



วารสาร

ชีวพลัตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 29 ฉบับที่ 1-2 (มีนาคม-กันยายน 2563)

Vol.29 No.1-2 (March-September 2020)

01

การผลิตวัคซีนแบบกลไกชนิดลดปริมาณการฉีดต่อโกลในระดัต้นแบบ

02

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมแบบกลไก
และเอยโมรียาเซพติซีเมียที่ใช้เอยดวูเวนท์ต่างกัน

03

เปรียบเทียบความไวของเซลล์ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line
และเซลล์ปฐมภูมิกากไตแกะ primary lamb kidney cell
สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

04

การประเมินชุดตรวจสอยบนสตรีกาอาร์ โปรตีนชนิดต่าง ๆ สำหรับ
แยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ
ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

05

เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีน
ทดสอบอิมูโนโลยีที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน

06

การศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแท้งวัคซีนบรูเซลลาซิส สตรน 19

07

การวิเคราะห์แนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้น
และปริมาณไวรัสของวัคซีนรวมนิวคาสเซิล
และทดสอบอิมูโนโลยีที่

เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 29 ฉบับที่ 1-2 มีนาคม-กันยายน 2563

สารบัญ

- จากกองบรรณาธิการ 5
- การผลิตวัคซีนแบคทีเรียลดปริมาณเชื้อไวรัสในระดับต้นแบบ 6
อนันต์ ท้าวเพชร เข้มชมพู่ อธิกัญญ์ภักดิ์ ดีถี ประเสริฐสุวรรณ
- เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมแบคทีเรีย และเฮโมราจิกเซพติซีเมียที่ใช้ 19
แอดจูแวนท์ต่างกัน
อนันต์ ท้าวเพชร เข้มชมพู่ อธิกัญญ์ภักดิ์ ดีถี ประเสริฐสุวรรณ
- เปรียบเทียบความไวของเซลล์ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line และเซลล์ 36
ปฐมภูมิจากไตแกะ primary lamb kidney cell สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสโรค
ปากและเท้าเปื่อย
วิไล ลินจงสุขภักข กานต์รวี ชวนพัฒน์ จรรยา สมานิต ชาลีณี ดีแปลง
- การประเมินชุดตรวจสอบแอนติเจนไวรัส โปรตีนชนิดต่างๆ สำหรับแยกระหว่างสัตว์ 47
ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
วิไล ลินจงสุขภักข
- เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบ 57
ติดต่อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน
คณิตา ภาสะฐิติ นพคุณ มูลสิน
- การศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19 68
จิณณพัต ปัญจพันธ์พงศ์ สุพายา ตรีภมล
- การวิเคราะห์แนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและปริมาณไวรัสของ 78
วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่
สุพายา ตรีภมล จิณณพัต ปัญจพันธ์พงศ์

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 29 No. 1-2 March-September 2020

Contents

- The editorial 5
- Production of reduced dose volume blackleg vaccine, pilot scale 6
Anan Thaopech Khemchomphu Atikanyapak Ditee Prasertsuwan
- Comparison efficacy of combined blackleg and hemorrhagic septicemia vaccine using different adjuvant 19
Anan Thaopech Khemchomphu Atikanyapak Ditee Prasertsuwan
- Comparative sensitivity of fetal goat tongue ZZ-R127 cell line and primary lamb kidney cell for isolation of foot and mouth disease virus 36
Wilai Linchongsubongkoch Karnrawee Chuanpat Janya Samanit
Chalineee Deepang
- Evaluation of various types of non structural protein kit to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus 47
Wilai Linchongsubongkoch
- Comparison of neutralizing antibody titer in specific pathogen- free chicken after vaccination with Department of Livestock Development and commercial infectious bronchitis vaccine 57
Kanita Bhasathiti Noppakun Moolsin
- Study on optimal lyophilization formulation of Brucellosis vaccine strain 19 68
Jinnapat Panchaphanpong Supaya Trekamon
- The Relationship between moisture and virus content of combined Newcastle disease and Infectious bronchitis vaccine: Trend analysis 78
Supaya Trekamon Jinnapat Panchaphanpong

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	จาทูรนต์	พลราช	Advisory board	Jaturon	Polrach
บรรณาธิการ	ไชยา	สง่าประโคน	Editor	Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	ฐิตวัฒน์	จันทวร	Editorial board	Thitawat	Janthawon
	ร่มพฤษ์	อุดล		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 1165 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 บทความปริทรรศน์ (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 วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ 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 (วิไลและคณะ, 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 และหน้าที่ยังถึง เช่น
 สายพิน ชุมทรัพย์ สุรพล ชุมทรัพย์ และจาตุรนต์ 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 หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่ยังถึง 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 แป้นดุ่ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพิงพิศ ดุลยพัชร
2541อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา
<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm> 27 มีนาคม 2541

Boscos, 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

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ประกอบด้วยผลงานวิชาการ จำนวน 7 เรื่อง ได้แก่

- 1) เรื่องการผลิตวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบ
- 2) เรื่องเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมแบบลดเลข และเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ใช้แอดจูแวนท์ต่างกัน
- 3) เรื่องเปรียบเทียบความไวของเซลล์ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line และเซลล์ปฐมภูมิจากไตแกะ primary lamb kidney cell สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
- 4) เรื่องการประเมินชุดตรวจสอบอนโคตรัคเจอร์ โปรตีนชนิดต่างๆ สำหรับแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
- 5) เรื่องเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน
- 6) เรื่องการศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19
- 7) การวิเคราะห์แนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและปริมาณไวรัสของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

ซึ่งเป็นผลงานของสัตวแพทย์หญิงวิไล ลิณจงสูงงกข ที่ปรึกษากิจการกรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย และเป็นผลงานจากนักวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้อ่านและนักวิชาการที่สนใจและให้การสนับสนุนงานด้านวิชาการ ด้วยการส่งผลงานวิชาการและบทความวิชาการที่เป็นประโยชน์มาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ และขอเชิญชวนให้ส่งผลงานวิชาการเข้ามามากๆ เพื่อให้วารสารฉบับหน้าและฉบับต่อไปได้ตีพิมพ์ให้ได้ปีละ 2 ฉบับตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ
กองบรรณาธิการ

การผลิตวัคซีนแบคทีเรียชนิดลดปริมาตรฉีดต่อได้สในระดับต้นแบบ

อนันต์ ท้าวเพชร¹ เข็มชมพู อธิกัญญะ¹ ดิถี ประเสริฐสุวรรณ¹

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตวัคซีนแบคทีเรียชนิดลดปริมาตรฉีดต่อได้สในระดับต้นแบบ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium chauvoei* (Cl. chauvoei) สเตรนท้องถิ่น ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 100 ลิตร เตรียมเป็นวัคซีนให้มีจำนวนเชื้อเป็นค่า % packed cell volume (% PCV) จากเดิมที่ปริมาตรฉีด 5 มล./โดส มี % PCV ไม่น้อยกว่า 0.26% เพิ่มขึ้นเป็นไม่น้อยกว่า 0.65% ปริมาตรฉีด 2 มล./โดส โดยปรับความเข้มข้นด้วย 0.85% sodium chloride และ potassium aluminium sulphate 0.65% ของปริมาตรวัคซีน จำนวน 3 ชุด การผลิต นำมาทดสอบคุณภาพวัคซีนตามมาตรฐาน โดยทดสอบคุณลักษณะทั่วไป ทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในแกะ และทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 3 ชุดการผลิต มีความเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเขย่า มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.03 ± 0.0133 , 7.07 ± 0.0120 และ 7.08 ± 0.0089 ตามลำดับ ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย มีความปลอดภัยในแกะ และมีความคุ้มโรคในหนูขาว 80%, 75% และ 70% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความคงสภาพแบบเร่งหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ โดยทำการทดสอบความปลอดภัยในแกะและทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 3 ชุดการผลิต มีความปลอดภัยในแกะ และมีความคุ้มโรคในหนูขาว 80%, 75% และ 90% ตามลำดับ

วัคซีนแบคทีเรียชนิดลดปริมาตรฉีดต่อได้สในระดับต้นแบบ มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน สามารถนำข้อมูลวิธีการผลิตในระดับต้นแบบ ไปพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และได้ข้อมูลการทดสอบคุณภาพวัคซีนสำหรับใช้ประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุใหม่ตามวัตถุประสงค์

คำสำคัญ: วัคซีนแบคทีเรีย ลดปริมาตรฉีดต่อได้ส ระดับต้นแบบ

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคแบลคเลก เป็นโรคติดต่อร้ายแรงของโค-กระบือ ลักษณะสำคัญของโรคนี้คือ การอักเสบของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะบริเวณต้นขาหลัง บริเวณที่อักเสบจะบวมร้อน มีอากาศแทรกอยู่ภายใน เมื่อกดดูจะมีเสียงดังกรอบแกรบ ไข้สูง และเดินขาเกแปลก จึงเรียกโรคนี้ว่า "โรคไข้ขา" เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium chauvoei* (*Cl. chauvoei*) มีการเจริญแบบไม่ใช้อากาศ สามารถสร้างสปอร์ในสภาวะที่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีชีวิตอยู่ในดินได้นานหลายปี สัตว์เป็นโรคได้ทุกฤดูกาล และมักเกิดโรคในบริเวณที่เคยเกิดโรคอยู่เสมอ (Blood *et al.*, 1983; Hailu and Aferu, 2015) การให้วัคซีนในสัตว์ที่เสี่ยงกับการเกิดโรคเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมโรคนี้ โดยเฉพาะในท้องที่ที่เคยเกิดโรค

วัคซีนป้องกันโรคแบลคเลกในหลายๆประเทศโดยปกติผลิตจาก formalinized whole culture (Tamura and Tanaka, 1984) เช่นเดียวกับที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ผลิตเป็นชนิด formalinized whole culture จากเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ชนิดผสมอะลัม สำหรับฉีดได้ผิวหนังมีปริมาตรฉีดต่อโดส 5 มล. สำหรับโค กระบือ และ 2.5 มล. สำหรับแพะแกะ ส่วนที่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันเป็น vegetative cell (Chandler and Hamilton, 1975; Tamura and Tanaka, 1984; Tamura *et al.*, 1984) ดังนั้นในกระบวนการผลิตให้ได้ผลผลิตของเชื้อเป็น vegetative cell สูงจึงมีความสำคัญ

เดิมการผลิตวัคซีนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย tryptose phosphate broth (TPB) 29.5 กรัมต่อลิตร, glucose 8 กรัมต่อลิตร, tryptose 3 กรัมต่อลิตร, meat extract 2 กรัมต่อลิตร และ L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร (Cameron *et al.*, 1986) แต่พบปัญหา ไม่ทราบช่วงระยะเวลาที่เชื้อแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ทำให้ปริมาณผลผลิต vegetative cell ของเชื้อต่ำ เกิดสปอร์จำนวนมาก นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ผลิตได้ไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดความสูญเสียระหว่างขั้นตอนการผลิต วันชัยและวีรชาย (2549) ได้ทำการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อมากขึ้น โดยปรับปริมาณสารอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อให้เหมาะสม ได้แก่ glucose, tryptose และ meat extract เท่ากับ 15, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณ TPB และ L-cysteine HCl ปริมาณเท่าเดิม จากการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ ขนาด 3 และ 500 ลิตร พบว่ามีระยะพักตัวของเชื้อ (lag phase) 15 ชั่วโมง และระยะที่เชื้อแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณเชื้อที่เป็น vegetative cell สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ของ log phase เมื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนและทดสอบประสิทธิภาพตามมาตรฐานกำหนด ได้วัคซีนที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัย

