnson, R. H. and Collings, D. F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.
 กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a, b, c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น
 Carter, G. R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170-174.
 Carter, G. R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61-63.
- 2) หนังสือ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุม
สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม
พูลเกษ บรรณาธิการ หลักการทำไร้อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
หน้า 141-145

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. Fowl cholera. *In* Manual
of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris,
France. p. 899.

Dutta, S. K., Shankarappa, B. and Mattingly-Napier, B. 1991. Antigenic
analysis of *Ehrlichia risticii* isolates. *In* Plowright, W., Rosedale, P. D.,
Wade, J. F. (ed.), Equine Infectious Diseases VI Proceedings of the
Sixth International Conference 7-11 July 1991. R&W Publication
(Newmarket) Limited. Suffolk, UK. pp. 61-65.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. *In* Leman, A. D. (ed.), Diseases of
Swine, 6th ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

3) เว็บไซต์ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ (ถ้ามี) แหล่งที่มาและวันที่เข้าถึง
เช่น

จันทร์หา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึงพิศ ดุลยพัชร
2541อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา
<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm> 27 มีนาคม 2541

Boscov, C. M. 2004. Canine TVT: Clinical findings, Diagnosis and
Treatment. The 29th World Congress of the World Small Animal
Veterinary Association. 6-9 October 2004. Rhodes, Greece. Available
from <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx> [Accessed 10
January 2006].

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ ประกอบด้วยผลงานวิชาการ จำนวน 4 เรื่อง ได้แก่ การหาปริมาณแอนติ-ทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียโดยวิธี Limulus Amebocyte Lysate (LAL) การเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน และเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันและผลกระทบต่อการให้นมของโคนมหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาและเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (needle free) ซึ่งเป็นผลงานจากนักวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา และบทความวิชาการ จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่ เรื่องวิธีการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยผ่านสายการบินระหว่างประเทศ ซึ่งเป็นผลงานของสัตวแพทย์หญิงวิไล ลิ้นจงสุขภงกช ที่ปรีชากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย

กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้อ่านและนักวิชาการที่สนใจและให้การสนับสนุนงานด้านวิชาการ ด้วยการส่งผลงานวิชาการและบทความวิชาการที่เป็นประโยชน์มาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ และขอเชิญชวนให้ส่งผลงานวิชาการเข้ามามากๆ เพื่อให้วารสารฉบับหน้าและฉบับต่อไปได้ตีพิมพ์ให้ได้ปีละ 2 ฉบับตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ

กองบรรณาธิการ

การหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยวิธี Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

อารีรัตน์ สุดโต¹ภูวนาล เปาปราโมทย์¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ เป็นการหาความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี Limulus Amebocyte Lysate (LAL) เทคนิค Kinetic Chromogenic LAL จากการศึกษาพบว่า ความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินของบรอตแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน คือ ความเจือจางที่ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างบรอตแบคทีเรียก่อนและหลังการผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration มาตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน มีค่าเท่ากับ $4.31 \pm 0.59 \times 10^5$ และ $7.92 \pm 0.88 \times 10^4$ EU/ml ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จำนวน 20 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินจากการเติมและไม่เติมสารช่วยการกระจายตัว (dispersing agent) พบว่าตัวอย่างวัคซีนที่เติม dispersing agent มีค่าเฉลี่ยปริมาณเอนโดทอกซินเท่ากับ $7.98 \pm 1.79 \times 10^3$ EU/ml และตัวอย่างวัคซีนที่ไม่เติม dispersing agent มีปริมาณเอนโดทอกซินเท่ากับ $7.29 \pm 1.63 \times 10^3$ EU/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาหาวิธีการลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย เอนโดทอกซิน สารช่วยการกระจายตัว
Limulus Amebocyte Lysate

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียหรือโรคคอบวมเป็นโรคระบาดสัตว์ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 เป็นโรคระบาดชนิดรุนแรงทั้งในระยะเฉียบพลัน และระยะเรื้อรัง ของโคและกระบือ ลักษณะเฉพาะของโรคคือ สัตว์มีไข้สูง เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด หายใจหอบ คอบวมและตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2 และ E:2 ซึ่งในทวีปเอเชียเชื้อก่อโรคเป็นซีโรไทป์ B:2 เท่านั้น ส่วนทวีปแอฟริกาพบทั้งซีโรไทป์ B:2 และ E:2 (De Alwis, 1999) เมื่อเกิดโรคในสัตว์ที่ไม่เคยมีภูมิคุ้มกันโรคมามาก่อนสัตว์จะแสดงอาการป่วยรุนแรง การแพร่โรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาในสัตว์ที่แสดงอาการแล้วมักจะไม่ได้ผล ทำให้จำนวนสัตว์ป่วยและตายสูง

วัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการป้องกันโรค วัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียมีทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย และยังแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ตามรูปแบบของวัคซีน สารแอดจูแวนท์ และเทคโนโลยีการผลิต (Verma and Jaiswal, 1998) ในประเทศไทยวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันผลิตจากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 โดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินแล้วผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration จากนั้นนำไปผสมสารแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันจะได้วัคซีนที่อยู่ในรูปของอิมัลชันให้ความคุ้มโรคสูง (รัชนิ, 2553)

เชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe ติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ แต่จะมีการสร้างสารพิษบริเวณด้านนอกของผนังเซลล์ เมื่อเซลล์ถูกทำลายจะปล่อยสารพิษออกมาเป็นสารพวก Lipopolysaccharide (LPS) สารพิษที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายเรียกว่า เอนโดทอกซิน (endotoxin) (Marina *et al*, 2006) ซึ่งทนความร้อนสูง ไม่สามารถทำลายด้วยความร้อนชื้น (steam sterilization) แต่จะถูกทำลายด้วยความร้อนแห้ง (heat sterilization) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 200-300°C ในอุตสาหกรรมยามักพบการปนเปื้อนของเอนโดทอกซิน จากน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต วัตถุดิบ การผลิต เครื่องมือ เครื่องแก้วและภาชนะบรรจุ รวมทั้งจากกระบวนการผลิต เป็นต้น (USP, 2012a)

เอนโดทอกซิน เป็นสารพิษที่สามารถออกฤทธิ์ทันทีโดยไม่มีระยะพักตัว เมื่อเอนโดทอกซินเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดอาการไข้ (pyrogenicity) เนื่องจากเอนโดทอกซินจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่งสารที่มีผลต่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย ทำให้อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเลือด (blood change) โดยการทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงชั่วคราวแล้วจึงมีจำนวนสูงขึ้น สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelet) ทำให้เกล็ดเลือดปล่อยสารที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ภายในเส้นเลือดฝอยเกิดการบวมน้ำและทำให้เลือดออกได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของความดันโลหิต และหากปริมาณเอนโดทอกซินในกระแสเลือดมีสูงจะทำให้เกิดอาการช็อก โดยความดันโลหิตลดต่ำลง อ่อนเพลีย ชีพจรเต้นเร็ว การหายใจช้าลง หมดสี ระบบการไหลเวียนของเลือดล้มเหลวและตาย (Mark and Shauna, 2005) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค และกระบือ เมื่อได้รับเอนโดทอกซินในปริมาณมาก เอนโดทอกซินจะเหนี่ยวนำให้สัตว์แสดงอาการพิษของเอนโดทอกซิน เช่น มีไข้สูง หอบ และช็อก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสาร โปรสตาแกลนดินในระดับสูงมากทันทีหลังจากที่สัตว์ได้รับเอนโดทอกซิน และพบว่าระดับแคลเซียมและเม็ดเลือดขาวลดลง (สุณิรัตน์ และคณะ, 2536)

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในผลิตภัณฑ์ยาฉีดตามมาตรฐานเภสัชตำรับมี 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 Rabbit pyrogen test เป็นวิธีการทดสอบด้วยกระต่าย โดยฉีดยาที่ต้องการทดสอบเข้าเส้นเลือดดำริมใบหูของกระต่าย แล้วบันทึกอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการทดสอบนาน มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความไวของการทดสอบ ซึ่งอาจทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน เช่น ฤดูกาล การให้อาหาร อุณหภูมิแวดล้อม เป็นต้น วิธีที่ 2 Limulus Amebocyte Lysate test หรือ LAL test เป็นวิธีการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) โดยอาศัย

หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากเลือดแดงจากสัตว์กับสาร bacterial endotoxins ซึ่งเฉพาะเจาะจงสำหรับการหาปริมาณเอนโดทอกซิน จากแบคทีเรียแกรมลบ (ฐิติพร, 2554) ปัจจุบันนิยมใช้วิธี LAL test ในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน เนื่องจากเป็น in vitro test ให้ผลทดสอบที่รวดเร็ว และมีความไว (Sensitivity) ในการทดสอบมากกว่าวิธี Rabbit pyrogen test

LAL test มี 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 Gel-clot techniques อาศัยหลักการ LAL จะเกิดการแข็งตัว เมื่อมีเอนโดทอกซิน ซึ่งผู้ทดสอบต้องสังเกตการเกิดเจลด้วยตา วิธีที่ 2 Turbidimetric method อาศัยการวัดความขุ่นหลังการแข็งตัวเป็นเจล สามารถอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซินต่ำสุดได้ตั้งแต่ 0.01-100 EU/ml และวิธีที่ 3 Kinetic Chromogenic LAL อาศัยการเกิดสีหลังจากการแตกออกของ synthetic peptide chromogen complex ซึ่งความเข้มของสีจะขึ้นกับปริมาณเอนโดทอกซิน สามารถอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซินต่ำสุดได้ตั้งแต่ 0.005–50 EU/ml (USP, 2012b)

การกำหนดปริมาณเอนโดทอกซิน (Endotoxin limit) ของยาหรือวัคซีนในคนจะคำนวณจากขนาดสูงสุดที่ให้ได้ในรูปมิลลิกรัมหรือมิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ซึ่งกรณียาสัตว์ให้คำนวณเช่นเดียวกับยาที่ใช้ในคน (USP, 2012b) แต่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนสัตว์ และยังไม่เคยมีรายงานปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน

ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จึงจะนำวิธี Limulus Amebocyte Lysate test หรือ LAL test ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่เฉพาะเจาะจงสำหรับการหาปริมาณเอนโดทอกซินจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (USP, 2012b) มาใช้ในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน ซึ่งการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน และนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการควบคุมคุณภาพการผลิตวัคซีน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

1. บรอกแบคทีเรีย จากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน
2. บรอกแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration
3. วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่วัคซีนชุดการผลิตที่ 1-2/55, 1-5/56, 1-2/57, 1-7/58 และ 1-4/59

ชุดทดสอบและน้ำยาทดสอบปริมาณเอนโดทอกซิน

1. Kinetic - QCL™ Kinetic Chromogenic LAL Assay¹
2. PYROSPERSE™ เป็นสารกลุ่ม metallo - modified polyanionic มีหน้าที่เป็นสารช่วยการกระจายตัว (Dispersing agent)²

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอนโดทอกซิน (Endotoxin standard)

1. เติม LAL Reagent Water (LRW) ลงใน *E.coli* O55:B5 Endotoxin ตามปริมาตรที่ระบุไว้ในใบ Certificate of Analysis เมื่อเติม LRW ตามปริมาตรที่กำหนดจะได้ Control Standard Endotoxin (CSE) ที่มี Endotoxin Potency 50 EU/ml
2. เติม CSE ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดสอบที่มี LRW ปริมาตร 900 µl จะได้ Endotoxin Potency 5 EU/ml

¹ Lonza Walkersville, Inc., USA

² Lonza Walkersville, Inc., USA

3. เจือจาง CSE ด้วย LRW ให้มีความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5 EU/ml ตามตาราง

Endotoxin concentration (EU/ml)	Volume of LAL reagent water	Volume of endotoxin solution added to LAL reagent water
5	900 µl	100 µl of 50 EU/ml solution
0.5	900 µl	100 µl of 5 EU/ml solution
0.05	900 µl	100 µl of 0.5 EU/ml solution
0.005	900 µl	100 µl of 0.05 EU/ml solution

การเตรียมตัวอย่างทดสอบเพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสมโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1. บรอกแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน
ทำ ten fold dilution บรอกแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการกรอง และวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันด้วย LRW ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}
2. วัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent
ทำ ten fold dilution วัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน ด้วย LRW ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นเติม dispersing agent ปริมาตร 10 µl ลงในตัวอย่างวัคซีนที่เจือจางแล้ว 4 dilution สุดท้าย (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6})

การหาความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

1. เติม LRW (Blank) ลงใน 96-wells plate จำนวน 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl
2. เติม standard endotoxin ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 50 EU/ml โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl โดยเรียงลำดับจาก standard endotoxin ที่มีความเข้มข้นน้อยไปมาก
3. ทำ Positive Product Control (PPC) โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้น 5.0 EU/ml ลงใน plate จำนวน 3 หลุมต่อตัวอย่าง ปริมาตรหลุมละ 11 µl
4. เติมบรอกแบคทีเรีย วัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent โดยเลือก dilution ที่ 10^{-3} ถึง 10^{-6} เติมตัวอย่างละ 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl (หลุมตัวอย่าง 3 หลุม และหลุมตัวอย่าง + PPC 3 หลุม)
5. นำ plate ใส่ลงในเครื่อง microplate reader³ บ่มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 37°C ทั่วทั้ง plate
6. เติม Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) ปริมาตร 100 µl ลงในทุกหลุมอ่านค่าการเกิดปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm เทียบกราฟมาตรฐานเอนโดทอกซิน
7. อ่านค่าเอนโดทอกซินที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม WinKQCL Version 4⁴ และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง
จากการอ่านค่าเอนโดทอกซิน พบว่าความเจือจางที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินของบรอกแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน คือ dilution ที่ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ

³ รุ่น ELx808IU ยี่ห้อ BioTek, USA

⁴ Lonza Walkersville, Inc., USA

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

1. เติม LRW (Blank) ลงใน 96-wells plate จำนวน 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μl
2. เติม standard endotoxin ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 50 EU/ml ลงใน plate โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μl โดยเรียงลำดับจาก standard endotoxin ที่มีความเข้มข้นน้อยไปมาก
3. ทำ PPC โดยเติม standard endotoxin ความเข้มข้น 5.0 EU/ml ลงใน plate จำนวน 3 หลุมต่อตัวอย่าง ปริมาตรหลุมละ 11 μl
4. เติมบรอตแบคทีเรีย วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent ตัวอย่างละ 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μl (หลุมตัวอย่าง 3 หลุม และหลุมตัวอย่าง + PPC 3 หลุม) โดยเลือก dilution ที่ 10^{-5} สำหรับบรอต-แบคทีเรีย และ dilution ที่ 10^{-4} สำหรับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent
5. นำ plate ใส่ลงในเครื่อง microplate reader บ่มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 37°C ทั่วทั้ง plate
6. เติม LAL ปริมาตร 100 μl ลงในทุกหลุมอ่านค่าการเกิดปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm เทียบกราฟมาตรฐานเอนโดทอกซิน
7. อ่านค่าเอนโดทอกซินที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม WinKQCL Version 4 และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ผล

1. เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินของบรอตแบคทีเรียและบรอตแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration โดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเอนโดทอกซิน
2. เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent โดยวิธี Paired sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 20

ผล

1. การหาความเจือจางที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

จากการอ่านค่าปริมาณเอนโดทอกซิน พบว่าความเจือจางที่เหมาะสมของบรอตแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน คือ dilution ที่ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

ปริมาณเอนโดทอกซินในบรอตแบคทีเรียก่อนกรองและหลังการกรองด้วย cross flow filtration พบว่ามีค่าเฉลี่ย (mean) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ $4.31 \pm 0.59 \times 10^5$ และ $7.92 \pm 0.88 \times 10^4$ EU/ml ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเอนโดทอกซิน เท่ากับ $81.51 \pm 1.94\%$ (ตารางที่ 2)

ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน และวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent จำนวน 20 ชุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $7.29 \pm 1.63 \times 10^3$ และ $7.98 \pm 1.79 \times 10^3$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Paired sample T-test พบว่าปริมาณเอนโดทอกซิน

ของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี LAL test เทคนิค Kinetic Chromogenic LAL จะอาศัยการเกิดสีหลังจากการแตกออกของ synthetic peptide chromogen complex ความเข้มข้นของสีจะขึ้นกับปริมาณเอนโดทอกซิน (ประพิมพ์พัทตร์, 2558) และการอ่านค่าเอนโดทอกซิน มีเกณฑ์กำหนดว่าเปอร์เซ็นต์ Positive Product Control Recovered (%PPC Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 50-200% และเปอร์เซ็นต์ Coefficient of Variation (%CV) ต้องมีค่า <10% จึงถือว่าไม่เกิด Inhibition/Enhancement ปริมาณเอนโดทอกซินในตัวอย่างทดสอบนั้นจึงจะนำมาใช้ได้ (USP, 2012b) เนื่องจากบรอกแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันมีความชุ่มชื้นทำให้ไม่สามารถอ่านค่าได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหา dilution ที่เหมาะสมก่อนนำไปตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน จากผลการทดสอบพบว่า dilution ที่เหมาะสมของบรอกแบคทีเรียและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน คือ 10^{-5} และ 10^{-4} ตามลำดับ โดยมีค่า %PPC Recovery และ %CV ที่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างน้อยที่สุด (ธานินทร์, 2548) (ตารางที่ 1)

กระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันจะเริ่มจากการเพาะเชื้อ *P. multocida* ในอาหารเลี้ยงเชื้อและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเรียกสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่ถูกฆ่าเชื้อแล้วว่าบรอกแบคทีเรีย การฆ่าเชื้อนี้จะทำให้เชื้อ *P. multocida* ตายและปล่อยเอนโดทอกซิน ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินจึงพบว่าปริมาณเอนโดทอกซินสูงกว่าตัวอย่างในขั้นตอนอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการหาปริมาณเอนโดทอกซินในบรอกแบคทีเรียระหว่างการเพาะเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ รวม 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเอนโดทอกซินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเชื้อโดยพบปริมาณเอนโดทอกซิน 718,500 EU/ml ณ เวลา 24 ชั่วโมงหลังการเพาะเชื้อ (รัชนิ และคณะ, 2546) จากนั้นนำบรอกแบคทีเรียมานำผ่านกระบวนการกรอง cross flow filtration พบว่าปริมาณเอนโดทอกซินลดลง เนื่องจากกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration มีการเจือจางบรอกแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือและกรองหลายรอบ เอนโดทอกซินบางส่วนไหลผ่านรูพรุนของเมมเบรนไปพร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้ปริมาณเอนโดทอกซินลดลง จาก $4.31 \pm 0.59 \times 10^5$ เหลือ $7.9 \pm 0.88 \times 10^4$ คิดเป็น 81.51 $\pm$ 1.94% (ตารางที่ 2)

มีการศึกษาพบว่าตัวอย่างบางประเภท เช่น Human serum albumin, 5% and 25% Plasma protein fraction, Electrolyte solutions, Antihemophilic factor และ Lipid emulsions จะมีสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินได้ โดยองค์ประกอบของเอนโดทอกซิน ได้แก่ Lipid A จะเข้าไปจับกับสารประกอบของตัวอย่าง ทำให้ LAL ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนโดทอกซินในตัวอย่างได้ (Hochstein *et al.*, 1979) ดังนั้นในการตรวจตัวอย่างที่มีแนวโน้มว่าจะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยากับการทดสอบด้วยวิธี LAL test จำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยการกระจายตัว (dispersing agent) ระหว่างสารประกอบกับ Lipid A ให้เป็นสารที่มีอนุภาคขนาดเล็ก เพื่อให้ LAL สามารถทำปฏิกิริยากับเอนโดทอกซินได้ เช่นการเติมคลอโรฟอร์มในซีรัมหรือพลาสมาเพื่อช่วยการกระจายตัวระหว่าง serum protein กับ Lipid A (Levin *et al.*, 1970) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน โดยพบว่าเมื่อเติม dispersing agent ลงในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน แล้วนำไปตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินพบว่าปริมาณเอนโดทอกซินที่อ่านค่าได้ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่ไม่ได้เติม dispersing agent และเมื่อนำมาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่าแต่ละชุดที่มีการทดสอบซ้ำจะมี

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันน้อยมากเมื่อเทียบกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันที่ไม่ได้เติม dispersing agent (ตารางที่ 3) และเมื่อนำค่าปริมาณเอนโดทอกซินมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Paired sample T-test ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าการเติม dispersing agent จะช่วยในการกระจายตัวระหว่างสารประกอบกับ Lipid A ทำให้สามารถหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี LAL ได้

ในประเทศอิหร่านเคยมีรายงานว่าสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลด 3-12% ของสัตว์เกิดอาการช็อก (Vesal and Maleki, 2000) จึงเริ่มมีการศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลดที่ผลิตด้วยวิธีเดิมกับวัคซีนที่มีการปรับปรุงกระบวนการผลิต โดยการนำบรอกแบคทีเรียที่เติมฟอร์มาลินมา centrifuged จากนั้นนำตะกอนเชื้อที่ได้มาเติม 0.9% โซเดียมคลอไรด์เพื่อให้เชื้อเข้มข้น 3×10^9 CFU/ml และเติม 10% อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลดผสมให้เข้ากัน เมื่อนำมาทดสอบความปลอดภัย (safety test) พบว่าสัตว์ไม่เกิดภาวะช็อกจากการแพ้วัคซีน (Jabbari and Monzeni, 2002) และเมื่อตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน พบว่าวัคซีนที่มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตจะมีปริมาณเอนโดทอกซินต่ำกว่าวัคซีนที่ผลิตด้วยวิธีเดิม (Jabbari and Monzeni, 2007) เนื่องจากในขั้นตอนการ centrifuged จะปั่นเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งทั้งหมดเหลือไว้แต่ตะกอนเชื้อ จึงทำให้เอนโดทอกซินที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกจัดออกปริมาณมาก

ดังนั้นหากในกระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันเปลี่ยนจากการนำบรอกแบคทีเรียที่เติมฟอร์มาลินมาผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration เป็นการ centrifuged อาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันได้ และเป็นการป้องกันไม่ให้สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเกิดการแพ้วัคซีนจากเอนโดทอกซิน

สรุป

การตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันโดยวิธี LAL พบว่าความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซินในบรอกแบคทีเรียก่อนกรองและหลังกรองด้วย cross flow filtration คือ ความเจือจางที่ 10^{-5} และสำหรับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมียชนิดน้ำมัน คือ ความเจือจางที่ 10^{-4} และเติม dispersing agent ซึ่งที่ความเจือจางนี้มี %PPC และ %CV อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีความแตกต่างกันน้อยมาก ทำให้ปริมาณเอนโดทอกซินที่อ่านค่าได้มีความถูกต้อง สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อศึกษาวิธีการลดปริมาณเอนโดทอกซินในกระบวนการผลิตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัตถุดิบการผลิต เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย และเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรียทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืองานทดลองครั้งนี้ให้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ฐิติพร ภาณุภูมิพงศ์ 2554 การทดสอบสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 21(1): 37-40
ธานินทร์ ศิลป์จารุ 2548 การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS บริษัท วี อินเทอร์เน็ต พรินท์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 167-172

- ประพิมพ์พักร์ เกื้อนสุคนธ์ 2558 การทดสอบ Bacterial Endotoxins ในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ วารสาร เพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม 22(2): 2-4
- รัชนี้ อรรถิ 2553 โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและการควบคุมป้องกันโรค วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 19(1-2): 37-51
- รัชนี้ อรรถิ รวินันท์ ฉ่ำเฉลิม นิตยา รักศรี และจันทรทิพย์ แสงทอง 2546 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณ Endotoxin ในวัคซีน Haemorrhagic septicaemia ประมวลเรื่องการประชุมสัมมนาวิชาการสำนัก เทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ครั้งที่ 9: 77-80
- สุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย ฮันส์ ดินดอลล์ กุลน้า เฟรดริกสัน และลาร์ เอตควิสท์ 2536 โปรสต้าแกลนดินและเอนโด- ท็อกซินกับโรคที่มีความสัมพันธ์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาสัตวประมง สัตวแพทยศาสตร์: 615-618
- De Alwis, M. C. L. 1999. Vaccine. In Haemorrhagic septicaemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Centre for International Agriculture Research, Canberra, Australia. pp. 1-11.
- Harper, M., Boyce, J. D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbio. Lett. 265(1): 1-10.
- Hochstein, H. D., Seligmann, E. G., Marquina, R. B. and Rivera, E. 1979. Limulus amebocyte lysate testing in normal serum albumin (human). Develop. Biol. Standard. 44: 35-52.
- Jabbari, A. R. and Moazeni Jula, G. R. 2002. Improvement of haemorrhagic septicaemia vaccine by removing of anaphylactic agents. Arch. Razi Ins. 54: 85-92.
- Jabbari, A. R. and Moazeni Jula, G. R. 2007. Measuring of free endotoxin in alum-precipitated vaccine of haemorrhagic septicaemia by limulus amebocyte lysate test. Iranian J. Vet. Res. 8 (1): 83-85.
- Levin, J., Tomasulo, P. A. and Oser, R. S. 1970. Detection of endotoxin in blood and demonstration of an inhibitor. J. Lab. Clin. Med. 75(6): 903 -911.
- Mark, E. B. and Shauna, N. H. 2005. Bacterial contamination of blood components. Clinical Microbiology Reviewers. 18: 195-204.
- United States Pharmacopeia. 2012a. Sterilization and sterility assurance/General information. In The United States Pharmacopeia, 37thed. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD. pp. 1141-1145.
- United States Pharmacopeia. 2012b. Bacterial endotoxin test/Biological test. In The United States Pharmacopeia, 37th ed. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD. pp. 92-96.
- Verma, R. and Jaiswal, T. N. 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. Vaccine. 16: 1184-1192
- Vesal, N. and Maleki, M. 2000. Anaphylactic reaction following vaccination in herd of dairy cattle. Iranian J. Vet. Res. 1: 60-66.

ตารางที่ 1 การหา dilution ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณเอนโดทอกซิน

ตัวอย่าง	dilution	%PPC Recovery				% cv			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean±SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean±SD
1. บรอตแบคทีเรีย ก่อนกรอง	10 ⁻³	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.56	2.93	2.85	2.78±0.16
	10 ⁻⁴	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.37	2.60	2.48	2.48±0.09
	10 ⁻⁵	64	63	65	64±0.82	2.55	2.56	2.55	2.55±0.00
	10 ⁻⁶	153	149	151	151±1.63	1.98	1.73	1.84	1.85±0.10
2. บรอตแบคทีเรีย หลังกรองด้วย cross flow filtration	10 ⁻³	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	3.10	2.75	2.95	2.93±0.14
	10 ⁻⁴	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	2.53	2.37	2.55	2.48±0.08
	10 ⁻⁵	89	89	91	90±0.94	2.11	2.15	2.13	2.13±0.02
	10 ⁻⁶	133	120	126	126±5.31	3.70	3.77	3.82	3.76±0.05
3. วัคซีนเฮโมรายิก- เซพติซีเมียชนิดน้ำมัน	10 ⁻³	23	26	24	24±1.25	1.32	1.28	1.34	1.31±0.02
	10 ⁻⁴	99	100	99	99±0.47	1.01	1.00	1.03	1.01±0.01
	10 ⁻⁵	150	155	151	152±2.16	3.38	3.16	3.40	3.31±0.11
	10 ⁻⁶	100	94	95	96±2.62	1.20	1.40	1.17	1.25±0.10
4. วัคซีนเฮโมรายิก- เซพติซีเมียชนิดน้ำมัน ที่เติม dispersing agent	10 ⁻³	15	13	16	15±1.25	1.50	1.45	1.63	1.52±0.08
	10 ⁻⁴	110	110	109	110±0.47	1.90	1.98	1.95	1.94±0.03
	10 ⁻⁵	99	99	94	97±2.36	3.13	3.70	3.00	3.26±0.30
	10 ⁻⁶	136	130	136	134±2.83	2.46	3.40	3.00	2.93±0.39

หมายเหตุ N/A* = ไม่สามารถอ่านค่าได้

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในบรอตแบคทีเรียก่อนและหลังการกรองด้วย cross flow filtration

การตรวจหาปริมาณ เอนโดทอกซิน	ปริมาณเอนโดทอกซิน (EU/ml)		เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ปริมาณเอนโดทอกซิน
	บรอตแบคทีเรียก่อนกรอง	บรอตแบคทีเรียหลังการกรองด้วย cross flow filtration	
ครั้งที่ 1	4.31 × 10 ⁵	8.74 × 10 ⁴	79.72%
ครั้งที่ 2	4.90 × 10 ⁵	8.05 × 10 ⁴	83.57%
ครั้งที่ 3	3.72 × 10 ⁵	6.98 × 10 ⁴	81.24%
Mean ± SD	4.31 ± 0.59 × 10 ⁵	7.92 ± 0.88 × 10 ⁴	81.51 ± 1.94%

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent

ชุดการผลิต	ปริมาณเอนโดทอกซิน ($\times 10^3$ EU/ml)	
	วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน	วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent
1/55	7.01 $\pm$ 1.11	7.63 $\pm$ 0.38
2/55	8.45 $\pm$ 1.47	9.35 $\pm$ 0.02
1/56	8.06 $\pm$ 3.37	10.30 $\pm$ 0.12
2/56	7.44 $\pm$ 2.81	8.55 $\pm$ 0.05
3/56	9.21 $\pm$ 2.79	9.05 $\pm$ 0.02
4/56	7.83 $\pm$ 1.34	9.17 $\pm$ 0.02
5/56	7.01 $\pm$ 2.66	8.30 $\pm$ 0.20
1/57	4.37 $\pm$ 1.98	4.89 $\pm$ 0.29
2/57	4.98 $\pm$ 1.48	4.81 $\pm$ 0.27
1/58	7.51 $\pm$ 1.69	7.36 $\pm$ 0.50
2/58	6.86 $\pm$ 1.56	7.71 $\pm$ 0.32
3/58	6.59 $\pm$ 1.86	8.52 $\pm$ 0.25
4/58	8.87 $\pm$ 0.91	8.61 $\pm$ 0.42
5/58	5.26 $\pm$ 1.08	6.77 $\pm$ 0.34
6/58	5.79 $\pm$ 1.12	5.71 $\pm$ 0.21
7/58	4.64 $\pm$ 0.71	4.97 $\pm$ 0.37
1/59	9.08 $\pm$ 3.04	8.46 $\pm$ 0.41
2/59	7.53 $\pm$ 1.99	8.51 $\pm$ 0.39
3/59	9.52 $\pm$ 0.84	9.80 $\pm$ 0.31
4/59	9.73 $\pm$ 0.44	11.17 $\pm$ 0.35
Mean $\pm$ SD	7.29 $\pm$ 1.63	7.98 $\pm$ 1.79

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณเอนโดทอกซินในวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม Dispersing agent โดยวิธี Paired sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 20

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Type A *	7.2870	20	1.63449	.36548
	Type B **	7.9820	20	1.78870	.39997

Paired Samples Correlations					
			N	Correlation	Sig.
Pair 1	Type A * & Type B **		20	.896	.000

Paired Samples Test								
Paired Differences						T	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1								
Type A * - Type B **	-.69500	.79465	.17769	-1.06691	-.32309	-3.911	19	.001

Type A * = ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน

Type B ** = ปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent

จากผลการวิเคราะห์ ค่า t เท่ากับ -3.911 และค่า Sig. เท่ากับ .001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปริมาณเอนโดทอกซินของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันและวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่เติม dispersing agent มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

Determination of endotoxin in Haemorrhagic septicaemia vaccine by Limulus Amebocyte Lysate test

Areerat Sutto¹Puvanat Paopramote¹

Abstract

The Kinetic Chromogenic LAL technique for endotoxin detection in haemorrhagic septicaemia (HS) vaccine was performed. This study found that the optimal dilution for broth bacterin and HS vaccine were 10^{-5} and 10^{-4} , respectively. The endotoxin concentration in broth bacterin before crossflow filtration was $4.31 \pm 0.59 \times 10^5$ EU/ml and after crossflow filtration was $7.92 \pm 0.88 \times 10^4$ EU/ml. Of 20 sample HS vaccine and 20 sample HS vaccine with dispersing agent added were measured endotoxin concentration. The result show that an average value of endotoxin in HS vaccine with and without dispersing agent were $7.98 \pm 1.79 \times 10^3$ and $7.29 \pm 1.63 \times 10^3$ EU/ml, respectively which was statistical significance ($P < 0.05$). From this research, the derived data is to be utilized in oil HS vaccine manufacturing process for controlling of endotoxin.

Keywords: Haemorrhagic septicaemia vaccine, Endotoxin, Dispersing agent, Limulus Amebocyte Lysate

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6

กั้ววาน จิงธีรพานิช¹ ดิถี ประเสริฐสุวรรณ¹

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขนสำหรับเป็นเชื้อพิษตับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร โดยเพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 เก็บไวรัสทุกวัน เป็นเวลา 16 วัน ตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสุกรทดลอง พบว่า วันที่ 10 หลังการเพาะไวรัสลงเซลล์เพาะเลี้ยง จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุดเท่ากับ $10^{6.08}$ TCID₅₀/มิลลิลิตร และปริมาณไวรัสในสุกรทดลองเท่ากับ 10^6 PID₅₀/มิลลิลิตร เมื่อนำไวรัสมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 3, 9 และ 15 เดือน พบปริมาณไวรัสเท่ากับ 10^6 , 10^6 และ $10^{5.54}$ PID₅₀/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสามารถเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์ SK6 ซึ่งให้ปริมาณไวรัสเพียงพอกับการใช้เป็นเชื้อพิษตับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร คือ ไม่น้อยกว่า 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร และสามารถเก็บรักษาเพื่อใช้งานได้ อย่างน้อย 1 ปี

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง เซลล์เพาะเลี้ยง SK6 ปริมาณไวรัส ความคุ้มโรค

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกร (พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์, 2558) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เกิดจากเชื้อไวรัส Classical swine fever อยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus ติดต่อกันโดยการสัมผัสกับสัตว์ป่วยสิ่งขับถ่าย น้ำเชื้อ หรือสารคัดหลั่งจากสัตว์ที่ป่วยหรือตาย การป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรคให้กับสุกร ซึ่งวัคซีนที่ใช้ต้องเป็นไปตามมาตรฐานสากล เช่น องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health (OIE), 2014) หรือ ประชาคมอาเซียน (Association of South East Asian Nations (ASEAN), 1998) สำหรับการทดสอบความคุ้มโรค วัคซีนอหิวาต์สุกรที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำได้โดยการฉีดวัคซีนที่เจือจางจากขนาดที่แนะนำให้ใช้ใน พื้นที่เป็นขนาด 1/40 และ 1/160 จากนั้น 14 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่มีปริมาณไวรัส 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร (50% Pig Infectious Dose) ตัวละ 1 มิลลิลิตร ให้สุกรกลุ่มได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุม สังเกตอาการและบันทึกอุณหภูมิร่างกายสุกรทุกวันเป็นเวลา 14 วัน นำข้อมูลสุกรที่แสดงอาการป่วยหรือตายด้วย โรคอหิวาต์สุกรมาคำนวณความคุ้มโรค ซึ่งวัคซีนต้องมีความคุ้มโรค (50% Protective Dose) ไม่น้อยกว่า 100 PD₅₀/โดส

การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงสายพันธุ์บางเคน (Classical swine fever, Bangkhen strain) ทำได้โดยการฉีดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวให้กับสุกร ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรใน ท้องที่อำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2493 มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร ภายหลังฉีดเชื้อไวรัส 5-10 วัน สุกรจะแสดงอาการป่วย อุณหภูมิร่างกายสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เจาะเก็บเลือดสุกรจากหัวใจหรือเส้นเลือด Anterior vena cava ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำเลือดที่ได้ใส่ใน ขวดบอลลูนและทำ defibrinated ด้วย glass bleed จากนั้นบรรจุเลือดที่ได้ลงในขวดแก้ว ขวดละ 1 มิลลิลิตร นำไปทดสอบความปลอดเชื้อบนเป็อนและหาปริมาณไวรัสในสุกร ซึ่งการหาปริมาณไวรัสของเชื้อพิษอหิวาต์สุกร ตามวิธีมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำโดยเจือจางไวรัสที่เก็บจากสุกรเป็น 10-fold dilution ที่ความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-9} จากนั้นฉีดสุกรทดลองความเจือจางละ 4 ตัวๆ ละ 1 มิลลิลิตร แยกเลี้ยงแต่ละความเจือจาง พร้อมสุกรกลุ่มควบคุม บันทึกอุณหภูมิทุกวัน จำนวนสุกรตาย/รอด และรอยโรคที่เกิดจาก โรคอหิวาต์สุกร คำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีมาตรฐาน เก็บเป็นสต็อกเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง เพื่อใช้ในการทดสอบ ความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรต่อไป

การเตรียมเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงด้วยวิธีนี้ยังต้องใช้สุกรเป็นตัวตั้งต้นซึ่งมีข้อจำกัด ได้แก่ 1) ผู้ปฏิบัติงาน เจาะเก็บเลือดจากสุกรต้องมีความชำนาญ เนื่องจากมีโอกาสการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างการเก็บค่อนข้างสูง อีกทั้งปริมาณเลือดที่ได้แต่ละครั้งอาจไม่แน่นอน 2) สุกรที่ใช้ต้องมีการตรวจสุขภาพและสภาวะร่างกายของสุกร ทุกครั้งก่อนนำมาใช้เตรียมเชื้อพิษ โดยสุกรต้องปลอดจากโรค เช่น Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome (PRRS), โรคติดเชื้อ Mycoplasma หรือโรคอื่นตามข้อกำหนดโรคระบาดสุกรขององค์การโรคระบาด สัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) หากตรวจพบจะทำให้เกิดความล่าช้าในขั้นตอนการเตรียมสัตว์ก่อนนำมาใช้ และใน ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณไวรัสของเชื้อพิษหลังจากเจาะเก็บเลือดสุกรก็ต้องมีการเตรียมสัตว์ทดลองและต้องรอ ผลการตรวจโรคเช่นเดียวกัน

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น SK6 (Hulst *et al.*, 2000; Terpstra *et al.*, 1990) และ FS-L3 (Sakoda and Fukusho, 1996; วาสนาและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร พบว่า เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนโซนิส สามารถตรวจพบในเซลล์ทั้ง SK6 และ FS-L3 ได้ใน passage แรก ในวันที่ 7 และ 12 หลังเพาะเชื้อตามลำดับ นอกจากนี้ไวรัสอหิวาต์สุกรยังเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ เซลล์สุกร (Sasahara and Kumagai, 1966) ได้แก่ BEK (เซลล์ไตโค), MARC-145 (เซลล์ไตลิง), Vero (เซลล์ไต

ลิง), และ HL (เซลล์ปอดแฮมสเตอร์) ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์มีการใช้เซลล์ SK6 ในการตรวจหาปริมาณไวรัสพบว่าเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายและไวรัสเจริญเติบโตได้ดี

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 สำหรับใช้เป็นเชื้อพิษทัพบในการทดลองความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร ซึ่งหากเตรียมไวรัสจากเซลล์ชนิดนี้ได้จะสามารถลดขั้นตอนการเตรียมเชื้อพิษทัพบแต่ละครั้งให้สั้นลง เพาะเลี้ยงไวรัสได้มาก ลดการปนเปื้อนของเชื้อในขั้นตอนการเจาะเลือด อีกทั้งยังลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองได้ตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large white, Landrace, Duroc) คละเพศ อายุ 6-8 สัปดาห์ ปลอดโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอหิวาต์สุกร จำนวน 127 ตัว

2. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ SK6 (Growth medium, GM) ประกอบด้วย minimal essential medium, Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 5%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium, MM) ประกอบด้วย minimal essential medium, Tryptose phosphate broth solution 1%, L-glutamine 1%, sodium bicarbonate 1%, antibiotic 1%, และ calf serum 1%

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ SK6

ใช้เซลล์ SK6 ที่เก็บในถังลิควิดไนโตรเจน passage ที่ 27 เพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดพลาสติกแบนขนาด 75 ตารางเซนติเมตร จำนวน 40 ขวด จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อขวด เติม 5% GM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ขวด บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 5 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นที่ผิวขวด จึงนำไปใช้เพาะเลี้ยงไวรัสต่อไป

4. การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ใช้เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน (Classical swine fever, Bangkok strain) มีปริมาณไวรัส 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนอหิวาต์สุกร ตามมาตรฐานการปฏิบัติงานทดสอบวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

4.1 การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในสุกร

ฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงปริมาณไวรัส 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร ให้สุกร 2 ตัวๆ ละ 1 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อที่คอหลังหู บันทึกอุณหภูมิร่างกายทุกวันภายหลังฉีดไวรัสเป็นเวลา 10 วัน สุกรต้องมีอุณหภูมิร่างกายสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสและแสดงอาการป่วยของโรคอหิวาต์สุกร เจาะเก็บเลือดสุกรจากหัวใจหรือเส้นเลือด Anterior vena cava ปั่นและเก็บตัวอย่างซีรัมที่ได้ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณไวรัสในสุกรทดลองและใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การเตรียมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ SK6

นำไวรัสอหิวาต์สุกรที่ได้จากข้อ 4.1 ซึ่งทราบปริมาณไวรัสแล้วและเจือจางให้มีปริมาณไวรัสตั้งต้น 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จำนวน 36 ขวดๆ ละ 1 มิลลิลิตร เติม MM ปริมาตร 19

มิลลิลิตร อีก 4 ขวดไม่ใส่ไวรัส (เป็นกลุ่มควบคุม) นำไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เก็บไวรัสทุกวัน (day post inoculation; dpi) วันละ 2 ขวด นาน 16 วัน นำมาแช่แข็งที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายน้ำไวรัส (thaw) มารวมกันในแต่ละวัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์¹ เก็บส่วนน้ำใส แบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำไปหาปริมาณไวรัสโดยใช้เซลล์ SK6 และความรุนแรงในสุกรในขั้นตอนต่อไป

5. การหาปริมาณไวรัส

5.1 วิธีการหาปริมาณไวรัสในเซลล์ SK6

เพาะเลี้ยงเซลล์ SK6 ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 3 วัน นำมาใช้งาน เมื่อเซลล์เจริญเต็มก้นเพลท เตรียมตัวอย่างไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากข้อ 4.2 จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยการเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วย PBS pH 6.8-7.2 ที่ความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-7} เติมตัวอย่างไวรัสลงในไมโครเพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง หลุมละ 50 ไมโครลิตร พร้อมเซลล์ควบคุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 7 วัน ย้อมสีไมโครเพลทด้วยวิธี Immunoperoxidase สังเกตการย้อมติดสีของเซลล์จากไมโครเพลทที่ใส่เชื้อไวรัส เปรียบเทียบกับหลุมที่มีเซลล์ควบคุม บันทึกจำนวนหลุมที่มีการย้อมติดสีและไม่มี คำนวณปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (tissue culture infective dose, TCID₅₀) ด้วยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938)

5.2 วิธีการหาปริมาณไวรัสในสุกร

ใช้สุกรทดลอง 6 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว สุกรควบคุม 1 ตัว เจือจางไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่เตรียมในเซลล์ SK6 (วันที่ให้ปริมาณไวรัสสูงสุด) แบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-7} ฉีดไวรัสแต่ละ dilution ให้กับสุกรแต่ละกลุ่ม บันทึกอุณหภูมิร่างกายทุกวันและจำนวนสัตว์ตาย/รอด คำนวณหาความรุนแรงของไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench เป็นค่า PID₅₀/มิลลิลิตร ทำการหาความรุนแรงของไวรัสในสุกรในเดือนที่ 0, 3, 9 และ 15 หลังเก็บไวรัส

ผล

ไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง ที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุด คือ $10^{6.08}$ TCID₅₀/มิลลิลิตร ในวันที่ 10 และ 11 หลังเพาะเชื้อ (ตารางที่ 1) และไวรัสที่เก็บได้ในวันที่ 10 มีปริมาณไวรัสในสุกรทดลอง เท่ากับ 10^6 PID₅₀/มิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทดสอบหาปริมาณไวรัสในสุกรพบว่า ในเดือนที่ 3, 9 และ 15 มีปริมาณไวรัสเท่ากับ 10^6 , 10^6 และ $10^{5.54}$ PID₅₀/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาการเตรียมปริมาณไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเชน ในเซลล์เพาะเลี้ยง SK6 ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร (Kasza, 1972) ในสภาพ stationary บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีซีรัมโค 1% เก็บตัวอย่าง culture fluid ติดต่อกัน 16 วัน พบว่าไวรัสสามารถเจริญเติบโตในเซลล์ชนิดนี้ได้ โดยปริมาณไวรัscopy เพิ่มขึ้นจนพบปริมาณสูงสุดในวันที่ 10 และ 11 หลังเพาะเชื้อ ซึ่งไวรัสสอหิวาต์สุกร สเตรนไซนิสชนิดผ่านกระต่าย สามารถเจริญได้ในเซลล์นี้เช่นกัน (วาสนาและคณะ, 2544) เมื่อนำไวรัสวันที่ 10 หลังเพาะเชื้อไปตรวจ

¹ Sigma model 2K15 centrifuge, Germany

ปริมาณไวรัสในสุกรทดลอง พบว่าปริมาณไวรัสที่เตรียมจากเซลล์และสัตว์ทดลองมีปริมาณไวรัสใกล้เคียงกัน โดยสุกรตอบสนองต่อเชื้อไวรัสอุนหมูมีร่างกายเพิ่มขึ้นสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และแสดงอาการป่วยของโรคอหิวาต์-สุกร (สุพล, 2543) และปริมาณไวรัสของตัวอย่างดังกล่าว ที่เก็บอุนหมูมี -80 องศาเซลเซียส ตรวจซ้ำในสุกรทดลอง เดือนที่ 3, 9 และ 15 พบว่าปริมาณไวรัสยังคงมากกว่า 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร

ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากสุกรทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความคุ้มโรควัคซีนอหิวาต์สุกร ซึ่งการเตรียมเชื้อแต่ละครั้งต้องอาศัยความชำนาญของผู้เตรียม อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงสุขภาพและคุณภาพของสัตว์ทดลองที่ใช้ รวมถึงจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละครั้งมีจำนวนมาก ส่วนการเตรียมไวรัสด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำได้ง่าย สะดวกในการใช้งาน ลดขั้นตอนในการจัดหาสุกรทดลอง ลดการใช้สัตว์ทดลอง และไม่ต้องฝึกฝนผู้ปฏิบัติงานในการเตรียมเชื้อจากสัตว์ทดลอง ลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในขั้นตอนการเตรียมไวรัสได้

สรุป

ไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงสายพันธุ์บางเขน สามารถเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 ได้ โดยวิธีการตรวจในเซลล์เพาะเลี้ยงและสุกรทดลอง ไวรัสที่ได้มีความรุนแรงตามมาตรฐานสำหรับทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร คือไม่น้อยกว่า 10^5 PID₅₀/มิลลิลิตร วันที่เหมาะสมในการเก็บเชื้อไวรัสเป็นวันที่ 10 หลังการเพาะ และเมื่อเก็บรักษาเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 ปี ไวรัสยังคงความรุนแรงเพียงพอต่อการใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร

เอกสารอ้างอิง

- พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 14 ก หน้า 22-40.
- วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากร สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโกคิน และฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2544 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ไลน์สัตว์แพทยสาร ปีที่ 52 เล่มที่ 3 หน้า 21-30
- สุพล เลื่องยศลือชากุล 2543 โรคติดเชื้อของสุกร คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม ISBN 974-333-383-5 หน้า 1-17
- ASEAN. 1998. ASEAN standards requirement for swine fever vaccine (cell culture origins), live. In ASEAN standard for animal vaccines. Livestock publication series. No.2A. 2nd edition. P.60-61.
- Hulst, M. M., Van Gennip, H. P. G. and Moormann, R. J. M. 2000. Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein E^{ms}. J. Virol. 74(20): 9553-9561.
- Kasza, L., Shaddock, J. A., and Christofines, G. J. 1972. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of swine kidney cell line SK-6. Res. Vet. Sci. 13: 46-51
- OIE Terrestrial Manual 2014 Chapter 2.8.3 Classical Swine Fever (Hog Cholera) (Infection with classical swine fever virus) p. 1-26.
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

- Sakuda, Y. and Fukusho, A .1996. Establishment and characterization of a porcine kidney cell line, FS-L3, which forms unique multicellular domes in serum-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34: 53-57.
- Sasahara, J.and Kumagai,T.1966. Development of tissue culture live hog cholera vaccine. *Jpn. Agr. Res.Q. (Tokyo)* 1, pp.24-26.
- Terpstra C, Woortmeyer R, Barteling SJ.1990. Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. 1990 Feb; 97(2): 77-9.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 หลังเพาะเชื้อวันที่ 1-16 โดย ตรวจในเซลล์เพาะเลี้ยง

วันที่เก็บ	ปริมาณไวรัส (TCID ₅₀ /มิลลิลิตร)
1	10 ^{5.01}
2	10 ^{5.01}
3	10 ^{3.73}
4	10 ^{3.8}
5	10 ^{3.8}
6	10 ^{4.7}
7	10 ^{4.7}
8	10 ^{4.7}
9	10 ^{5.05}
10	10 ^{6.08}
11	10 ^{6.08}
12	10 ^{5.86}
13	10 ^{4.3}
14	10 ^{3.73}
15	น้อยกว่า 10 ²
16	อ่านค่าไม่ได้

*คำนวณด้วยวิธี Reed and Muench

ตารางที่ 2 ความรุนแรงของเชื้อไวรัสสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ SK6 จากการทดสอบในสุกรทดลอง ในเดือนที่ 0, 3, 9 และ 15 หลังเก็บไวรัส

ความเจือจาง (Dilution)	จำนวนสุกร (ตาย/รอด)			
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 3	เดือนที่ 9	เดือนที่ 15
10 ⁻²	4/0	4/0	4/0	4/0
10 ⁻³	4/0	4/0	4/0	4/0
10 ⁻⁴	4/0	4/0	4/0	4/0
10 ⁻⁵	3/1	3/1	3/1	3/1
10 ⁻⁶	2/2	2/2	2/2	1/3
10 ⁻⁷	1/3	1/3	1/3	0/4
ปริมาณไวรัส (PID ₅₀ /มิลลิลิตร)	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ^{5.54}

*คำนวณด้วยวิธี Reed and Muench

The preparation of virulent classical swine fever virus from SK6 cells culture

Kungwan Jungtheerapanich¹

Ditee Prasertsuwan¹

Abstract

Study on the preparation of Bang khen virulent swine fever virus using for vaccine potency test by inoculation in SK6 cells was conducted in SK6 cell was conducted. The virus was harvested daily for 16 days and determined the virulent in an experimental pig. It was found that the harvested virus at day 10 obtained the maximum titer in cell culture equal to $10^{6.08}$ TCID₅₀/ml and 10^6 PID₅₀/ml in experimental pig. After keeping at -80°C for 3, 9 and 15 months the virus titer were 10^6 , 10^6 and $10^{5.54}$ PID₅₀/ml, respectively. Therefore, the virulent swine fever virus could be prepared from SK6 cells, titer not less than $10^{5.0}$ PID₅₀/ml and shelf-life one year at least which can be use for swine fever vaccine potency test.

Keywords: Virulent classical swine fever virus, SK6 cells culture, Virus content, Potency test

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

วรพร ปู่สูงเนิน¹วีรชาย ปู่สูงเนิน¹

บทคัดย่อ

ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่จากเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สเตรนท้องถิ่น จำนวน 3 ตัวรับ ได้แก่ ตัวรับที่ 1 วัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์ริน มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) ตัวรับที่ 2 วัคซีนชนิดน้ำมัน โดยใช้แอดจูแวนท์สำเร็จรูปพร้อมผสม (MONTANIDE™ ISA 71 VG) มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) และตัวรับที่ 3 วัคซีนชนิดน้ำมัน โดยใช้แอดจูแวนท์ชนิดเดียวกับตัวรับที่ 2 มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (0.5 มล.) นำวัคซีนไปทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งทดสอบในเป็ดพันธุ์กากิ-แคมป์เบลล์ ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัย การทดสอบความคุ้มโรค และการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่า วัคซีนทุกตัวรับผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทางห้องปฏิบัติการ มีความปลอดภัย โดยเป็ดไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ไม่มีอาการและวิการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ รวมทั้งไม่มีวัคซีนหลงเหลือบริเวณจุดฉีด และการทดสอบความคุ้มโรค พบว่าจากการฉีดวัคซีนตัวรับที่ 1 ตัวละ 1 มล. จำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง ให้ความคุ้มโรค 90% และ 100% ตามลำดับ เมื่อฉีดวัคซีนตัวรับที่ 2 ตัวละ 1 มล. และ 0.5 มล. และวัคซีนตัวรับที่ 3 ตัวละ 0.5 มล. ให้ความคุ้มโรค 100% ทั้งกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง และจากการตรวจหาระดับแอนติบอดี พบว่าทั้งการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่แตกต่างจากกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้นสรุปได้ว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน มีความปลอดภัย สามารถลดขนาดโดสที่ฉีดลดปริมาณเชื้อในวัคซีน ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว สามารถให้ความคุ้มโรคได้ 100% และให้ระดับแอนติบอดีสูงภายใน 7 วัน

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน ระดับแอนติบอดี ความคุ้มโรค

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* serotype A เป็นโรคระบาดเกิดขึ้นทั่วโลก มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง เป็นโรคติดต่อร้ายแรง พบได้ในไก่ เป็ด ห่าน ไก่วง สัตว์ปีกอื่นๆ รวมทั้งนกหลายชนิด ทุกระดับอายุ แต่สัตว์อายุน้อยมีอัตราการป่วยและตายสูงกว่าสัตว์อายุน้อย ระบาดได้ทุกฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนหรือช่วงเปลี่ยนฤดูกาลจะมีการระบาดรุนแรงมากที่สุด (สุรวัฒน์และจารุณี, 2558) จึงเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งการเลี้ยงสัตว์ปีกในฟาร์มและสัตว์ปีกที่เลี้ยงตามหลังบ้าน การทำวัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ทั่วโลกใช้ลดความชุกและอุบัติการณ์การเกิดโรค เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีราคาแพง ใช้เวลานาน ไม่ได้ผลเท่าที่ควร และเพิ่มโอกาสให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ แม้ว่าการมีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดียังช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ไม่เพียงพอในการจัดการกับโรคนี้นี้ ดังนั้นวัคซีนจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกัน และป้องกันการสูญเสียจากการเกิดโรค (Ahmad *et al.*, 2014)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์ริน จากเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ โดยแนะนำให้ฉีดใน เป็ดและไก่พื้นเมืองตัวละ 1 มล. ทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) แต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ส่วนใหญ่จากผู้ผลิตรายอื่นแนะนำให้ฉีดตัวละ 0.5 มล. รวมทั้งวัคซีนสัตว์ปีกหลายชนิดให้ฉีดตัวละ 0.5 มล. เช่น วัคซีนกัมโบโร วัคซีนกาฬโรคเป็ด วัคซีนนิวคาสเซิล เป็นต้น และการฉีดวัคซีน ตัวละ 1 มล. ถือว่าเป็นปริมาณที่สูง ในการฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ปีก ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็ก จึงทำให้พบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนในสัตว์บางตัว อาจส่งผลให้เกษตรกรไม่ยอมฉีดวัคซีน นอกจากนี้วัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์ริน มีข้อเสีย คือ มีระยะคุ้มโรคสั้น เพียง 3 เดือน เกษตรกรต้องฉีดวัคซีนหลายครั้ง จึงอาจไม่ได้ฉีดวัคซีนตามเวลาที่กำหนด และทำให้เกิดโรคตามมาได้ ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการผสมแอดจูแวนท์ชนิดต่างๆ ในวัคซีน เช่น ผสมกับโปแตสเซียม หรืออลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล เป็นวัคซีนชนิดผสมอะดัลท์ ให้ความคุ้มโรคนานขึ้น แต่ไม่เกิน 6 เดือน และมีโอกาสทำให้สัตว์เกิดการแพ้ได้ ในขณะที่การผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันอยู่ในรูปของอิมัลชัน เป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน สามารถให้ความคุ้มโรคได้นานถึง 1 ปี (รัชนิ, 2553; Spickler and Roth, 2003)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันสำเร็จรูปพร้อมผสม (Ready to formulation) ซึ่งมีวิธีการเตรียมง่าย ทำให้วัคซีนมีความหนืดลดลง ฉีดง่ายขึ้น มีความคงตัวสูง และมีการใช้ในการผลิตวัคซีนอย่างแพร่หลาย เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในด้านต่างๆ ได้แก่ ลดโดสที่ฉีด ลดปริมาณแอนติเจน ลดจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีน เพิ่มระยะคุ้มโรคให้นานขึ้น สร้างความคุ้มโรคได้สูง มีความปลอดภัย ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดการแพ้ กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงและยาวนาน ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์ (humoral immune response) และแบบพึ่งเซลล์ (cellular immune response) สามารถใช้ผสมกับแอนติเจน ได้หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไมโคพลาสมา ไวรัส และปรสิต (Arous *et al.*, 2013; Aucouturier *et al.*, 2001; Belloc *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2015) มีรายงานการใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันผสมใน วัคซีนชนิด subunit พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์และแบบพึ่งเซลล์ได้สูงในการป้องกันโรคบิดและโรคลำไส้อักเสบแบบมีเนื้อตายในไก่ (Jang *et al.*, 2010; 2011; 2012; 2013) และ Arous *et al.* (2013) ทดลองผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเชื้อตาย พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพ และสามารถลดขนาดฉีดได้ โดยฉีดวัคซีนเพียง 0.1 มล. สามารถกระตุ้นให้เกิดความคุ้มโรคและให้ระดับแอนติบอดีที่สูงและยาวนาน

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันจะช่วยลดโดสและเพิ่มระยะคุ้มโรคในวัคซีน อหิวาต์เป็ด-ไก่ได้ นอกจากนี้ปัจจุบันสทช. มีการผลิตวัคซีนป้องกันโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันจากเชื้อ

Pasteurella multocida serotype B:2 อยู่แล้ว หากในอนาคตจะมีการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จึงสามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลในการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยไม่ต้องเพิ่มต้นทุนการผลิตและไม่ต้องเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตวัคซีนในรูปแบบเดิม ผู้วิจัยจึงมีความสนใจทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันขนาดฉีดตัวละ 1 มล. และ 0.5 มล. ทั้งแบบจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) และ 1.0×10^9 CFU/โดส (0.5 มล.) แล้วเปรียบเทียบกับวัคซีนเดิม คือ วัคซีนชนิดบรอทแบคเทอริน ที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) โดยทดสอบความปลอดภัย ความคุ้มโรค และตรวจหาระดับแอนติบอดีในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เพื่อให้ได้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ เพิ่มระยะคุ้มโรค เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บและการขนส่งวัคซีน รวมทั้งเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ทองถิ่น เก็บในสภาพทำแห้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย เชื้อนี้ใช้ในการเตรียมวัคซีนและการทดสอบความคุ้มโรค

การเตรียมบรอทแบคเทอริน

ละลายเชื้อแบคทีเรียด้วย Tryptose Phosphate Broth¹ (TPB) แล้ว streak เชื้อลงบน Dextrose Starch Agar² (DSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ลงในขวดเริ่มต้นที่มี TPB ปริมาตร 4 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพมือออกซิเจน นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเฟอร์เมนเตอร์³ ที่มี TPB ปริมาตร 400 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบใบพัด 150 รอบต่อนาที นาน 9 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน⁴ 0.3% (v/v) เก็บตัวอย่างไปตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์⁵ (นิตยาและคณะ, 2547)

วัคซีน

นำบรอทแบคเทอรินที่เตรียมได้ มาผลิตวัคซีน จำนวน 3 ตำรับๆ ละ 10 ลิตร ดังนี้

วัคซีนตำรับที่ 1

เป็นวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอริน โดยนำเชื้อที่เตรียมได้มาผสมกับ 0.85% normal saline ให้ได้จำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) แล้วบรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับที่ 2

เป็นวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) โดยนำบรอทแบคเทอรินมาผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน⁶ ในอัตราส่วน บรอทแบคเทอริน:แอดจูแวนท์เท่ากับ 30:70 (w/w) ทำการผสมที่อุณหภูมิ 20°C ดังนี้ ปั่นผสมแอดจูแวนท์ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน (high shear mixer)⁷ ความเร็วรอบ 7,600 รอบ/นาที จากนั้นค่อยๆ เติบบรอทแบคเทอรินลงในแอดจูแวนท์ (ภายในเวลา 10 วินาที) เพิ่มความเร็วของเครื่องเป็น 11,600 รอบ/นาที ปั่นนาน 3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

¹ALPHA™ BIOSCIENCES, USA

²Difco™, France

³B.Braun Melsungen AG, Germany

⁴GPO, Thailand

⁵Biochrom Libra S32, UK

⁶MONTANIDE™ ISA 71 VG, France

⁷IKA Ultra Turrax® T25, Germany

วัคซีนตำรับที่ 3

เป็นวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (0.5 มล.) โดยทำการผสมวัคซีนเช่นเดียวกับวัคซีนตำรับที่ 2 แต่คำนวณให้ได้จำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (0.5 มล.) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

สัตว์ทดลอง

เปิดพันธุ์กากิแคมป์เบลล์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 200 ตัว ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราชญ์บุรี ซึ่งไม่เคยฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและสังเกตอาการ 1 สัปดาห์

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

ดูตัวอย่างวัคซีน ลงใน Fluid Thioglycollate Medium⁸, Tryptic Soy Broth⁹ และ Sabouraud Dextrose Broth¹⁰ โดยดูตัวอย่าง 1 มล./อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 หลอด แยก Fluid Thioglycollate Medium และ Tryptic Soy Broth ชนิดละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35°C และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดๆ ละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เพื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ รา aerobic bacteria และ anaerobic bacteria เมื่อครบ 14 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560; OIE, 2018b)

การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาย้อมสีแกรม ต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนอกจาก *Pasteurella multocida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง รูปร่างแท่งสั้น หรือแท่งสั้นค่อนข้างกลม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ก; ASEAN Secretariat, 1998)

การทดสอบการฆ่าเชื้อโดยสมบูรณ์ (Inactivation test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร DSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ต้องไม่มี *Pasteurella multocida* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร (ASEAN Secretariat, 1998)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนชนิดน้ำมัน

การทดสอบชนิดอิมัลชัน (Drop test)