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลก และการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (รัชนิและนิตยา, 2551) โดยเตรียมวัคซีนแบลคเลกชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม มีขนาดฉีดโดสละ 5 และ 2 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 2 ชุดให้ความคุ้มโรค 100% เมื่อทดลองเตรียมวัคซีนรวมแบลคเลก และเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม ให้มีขนาดฉีดโดสละ 3 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก (100%) และต่อเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (ค่า log protection มากกว่า 4) ต่อมาการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในโคและแพะ (รัชนิและคณะ, 2557) พบว่าวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีด (โคโดสละ 2 มล. และแพะโดสละ 1 มล.) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี หลังฉีดวัคซีนโคและแพะ 2 ครั้งดีกว่าการฉีด 1 ครั้ง โดยมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างน้อย 28 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีน และวัคซีนมีอายุการเก็บรักษานาน 24 เดือน และจากการศึกษาการเตรียมวัคซีนแบลคเลกเข้มข้น (Shoshtary and Langroudi, 2007) ซึ่งเตรียมวัคซีนแบลคเลกที่มีความเข้มข้นมากขึ้น 2.5 เท่า โดยใช้ aluminum hydroxide gel เป็นแอดจูแวนท์ ผลสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในวัคซีนเท่ากับ 10% เมื่อทดสอบความคุ้มโรคในหนูตะเภา พบว่าให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก 100% จึงเป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนแบลคเลกเพื่อการลดปริมาตรฉีดต่อตัวเหลือ 2 มล. สำหรับโค กระบือ และ 1 มล.

สำหรับแพะและแกะ อีกทั้งยังเป็นการลดต้นทุนในการใช้สารเคมี บรรจุภัณฑ์ และตอบสนองความต้องการของเกษตรกร

ดังนั้นจึงใช้ผลการศึกษาของวันชัยและวีรชัย (2549) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนต่อปริมาตรสูงขึ้น มาปรับปรุงกระบวนการผลิตในขั้นตอนการผสมวัคซีน (formulate) ให้เข้มข้นมากกว่าเดิมที่ใส่เชื้อปริมาณ 6.5×10^8 CFU/โดส นำไปสู่การใส่เชื้อจาก 0.26%PCV เป็น 0.65%PCV (รัชนิและคณะ, 2557)

การผลิตวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบ เป็นโครงการหนึ่งในยุทธศาสตร์เชิงพัฒนาของ สทช. กรมปศุสัตว์ เพื่อให้การผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ก้าวทันการพัฒนาวัคซีนที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และตอบสนองความต้องการของผู้ใช้วัคซีน และเนื่องจากมีปริมาณความต้องการใช้วัคซีนแบบลดเลขเพิ่มขึ้นอย่างมาก ส่งผลให้ต้องใช้สารเคมีในการเลี้ยงเชื้อ บรรจุภัณฑ์ และพื้นที่ในการขนส่ง การจัดเก็บทั้งใน สทช. และท้องที่มากขึ้น เพื่อลดปัญหาดังกล่าว สทช. ต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบบลดเลข จึงได้ทำการทดลองโดยผลิตวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบ จำนวน 3 ชุดการผลิต

การปรับลดปริมาตรฉีดมีผลดีต่อผู้ปฏิบัติงานหลายประการเช่น สะดวกในการฉีด ลดพื้นที่การจัดเก็บ แต่ก่อนที่จะทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องศึกษาว่าการปรับเปลี่ยนวิธีการผลิตจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพวัคซีนด้วยหรือไม่ จึงทำการทดลองโดยผลิตวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบขึ้นจำนวน 3 ชุดการผลิต เพื่อให้ได้ข้อมูลวิธีการผลิต และข้อมูลการทดสอบคุณภาพว่าการปรับเปลี่ยนวิธีการผลิตต่างไปจากเดิมยังคงผ่านการทดสอบคุณภาพ

การศึกษาก่อนการผลิตวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบครั้งนี้ เพื่อผลักดันให้ผลิตได้จริงในระดับอุตสาหกรรม และให้ได้ข้อมูลการทดสอบคุณภาพวัคซีนสำหรับใช้ประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุใหม่สำหรับวัคซีนแบบลดเลข โดยทดสอบคุณสมบัติ ความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสัตว์ทดลองตามมาตรฐานที่กำหนด

อุปกรณ์ และวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ซึ่งเก็บในรูปของสปอร์แห้ง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเพาะเลี้ยง *Cl. chauvoei* ประกอบด้วย glucose 15 กรัมต่อลิตร, meat extract 3 กรัมต่อลิตร, TPB 29.5 กรัมต่อลิตร, L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร และ tryptose 2 กรัมต่อลิตร
2. Semi-synthetic broth ประกอบด้วย glucose 8 กรัมต่อลิตร, meat extract 2 กรัมต่อลิตร, TPB 29.5 กรัมต่อลิตร, L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร และ tryptose 3 กรัมต่อลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร
3. Phosphate buffer saline (PBS) ประกอบด้วย โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 6.67 กรัมต่อลิตร, โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3 กรัมต่อลิตร, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 85 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. สเตบิไลเซอร์ (Stabilizer) ประกอบด้วย enzymatic digest of casein 25 กรัมต่อลิตร, sucrose 50 กรัมต่อลิตร, sodium glutamate 10 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร
5. Thioglycolate broth
6. Tryptic soy broth
7. Sabouraud dextrose broth

สัตว์ทดลอง

1. หนูตะเภา พันธุ์ Dunkin Hartley เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนัก 300-400 กรัม จำนวน 10 ตัว เพื่อใช้เตรียมเชื้อพิษ โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบที่เรียกว่าแบบ conventional ซึ่งไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟในกรงพื้นต้น ทำจากสแตนเลส ขนาด 90x120x50 ซม. จำนวนสัตว์ 5 ตัว/กรง ให้อาหารเม็ด และน้ำดื่มในภาชนะขวดมีจุลินทรีย์ตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ (euthanasia) โดยการดึงคอ (cervical dislocation) (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา
2. หนูขาว พันธุ์ ICR เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนัก 20-25 กรัม จำนวน 396 ตัว โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบที่เรียกว่าแบบ conventional ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟ เลี้ยงในกรงพื้นต้น ทำจากสแตนเลส ขนาดกรง 38x68x12 ซม. จำนวนสัตว์ 20 ตัว/กรง ใช้กลบเป็นวัสดุรองนอนโดยเปลี่ยนทุกวัน ให้อาหารเม็ดและน้ำดื่มในภาชนะขวดมีจุลินทรีย์ตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ โดยการดึงคอ (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา
3. แกะ เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนักไม่น้อยกว่า 20 กิโลกรัม จำนวน 18 ตัว โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบที่เรียกว่าแบบ conventional ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติ และหลอดไฟ เลี้ยงในคอก พื้นซีเมนต์ ขนาด 4x8 เมตร จำนวนสัตว์ 9 ตัว/คอก ให้อาหารเม็ด หญ้าแห้งและน้ำดื่มตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ โดยการฉีด xylazine HCl ขนาด 0.15 มล. /10 กก. เข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพก และ magnesium sulfate ขนาด 120 มล. /ตัว. เข้าเส้นเลือด jugular vein (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา

การเตรียมวัคซีนแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์¹ ขนาด 100 ลิตร (ภาพที่ 2) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ *Cl. chauvoei* 50 ลิตร นาน 19 ชั่วโมง และฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% โดยปริมาตร (V/V) มานับจำนวนเชื้อทางอ้อมจากค่า % PCV ตามวิธีของ Alton *et al.* (1988) โดยใส่บรอทแบคเทอริน 10 มล. ในหลอด Hopkins vaccine tubes (ภาพที่ 3) สำหรับปั่นเหวี่ยงที่มีสเกลบอกปริมาตร ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 2,500 x g นาน 75 นาที และวัดปริมาตรของตะกอน นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณเตรียมวัคซีนให้มีจำนวนเชื้อเป็นค่า % PCV จากเดิมขนาดฉีด 5 มล./โดส มีปริมาณเชื้อไม่น้อยกว่า 0.26% PCV (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543) หรือเท่ากับ 6.5×10^8 CFU/โดส (รังสรรค์ และวิวัฒน์, 2549) เป็น 0.65% PCV โดยปรับความเข้มข้นด้วย 0.85% sodium chloride และ potassium aluminium sulphate 0.65% ของปริมาตรวัคซีน ปรับให้มีค่า pH 7.0 ± 0.3 (Misra, 1991) จำนวน 3 ชุดการผลิต นำมาทดสอบคุณภาพวัคซีนตามมาตรฐาน

การเตรียมเชื้อพิษในหนูตะเภา

การเตรียมเชื้อพิษ

โดยละลาย Seed *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ด้วย semi-synthetic broth ขวดละ 1 มล. เจือจางแบบ 10-fold dilution ให้ได้ 10^{-1} นำเชื้อ undilute และ 10^{-1} ฉีดหนูตะเภา (ภาพที่ 4) ตัวละ 1 มล. ความเข้มข้นละ 5 ตัว หนูจะแสดงอาการป่วย/ตาย ภายใน 24-48 ชั่วโมง เก็บเลือดจากหัวใจ 1 มล. ไปเพาะใน semi-synthetic broth หลอดละ 10 มล. จำนวน 5 หลอด โดยใช้ liquid paraffin ปิดผิวอาหารไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อจากหลอดไปเลี้ยงต่อใน semi-synthetic broth 100 มล. ในขวดแก้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ดูดเชื้อ 5 มล. ไปเลี้ยงต่อใน semi-synthetic broth 500 มล. จำนวน 10 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองก๊าซ

¹ New Brunswick, USA

ลุ่มตัวอย่างเชื้อมาย้อมแกรมดูลักษณะสปอร์ (ภาพที่ 5) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง² ที่ 3,100 x g นาน 90 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 รอบ เติมนิเตรตปิไลเซอร์ ปริมาตร 2 เท่าของตะกอนเชื้อ ปั่นด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) บรรจุลงขวดทำแห้งขนาด 12 มล. ปริมาตรขวดละ 2 มล. นำเข้าเครื่องทำแห้ง³

การหาปริมาณ และ LD₅₀ ของเชื้อพิษ

นำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแล้วไปหาปริมาณเชื้อ (ภาพที่ 6) และหา LD₅₀ โดยฉีดเชื้อ undilute, 10⁻¹ และ 10⁻² ตัวละ 0.2 มล. ความเข้มข้นละ 10 ตัว เข้ากล้ามเนื้อขาหลังหนูขาว (ภาพที่ 7) นำจำนวนหนูที่ตาย (ภาพที่ 8) ไปคำนวณค่า LD₅₀ ในช่วง 10-100 LD₅₀ (Misra, 1991)

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

ทดสอบคุณภาพวัคซีน ตามมาตรฐานที่กำหนดดังนี้

การทดสอบคุณลักษณะทั่วไป (Property test)

เกณฑ์ยอมรับได้คือฉลาก ฝาขวดอยู่ในสภาพดี วัคซีนเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเขย่า

การทดสอบความเป็นกรด-ด่างของวัคซีน

เกณฑ์ยอมรับได้คือ 7.0±0.3 (Misra, 1991)

การทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีน (Sterility test)

ทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีนก่อนและหลังการบรรจุ โดยเฉพาะวัคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ thioglycolate broth, tryptic soy broth อบที่ 37°C และเพาะใน thioglycolate broth, tryptic soy broth และ sabouraud dextrose broth อบที่ 22°C เป็นเวลา 14 วัน จะต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อรา (ASEAN, 1998)

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนแบคทีเรียในแกะ (Safety test)

ทดสอบวัคซีนแต่ละชุดโดยฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังแกะ (ภาพที่ 9) ตัวละ 2 เท่าของโดสที่กำหนด จำนวน 3 ตัว/ชุด วัดอุณหภูมิร่างกายเช้า-เย็น และสังเกตอาการ 10 วัน เกณฑ์ยอมรับได้คือ แกะมีอาการปกติ ยกเว้นอาจมีอาการบวมบ้างบริเวณที่ฉีด ซึ่งจะหายไปภายใน 4-5 วัน (ASEAN, 1998)

การทดสอบความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว (Potency test)

ทดสอบวัคซีนแต่ละชุดโดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 20 ตัว และกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดวัคซีน จำนวน 20 ตัว ใช้กระบอกฉีดยาทิวเบอร์คูลินขนาด 1 มล. เข็มเบอร์ 26 G x 0.5 นิ้ว ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง (ภาพที่ 10) 4 ครั้งๆ ละ 0.25 มล. ห่างกัน 2 วัน หลังเข็มสุดท้าย 10 วัน จึงฉีดพิษตับ *Cl. chauvoei* ที่ผสม 3% CaCl₂ ความรุนแรง 10-100 LD₅₀ ปริมาตร 0.25 มล. เข้ากล้ามเนื้อขา หลังฉีดพิษตับ 7 วัน หนูขาวกลุ่มฉีดวัคซีนจะต้องรอดไม่น้อยกว่า 60% ส่วนกลุ่มควบคุมต้องตายไม่น้อยกว่า 80% (ASEAN, 1998)

การทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Accelerated stability test)

โดยการเก็บตัวอย่างวัคซีนที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ (OIE, 2012) แล้วนำมาทดสอบความปลอดภัยในแกะและความคุ้มโรคในหนูขาว

² Mistral, U.K.

³ Telstar, Spain

ผล

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบ 3 ชุดการผลิต ที่มีขนาดฉีด 2 มล. ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ชุดละ 5 ขวด พบว่าวัคซีนชุดที่ 1 มีค่าเท่ากับ 7.01, 7.02, 7.03, 7.03 และ 7.05 ได้ค่าเฉลี่ย 7.03 ± 0.0133 ชุดที่ 2 มีค่าเท่ากับ 7.06, 7.06, 7.09, 7.08 และ 7.08 ได้ค่าเฉลี่ย 7.07 ± 0.0120 และชุดที่ 3 มีค่าเท่ากับ 7.09, 7.08, 7.07, 7.09 และ 7.07 ได้ค่าเฉลี่ย 7.08 ± 0.0089 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาทดสอบความปลอดภัยในแกะ อาการปกติ ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย

ผลการวัดค่าอุณหภูมิร่างกายของแกะทดลองทั้ง 9 ตัว ตลอดการทดสอบ ในวัคซีนชุดที่ 1 (แกะตัวที่ 1-3), ชุดที่ 2 (แกะตัวที่ 4-6) และ ชุดที่ 3 (แกะตัวที่ 7-9) พบว่าแกะแสดงอุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าปกติ ในวันที่ 1-5 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 6 (รูปที่ 11)

เมื่อผ่าซากแกะดูเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนชุดที่ 1 (รูปที่ 12), ชุดที่ 2 (รูปที่ 13) และ ชุดที่ 3 (รูปที่ 14) ไม่พบลักษณะผิดปกติบริเวณที่ได้รับวัคซีน เช่น post vaccination granuloma หรือฝี (abscess) ในแกะทดลอง ทั้ง 9 ตัว

ประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว พบว่า มีความคุ้มโรค 80%, 75% และ 70% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมตาย 80% ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานกำหนด (รูปที่ 1) และทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Accelerated stability test) หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ พบว่าให้ความปลอดภัยในแกะ โดย ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย และความคุ้มโรคแบบลดเลขของวัคซีนในหนูขาว พบว่ามีความคุ้มโรค 80%, 75% และ 90% ตามลำดับ (รูปที่ 1)

วิจารณ์

จากการทดลองครั้งนี้ เมื่อทดสอบคุณภาพวัคซีนของวัคซีน 3 ชุดการผลิต ตามมาตรฐาน ผลการทดสอบ คุณลักษณะทั่วไป พบว่าวัคซีนมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) เมื่อเขย่า ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.03 ± 0.0133 , 7.07 ± 0.0120 และ 7.08 ± 0.0089 ตามลำดับ แสดงว่ามีความเป็นกลาง เหมาะสมที่จะฉีดเข้าร่างกายสัตว์ โดยไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อ

และโดยเฉพาะด้านความปลอดภัย ต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของแอนติเจนที่สูงขึ้นซึ่งจะส่งผลกระทบต่อ ร่างกายสัตว์ จึงต้องมีการทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง (แกะ) ก่อนที่จะนำไปใช้งานจริงกับสัตว์เป้าหมาย (โค กระบือ แพะและแกะ) พบว่าวัคซีนทั้ง 3 ชุดการผลิต มีความปลอดภัยในแกะ โดยไม่พบอาการแพ้วัคซีน ไม่พบอาการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด และไม่พบอาการของโรคแบบลดเลข

ผลการวัดค่าอุณหภูมิร่างกายของแกะทดลองทั้ง 9 ตัว ตลอดการทดสอบ ในวัคซีนชุดที่ 1, 2 และ 3 พบว่าแกะแสดงอุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าปกติ (อุณหภูมิปกติ 38.5-40°C) ในวันที่ 1-5 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 6 เนื่องจากหลังสัตว์ได้รับวัคซีนจะมีการตอบสนองจากระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอม เกิดการหลั่ง prostaglandin E₂ และระบบร่างกายปรับตัวทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงแรก ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เพื่อกระตุ้นให้ไขกระดูกเร่งสร้างระบบภูมิคุ้มกัน แล้วหลังจากนั้นอุณหภูมิร่างกายก็จะลดลงสู่ระดับปกติ

เมื่อผ่าซากแกะดูเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนชุดที่ 1, 2 และ 3 ไม่พบลักษณะผิดปกติบริเวณที่ได้รับวัคซีน เช่น post vaccination granuloma หรือฝี (abscess) ในแกะทดลองทั้ง 9 ตัว แสดงว่าวัคซีนแบบลดเลขชนิดลดปริมาตรฉีดต่อโดส ซึ่งมีความเข้มข้นของแอนติเจนมากกว่าเดิม สามารถกระจายตัวในเนื้อเยื่อได้ดี ไม่ก่อให้เกิดเนื้อตาย สรุปได้ว่ามีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง สามารถนำไปใช้งานจริงกับสัตว์เป้าหมายได้

ด้านประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว พบว่ามีความคุ้มโรค 80%, 75% และ 70% ตามลำดับ ให้ผลสอดคล้องกับรายงานการศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบคคิล และการเตรียมเป็นวัคซีนร่วมกับเฮโมรายิกเซพติซิเมีย (รัชนิและนิตยา, 2551) การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนแบคคิล ที่ลดปริมาณฉีดในโคและแพะ (รัชนิและคณะ, 2557) และการเตรียมวัคซีนแบคคิลเข้มข้น (Shoshtary and Langroudi, 2007) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 26 พบว่าค่า sig. = 0.700 ซึ่งมีความมากกว่า $\alpha = 0.05$ ดังนั้น ความคุ้มโรคในหนูขาวของ วัคซีนแบคคิลที่เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C จำนวน 3 ชุดการผลิต ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เมื่อทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (accelerated stability test) หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ พบว่าให้ความปลอดภัยในแกะ โดยไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย และมีความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว 80%, 75% และ 90% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 26 พบว่าค่า sig. = 0.496 ซึ่งมีความมากกว่า $\alpha = 0.05$ ดังนั้น ความคุ้มโรคใน หนูขาวของวัคซีนแบคคิล หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ชุดการผลิต ไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เมื่อเปรียบเทียบความคุ้มโรคในหนูขาวของวัคซีนแบคคิล ชุดการผลิตที่ 3 ระหว่างวัคซีนที่เก็บที่ อุณหภูมิ 2-8°C กับเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ โดยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับ นัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 26 พบว่า ค่า P = 0.121 ซึ่งมีความมากกว่า $\alpha = 0.05$ ดังนั้น ความคุ้มโรคในหนูขาวของวัคซีนแบคคิล ชุดการผลิตที่ 3 ระหว่างวัคซีนที่เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C กับ เก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แสดงว่าวัคซีนยัง มีความคงสภาพ ในความปลอดภัย และความคุ้มโรค สามารถนำไปอ้างอิงอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้ นาน 2 ปี แต่ควรมีการทดสอบความคงสภาพแบบปกติเพิ่มเติม เมื่อทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว

ในด้านการใช้งาน วัคซีนแบคคิลชนิดลดปริมาณฉีดต่อโดส จากปริมาณฉีดต่อโดส 5 มล. สำหรับโค กระบือ และ 2.5 มล. สำหรับแพะและ ลดเป็น 2 มล. สำหรับโค กระบือ และ 1 มล. สำหรับแพะและ ให้ความสะดวกในการฉีดเพิ่มขึ้น คาดว่าน่าจะมีการใช้วัคซีนอย่างทั่วถึง ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคอย่างมี ประสิทธิภาพ ช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ ปัญหาการดื้อยา ปัญหาटक้างให้ เกษตรกรได้ ทำให้การเลี้ยงสัตว์เป็นอาชีพที่มั่นคง และยังยืน ผู้บริโภคได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และปลอดภัยจากยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว ควรมีการทดสอบและติดตามผลการใช้วัคซีนใน พื้นที่ เพื่อประเมินความปลอดภัยในสัตว์เป้าหมาย และเก็บตัวอย่างเชื้อที่เกิดการระบาดในพื้นที่มาตรวจว่าตรงกับ เชื้อที่ผลิตวัคซีนหรือไม่ ด้วยวิธี PCR ซึ่งมีข้อดีคือ มีความรวดเร็ว มีความไว (sensitivity) มีความจำเพาะ (specificity) ง่าย ไม่จำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ และใช้สัตว์ทดลอง (Abbas *et al.*, 2018)