นำตัวอย่างวัคซีนหยดลงในน้ำ หากเป็นอิมัลชันชนิด water in oil ต้องคงอยู่นานและไม่กระจายตัวในน้ำ (Aucouturier *et al.*, 2001)

การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic aspect)

นำตัวอย่างวัคซีนหยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์¹¹ วัคซีนต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน (Aucouturier *et al.*, 2001)

การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย¹² โดยใช้เข็มวัดค่าจากตัวเครื่อง เบอร์ 1 ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ข)

⁸HIMEDIA, India

⁹BD™, Germany

¹⁰Difco™, France

¹¹OLYMPUS BX 51, USA

¹²Brookfield DV-I, USA

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์¹³ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ค)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

การทดสอบความปลอดภัย (Safety test)

แบ่งเปิดทดลองเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) เข้ากล้ามเนื้อขา จำนวน 2 เท่าของโดสปกติ โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 1 ตัวละ 2 มล. และกลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 2 ตัวละ 2 มล. (สำหรับวัคซีนตำรับที่ 3 ไม่ต้องทดสอบ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าตำรับที่ 2 แต่มีจำนวนเชื้อเท่ากัน) จากนั้นสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เปิดทดลองทุกตัวต้องไม่พบอาการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและอาการของโรคอหิวาต์-เปิด-ไก่ จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559ง; OIE, 2018a) และทำการผ่าซากบริเวณกล้ามเนื้อขาจุดฉีดวัคซีน เพื่อดูการกระจายตัวของวัคซีน

การทดสอบความคุ้มโรค (Potency test)

แบ่งเปิดทดลองเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 1 ตัวละ 1 มล. จำนวน 1 ครั้ง กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 2 ตัวละ 1 มล. จำนวน 1 ครั้ง กลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 2 ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 1 ครั้ง กลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 3 ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 1 ครั้ง กลุ่มที่ 5 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 1 ตัวละ 1 มล. จำนวน 2 ครั้ง กลุ่มที่ 6 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 2 ตัวละ 1 มล. จำนวน 2 ครั้ง กลุ่มที่ 7 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 2 ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 2 ครั้ง และกลุ่มที่ 8 ฉีดวัคซีนตำรับที่ 3 ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 2 ครั้ง หลังจากฉีดวัคซีนในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง (กลุ่มที่ 1-4) เป็นเวลา 14 วัน ฉีดพิษหัดด้วยเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 fifty percent lethal dose (LD₅₀) ตัวละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อขา พร้อมกลุ่มควบคุม จำนวน 10 ตัว ซึ่งไม่ฉีดวัคซีน เจาะเลือดเปิดทดลอง 3 ครั้ง คือ ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7 และ 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี และกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง (กลุ่มที่ 5-8) ให้ฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 21 วัน แล้วฉีดพิษหัด หลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน พร้อมกลุ่มควบคุม จำนวน 10 ตัว เจาะเลือดเปิดทดลอง 6 ครั้ง คือ ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี

การอ่านผล หลังจากฉีดพิษหัดแล้ว สังเกตอาการและนับจำนวนเปิดตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องรอดอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559จ; OIE, 2018a) เมื่อผ่าซากดูกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องไม่พบรอยโรคจากโรคอหิวาต์เปิด-ไก่ และกลุ่มควบคุมต้องพบรอยโรคจากการตายด้วยโรคอหิวาต์เปิด-ไก่

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เปิด-ไก่ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป¹⁴ ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม 1:50 ด้วย sample dilution buffer แล้วเติมซีรัมที่เจือจางลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง และเติม anti-duck horseradish peroxidase conjugate หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (TMB) หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ในที่มีดหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 100 µl และอ่านผลค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader¹⁵ แล้วนำค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดีและค่า %S/P ตามสูตร โดยตัดสิน

¹³SIGMA 3K 18, UK

¹⁴ID Screen®, France

¹⁵Infinite M200 PRO, Switzerland

ผลที่ %S/P>50% เป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อหิวาต์เปิด-ไก่ และ %S/P≤50% เป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อหิวาต์เปิด-ไก่

$$\%S/P = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{450} \text{ ตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมบวก} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มจากการฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้งมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Least-Significant Different (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS 18)

ผล

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนหิวาต์เปิด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 1)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

การทดสอบความปลอดภัย (Safety test)

ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนหิวาต์เปิด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมัน เมื่อฉีดวัคซีน จำนวน 2 เท่าของโดสปกติ พบว่าวัคซีนทั้งสองชนิดมีความปลอดภัยในเปิดทดลอง ไม่พบอาการแพ้วัคซีน และไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและอาการของโรคหิวาต์เปิด-ไก่ และเมื่อผ่าซากดูบริเวณกล้ามเนื้อขา ไม่มีวัคซีนหลงเหลืออยู่ในเปิดทดลองทั้ง 2 กลุ่ม (รูปที่ 1)

การทดสอบความคุ้มโรค (Potency test)

ผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนหิวาต์เปิด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมัน พบว่าเมื่อฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) ตัวละ 1 มล. ในเปิดทดลองกลุ่มที่ 1 ครั้งเดียว มีความคุ้มโรค 90% ในขณะที่เปิดกลุ่มที่ 5 ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินที่มีจำนวนเชื้อและขนาดฉีดเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ครั้ง มีความคุ้มโรค 100% และเมื่อฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) ตัวละ 1 มล. ในเปิดทดลองกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 6 จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 100% ทั้ง 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับเปิดทดลองกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 7 ซึ่งฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (1 มล.) ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 100% ทั้ง 2 กลุ่ม รวมทั้งเปิดทดลองกลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 8 ซึ่งฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/โดส (0.5 มล.) ตัวละ 0.5 มล. จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 100% ทั้ง 2 กลุ่ม เช่นเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีน มีอัตราการตาย 100% ทั้ง 2 กลุ่ม ตายภายใน 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) เมื่อผ่าซากดูกลุ่มที่ฉีดวัคซีนไม่พบรอยโรคจากโรคหิวาต์เปิด-ไก่ และกลุ่มควบคุมพบรอยโรคจากการตายด้วยโรคหิวาต์เปิด-ไก่ (รูปที่ 2)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่าการฉีดวัคซีนหิวาต์เปิด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันจำนวน 1 ครั้ง ในเปิดทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่มที่ 1-4) หลังฉีดวัคซีน 7 และ 14 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทั้ง 3 กลุ่ม (กลุ่มที่ 2-4) มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่า

กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์ริน (กลุ่มที่ 1) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งวันที่ 7 และ 14 หลังฉีดวัคซีน สำหรับการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันจำนวน 2 ครั้ง ในเปิดทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่มที่ 5-8) มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน จนสิ้นสุดการทดลอง โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทั้ง 3 กลุ่ม (กลุ่มที่ 6-8) มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์ริน (กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน จนสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 3)

ค่า %S/P เฉลี่ย ในเปิดทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (กลุ่มที่ 1-8) ให้ผลลบในวันที่ 0 และหลังฉีดวัคซีน 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน ให้ผลบวกทุกกลุ่ม สำหรับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มให้ผลลบทุกช่วงเวลา ตั้งแต่วันที่ 0 จนสิ้นสุดการทดลองและค่า %S/P เฉลี่ย มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกันกับค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4)

วิจารณ์

การพัฒนาประสิทธิภาพของวัคซีนเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการใช้ป้องกันโรค โดยต้องสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างเหมาะสม เพื่อให้ต่อสู้กับเชื้อโรคได้ ซึ่งวัคซีนประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ แอนติเจนกับแอดจูแวนท์ หากแอนติเจนไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีพอและให้ความคุ้มโรคสั้น จึงต้องใช้แอดจูแวนท์ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว (Klimka *et al.*, 2015) แอดจูแวนท์เป็นสารเคมีที่ใช้ในการผสมวัคซีนเพื่อเป็นตัวจับแอนติเจนแล้วค่อยๆ ปล่อยแอนติเจนออกมากระตุ้นร่างกายให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนั้นๆ โดยแอดจูแวนท์จะจับกับแอนติเจนด้วย ion interaction เมื่อถูกฉีดเข้าสู่ร่างกายก็จะถูกจับด้วย macrophage แล้วส่งสัญญาณไปยัง lymphocyte (helper-T-cell) ที่ผลิตจาก thymus หรือเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ซึ่ง T-lymphocyte นี้จะทำงานร่วมกับ lymphocyte ที่ผลิตจาก bone marrow หลังแอนติบอดี ทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนตัวที่ฉีดเข้าไป ในขณะที่เดียวกันจะเกิดการรวมตัวของ lymphocyte ที่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง บริเวณที่ฉีด ซึ่งจะเป็นผลทางอ้อมในการมีคุณสมบัติเป็นแอดจูแวนท์ต่อ macrophage ที่จะไปกระตุ้น T-lymphocyte และ lymphocyte ในต่อมน้ำเหลืองร่วมกันสร้างแอนติบอดีได้ยาวนานขึ้น (พยนต์, 2547; Shah *et al.*, 2015)

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เนื่องจากมีโอกาสเกิดการแพ้ภัยน้อยและให้ความคุ้มโรคนานกว่าแอดจูแวนท์ชนิดอะลูมิเนียม และปัจจุบันพบว่ามีการใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในการผลิตวัคซีนอย่างแพร่หลาย โดยมีการใช้ในวัคซีนสัตว์มากถึง 500 ล้านโดส/ปี ซึ่งแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันมีหลายรูปแบบ ได้แก่ water in oil (W/O), oil in water (O/W) และ water in oil in water (W/O/W) โดย W/O ช่วยกระตุ้นให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงและยาวนานขึ้น เนื่องจากมีส่วนประกอบหลักของน้ำมันแร่ (mineral oil) ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ สำหรับ O/W ช่วยให้วัคซีนมีความคงตัวสูง แต่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ระยะสั้น และ W/O/W กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สั้นและยาวตามชนิดของแอนติเจน (พยนต์, 2547; Aucouturier *et al.*, 2001) ซึ่งแอดจูแวนท์ชนิด W/O ได้รับการแนะนำให้ใช้ในวัคซีนสัตว์ปีก สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับชนิดอื่นๆ เนื่องจาก W/O ทำให้อันติเจนอยู่บริเวณที่ฉีดและค่อยๆ ปล่อยแอนติเจนออกมา ทำให้ภูมิคุ้มกันแบบไม่พึ่งเซลล์อยู่ได้ยาวนาน สามารถคุ้มโรคได้นานถึง 1 ปี ให้ความคุ้มโรคสูง ช่วยลดได้ส ลดปริมาณแอนติเจน ลดต้นทุนการผลิตวัคซีนได้ ใช้ได้กับวัคซีนหลายชนิด ทั้งไวรัส แบคทีเรีย ปรสิตร ช่วยทำให้กระบวนการ Ag presenting cell ทำงานได้ดี โดยผ่าน Major histocompatibility complex (MHC) class I และ II จึงทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์และแบบพึ่งเซลล์ได้ดี (Arous *et al.*, 2013; Aucouturier *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2006; Klimka *et al.*, 2015) ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้แอดจูแวนท์ชนิด W/O มาทดลองผลิต

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ซึ่งปัจจุบันสห.ใช้แอดจูแวนท์ชนิด W/O ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิก-เซพติซีเมียเช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลในการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมได้

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการและการทดสอบความปลอดภัยตามมาตรฐานที่กำหนด สำหรับการทดสอบความคุ้มโรคพบว่าทั้งวัคซีนชนิดบรอนแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมันผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งคู่ (มากกว่า 70%) โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทั้งหมดให้ความคุ้มโรค 100% ทั้งการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ในขณะที่วัคซีนชนิดบรอนแบคเทอร์รินต้องฉีด 2 ครั้ง ถึงให้ความคุ้มโรค 100% สำหรับผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีพบว่าทั้งการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทุกกลุ่มมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอนแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันแต่ละกลุ่มมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และในการฉีดวัคซีน 2 ครั้ง กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอนแบคเทอร์ริน มีระดับแอนติบอดีลดลงอย่างชัดเจนหลังฉีดวัคซีนเข็มแรก 21 วัน เมื่อฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 7 วัน ระดับแอนติบอดีจึงสูงขึ้นมาใหม่ และระดับแอนติบอดีลดลงอีกครั้งหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 14 วัน ในขณะที่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทุกกลุ่มมีระดับแอนติบอดีสูงคงที่ตลอดการทดลองและให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 14 วัน ตรงตามรายงานของ OIE (2018a) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Belloc *et al.* (2008) ที่ทดลองฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมัน พบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอนแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้มีงานวิจัยเปรียบเทียบการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดอะลุ่มและชนิดน้ำมันพบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงและให้ความคุ้มโรคสูงกว่าวัคซีนชนิดอะลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (levy *et al.*, 2013) รวมทั้งมีรายงานการใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในรูปแบบต่างๆ อย่างประสบผลสำเร็จ โดยช่วยให้ภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้เร็ว เพิ่มระดับภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นและยาวนาน เพิ่มระยะคุ้มโรคและให้ความคุ้มโรคสูงต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (Abdel Aziz *et al.* 2015; Burns *et al.*, 2003) ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการทดลองในไก่ทั้งหมด งานวิจัยในครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในเป็ดให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาในไก่

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ส่วนใหญ่จากผู้ผลิตรายอื่นแนะนำให้ฉีดตัวละ 0.5 มล. เช่น K Vac FC3, Poulvac® Pabac IV, cevac MULTIMUNE K5 k, GlobiVac® เป็นต้น การทดลองครั้งนี้จึงได้กำหนดขนาดฉีด ตัวละ 0.5 มล. โดยคาดว่าน่าจะเป็นปริมาณที่เหมาะสม สะดวกสำหรับผู้ฉีด และทำให้บริเวณที่ฉีดเกิดอาการบวมน้อย เพราะการบวมและอักเสบบริเวณฉีดมากหรือน้อย นอกจากขึ้นกับคุณสมบัติและปริมาณแอนติเจนในวัคซีน คุณสมบัติการเป็นอิมัลชันของวัคซีน ชนิดและสายพันธุ์สัตว์แล้วยังขึ้นกับปริมาณที่ฉีดด้วย (วุฒิพร และคณะ, 2542) จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อเท่าเดิม ทั้งการฉีดปริมาตรเท่าเดิม (กลุ่มที่ 2 และ 6) และปริมาตรลดลง (กลุ่มที่ 4 และ 8) ต่างก็ให้ความคุ้มโรคสูงและมีระดับแอนติบอดีสูงเช่นเดียวกันกับการฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีจำนวนเชื้อลดลง ในขนาดฉีดตัวละ 0.5 มล. (กลุ่มที่ 3 และ 7) แสดงว่าสามารถลดปริมาณแอนติเจนที่ใช้เป็นส่วนผสมของวัคซีนและลดขนาดฉีดวัคซีนได้อีกหนึ่งเท่า ขณะที่งานวิจัยของ Akhtar *et al.* (2016) ทดลองฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแบคเทอร์รินในไก่ ตัวละ 0.5 มล. และ 1 มล. ในจำนวนเชื้อเท่ากัน พบว่าการฉีดวัคซีนตัวละ 1 มล. มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าและให้ความคุ้มโรคสูงกว่าการฉีดวัคซีนตัวละ 0.5 มล. อย่างมีนัยสำคัญ แต่ levy *et al.* (2013) พบว่าการฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันในไก่ ตัวละ 0.5 มล. มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าการฉีดตัวละ 1 มล. อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ต้องมีการศึกษาในด้านต่างๆ เพิ่มเติม เช่น การหาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมในวัคซีน ระยะคุ้มโรค (Duration of immunity) ความคุ้มโรคแรกเริ่ม (Onset of immunity) คุณภาพการเก็บรักษา (Keeping quality) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึงเซลล์และแบบพึ่งเซลล์ เป็นต้น