สรุป

วัคซีนแบคคิลชนิดลดปริมาณฉีดต่อโดสในระดับต้นแบบ มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน สามารถนำ ข้อมูลวิธีการผลิตในระดับต้นแบบ ไปพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และได้ข้อมูลการทดสอบ คุณภาพวัคซีนสำหรับใช้ประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุใหม่ตามวัตถุประสงค์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ นายสัตวแพทย์ เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ สัตวแพทย์หญิงรัชณี อັติ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย และฝ่ายทดสอบคุณภาพ วัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนให้การทดลองนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ 2543 วัคซีนแบคทีเรีย ในคู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 18
- รังสรรค์ รักษาอุทิต และวิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา 2549 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ ความชุ่มชื้น น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ PCV ในแบคทีเรียบรอทแบคทีเรีย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(1): 37-44
- รัชณี อັติ และ นิตยา รักศรี 2551 ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบคทีเรียและการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 18(1-2): 35-42
- รัชณี อັติ วันชัย ตีระจรรววรรณ วีระชัย ปุ่สูงเนิน และ อาธิรัตน์ แพงเพ็ง 2557 ประสิทธิภาพของวัคซีนแบคทีเรียที่ลดปริมาณฉีดในโคและแพะ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 23(1-2): 7-15
- วันชัย ตีระจรรววรรณ และวีระชัย ปุ่สูงเนิน 2549 การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบคทีเรียในเฟอร์เมนเตอร์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(2): 71-79
- Abbas, Ashraf M., Dalia A.M. Abd EL-Moaty, Eman S.A. Zaki, Elham F. El-Sergany, Nadine A. El-Sebay, Hala A. Fadl, and A. A. Samy. 2018. "Use of Molecular Biology Tools for Rapid Identification and Characterization of Pasteurella Spp." Veterinary World 11 (7): 1006–1014.
- Alton, G. G., Jones L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institute National De La Recherche Agronomique. Paris. p. 63-71.
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2020. The AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Schaumburg, American. pp. 60-70.
- ASEAN, 1998. ASEAN standard requirements for blackleg bacterin. In Manual of ASEAN standards for animal vaccines. Livestock publication series no, 2A, 2nd edition, ASEAN Secretariat, Jakarta, Indonesia. pp. 71-72.
- Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson. J.A. 1983 Blackleg. In Veterinary medicine, 6th edition. Bailliere Tindal, Bath, UK. Pp. 603-605.
- Cameron, C. M., Botha, W. J. S. and Schoeman, J. H. 1986. Immunization of guinea-pigs and cattle with a reduced dose Clostridium chauvoei vaccine produced in a semi-synthetic medium. Onderstepoort J. Vet. Res. 53:51-53
- Chandler, H. M., and R. C. Hamilton. 1975. "The Preparation of Immunogenic Cell Walls from a Highly Protective Strain of Clostridium Chauvoei." Journal of General Microbiology 88 (1): 27–35.

- Hailu, G, and B Aferu. 2015. "Retrospective Assessment of Black Leg in Kafta Humera Woreda." *Momona Ethiopian Journal of Science* 7 (1): 134.
- Misra, R. P. 1991. Production of blackleg vaccine. In *Manual for production of Anthrax and Blackleg vaccine*, FAO animal production and health paper 87. FAO, Rome, Italy. pp. 85-93
- Office International des Epizooties. 2012. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, 7th edition. OIE. Paris, France. p.58.
- Shoshtary, Mossawi, and Pilehchian Langroudi. 2007. "Preparation of Concentrated Blackleg Vaccine." *Archives of Razi Institute* 62 (3): 165–169.
- Tamura, Y., and S. Tanaka. 1984. "Effect of Antiflagellar Serum in the Protection of Mice against *Clostridium Chauvoei*." *Infection and Immunity* 43 (2): 612–616.
- Tamura, Yutaka, Shozo Tanaka, and Nobuyuki Minamoto. 1984. "Demonstration of Protective Antigen Carried by Flagella of *Clostridium Chauvoei*." *Microbiology and Immunology* 28 (12): 1325–1332.

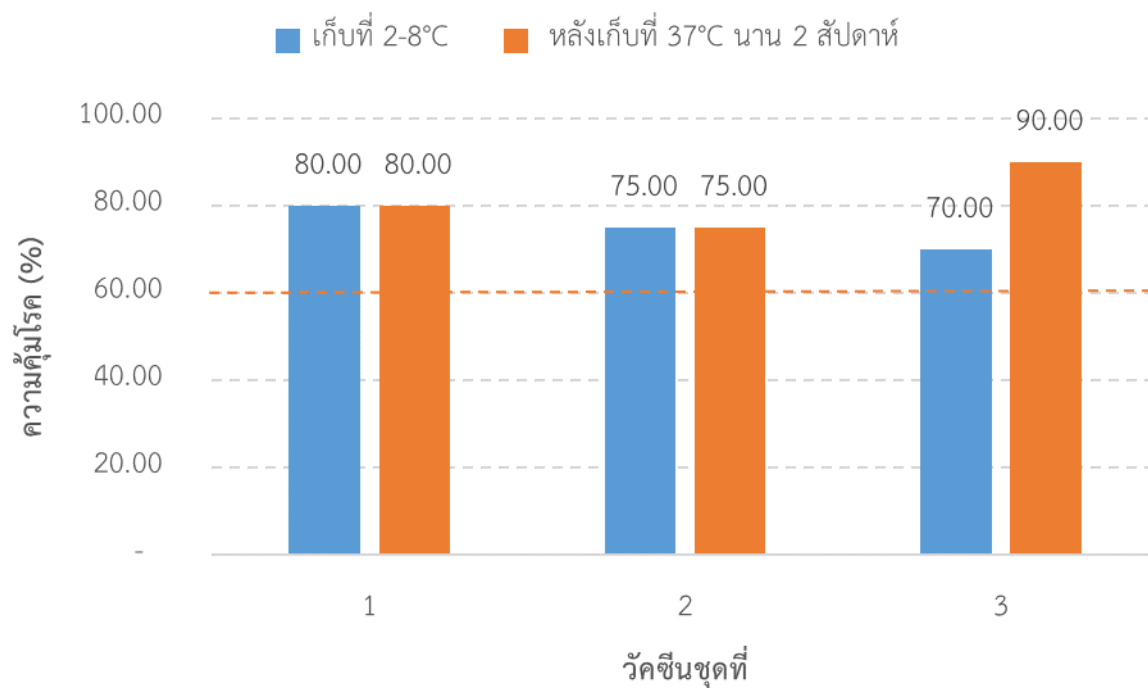
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรียลดปริมาณเชื้อต่อโด้สในระดับต้นแบบ

การทดสอบ	ชุดการผลิตที่		
	1	2	3
คุณลักษณะทั่วไป	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
ความเป็นกรด-ด่าง *	7.03±0.0133	7.07±0.0120	7.08±0.0089
การปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
ความปลอดภัยในแกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
ความคุ้มโรคในหนูขาว			
- กลุ่มฉีดวัคซีนคุ้มโรค **	80% (16/20)	75% (15/20)	70% (14/20)
- กลุ่มควบคุม *** (ใช้ร่วมกัน)	80% (16/20)		
ความคงสภาพแบบเร่ง			
- ความปลอดภัยในแกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
- ความคุ้มโรคในหนูขาว			
- กลุ่มฉีดวัคซีนคุ้มโรค **	80% (16/20)	75% (15/20)	90% (18/20)
- กลุ่มควบคุม *** (ใช้ร่วมกัน)		80% (16/20)	

* ค่าความเป็นกรด-ด่างของวัคซีนอยู่ในช่วง 7.0±0.3 ถือว่าผ่าน

** มากกว่า 60% ถือว่าคุ้มโรค

*** กลุ่มควบคุมต้องตายไม่น้อยกว่า 80%



รูปที่ 1 ผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนแบคทีเรียลดปริมาณเชื้อต่อโด้สในระดับต้นแบบ



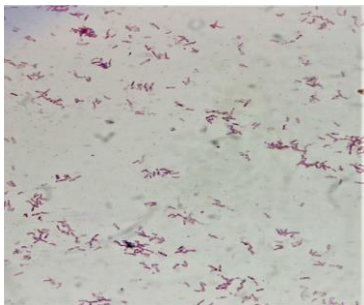
รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์