สรุป

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดได้สัณติเหลืตัวละ 0.5 มล. ในจำนวนเชื้อที่ลดลง ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอร์นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน จึงสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียน เพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่อ งานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำการใช้สัตว์ทดลอง ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้าราชการและพนักงาน กลุ่มวิจัยและพัฒนา กลุ่มสัตว์ทดลอง ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย และฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา รักศรี ธนรัตน์ จานุกิจ และจันทร์ทิพย์ แสงทอง 2547 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นและปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(2): 19-25
- พยนต์ ลินสุวงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 55-56
- รัชนิ อัดถิ 2553 โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและการควบคุมป้องกัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 19(1-2): 37-51
- วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชนิ อัดถิ และวันชัย ธีระวรธรรม 2542 การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน 3. การทดลองใช้วัคซีนในห้องที่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9(1-2): 7-18
- สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล และจารุณี เกษรพิกุล 2558 โรคอหิวาต์เป็ดไก่ ในโรคไก่ (Common Chicken Diseases) คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร เพชรบุรี หน้า 21-22
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2557 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ ศูนย์สื่อสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ หน้า 13
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559ก เรื่องการทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-024) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559ข เรื่องการทดสอบความหนืด (Viscosity test) ของบรอทแบคเทอร์นเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-027) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559ค เรื่องการทดสอบความคงตัว (Stability test) ของบรอทแบคเทอร์นเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-028) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559ง เรื่องการทดสอบความปลอดภัย (safety test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-026) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559จ เรื่องการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-025) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 เรื่องการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อรา และแบคทีเรียของชีวภัณฑ์
สำเร็จรูป (SOP-QCP-031) หน้า 1-6

- Abdel Aziz, H. M. G., El-Enbaawy, M. I. H., Afifi, M., Ibrahim, S. I., Omar, L. and Koudier, M. H. 2015. Efficacy of Montanide ISA-70-VG as Adjuvant to Fowl Cholera Vaccine. J. Vet. Adv. 5(3): 848-852.
- Ahmad, T. A., Rammah, S. S., Sheweita, S. A., Haroun, M. and El-Sayed, L. H. 2014. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. Vaccine. 32(8): 909-917.
- Akhtar, M., Rahman, M. T., Ara, M. S., Rahman, M., Nazir, K. H. M. N. H, Ahmed, S., Hossen, M. L. and Rahman, M. B. 2016. Isolation of *Pasteurella multocida* from chickens, preparation of formalin killed fowl cholera vaccine and determination of efficacy in experimental chickens. J. Adv. Vet. Anim. Res. 3(1): 45-50.
- Arous, J. B., Deville, S., Pal, J. K., Baksi, S., Bertrand, F. and Dupuis, L. 2013. Reduction of Newcastle Disease Vaccine Dose Using a Novel Adjuvant for Cellular Immune Response in Poultry. Proc. Vac. 7: 28-33.
- ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for fowl cholera bacterin. In ASEAN standards for animal vaccines, Livestock publication series 2A, 2nd ed. Penehar Swadaya, Indonesia. pp. 14-15.
- Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine. 19: 2666-2672.
- Belloc, C., Dupuis, L., Deville, S., Aucouturier, J. and Laval, A. 2008. Evaluation of safety and immune response induced by several adjuvants included in *Pasteurella multocida* vaccines in chickens. Revue. Med. Vet. 159(7): 371-375.
- Burns, K. E., Ruiz, J. and Glisson, J. R. 2003. Evaluation of the effect of heating an oil-emulsion *Pasteurella multocida* bacterin on tissue reaction and immunity. Avian Dis. 47(1): 54-58.
- Ivy, S., Khan, M. F. R., Islam, M. A. and Rahman, M. B. 2013. Isolation and Identification of *Pasteurella multocida* from Chicken for the Preparation of Oil Adjuvanted Vaccine. Microbes and Health. 2(1): 1-4.
- Jang, S. I., Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., Ben, Arous, J. B. and Lillehoj, E. P. 2013. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis. PLoS One. 8(4): 1-12.
- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Bertrand, F., Dupuis, L. and Deville, S. 2011. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. Exp. Parasitol. 127(1): 178-183.
- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Hong, Y. H., An, D. J., Jeong, W., Chun, J. E., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S. and Arous, J. B. 2012. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. Vaccine. 30(36): 5401-5406.

- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Park, K. W., Bauchan, G. R., Lillehoj, E. P., Bertrand, F., Dupuis, L. and Deville, S. 2010. Immunoenhancing effects of Montanide ISA oil-based adjuvants on recombinant coccidia antigen vaccination against *Eimeria acervulina* infection. *Vet. Parasitol.* 172(3-4): 221-228.
- Jansen, T., Hofmans, M. P., Theelen, M. J., Manders, F., and Schijns, V. E. 2006. Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. *Vaccine.* 24(26): 5400-5405.
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M. and Krut, O. 2015. Montanide ISA 71 VG is advantageous to Freund's adjuvant in immunization against *S. aureus* infection of mice. *Scand. J. Immunol.* 81(5): 291-297.
- Shah, R. R., Brito, L. A., O'Hagan, D. T. and Amiji, M. M. 2015. Emulsions as Vaccine Adjuvants. *In* Foged, C., Rades, T., Perrie, Y. and Hook, S. (eds.), *Advances in Delivery Science and Technology*, Springer Science+Business Media. New York. pp. 59-61.
- Spickler, A. R. and Roth, J. A. 2003. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. *J. Vet. Intern. Med.* 17: 273-281.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2018a. Fowl cholera. *In* *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018*. OIE. Paris, France. pp. 895-905.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2018b. Test for sterility and freedom from contamination of biological materials intended for veterinary use. *In* *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018*. OIE. Paris, France. pp. 109-122.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแคเทอรินและชนิดน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบ	วัคซีนชนิดบรอนแคเทอริน		วัคซีนชนิดน้ำมัน	
	จำนวนเชื้อ 1.0×10^9		จำนวนเชื้อ 1.0×10^9	
	CFU/โด้ส (1 มล.)		CFU/โด้ส (1 มล.)	
1. Sterility test	ผ่าน		ผ่าน	
2. Purity test	ผ่าน		ผ่าน	
3. Inactivation test	ผ่าน		ผ่าน	
4. Drop test*	ไม่ทดสอบ		ผ่าน	
5. Microscopic aspect*	ไม่ทดสอบ		ผ่าน	
6. Viscosity test* (centipoises)	ไม่ทดสอบ		19.33	19.47
7. Stability test* (%)	ไม่ทดสอบ		2	2

หมายเหตุ * การทดสอบรายการที่ 4-7 เป็นการทดสอบคุณภาพวัคซีนชนิดน้ำมัน

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความคุ้มโรคหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแคเทอรินและชนิดน้ำมัน จำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง

กลุ่มที่	จำนวนสัตว์คุ้มโรค	จำนวนสัตว์ทั้งหมด	ความคุ้มโรค	กลุ่มควบคุม		
				จำนวนสัตว์ตาย	จำนวนสัตว์ทั้งหมด	การตาย
1	18 ตัว	20 ตัว	90%			
2	20 ตัว	20 ตัว	100%			
3	20 ตัว	20 ตัว	100%	10 ตัว	10 ตัว	100%
4	20 ตัว	20 ตัว	100%			
5	20 ตัว	20 ตัว	100%			
6	20 ตัว	20 ตัว	100%			
7	20 ตัว	20 ตัว	100%	10 ตัว	10 ตัว	100%
8	20 ตัว	20 ตัว	100%			

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบ %S/P เฉลี่ยหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแคเทอรินและชนิดน้ำมัน จำนวน 1 ครั้ง

วันที่หลังฉีดวัคซีน	กลุ่มที่ 1		กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		กลุ่มที่ 4		กลุ่มควบคุม	
	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล
0	42.76 ^a	ลบ	31.47 ^b	ลบ	36.60 ^{bc}	ลบ	37.37 ^{bc}	ลบ	39.48 ^c	ลบ
7	440.58 ^a	บวก	683.06 ^b	บวก	643.10 ^b	บวก	700.03 ^b	บวก	39.66 ^c	ลบ
14	492.16 ^a	บวก	869.15 ^b	บวก	866.72 ^b	บวก	871.25 ^b	บวก	39.76 ^c	ลบ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบ %S/P เฉลี่ยหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนแคเทอรินและชนิดน้ำมัน จำนวน 2 ครั้ง

วันที่หลังฉีดวัคซีน	กลุ่มที่ 5		กลุ่มที่ 6		กลุ่มที่ 7		กลุ่มที่ 8		กลุ่มควบคุม	
	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล	%S/P	ผล
0	33.14 ^a	ลบ	34.91 ^a	ลบ	34.01 ^a	ลบ	27.57 ^b	ลบ	31.99 ^{ab}	ลบ
7	374.17 ^a	บวก	562.35 ^b	บวก	498.27 ^b	บวก	572.62 ^b	บวก	34.30 ^c	ลบ
14	389.64 ^a	บวก	859.73 ^b	บวก	829.20 ^b	บวก	855.42 ^b	บวก	28.79 ^c	ลบ
21	288.70 ^a	บวก	868.28 ^b	บวก	846.44 ^b	บวก	848.50 ^b	บวก	28.06 ^c	ลบ
28	774.02 ^a	บวก	895.88 ^b	บวก	878.28 ^b	บวก	890.53 ^b	บวก	34.89 ^c	ลบ
35	627.10 ^a	บวก	900.16 ^b	บวก	878.74 ^b	บวก	901.36 ^b	บวก	33.14 ^c	ลบ

หมายเหตุ 1. %S/P > 50% ให้ผลเป็นบวก และ %S/P ≤ 50% ให้ผลเป็นลบ

2. ตัวอักษร a, b และ c ที่อยู่ในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

รูปที่ 1A

กล้ามเนื้อขาไม่มีวัคซินหลงเหลืออยู่



รูปที่ 1B

กล้ามเนื้อขาไม่มีวัคซินหลงเหลืออยู่



รูปที่ 1 ตัวอย่างกล้ามเนื้อขาของซากเปิดทดลองจากการผ่าชันสูตรซาก เพื่อดูบริเวณที่ฉีดวัคซิน

รูปที่ 1A ตัวอย่างซากเปิดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซินอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอนไช

รูปที่ 1B ตัวอย่างซากเปิดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซินอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

รูปที่ 2A ตัวอย่างซากเปิดทดลองกลุ่มควบคุม พบรอยโรคจากการตายด้วยโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่

(1) อวัยวะภายในมีเลือดคั่ง

และจุดเลือดออก



(2) หัวใจมีจุดเลือดออก



(3) ลำไส้เล็กอักเสบมีเมือก

และจุดเลือดออก



รูปที่ 2B ตัวอย่างซากเปิดทดลองกลุ่มฉีดวัคซิน ไม่พบรอยโรคจากโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่

(1) อวัยวะภายในไม่มีเลือดคั่ง

และไม่มีจุดเลือดออก



(2) หัวใจปกติ ไม่มีจุดเลือดออก

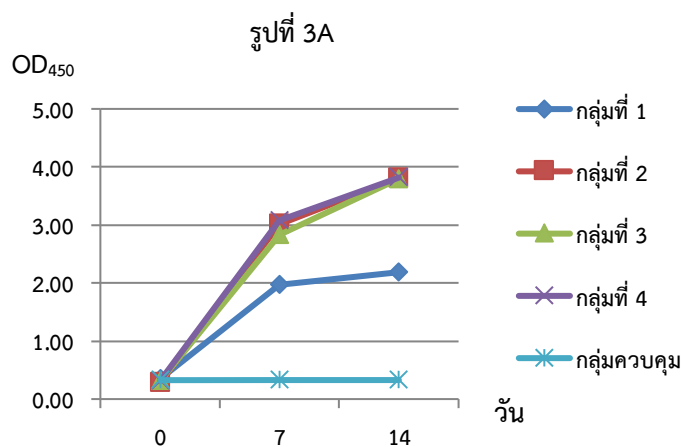


(3) ลำไส้เล็กปกติไม่มีเมือก

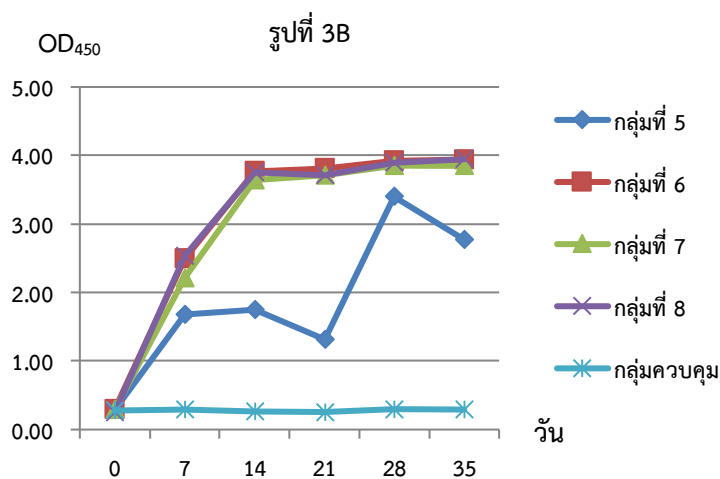
และไม่มีจุดเลือดออก



รูปที่ 2 ตัวอย่างซากเปิดทดลองจากการผ่าชันสูตรซาก เพื่อดูรอยโรคจากโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่



กลุ่มที่	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
1	0.347±0.026 ^a	1.965±0.531 ^a	2.186±0.821 ^a
2	0.277±0.078 ^b	3.007±0.564 ^b	3.807±0.108 ^b
3	0.309±0.075 ^{bc}	2.835±0.519 ^b	3.797±0.182 ^b
4	0.313±0.055 ^{bc}	3.080±0.532 ^b	3.816±0.099 ^b
กลุ่มควบคุม	0.326±0.016 ^c	0.328±0.018 ^c	0.328±0.038 ^c



กลุ่มที่	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35
5	0.288±0.036 ^a	1.679±0.738 ^a	1.745±0.699 ^a	1.311±0.552 ^a	3.398±0.466 ^a	2.767±0.794 ^a
6	0.298±0.051 ^a	2.488±0.485 ^b	3.767±0.236 ^b	3.804±0.171 ^b	3.922±0.062 ^b	3.941±0.057 ^b
7	0.293±0.052 ^a	2.213±0.735 ^b	3.636±0.337 ^b	3.710±0.270 ^b	3.847±0.173 ^b	3.849±0.111 ^b
8	0.253±0.046 ^b	2.532±0.583 ^b	3.748±0.353 ^b	3.719±0.201 ^b	3.899±0.092 ^b	3.946±0.050 ^b
กลุ่มควบคุม	0.280±0.040 ^{ab}	0.295±0.032 ^c	0.261±0.035 ^c	0.256±0.025 ^c	0.298±0.042 ^c	0.288±0.063 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c ที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

รูปที่ 3 ระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (Mean±SD) ที่ 0, 7, 14 วัน หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดบรอนแคคเทอรินและชนิดน้ำมัน จำนวน 1 ครั้ง (รูปที่ 3A) และระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (Mean±SD) ที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดบรอนแคคเทอรินและชนิดน้ำมัน จำนวน 2 ครั้ง (รูปที่ 3B)

Efficacy of oil adjuvant fowl cholera vaccine

Woraporn Poosungnoen ¹Weerachai Poosungnoen ¹

Abstract

Three preparation of fowl cholera vaccine was produced from a bacterium *Pasteurella multocida* serotype A:1 (local strain): the first preparation was broth bacterin containing 1.0×10^9 CFU/dose (1 ml), the second preparation was, ready to use adjuvant (MONTANIDE™ ISA 71 VG), oil adjuvant vaccine containing 1.0×10^9 CFU/dose (1 ml), and the third one was oil adjuvant vaccine containing 1.0×10^9 CFU/ dose (0.5 ml). All vaccine preparations were tested in a laboratory whereas safety and potency were tested in Khaki Campbell ducks, including serum antibody was detected by ELISA. It was found that all vaccine preparations have met the quality standard requirement in laboratory tests, safe and no symptoms or deviation of fowl cholera showed in ducks. For the potency test, the ducks vaccinated with the first prepared vaccine (1 ml/duck) with single and twice vaccinations were 90% and 100% protection respectively, the ducks immunized with the second prepared vaccine (1 ml/duck and 0.5 ml/duck) and the third prepared vaccine (0.5 ml/duck) were 100% protection both single and twice vaccination. The results of the antibody determination showed that the antibody titer of ducked immunized with the second prepared vaccine was no different from the antibody titer detected from ducked vaccinated with the third prepared vaccine ($P > 0.05$) but the antibody titer of ducked vaccinated with the second prepared vaccine and the third prepared vaccine were higher than the antibody titer detected from ducked vaccinated with the first prepared vaccine ($P < 0.05$) both single and twice vaccination at 7 days after vaccination throughout the experiment. In conclusion, the oil adjuvant fowl cholera vaccine was safe, can be reduced dose and antigen, completely prevent fowl cholera when single vaccination and providing high antibody titer at 7 days after vaccination.