รูปที่ 3 Hopkins vaccine tube



รูปที่ 4 เตรียมเชื้อพิษในหนูตะเกาะ



รูปที่ 5 สปอร์ *Cl. chauvoei*



รูปที่ 6 โคโลนี *Cl. chauvoei*



รูปที่ 7 การทดสอบเชื้อพิษที่เข้ากล้ามเนื้อของหนู



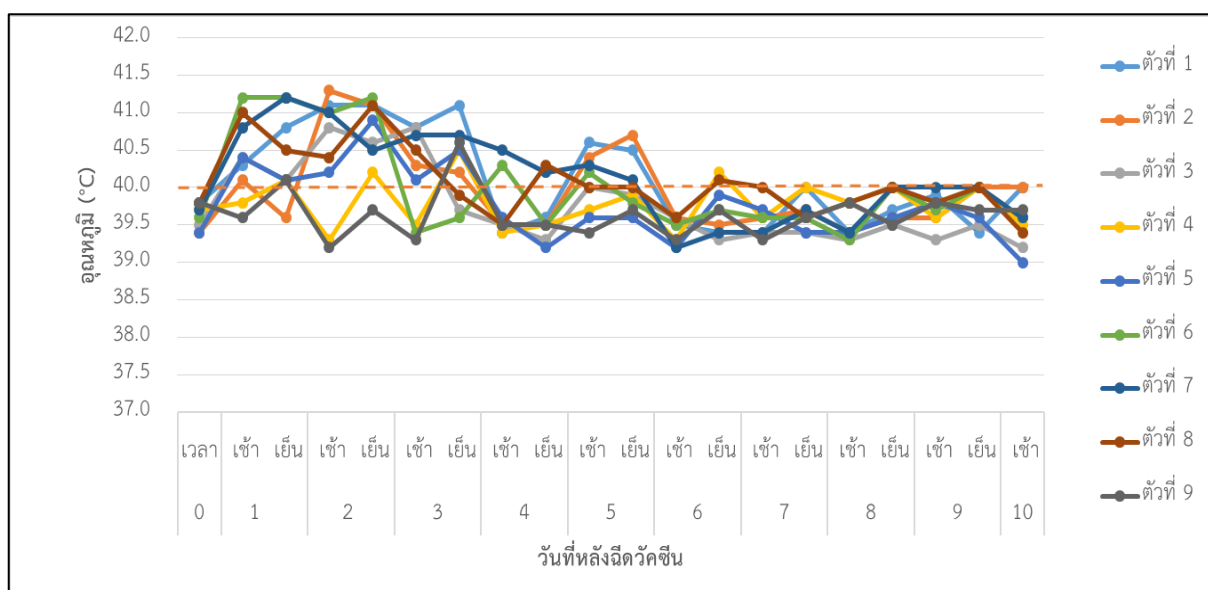
รูปที่ 8 หนูที่ตายจากเชื้อพิษ



รูปที่ 9 การทดสอบความปลอดภัยในแกะ



รูปที่ 10 ทดสอบความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว



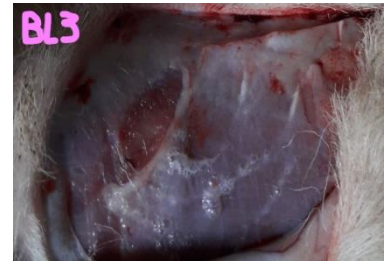
รูปที่ 11 อุณหภูมิแกะทดสอบความปลอดภัย



แกะตัวที่ 1



แกะตัวที่ 2



แกะตัวที่ 3

รูปที่ 12 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนชนิดที่ 1



แกะตัวที่ 4



แกะตัวที่ 5



แกะตัวที่ 6

รูปที่ 13 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนชนิดที่ 2



แกะตัวที่ 7



แกะตัวที่ 8



แกะตัวที่ 9

รูปที่ 14 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนชนิดที่ 3

Production of reduced dose volume blackleg vaccine, pilot scale

Anan Thaopech¹ Khemchomphu Atikanyapak¹ Ditee Prasertsuwan¹

Abstract

This study aimed to produce a reduced dose-volume blackleg vaccine for the pilot scale. Three batches of reduced dose-volume blackleg vaccine were prepared from the culture of *Clostridium chauvoei* local strain in 100 liters fermenter, and dose-volume was reduced from 5 ml/dose to 2 ml/dose by adjusting concentration with 0.85 % sodium chloride and potassium aluminium sulphate 0.65 % of total vaccine volume. Three batches were tested for quality according to the ASEAN standard. Property test showed that three batches vaccine were homogeneous when shake. The determination of pH showed the value at 7.03 ± 0.0133 , 7.07 ± 0.0120 and 7.08 ± 0.0089 , respectively. Sterility test showed the absence of bacteria and fungi. Safety test in sheep showed no untoward reaction. Potency test in mice showed 80%, 75% and 70% protection challenge against *Cl. chauvoei* virulence, respectively. Accelerated stability test after incubation 37°C for 2 weeks in sheep showed no untoward reaction. Potency test in mice showed 80%, 75%, and 90% protection challenge against *Cl. chauvoei* virulence, respectively. In conclusion, three batches of reduced dose volume blackleg vaccine were effectively produced for pilot scale according to the ASEAN standard and can be developed to reproduce in the industrial scale. The results also provide data on vaccine quality test for the registration as a new biological product.

Keywords: Blackleg vaccine, reduced dose volume, pilot scale

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมแบคทีเรีย และเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ที่ใช้แอดจูแวนต์ต่างกัน

อนันต์ ท้าวเพชร¹ เข้มชมพู่ อธิกัญญ์¹ ดิถี ประเสริฐสุวรรณ¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ใช้แอดจูแวนต์ต่างกัน เปรียบวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย โดยใช้ MONTANIDE™ ISA 201 VG, MONTANIDE™ ISA 61 VG และ aluminum hydroxide gel เป็นแอดจูแวนต์ นำมาทดสอบคุณภาพวัคซีนตามมาตรฐานสากล ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง 6.95 ± 0.0080 , 7.01 ± 0.0049 และ 6.78 ± 0.0133 ตามลำดับ ผลการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในแกะและหนูขาว ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย เมื่อทดสอบความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว พบว่ามีความคุ้มโรค 100% ทั้ง 3 ตำรับ ความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว พบว่ามีค่า log protection เท่ากับ 6.182, 5.500 และ 4.334 ตามลำดับ และการทดสอบความคงสภาพแบบเร่งหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ พบว่าให้ความปลอดภัยในแกะและหนูขาว โดยไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย และความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว พบว่ามีความคุ้มโรค 100% ทั้ง 3 ตำรับ ความคุ้มโรค เฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว พบว่ามีค่า log protection เท่ากับ 6.182, 5.500 และ 4.334 ตามลำดับ

วัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย 3 ตำรับ มีประสิทธิภาพตามมาตรฐานสากล สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการผลิตในระดับต้นแบบ และพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ตามวัตถุประสงค์ โดยมีความคุ้มโรคแบคทีเรียเท่ากัน ทั้ง 3 ตำรับ ส่วนความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ตำรับที่ 1 สูงที่สุด รองลงมาเป็นตำรับที่ 2 และตำรับที่ 3 ตามลำดับ

คำสำคัญ: วัคซีนรวม แบคทีเรีย เฮโมรายิกเซพติซีเมีย แอดจูแวนต์

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคแบลคเลก (Blackleg) และเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในโคและกระบือ ทั้งสองโรคมียาสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย โรคแบลคเลกเกิดจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* (*Cl. chauvoei*) ลักษณะสำคัญของโรคนี้คือการอักเสบของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะบริเวณต้นขาหลัง บริเวณที่อักเสบจะบวมร้อน มีอากาศแทรกอยู่ภายใน เมื่อกดดูจะมีเสียงดังกรอบแกรบ ใช้สูง และเดินขาจะแปลก จึงเรียกรโรคนี้ว่า "โรคไขขา" โรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียเกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) เป็นโรคติดต่อที่สำคัญทางเศรษฐกิจของโคและกระบือ พบที่ระบบทางเดินหายใจของสัตว์ (De Alwis, 1999) และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ลายสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Maslog, 1998) ทั้งสองโรคสามารถรักษาได้ด้วยยาต้านจุลชีพ แต่ปัจจุบันการดื้อยาต้านจุลชีพเป็นปัญหาต่อการรักษาทั้งในมนุษย์และสัตว์ การใช้ยาต้านจุลชีพมากขึ้นเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยา (Lukášová and Šustáčková, 2003) การสืบสวนการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์มีความซับซ้อนมากกว่าในคน (WHO, 2017) ทั้งสองโรคสามารถป้องกันได้โดยการฉีดวัคซีน

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ผลิตวัคซีนทั้งสองชนิดเป็นชนิดวัคซีนเดี่ยวต้องฉีดแยกเข้มนกัน และต้องฉีดตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียเป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน (water in oil adjuvant, W/O) ใช้ MONTANIDE™ ISA 71 เป็นแอดจูแวนท์ ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้นาน แต่ MONTANIDE™ ISA 71 มีความหนืดสูง ทำให้เกิดความลำบากในการปฏิบัติการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อลึกและมีผลทำให้สัตว์มีการแพ้วัคซีน บวมอักเสบ หรือมีไข้ได้ง่าย ต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึก 1 ครั้งต่อปี ให้ความคุ้มโรค 15 เดือน ส่วนวัคซีนแบลคเลกเป็นชนิด formalinized whole cell จากเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ตกตะกอนด้วยอะลัม ใช้ฉีดได้ผิวหนัง มีขนาดฉีดตัวละ 5 มล. สำหรับโค กระบือ ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ให้ความคุ้มโรคเพียง 6 เดือน จึงต้องฉีด 2 ครั้งต่อปี ทำให้เป็นปัญหาต่อเกษตรกรที่ต้องเตรียมการฉีดวัคซีนแต่ละครั้งต้องมีการวางแผน เตรียมอุปกรณ์ การบริหารจัดการ เสียเวลา และแรงงานในการบังคับสัตว์ ทำให้การทำวัคซีนไม่ได้ประสิทธิภาพเท่าที่ควร ปัจจุบันวัคซีนแบลคเลกชนิดวัคซีนเดี่ยวที่ผลิตจำหน่ายในต่างประเทศส่วนใหญ่มีขนาดฉีดตัวละ 2 มล.^{1,2} และยังมีการผลิตวัคซีนรวมระหว่างวัคซีนแบลคเลกกับวัคซีนชนิดอื่นเช่น วัคซีนแบลคเลกรวมกับวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมีย³ วัคซีนรวมแบลคเลกกับแอนแทรกซ์⁴ และวัคซีนรวมโรคแบลคเลก ปากและเท้าเปื่อยและเฮโมราจิกเซพติซีเมีย⁵ เป็นต้น

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลก และการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (รัชนิและนิตยา, 2551) โดยเตรียมวัคซีนแบลคเลกชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม มีขนาดฉีดได้สละ 5 และ 2 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 2 ชุดให้ความคุ้มโรค 100% เมื่อทดลองเตรียมวัคซีนรวมแบลคเลก และเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม ให้มีขนาดฉีดได้สละ 3 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก (100%) และต่อเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (ค่า log protection มากกว่า 4) และจากการศึกษาการเตรียมวัคซีนแบลคเลกเข้มข้น (Shoshtary and Langroudi, 2007) ซึ่งเตรียมวัคซีนแบลคเลกที่มีความเข้มข้นมากขึ้น 2.5 เท่า โดยใช้ aluminum hydroxide gel เป็นแอดจูแวนท์ ผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในวัคซีนเท่ากับ 10% เมื่อทดสอบความคุ้มโรคในหนูตะเภา พบว่าให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก 100% และรายงานการเปรียบเทียบแอนติบอดีของแกะที่ฉีดวัคซีนรวมแบลคเลกและเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (Hanna *et al.*, 2014) ซึ่งใช้ aluminum hydroxide gel 25% เป็นแอดจูแวนท์ จากผลการตรวจ ELISA พบว่าให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก และเฮโมราจิกเซพติซีเมีย ในแกะได้นาน 180 วัน และผลการเปรียบเทียบวัคซีน Rift valley fever virus ที่ใช้ MONTANIDE™ ISA 201 VG, MONTANIDE™ ISA 61 VG และ aluminum hydroxide gel เป็นแอดจูแวนท์

¹ Blackleg vaccine®, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Iran

² Sponsvax®, Intervet, South Africa ³ Bovilis®HSBQ, Intervet, India

⁴ Blanthrax®, Intervet, South Africa ⁵ Raksha Triovac®, Indian Immunological Limited, India

(El-Bagoury *et al.*, 2015) พบว่า MONTANIDE™ ISA 201 VG และ MONTANIDE™ ISA 61 VG ให้ความคุ้มโรคนาน 12 เดือน ส่วน aluminum hydroxide gel ให้ความคุ้มโรคนาน 6 เดือน ส่วนผลระดับภูมิคุ้มกัน MONTANIDE™ ISA 201 VG มีระดับภูมิคุ้มกันสูงที่สุด

ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตวัคซีนแบบลดการรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซิเมีย โดยใช้ผลการศึกษาของวันชัย และวีรชาย (2549) ที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนต่อปริมาตรสูงขึ้น มาปรับปรุงกระบวนการผลิตในขั้นตอนการผสมวัคซีน (formulate) เป็นวัคซีนรวมแบบลดและเฮโมรายิกเซพติซิเมีย ซึ่งเป็นโครงการหนึ่งในยุทธศาสตร์เชิงพัฒนาของ สทช. กรมปศุสัตว์ เพื่อให้การผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ก้าวทันการพัฒนาวัคซีนที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และตอบสนองความต้องการของผู้ใช้วัคซีน ซึ่งข้อดีของการใช้วัคซีนรวมคือสามารถให้แอนติเจนได้มากกว่าสองชนิดในการฉีดเพียงหนึ่งครั้ง เพิ่มความสะดวกแก่เกษตรกรเพราะลดจำนวนครั้งในการฉีด ลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง เพิ่มความสามารถในการควบคุมป้องกันโรค (Hunderra *et al.*, 2018) โดยรวมแอนติเจนจากทั้งสองเชื้อ ผสมแอดจูแวนท์ที่เหมาะสม ปลอดภัย มีความหนืดต่ำ สะดวกในการฉีด ให้ภูมิคุ้มกันโรคที่ยาวนาน ฉีดเพียงครั้งเดียวต่อปี ทำให้ตารางแผนการฉีดวัคซีนชัดเจน ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะสูงขึ้น ป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ ปัญหาการดื้อยา ปัญหาขาดค้างให้เกษตรกรได้ ทำให้การเลี้ยงสัตว์เป็นอาชีพที่มั่นคง และยั่งยืน ผู้บริโภคได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปลอดภัย การปรับลดปริมาณฉีด มีผลดีต่อผู้ปฏิบัติงานหลายประการเช่น สะดวกในการฉีด ลดพื้นที่การจัดเก็บ

การเลือกแอดจูแวนท์เป็นกุญแจสำคัญที่ทำให้การทำวัคซีนในพื้นที่ประสบผลสำเร็จ (Parker *et al.*, 2009) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ต่างกัน ดังนั้นก่อนจะทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องศึกษาว่าการปรับเปลี่ยนวิธีการผลิต ความเข้มข้นของแอนติเจนที่สูงขึ้น และแอดจูแวนท์ที่เติมเข้าไป จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพวัคซีนด้วยหรือไม่ โดยเฉพาะด้านความปลอดภัย จึงทำการทดลองเตรียมวัคซีนรวมแบบลดและเฮโมรายิกเซพติซิเมีย ในระดับห้องปฏิบัติการขึ้นจำนวน 3 ตำรับ เพื่อให้ได้ข้อมูลวิธีการผลิต และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนโดยออกแบบการทดลองดังนี้ (ตารางที่ 1)

ตำรับที่ 1 เลือกใช้ MONTANIDE™ ISA 201 VG ซึ่งเป็นชนิดมัลติเฟสในน้ำมันในน้ำ (water in oil in water, W/O/W) เนื่องจากมีความหนืดต่ำกว่าชนิด W/O และมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral mediated immunity (HMI) ชนิดแอนติบอดี IgG₂ ได้ดี และให้ความคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยในโคสูง (Dar *et al.*, 2013)

ตำรับที่ 2 เลือกใช้ MONTANIDE™ ISA 61 VG ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O เช่นเดียวกับ MONTANIDE™ ISA 71 ที่ สทช. ใช้ผสมวัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซิเมียอยู่ในปัจจุบัน แต่มีความหนืดต่ำกว่า ใช้ปริมาณน้อยกว่า เนื่องจากอัตราส่วนในการผสมต่ำกว่า ไม่ต้องฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อลึก มีโอกาสการแพ้ต่ำกว่า และให้ความคุ้มโรคนานกว่าแอดจูแวนท์ชนิดอะลูมิเนียม เพราะมีส่วนประกอบหลักของน้ำมันแร่ (mineral oil) ทำให้แอนติเจนอยู่บริเวณที่ฉีดและค่อยๆ ปลดปล่อยแอนติเจนออกมา สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ HMI ชนิดแอนติบอดี IgG₂ ได้ดี และให้ความคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยในโคสูง (Dar *et al.*, 2013)

ส่วนตำรับที่ 3 เลือกใช้ aluminum hydroxide gel ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ที่ สทช. ใช้ผสมในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคในปัจจุบัน และมีรายงานผลการทดลองของ Hanna *et al.* (2014) ให้ความคุ้มโรคต่อแบบลด และต่อเฮโมรายิกเซพติซิเมีย ในแกะได้นาน 180 วัน

แล้วนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจผลิตในระดับต้นแบบ และระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

1. เชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 (Carter:Heddleston) สเตรนท้องถิ่นซึ่งเก็บในรูปแบบแห้ง
2. เชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ซึ่งเก็บในรูปแบบของสปอร์แห้ง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. อาหารเพาะเลี้ยง *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ประกอบด้วย tryptose phosphate broth (TPB) 29.5 กรัมต่อลิตร
2. อาหารเพาะเลี้ยง *Cl. chauvoei* ประกอบด้วย glucose 15 กรัมต่อลิตร, meat extract 3 กรัมต่อลิตร, TPB 29.5 กรัมต่อลิตร, L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร และ tryptose 2 กรัมต่อลิตร
3. Dextrose Starch Agar (DSA)
4. semi-synthetic broth ประกอบด้วย glucose 8 กรัมต่อลิตร, meat extract 2 กรัมต่อลิตร, TPB 29.5 กรัมต่อลิตร, L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร และ tryptose 3 กรัมต่อลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร
5. phosphate buffer saline (PBS) ประกอบด้วย โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 6.67 กรัมต่อลิตร, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3 กรัมต่อลิตร, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 85 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร
6. สเตบิลไลเซอร์ (Stabilizer) ประกอบด้วย enzymatic digest of casein 25 กรัมต่อลิตร, sucrose 50 กรัมต่อลิตร, sodium glutamate 10 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร
7. thioglycollate broth
8. tryptic soy broth
9. sabouraud dextrose broth
10. MONTANIDETM ISA 201 VG⁶
11. MONTANIDETM ISA 61 VG⁶
12. aluminum hydroxide gel

สัตว์ทดลอง

1. หนูตะเภา พันธุ์ Dunkin Hartley เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนัก 300-400 กรัม จำนวน 10 ตัว เพื่อใช้เตรียมเชื้อพิษ โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบคอกแบบ conventional ซึ่งไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อาคารถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟในกรงเหล็กกล่องขึ้นรูปผนังตาข่ายถัก ขนาด 90x120x50 ซม. จำนวนสัตว์ 5 ตัว/กรง ให้อาหารเม็ดกินเต็มที่ (ad libitum) และน้ำดื่มในภาชนะขวดมีจุลินทรีย์ตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ (Euthanasia) โดยการดึงคอ (cervical dislocation) (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา
2. หนูขาว พันธุ์ ICR เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนัก 20-25 กรัม จำนวน 1,155 ตัว โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบคอกแบบ conventional ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อาคารถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟเลี้ยงในกรงพื้นดิน ทำจากสแตนเลส กรงขนาด 38x68x12 ซม. จำนวนสัตว์ 20 ตัว/กรง ในการทดสอบความคุ้มโรคแบบลูกเล็ก และกรงขนาด 18x25x14 ซม. จำนวนสัตว์ 5 ตัว/กรง ในการทดสอบความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ใช้กลบเป็นวัสดุรองนอนโดยเปลี่ยนทุกวัน ให้อาหารเม็ดและน้ำดื่มในภาชนะขวดมีจุลินทรีย์ตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ โดยการดึงคอ (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา

⁶ Seppic, France

3. แกะ เพศผู้หรือเพศเมีย น้ำหนักไม่น้อยกว่า 20 กิโลกรัม จำนวน 18 ตัว โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบที่เรีย แบบ conventional ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติ และหลอดไฟ เลี้ยงในคอก พื้นซีเมนต์ ขนาด 4X8 เมตร จำนวนสัตว์ 9 ตัว/คอก ให้อาหารเม็ด หญ้าแห้งและน้ำดื่มตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ โดยการฉีด xylazine HCl ขนาด 0.15 มล. /10 กก. เข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพก และ magnesium sulfate ขนาด 120 มล. /ตัว. เข้าเส้นเลือด jugular vein (AVMA, 2020) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา

บรอตแบคทีเรียนำไปใช้ในการผสมวัคซีน

1. บรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะเลี้ยงใน TPB และฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% โดยปริมาตร กรองด้วย crossflow filtration ขนาด 0.2 ไมครอนและ resuspend ในน้ำเกลือที่มี 0.5% ฟอร์มาลิน ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 2×10^{10} CFU/โดส (Chandrasekaran et al., 1993)
2. บรอตแบคทีเรียของเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น เพาะเลี้ยงในแอสไพเรเตอร์ ขนาด 12 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ *Cl. chauvoei* ปริมาตร 8 ลิตร นาน 19 ชั่วโมงและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% โดยปริมาตร (วันชัยและวีรชัย, 2549) นับจำนวนเชื้อทางอ้อมจากค่า Packed cell volume (PCV) ตามวิธีของ Alton et al. (1988) โดยใส่บรอตแบคทีเรีย 10 มล. ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงที่มีสเกลบอกปริมาตร ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง $2,500 \times g$ นาน 75 นาที และวัดปริมาตรของตะกอน นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณเตรียมวัคซีนให้มีจำนวนเชื้อเป็นค่า %PCV จากเดิมที่ปริมาตรฉีด 5 มล./โดส มี %PCV ไม่น้อยกว่า 0.26 (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543) ซึ่งเท่ากับ 6.5×10^8 CFU/โดส (5 มล.) (รังสรรค์ และวิวัฒน์, 2549) เป็น 6.5×10^8 CFU/โดส (2 มล.)

วัคซีน

นำบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 และบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ที่เตรียมได้มาผสมเป็นวัคซีนรวมแบคคิลและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ที่มีเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 จำนวน 2×10^{10} CFU/โดส (2 มล.) และเชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น จำนวน 6.5×10^8 CFU/โดส (2 มล.) จำนวน 3 ตำรับ ดังนี้

วัคซีนตำรับที่ 1

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O/W โดยนำบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* และ *Cl. chauvoei* ที่เตรียมได้ มาผสมกับ MONTANIDE™ ISA 201 VG ในอัตราส่วน บรอตแบคทีเรีย:แอดจูแวนท์ เท่ากับ 50:50 (w/w) โดยเริ่มจากปรับอุณหภูมิบรอตแบคทีเรียและแอดจูแวนท์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 31°C ก่อนแล้วนำแอดจูแวนท์มาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน (low shear mixer) ที่ความเร็วรอบ 350 รอบ/นาที นาน 30 วินาที แล้วจึงเติมบรอตแบคทีเรียลงในแอดจูแวนท์อย่างรวดเร็ว ปั่นที่ความเร็วรอบ 350 รอบ/นาที ต่ออีก 5 นาที ให้วัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับอุณหภูมิวัคซีนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 20°C (ภาพที่ 1) แล้วจึงปรับ pH ด้วย 10% NaOH ให้ได้ 7.0 ± 0.3 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 20 มล. (10 โดส = 20 มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับที่ 2

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O โดยนำบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* และ *Cl. chauvoei* ที่เตรียมได้ มาผสมกับ MONTANIDE™ ISA 61 VG ในอัตราส่วน 40:60 (w/w) โดยทำการผสมตามวิธีของ Moncada et al. (1993) ด้วยกระบอกฉีดขนาด 20 มล. 2 กระบอก เข็มชนิด 2 หัว เบอร์ 18G x 1.5 นิ้ว ดูดผสมกลับป้อนกลับมานาน 5 นาที จนวัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 2) แล้วจึงปรับ pH เช่นเดียวกับตำรับที่

วัคซีนตำรับที่ 3

เตรียมเป็นวัคซีนชนิดเอควีเอส โดยนำบรอกแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* และ *Cl. chauvoei* ที่เตรียมได้ มาผสมกับ aluminum hydroxide gel ในอัตราส่วน 90:10 (v/v) โดยทำการผสมด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 30 นาที (ภาพที่ 3) จนวัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงปรับ pH เช่นเดียวกับตำรับที่ 1

การเตรียมเชื้อพิษโรคแบคทีเรียในหนูตะเภา

การเตรียมเชื้อพิษ

ละลาย Seed *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ด้วย semi-synthetic broth ขวดละ 1 มล.เจือจางแบบ 10-fold dilution ให้ได้ 10^{-1} นำเชื้อ undilute และ 10^{-1} ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหนูตะเภา (ภาพที่ 4) ตัวละ 1 มล. ความเข้มข้นละ 5 ตัว หนูจะแสดงอาการป่วย ภายใน 24-48 ชั่วโมง เก็บเลือดจากหัวใจ 1 มล. ไปเพาะใน semi-synthetic broth หลอดละ 10 มล. จำนวน 5 หลอด โดยใช้ liquid paraffin ปิดผิวอาหารไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง คูดเชื้อทั้งหมดจากหลอดไปเลี้ยงต่อใน semi-synthetic broth 100 มล. ในขวดแก้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง คูดเชื้อ 5 มล. ไปเลี้ยงต่อใน semi-synthetic broth 500 มล.จำนวน 10 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองก๊าซ สุ่มตัวอย่างเชื้อมา ย้อมแกรมดูลักษณะสปอร์ (ภาพที่ 5) นำเชื้อทั้ง 10 ฟลาสก์ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง⁷ ที่ $3,100 \times g$ นาน 90 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 รอบ เติมนิโคตอิลไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 2 เท่าของตะกอนเชื้อ ปั่นด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) บรรจุลงขวดทำแห้งขนาด 12 มล. ปริมาตรขวดละ 2 มล.นำเข้าเครื่องทำแห้ง⁸

การหาปริมาณ และ 50% Lethal dose (LD₅₀) ของเชื้อพิษ

นำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแล้วไปหาปริมาณเชื้อ และหา LD₅₀ โดยฉีดเชื้อ undilute, 10^{-1} และ 10^{-2} ตัวละ 0.2 มล. ความเข้มข้นละ 10 ตัว เข้ากล้ามเนื้อขาหลังหนูขาว นำจำนวนหนูที่ตาย ไปคำนวณค่า LD₅₀ ในช่วง 10-100 LD₅₀ (Misra,1991)

การเตรียมเชื้อพิษโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมีย

ละลาย seed *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ด้วย TPB ปริมาตร 2 มล. จากนั้นคูดสารละลาย seed หยดลงบน DSA และ streak เชื้อเพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ใช้ Loop เชี่ยโคโลนีเดี่ยวๆ (ภาพที่ 6) จำนวน 2 โคโลนี จุ่มลงใน TPB ปริมาตร 10 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชั่วโมง ทำ 10-fold dilution (ภาพที่ 7) โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อ ปริมาตร 1 มล. ใส่หลอดที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน จนถึง 10^{-10} นำไปฉีดในสัตว์ทดลองหาปริมาณเชื้อที่ฉีดในสัตว์ทดลองโดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่ 10^{-5} , 10^{-6} และ 10^{-7} ตามลำดับ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน DSA dilution ละ 3 ซ้ำอ่านค่าจาก dilution ที่เหมาะสมคำนวณเป็นโคโลนีต่อมล. (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562)

การทดสอบความเป็นกรด-ด่างของวัคซีน

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตำรับละ 5 ตัวอย่าง เกณฑ์ยอมรับได้คือ 7.0 ± 0.3 (Misra, 1991)

การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย ตำรับละ 3 ตัวอย่างโดยใช้เข็มวัดค่าจากตัวเครื่อง เบอร์ 1 ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises (McKercher, 1986)

⁷ Mistral, U.K.

⁸ Telstar, Spain

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดตัวอย่างใส่ลงในหลอดเซนต์ปีแยร์ที่มีซีตบอกริมาตร ปริมาตร 10 มล. ปิดฝาหลอด ตัวอย่างละ 2 หลอด ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% (McKercher, 1986)

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย (Sterility test)

ทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีนก่อนและหลังการบรรจุ โดยเฉพาะวัคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ thioglycollate broth, tryptic soy broth อบที่ 37°C และเพาะใน thioglycollate broth, tryptic soy broth และ sabouraud dextrose broth อบที่ 22°C เป็นเวลา 14 วัน จะต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นและเชื้อรา (ASEAN, 1998)

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน (Safety test)

ทดสอบวัคซีนแต่ละตำรับโดยฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังแกะ (ภาพที่ 8) ตัวละ 2 เท่าของโดสที่กำหนด จำนวน 3 ตัว/ตำรับ วัดอุณหภูมิร่างกายเข้า-เย็น และสังเกตอาการ 10 วัน เกณฑ์ยอมรับได้คือ แกะมีอาการปกติ ยกเว้นอาจมีอาการบวมบ้างบริเวณที่ฉีด ซึ่งจะหายไป 4-5 วัน (ASEAN, 1998)

ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว โดยฉีดวัคซีนแต่ละตำรับเข้าช่องท้องหนู 5 ตัวๆ ละ 0.5 มล. (ภาพที่ 9) สังเกตอาการ 2 สัปดาห์ ต้องไม่พบอาการผิดปกติ ในกรณีที่มีหนูป่วยและตายต้องตรวจพิสูจน์การติดเชื้อ *P. multocida* (ASEAN, 1998)

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (Potency test)

ทดสอบความคุ้มโรคแบบลดเลขของวัคซีนแต่ละตำรับโดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 20 ตัว และกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดวัคซีน จำนวน 20 ตัว ใช้กระบอกฉีดยาทิวเบอร์คูลินขนาด 1 มล. เข็มเบอร์ 26G x 0.5 นิ้ว ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง 4 ครั้งๆ ละ 0.25 มล. แต่ละครั้งห่างกัน 2 วัน หลังเข็มสุดท้าย 10 วัน จึงฉีดพิษตับ *Cl. chauvoei* ที่ผสม 3% CaCl_2 ความรุนแรง 10-100 LD₅₀ ปริมาตร 0.25 มล. เข้ากล้ามเนื้อขา (ภาพที่ 10) หลังฉีดพิษตับ 7 วัน หนูขาวกลุ่มฉีดวัคซีนจะต้องรอดไม่น้อยกว่า 60% ส่วนกลุ่มควบคุมต้องตายไม่น้อยกว่า 80% (ASEAN, 1998)

ทดสอบความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว ด้วยวิธี active mouse protection test โดยใช้หนูขาว 100 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ฉีดวัคซีนจำนวน 50 ตัว กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนจำนวน 50 ตัว ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง ตัวละ 0.2 มล. 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 14 วัน หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 7 วัน ทำการฉีดพิษตับหนูทั้ง 2 กลุ่มด้วยเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะเลี้ยงใน TPB นาน 6 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-10} เข้าช่องท้องของหนูตัวละ 0.1 มล. ทั้ง 2 กลุ่ม (ภาพที่ 11) ค่า LD₅₀ ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดวัคซีนตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ต้องไม่น้อยกว่า (at least) 4 log protection (ASEAN, 1998)

การทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Accelerated stability test)

โดยการเก็บตัวอย่างวัคซีนทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ (OIE, 2012) แล้วนำมาทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรค

ผล

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย 3 ตำรับ ในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตำรับละ 5 ตัวอย่าง พบว่าตำรับที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ย 6.95 ± 0.0080 ตำรับที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ย 7.01 ± 0.0049 และตำรับที่ 3 ได้ค่าเฉลี่ย 6.78 ± 0.0133 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบความหนืดของวัคซีนชนิดน้ำมันตำรับละ 3 ตัวอย่าง พบว่าตำรับที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ย 14.67 ± 0.4714 centipoises และตำรับที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ย 20.33 ± 0.4714 centipoises ผลการทดสอบความคงตัวของ

วัคซีนชนิดน้ำมัน ตำรับละ 2 ตัวอย่าง พบว่าการแยกชั้นตำรับที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ย $1.05 \pm 0.0500\%$ ส่วนตำรับที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ย $2.05 \pm 0.0500\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบความปลอดภัยในหนูขาวและแกะ อาการปกติ ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย ผลการวัดค่าอุณหภูมิร่างกายของแกะทดลองทั้ง 9 ตัว ในวัคซีนตำรับที่ 1 (แกะตัวที่ 1-3) พบว่าแกะแสดงอุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าปกติ ในวันที่ 6-8 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 9 (รูปที่ 12) ตำรับที่ 2 (แกะตัวที่ 4-6) พบว่าแกะแสดงอุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าปกติ ในวันที่ 2-8 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 9 (รูปที่ 13) และ ตำรับที่ 3 (แกะตัวที่ 7-9) พบว่าแกะแสดงอุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าปกติ ในวันที่ 4-6 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 7 (รูปที่ 14)

เมื่อผ่าซากแกะดูเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนตำรับที่ 1, 2 และ 3 ไม่พบลักษณะผิดปกติบริเวณที่ได้รับวัคซีน เช่น post vaccination granuloma หรือ ฝี (abscess) ในแกะทดลองทั้ง 9 ตัว (รูปที่ 15-17)

ผลการทดสอบความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาวพบว่ามีความคุ้มโรค 100% ทั้ง 3 ตำรับ (รูปที่ 18) ความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียในหนูขาว พบว่ามีค่า log protection เท่ากับ 6.182, 5.500 และ 4.334 ตามลำดับ (รูปที่ 19)

การทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Accelerated stability test) พบว่าให้ความปลอดภัยในแกะ และหนูขาวโดยไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย และความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว พบว่ามีความคุ้มโรค 100% ทั้ง 3 ตำรับ (รูปที่ 18) ความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียในหนูขาว พบว่ามีค่า log protection เท่ากับ 6.182, 5.500 และ 4.334 ตามลำดับ (รูปที่ 19)

วิจารณ์

จากผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมราจิกเซพติซีเมีย 3 ตำรับ ในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีความเป็นกลาง เหมาะสมที่จะฉีดเข้าร่างกายสัตว์ โดยไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อ เมื่อพิจารณาความหนืด ตำรับที่ 1 จะสะดวกในการฉีดมากกว่าตำรับที่ 2 เพราะมีความหนืดน้อยกว่าเนื่องจาก MONTANIDE™ ISA 201 VG ที่เป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O/W มีความหนืดน้อยกว่า MONTANIDE™ ISA 61 VG ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O การทดสอบความคงตัว ผ่านทั้งตำรับที่ 1 และ 2 การที่ตำรับที่ 2 มีการแยกชั้นสูงกว่าเนื่องจากอัตราส่วนของ บรอตแบคทีเรีย: แอดจูแวนท์สูงกว่า และ MONTANIDE™ ISA 61 VG มีความถ่วงจำเพาะสูงกว่า MONTANIDE™ ISA 201 VG