Keywords: Fowl cholera vaccine, Oil adjuvant, Antibody titer, Potency

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันและผลกระทบต่อการให้นมของโคนมหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาและเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (Needle free)

อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์¹ วัชรินทร์ หินอ่อน¹ รัชภูมิ เชี่ยวสนาม²

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันและผลกระทบต่อการให้นมของโคนมหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือชนิดเอควียสแบบรวม 3 ไทป์ ด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาและเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (needle free) ในแม่โครีดนมพันธุ์ผสมโฮสไตน์ฟรีเชียน อายุ 4-6 ปี จากฟาร์มโคนมคุ้มเจริญ อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา โดยโคนมไม่เคยมีประวัติการป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย แบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 50 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีน โดยใช้เข็มฉีดยา กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนโดยเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม ทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนและหลังฉีดวัคซีน 21 วันด้วยวิธี LP ELISA และเก็บน้ำนมก่อนและหลังฉีดวัคซีนเป็นเวลา 6 วัน พบว่าการฉีดวัคซีนด้วยเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็มสามารถสร้างระดับภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าการฉีดวัคซีนโดยใช้เข็มฉีดยาในทุกซีโรไทป์ และการให้ปริมาณน้ำนมของโคในฝูงจากการฉีดวัคซีนทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha < 0.05$)

คำสำคัญ: วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เครื่องฉีดยาไม่ใช้เข็ม ระดับแอนติบอดี ปริมาณน้ำนมของฝูงโค

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

² สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

บทนำ

โรคปากเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กีบคู่ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ อูฐ และกวาง (Lubroth *et al.*, 2006) เกิดจากเชื้อไวรัส Genus Aphthorirus ใน Family picornaviridae มี 7 ซีโรไทป์ ประกอบด้วย O, A, C, Asia I และ SAT1, SAT2, SAT3 ประเทศไทยมีการระบาดอยู่ 3 ซีโรไทป์ คือ O, A และ Asia I เป็นโรคที่มีการติดต่อได้ง่ายและรวดเร็วผ่านได้หลายทาง เช่น โดยการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ป่วย หรือสัมผัสสิ่งขับถ่ายของสัตว์ที่เป็นโรค เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ น้ำนม น้ำลาย ลมหายใจ น้ำจากตุ่มใสหรือสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนเชื้อ รวมทั้งติดต่อผ่านทางน้ำเชื้อ และการผสมเทียม (Kanrs, 2001) สัตว์ที่ป่วยจะมีอาการซึม เบื่ออาหาร น้ำลายไหล เกิดมีตุ่มใสบนเยื่อลิ้น และภายในช่องปาก กระพุ้งแก้ม และไรกีบ การป้องกันโรคโดยการฉีดวัคซีนซึ่งผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เป็นชนิด Trivalent ประกอบด้วย 3 ไทป์ O, A, Asia I โดยเชื้อไวรัสแต่ละซีโรไทป์ไม่ทำให้เกิดความคุ้มโรคข้ามซึ่งกันและกัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยในสัตว์เป็นผลเนื่องจากปัจจัยในตัวสัตว์เอง ได้แก่ ชนิด พันธุ์ อายุ สุขภาพ โภชนาการ และเป็นผลเนื่องจากประสิทธิภาพของวัคซีน เช่น ปริมาณแอนติเจนที่ใส่ (antigen payload) ทางเข้าของวัคซีน (route of immunization) ปริมาณวัคซีนที่ได้รับ (volume of dose) ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน (purity of antigen) ชนิดของเชื้อ (virus strain) ชนิดของสารแอดจูแวนท์ (adjuvants) และวิธีการหรือหลักเกณฑ์ในการฉีดวัคซีน (vaccine regimen) เช่น ความถี่ในการฉีดวัคซีน (Doel, 1999)

สำหรับระดับภูมิคุ้มกันของฝูงโคในประเทศตามเป้าหมายของกรมปศุสัตว์ต้องการให้มีระดับภูมิคุ้มกันไม่น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของฝูง แต่ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยของโคและกระบือในพื้นที่ในช่วงที่ผ่านมาพบว่ามีภูมิคุ้มกันโรคระดับฝูง (Herd Immunity) ที่สามารถป้องกันโรคยังไม่เป็นไปตามเป้าหมาย โดยเฉพาะในโคเนื้อและกระบือที่พบว่ายังมีระดับภูมิคุ้มกันโรคที่ค่อนข้างต่ำมาก (ประหยัดและคณะ, 2556) ซึ่งปัญหาสำคัญมาจากการควบคุมและบังคับสัตว์ในการฉีดวัคซีนทำได้ค่อนข้างยากและมักพบปัญหาเข็มหักหรืองอ ทำให้ได้รับวัคซีนไม่ครบโดส ติดเชื้อผ่านเข็มฉีดยากรณีใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน เกิดความเจ็บปวด และใช้เวลานาน ทำให้สัตว์เครียด ซึ่งส่งผลทำให้เกิดน้ำนมลด ทำให้เจ้าของสัตว์ไม่ยอมทำวัคซีน

ปัจจุบันมีการฉีดวัคซีนแบบใหม่ โดยใช้เครื่องฉีดยาแบบไม่ใช้เข็ม (Needle free equipment) ส่งวัคซีนผ่านเข้าสู่ใต้หนังของสัตว์โดยใช้แรงดันสูง (high pressure) มีข้อดี คือ ใช้งานสะดวก ไม่ต้องควบคุมบังคับสัตว์มาก ใช้เวลาน้อย ไม่เกิดปัญหาเข็มหักหรืองอ ไม่เกิดปัญหาติดโรคผ่านเข็มฉีดยา เกิดความเจ็บปวดน้อยกว่า ให้ผลทางภูมิคุ้มกันที่ดีกว่า (Hollis *et al.*, 2005) ส่วนข้อเสีย คือ เป็นอุปกรณ์ใหม่ยังไม่มีใช้แพร่หลาย สัตวแพทย์ไม่คุ้นเคย และราคาค่อนข้างสูง ปัจจุบันมี 2 ชนิดคือ ชนิดใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และชนิดใช้ไฟฟ้าจากแบตเตอรี่เป็นพลังงานขับเคลื่อน ซึ่งในการทดลองนี้เลือกชนิดใช้แก๊สซึ่งมีความสะดวกในการสำรองพลังงานมากกว่า สามารถเติมแก๊สได้สะดวกกว่าการใช้แบตเตอรี่ รวมทั้งมีความดังของเสียงขณะใช้งานน้อยกว่า

ดังนั้นสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาเปรียบเทียบผลการฉีดวัคซีนแบบใช้เข็มและไม่ใช้เข็มในโคนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันและผลกระทบต่อการผลิตน้ำนมของโค หลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาปรับปรุงการให้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีระดับภูมิคุ้มกันของฝูงเป็นไปตามหลักเกณฑ์ที่ตั้งไว้ เพื่อให้เกิดผลในทางปฏิบัติในการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกแม่โครีดนมพันธุ์ผสมโฮสไตน์ฟรีเซียนที่มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง อายุ 4-6 ปี และอยู่ในคอกเดียวกัน จำนวน 100 ตัว จากฟาร์มโคนมคุ้มเจริญ อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา โดยโคนมไม่มีประวัติการป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย และผ่านการตรวจคัดกรองการติดเชื้อแฝงของโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ Nonstructural protein (NSP) ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป¹

อุปกรณ์การฉีดวัคซีน

เครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (Needle Free)² (รูปที่ 1) ซึ่งทำงานโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) สร้างแรงดัน และกระบอกฉีดยาชนิดพลาสติก ขนาด 10 มล. พร้อมเข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 1/2 นิ้ว

วัคซีน

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิด 3 ไทป์ O, A, Asia I ชนิดเอเควีส ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ขนาดบรรจุ 20 โด๊สต่อขวด

การฉีดวัคซีน

แบ่งโคทดลองออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 50 ตัว ฉีดวัคซีนตัวละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ โดยกลุ่มที่ 1 ใช้เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 1/2 นิ้ว และกลุ่มที่ 2 ใช้เครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็มโดยตั้งค่าแรงดันของเครื่องขนาด 2.5 บาร์ ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การเก็บน้ำนม

บันทึกข้อมูลการให้น้ำนมรายตัวของโคแต่ละกลุ่มทดลอง จากการรีดนมวันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้า เวลา 02.00 น. ช่วงบ่ายเวลา 14.00 น. ด้วยเครื่องรีดนมที่มีกระบอกวัดปริมาณน้ำนม³ เก็บข้อมูลรายตัวเป็นจำนวนลิตร ทำการจดบันทึกเป็นข้อมูลน้ำนมของโคแต่ละกลุ่มทดลอง ก่อนและหลังการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 3 วัน รวม 6 วัน

การตรวจทางซีรัมวิทยา

เจาะเลือดและเก็บซีรัมโคนมก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 21 วัน เพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2548) และตรวจหาแอนติบอดีต่อ Nonstructural protein (NSP)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. ผลกระทบต่อการให้น้ำนม

นำข้อมูลการเก็บน้ำนมมาหาค่าเฉลี่ยเลขคณิตของปริมาณน้ำนม (Arithmetic mean titer, AMT) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เปรียบเทียบการให้น้ำนมของโคนมทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ก่อนและหลังฉีดวัคซีนด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha < 0.05$)

2. ระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

นำข้อมูลระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยมาหาค่าเฉลี่ย ก่อนและหลังฉีดวัคซีน เพื่อเปรียบเทียบผลของโคทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และสถิติเชิงพรรณนา

¹PrioCheck, Switzerland

²Pulse รุ่น pulse 500, USA

³Delaval[®], Germany

ผล

จากผลการทดลองฉีดวัคซีนโดยใช้เข็มและเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม พบว่าทั้ง 2 วิธีไม่มีผลกระทบต่อการให้ปริมาณน้ำนม (ตารางที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยของทั้ง 2 วิธี พบว่า กลุ่มไม่ใช้เข็มฉีดยา (needle free) สามารถสร้างระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยได้สูงกว่ากลุ่มที่ใช้เข็มฉีดยา (รูปที่ 2)

วิจารณ์

การศึกษาเครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็มครั้งนี้ ผลที่ได้ในส่วนผลกระทบต่อปริมาณน้ำนม กลุ่มไม่ใช้เข็มนมลด 0.23% กลุ่มใช้เข็มลด 0.86% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติของทั้งสองวิธีการให้วัคซีน ทั้งนี้เนื่องจากฟาร์มที่ทำการทดลองมีของบงคับสัตว์สำหรับฉีดวัคซีน แยกรายตัวทำให้การฉีดวัคซีนมีความสะดวก รวมถึงสัตวแพทย์ผู้ดูแลฟาร์มมีความชำนาญ ซึ่งต่างจากฟาร์มของเกษตรกรโดยทั่วไปที่มักจะไม่มีของบงคับสัตว์แยกรายตัว ทำให้เสียเวลาบงคับสัตว์มากฉีดวัคซีนไม่สะดวก เกิดปัญหาเข็มหักงอ เกิดความเจ็บปวด รวมถึงทำให้โคนมมีเวลากินอาหารน้อยลงจึงส่งผลให้ปริมาณน้ำนมลดลงได้

ในส่วนของระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยที่เกิดขึ้น พบว่าวิธีไม่ใช้เข็มฉีดยาให้ผลที่ดีกว่าวิธีใช้เข็มในทุกซีโรไทป์ของวัคซีน จากการตรวจระดับภูมิคุ้มกันหลังการให้วัคซีน 21 วัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองให้วัคซีน Infectious Bovine Rhino-tracheitis virus (TBR) ใน Dairy Calves ด้วยเครื่องฉีดยาแบบไร้เข็ม (Holis *et al.*, 2005) ซึ่งสรุปไว้ว่าเป็นผลมาจากการกระจายตัวของวัคซีนที่มากกว่าจึงทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน (immune response) ที่ดีกว่า เมื่อเทียบกับวิธีการใช้เข็มตามแบบเดิม

สรุป

เครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (Needle Free) สามารถใช้ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียสำหรับโค-กระบือในโคนมได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการให้ปริมาณน้ำนมของแม่โคและให้ผลตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการฉีดวัคซีนด้วยเข็มฉีดยาตามแบบเดิม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผชช.รัชณี อรรถิ ผชช.สมเกียรติ เพชรวานิชกุล เจ้าหน้าที่จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา คุณสุขสวัสดิ์ ทองน้อย ปศุสัตว์อำเภอครบุรี คณะกรรมการเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่ายในการสนับสนุนงบประมาณดำเนินการทดลอง คณะกรรมการพัฒนาวิชาการและผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืองานทดลองครั้งนี้จนสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประหยัด เข่งคำ ยุทธนา โสภี และเอกรินทร์ วัฒนพลาชัยกุล 2556 การติดตามระดับแอนติบอดีโรคปากและเท้าเปื่อยภายหลังการฉีดวัคซีนชนิด Trivalent O, A, และ Asia I ในลูกโคอายุ 4-6 เดือน ของจังหวัดตราด ปี 2555 วารสารสำนักงานปศุสัตว์เขต 2 9(17): 56-62

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2548 คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ISO 17025:2005 vol 1. ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้กรมปศุสัตว์ นครราชสีมา หน้า 1-16

Doel, T. R. 1999. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine. 17(13-14): 1767-1771.

Larry, C., Hollis, J. F. Smith, B. J. Johnson, S. K. and Darek, A. M. 2006. A comparison of Serological Responses when Modified-Live infections Bovine Rhinotracheitis Virus Vaccine, manheimia haemolyticum Cs Bocterin-Toxoid and Leptospira Pomona Bacterin are Administered with Needle-free versus Conventional Needle-based injection in HuLstein Dairy Calves. The Bovine Practitioner. 39(2): 110-114.

Lubroth, J., Rodriguez, L. and Dekker, A. 2006. Vascular disease, Disease of Swine. Black well publishing, pp. 517-525.

Robert F. Kahrs. 2001. Foot and mouth disease, Viral disease of cattle, 2nd ed. Blackwell publishing. pp. 255-262.

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำนมของโคนมฟาร์มโคนมคุ้มเจริญ อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา ก่อนและหลังฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้เข็มฉีดยาและใช้เครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม

กลุ่มทดลอง	ปริมาณน้ำนมก่อนฉีดวัคซีน (ลิตร)				ปริมาณน้ำนมหลังฉีดวัคซีน (ลิตร)				ค่าเฉลี่ย/ตัว/มื่อรีด (Mean $\pm$ SD)	
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	รวม	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	รวม	ก่อนฉีดวัคซีน	หลังฉีดวัคซีน
ใช้เข็มฉีดยา (n=50)	1,012	1,007	1,043	3,062	1,059	995	983	3,037	10.21 $\pm$ 0.47	10.12 $\pm$ 0.38
เครื่องฉีดยา ชนิดไม่ใช้เข็ม (n=50)	1,014	1,015	999	3,028	1,017	997	1,007	3,021	10.09 $\pm$ 0.51	10.06 $\pm$ 0.30

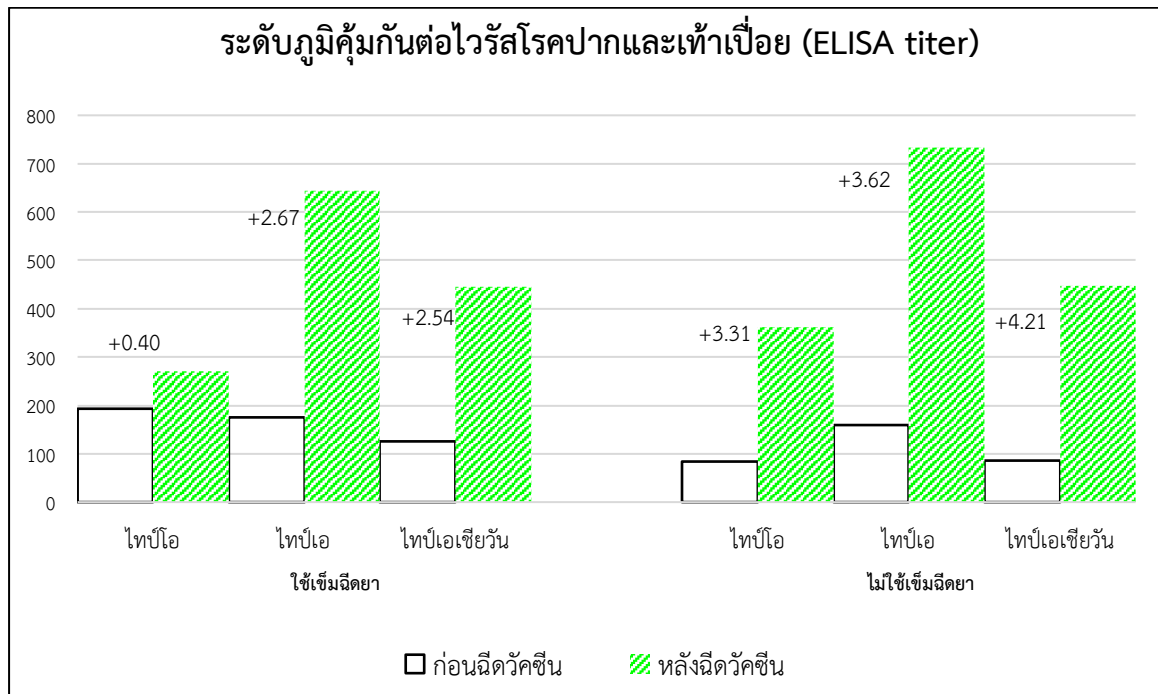


อุปกรณ์ชนิดใช้เข็มฉีดยา
(1A)



เครื่องฉีดยาชนิดไม่ใช้เข็ม (1B)

รูปที่ 1 อุปกรณ์การฉีดวัคซีน



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนและหลังฉีดวัคซีน 21 วัน ของโคทดลองกลุ่มไม่ใช้เข็มฉีดยาและใช้เข็มฉีดยา

Comparison of antibody titer levels and the effect on lactation in dairy cow after FMD vaccination by needle and needle-free injection

Aree Katsuwannawong¹ Watcharin Hinon¹ Ratchaphum Khiaosanam²

Abstract

The comparison study of antibody titer levels and the effect on lactation in dairy cow after Trivalent FMD aqueous vaccination by needle and needle-free injection were studied in 100 Holstein-Friesian crossbred lactating dairy cows, 4-6 years of age, no history of FMD, from Khumchareon dairy farm, Khonburi district, Nakhon Ratchasima province. They were divided equally into 2 groups. Group 1 were vaccinated by needle injection, while group 2 were vaccinated by needle-free injection. The antibody titer levels against FMD virus was measured before and after vaccination 21 days by LP ELISA and milk sample was collected before and after vaccination daily for 6 days. It was found that the cow vaccinated by needle-free showed average antibody titer levels higher than the one using a needle in all serotypes. And the quantity of milk production was not significantly different at 95% confidence interval.

Keywords: FMD Vaccine, Needle-free, Antibody titer, Milk production

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

² Nakhonratchasima Provincial Livestock Office, Mueang , Nakhonratchasima 30000

Protocol sample submission to Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia via International Airline

Wilai Linchongsungkoch

OIE Expert and Consultant of Department of Livestock Development on FMD,
National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, THAILAND

Introduction

The Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease in South East Asia (RRL), National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development (DLD), Ministry of Agriculture and Cooperatives is take responsible for FMD diagnosis and operating as the OIE Reference Laboratory for FMD and SEAFMD reference laboratory in the region. The specimens or infectious substances submission to the laboratory for diagnostic purpose are recommended to send to Regional Reference Laboratory (RRL), Pakchong , Thailand by AIRFREIGHT ONLY. The destination airport is to SUVARNABHUMI INTERNATIONAL AIRPORT. The customs clearance process will be proceeded by the DLD officers and collected by the authorized staffs from RRL, Pakchong.

In order to achieve the biosafety and biosecurity standard for shipment of samples or biological materials from oversea countries to Regional Reference Laboratory, the packing and dispatch of samples or biological materials are required as this following.

Infectious substance definition:

Infectious substance is known to contain, or reasonably expected to contain, pathogens. Pathogens are defined as micro-organisms (including bacteria, viruses, rickettsia. parasite, fungi) and other agents such as recombinant (hybrid or mutant) that are known or reasonably believed to cause disease in humans or animals.

Non infection substance definition:

Non infection substance is substances which do not contain infectious pathogens or have been treated, neutralized, inactivated so that they do not longer pose a health risk.

1. Collection of specimen/sample

1.1 Epithelium/infected tissue/vesicular fluid/or other

The suitable or fresh samples from tongue epithelium, tissue between hoof, vesicular fluid or others which are collected from recently infected animal that may be obtained of sufficient virus for laboratory diagnosis by type identification using antigen capture sandwich ELISA and virus isolation method.

The specimen should be collected as minimum of 2 cm², put tissue in strong container or bottle with screw cap then suspended in a mixture of 50% glycerine with 0.04 phosphate buffer pH 7.2-7.6. Preferably with added antibiotics. There will be considerable loss of infectivity if samples are sent in buffer outside of this pH range.

1.2 Blood/serum sample

Collection of blood sample should be collected under sterile conditions and serum part is separated by centrifugation and kept it in a screw cap vials with O-rings. Serum samples should be kept at freezing condition (-20°C) before dispatch to Regional Reference Laboratory.



Tissue specimen preserved in
50% glycerine buffer



Serum/blood specimen

2. Packaging and specification

Infectious substance (Infectious substance Category A) must be transported in packaging which meets the UN specifications for Division 6.2 and assigned to UN 2900 (UN 2900 is infectious substance, affecting to animals only) that meet the requirement of Packaging Instruction 602 (PI 602) of IATA Dangerous Goods

Non infectious substance or diagnostic specimens and assigned to UN 3373 (Biological product Category B) that must be transported in packaging that meets the requirements of Packaging Instruction 650 (PI 650)

The samples must be packed in a watertight primary and secondary IATA approved containers or a strong container so that the samples arrive in good condition and do not present any hazard to persons or animals during shipment. It is essential that the contents of containers which break or leak in the transit, do not contaminate the outside layer of the parcel.

The procedure for packing of samples are recommended as this following

2.1 The samples must be put a primary container (glass or plastic tubes or bottles) with screw caps and wrapped with paraffin film or adhesive tape individually in order to prevent leakage of fluid. The wrapping of bottle or primary container should be completed in clean surrounding by using effective disinfectant before proceeding further.

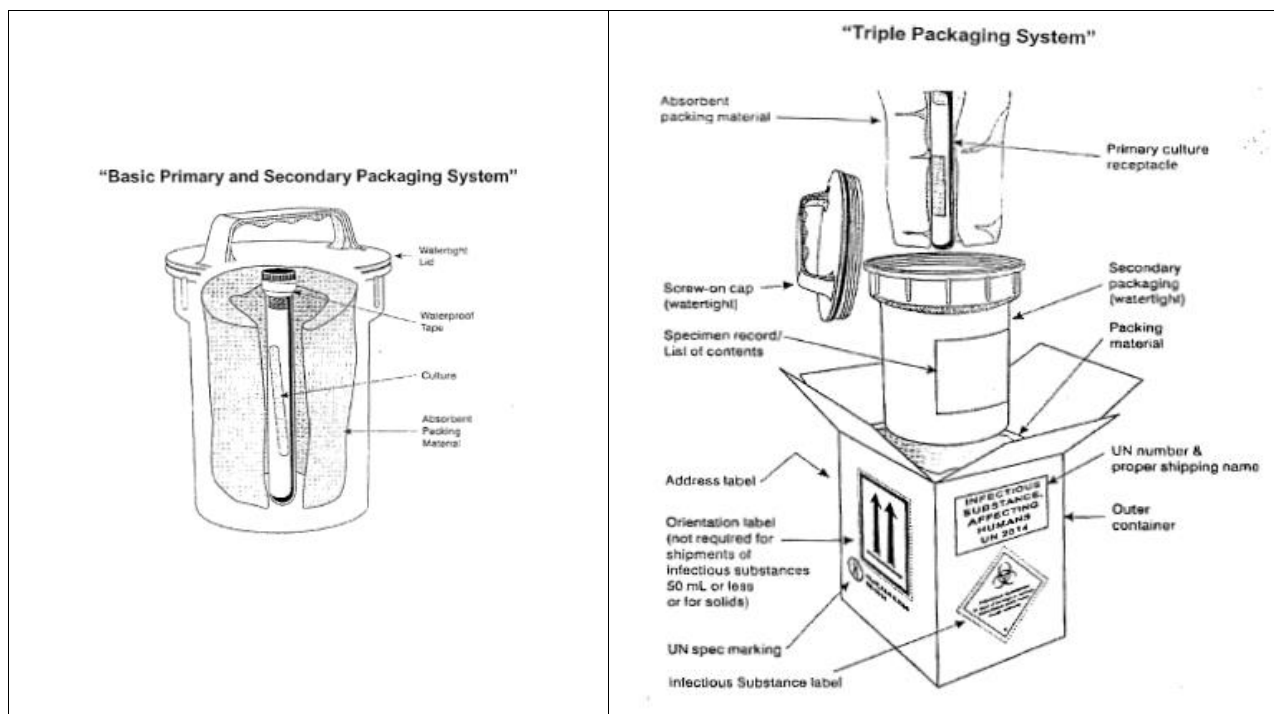
2.2 Primary container must be packed in watertight secondary packaging, which should be strong crushproof and leak-proof metal containers with absorbent cotton wool that can absorb entire contents of all primary containers.

2.3 The secondary packaging must be placed in outer containers which should be a foam box covered with hard box or IATA proved container.

2.4 Sufficient information and list of samples or materials should be enclosed in an envelope covered with plastic bag and placed between the secondary packaging and outer box.

2.5 The FREEZER PACK is recommended to put outside the secondary packaging to ensure that all materials are kept cool during shipment. The pre-frozen packs at -20°C is necessary to be prepared before packing samples.

2.6 In case of packing with dry ice, it must be put outside the secondary packing. Please do not place dry ice directly in the primary containers; it may break the sample tube.



3. Marking Labeling

The outer package of parcel must be clear labeled with all details as this following:

- The name and address of institute,
- Telephone numbers
- Flight number, arrival time
- Airway bill number
- Infectious substance hazard label
- Dry ice label (if necessary)
- Others such as Perishable, fragile, keep cool or keep at -20°C etc.

3.1 Name and address:

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia

Department of Livestock Development

Pakchong, Nakhonratchasima, 30130 THAILAND

Tel: +66 44 279112, Fax: +66 44 314889 Email: rrl@dld.go.th

3.2 Others marking:

The marking on the package is an essential source of information to communicate to everyone involved in the transportation process, such as

“DIAGNOSTIC SPECIMENS” or “BIOLOGICAL SUBSTANCE”

“PATHOLOGICAL MATERIAL OF NO COMMERCIAL VALUE”

“PERISHABLE” “FRAGILE” “KEEP AT 4 °C”

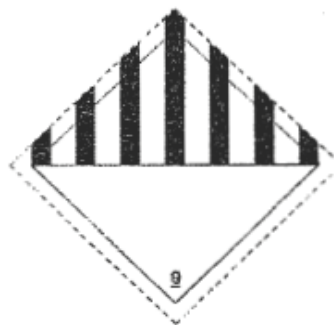
3.3 Hazard labels:

The label must be legible and must not be covered. The label must be attached to one side of the box and not overlap.

Infectious Substance label



Miscellaneous Dangerous Goods
(Dry ice)



Diagnostic specimen
UN 3373

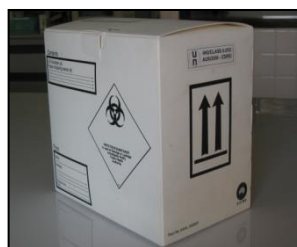
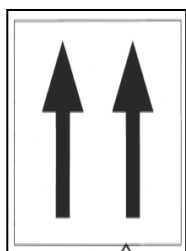


Cargo aircraft only
Must be used for all shipment that can
not ride on passenger aircrafts



3.4 Oriental label

The arrow label must be used when shipment liquid samples in the container, indicates to hold the package this way up, this label must be placed on 2 sides of the package (opposite side)



4. Route and destination of the shipment

All biological materials, diagnostic specimens or infectious substances must be sent by AIRFREIGHT ONLY direct to SUVARNABHUMI INTERNATIONAL AIRPORT, BANGKOK ONLY before dispatch the sender must notify the Regional Reference Laboratory at Pakchong by fax (Fax No. +66 44 314889) for the details of the Airway Bill Number, flight number, time and date of arrival of the parcel or package in Bangkok, Thailand.

5. Customs clearance process

The staffs of Department of Livestock Development (DLD) and Regional Reference Laboratory will clear the parcel through the customs at the airport, then the parcel will be collected and taken to the laboratory at Pakchong, Nakhonratchasima province (180 Kilometer from SUVARNABHUMI AIRPORT) by the staff of Reference Regional Laboratory.

6. References

IAH, Requirement for packaging and dispatch of biological materials to Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, UK from overseas.

Guidance document on Addendum III The 46th Edition of AITA's Dangerous Goods Regulation. Packing instruction for diagnostic specimens and infectious substance, ANQAP Department of Primary Industries, Australia.

Example 1. Picture of IATA approved container for Infectious specimen



Example 2. Picture of IATA approved container for Non Infectious specimen



Example 3. An alternative method of packing with strong container is also acceptable for diagnostic reagents



FMD SAMPLE SUBMISSION FORM						
<u>Sender details</u> Country:..... Your Reference No..... Name of Institute:..... Address:..... Tel:.....fax:..... Email:.....			<u>Owner Details</u> Owner's name..... Address:..... District/Province:..... Region:..... Country:..... Tel:Fax:.....			
<u>1. Sample Details:</u>						
☐ Epithelium tissue ☐ Vesicle fluid ☐ Virus culture ☐ Serum ☐ Other						
Number of animals sampled:						
Sample Identification:						
Date collected:/...../..... Date of dispatched:/...../.....						
Date first noticed:/...../.....		Date of report/...../.....		Number of heard involved /Duration of outbreak		
Species	sex	No. of animals affected, in outbreak or dead		Date of previous infection and serotype		
Cattle						
Buffalo						
Pig						
Other						
More details:.....						
<u>2. Vaccination history:</u>						
Species	Vaccinated Yes No		Date of Last vaccination	Type of vaccine or serotype	Vaccine producer	Batch no.
<u>3. Outbreak investigation /method of spread/Control measures:</u>						
<u>4. Comments:</u>						
<u>5. Signature:</u>Date.....						