วัคซีนทั้ง 3 ตำรับ มีความปลอดภัยในหนูขาวและแกะ สามารถนำไปใช้งานจริงกับสัตว์เป้าหมายได้ โดยผลการวัดค่าอุณหภูมิร่างกายของแกะทดลองในตำรับที่ 2 อุณหภูมิสูงกว่าปกติมากกว่าและนานกว่าตำรับที่ 1 และ 3 แสดงว่า MONTANIDE™ ISA 61 VG มีผลกระทบต่อร่างกายสัตว์ (side effect) สูงกว่า MONTANIDE™ ISA 201 VG และ aluminum hydroxide gel ส่วนตำรับที่ 1 และ 3 อุณหภูมิสูงกว่าปกติเพียงเล็กน้อย และนานเพียง 3 วัน แสดงว่า MONTANIDE™ ISA 201 VG มีผลกระทบต่อร่างกายสัตว์น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาด้านอัตราส่วน บรอตแบคทีเรีย: แอดจูแวนท์ ที่ใช้มากกว่า โดย aluminum hydroxide gel ใช้เพียง 10% แต่มีผลกระทบใกล้เคียง MONTANIDE™ ISA 201 VG ซึ่งใช้ 50%

เมื่อผ่าซากแกะดูเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนทั้ง 3 ตำรับ ไม่พบลักษณะผิดปกติบริเวณที่ได้รับวัคซีน เช่น post vaccination granuloma หรือ ฝี (abscess) แสดงว่าความเข้มข้นของแอนติเจนที่มากกว่าเดิม และแอดจูแวนท์ทั้ง 3 ชนิด สามารถกระจายตัวในเนื้อเยื่อได้ดี ไม่ก่อให้เกิดเนื้อตาย และแอดจูแวนท์ทั้ง 3 ชนิด มีความปลอดภัยในแกะสามารถนำไปใช้งานจริงกับสัตว์เป้าหมายได้

ผลการทดสอบความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว ผ่านเกณฑ์ทั้ง 3 ตัวรับ ส่วนความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียในหนูขาว มีค่าไม่น้อยกว่า 4 log protection ผ่านเกณฑ์ทั้ง 3 ตัวรับ ให้ผลสอดคล้องกับรายงานการศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบคทีเรีย และการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (รัชนีและนิตยา, 2551) และรายงานการทดลองผลิตวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมราจิกเซพติซีเมียที่ใช้ aluminum hydroxide gel 25% เป็นแอดจูแวนท์ ของ Hanna *et al.* (2014) ส่วนการที่ตัวรับที่ 1 ให้ความคุ้มโรคสูงที่สุด รองลงมาเป็นตัวรับที่ 2 และ 3 ตามลำดับ แสดงว่า MONTANIDETM ISA 201 VG สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่า MONTANIDETM ISA 61 VG และ aluminum hydroxide gel ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ El-Bagoury *et al.* (2015)

การทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 สัปดาห์ ยังคงมีความปลอดภัยในแกะและหนูขาว ในด้านความคุ้มโรคแบคทีเรียในหนูขาว ยังคงมีความคุ้มโรคทั้ง 3 ตัวรับ ความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียในหนูขาว ยังคงมีค่าไม่น้อยกว่า 4 log protection ผ่านเกณฑ์ทั้ง 3 ตัวรับ แสดงว่าวัคซีนยังมีความคงสภาพ ในความปลอดภัย และความคุ้มโรค สามารถนำไปอ้างอิงอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นาน 2 ปี แต่ควรมีการทดสอบความคงสภาพแบบปกติเพิ่มเติม เมื่อทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว

ในด้านการใช้งานวัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมราจิกเซพติซีเมีย ได้รวมแอนติเจนของ *Cl. chauvoei* และ *P. multocida* ไว้ในการฉีดเพียงหนึ่งครั้ง จากที่ต้องฉีดถึง 3 ครั้งต่อปี ลดลงเหลือฉีดเพียง 1 ครั้งต่อปี ช่วยลดภาระของเกษตรกรในการเตรียมการฉีดวัคซีนแต่ละครั้งที่ต้องมีการวางแผน เตรียมอุปกรณ์ การบริหารจัดการ เสียเวลา และแรงงานในการบังคับสัตว์ นอกจากนี้ยังได้ปรับลดปริมาณฉีดต่อโดสของวัคซีนแบคทีเรีย จากปริมาณฉีดต่อโดส 5 มล. และวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียปริมาณฉีดต่อโดส 1 มล. รวมฉีด 6 มล./ครั้ง ลดเป็น 2 มล. สำหรับโค กระบือ และ 1 มล. สำหรับแพะแกะ ให้ความสะดวกในการฉีดเพิ่มขึ้น คาดว่าเกษตรกรจะมีการใช้วัคซีนเพิ่มขึ้น ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ ปัญหาการดื้อยา ปัญหาหยดค้างให้เกษตรกรได้ ทำให้การเลี้ยงสัตว์เป็นอาชีพที่มั่นคง และยั่งยืน ผู้บริโภคได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และปลอดภัยจากยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์

อย่างไรก็ตามการตัดสินใจเลือกชนิดของแอดจูแวนท์ที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม นอกจากพิจารณา ด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพความคุ้มโรคแล้ว ยังต้องคำนึงถึงกระบวนการในขั้นตอนการผลิตที่มีความแตกต่างกันด้วย จึงต้องมีการออกแบบการทดลองผลิตในระดับต้นแบบก่อน เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของอุปกรณ์ และเครื่องจักรในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สรุป

วัคซีนรวมแบคทีเรียและเฮโมราจิกเซพติซีเมีย 3 ตัวรับ มีประสิทธิภาพตามมาตรฐานสากล สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการผลิตในระดับต้นแบบ และพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ตามวัตถุประสงค์ โดยมีความคุ้มโรคแบคทีเรียเท่ากันทั้ง 3 ตัวรับ ส่วนความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมีย ตัวรับที่ 1 สูงที่สุด รองลงมาเป็นตัวรับที่ 2 และตัวรับที่ 3 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ 2543 วัคซีนแบคทีเรีย ในคู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 18
รังสรรค์ รักษากุลวิทยา และวิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา 2549 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ ความขุ่น น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ PCV ในแบคทีเรียบรอทแบคทีเรีย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(1): 37-44

- รัชนี อรรถิ และ นิตยา รักศรี 2551 ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบคทีเรียและการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 18(1-2): 35-42
- วันชัย ตีระจวรรณ และวีรชัย ปุ่สูงเนิน 2549 การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบคทีเรียในเฟอร์เมนเตอร์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(2): 71-79
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562 เรื่องการเตรียมเชื้อพิษสำหรับการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-030) หน้า 1-4
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2020. The AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Schaumburg, American. pp. 60-70.
- ASEAN, 1998. ASEAN standard requirements for blackleg bacterin. In Manual of ASEAN standards for animal vaccines. Livestock publication series no, 2A, 2nd edition, ASEAN Secretariat, Jakarta, Indonesia. pp. 71-72.
- Alton, G. G., Jones L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M. 1988. Packed cell volume method in graduated tubes. In Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA, Paris, France. pp. 63-71.
- Chandrasekaran, S., Kennett, L., Muniandy, N., Rani, B. and Mukkur, T.K.S. 1993. Relationship between active protection in buffalo vaccinated against hemorrhagic septicemia and passive mouse protection and serological test. In B.E. Pattern, T.L. Spencer, R. B. Johnson, D. Hoffman, and L. Lehane, eds, ACIAR Proceedings No. 43. pp 215-218
- Dar, Pervaiz, Ramya Kalaivanan, Nuru Sied, Bedaso Mamo, Subodh Kishore, V. V.S. Suryanarayana, and Ganesh Kondabattula. 2013. "Montanide ISATM 201 Adjuvanted FMD Vaccine Induces Improved Immune Responses and Protection in Cattle." Vaccine. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.078>.
- De Alwis, M.C.L., 1999. In Hemorrhagic septicemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Centre for International Agriculture Research, Canberra, Australia. p. 63.
- El-Bagoury, Gabr, Saad Sharawi, Lily Salama, and Marwa Hammad. 2015. "Comparative Evaluation of Different Inactivated Rift Valley Fever Virus Vaccine Adjuvanted with Montanide Oil ISA 61 VG, Montanide Oil ISA 201 VG, and Aluminum Hydroxide Gel." Benha Veterinary Medical Journal 29 (1): 224-228.
- Hanna, Tarek N., Abdelfattah M. Selim, Mohamed H. Ebeid, Faysal K. Houmda, Alaa A. Elmeineisy, and Susan F. Gorgy. 2014. "Comparative Evaluation of Antibody Response in Sheep Vaccinated by Bivalent Clostridial and Pasteurella Combined Vaccine." Benha Veterinary Medical Journal 27: 309-316.
- Hunderra, Sori, Jemberie Shiferaw, Yami Martha, Shuka Jalata, Abebe Birhanu, and Birhanu Kenaw. 2018. "Evaluation of Safety and Immunogenicity of Combined Blackleg and Hemorrhagic Septicemia Vaccine." African Journal of Microbiology Research 12 (6): 141-146.
- Lukášová, Jindra, and A. Šustáčková. 2003. "Enterococci and Antibiotic Resistance." Acta Veterinaria Brno 72 (2): 315-23.
- Maslog, F. S. 1998. "Immunity Provided by Haemorrhagic Septicaemia-Subunit Vaccine in Ruminants." Developments in Biological Standardization.

- McKercher, P.D. 1986 Oil Adjuvant. Their use in Veterinary biologics. Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics, Iowa Univ. Press. p.115-119.
- Misra, R. P. 1991. Production of blackleg vaccine. In Manual for production of Anthrax and Blackleg vaccine, FAO animal production and health paper 87. FAO, Rome, Italy. pp. 85-93.
- Moncada, C., Torres, V. and Israel, Y. 1993. Simple method for the preparation of antigen emulsions for immunization. Journal of immunological methods. 162: 133-140.
- Office International des Epizooties. 2012. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals, 7th edition. OIE. Paris, France. p.58.
- Parker, R., S. Deville, L. Dupuis, F. Bertrand, and J. Aucouturier. 2009. "Adjuvant Formulation for Veterinary Vaccines: MontanideTM Gel Safety Profile." Procedia in Vaccinology 1 (1): 140–147.
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- Shoshtary, Mossawi, and Pilehchian Langroudi. 2007. "Preparation of Concentrated Blackleg Vaccine." Archives of Razi Institute 62 (3): 165–169.
- WHO, (World Health Organization). 2017. Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One Health Approach. Who. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255747/9789241512411_eng.pdf;jsessionid=1710DEAA0E355CBCB99450559C0DD0C8?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255747/1/9789241512411-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของวัคซีนรวมแบคทีเรีย และเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ใช้แอดจูแวนต์ต่างกัน

ส่วนประกอบ	ตำรับที่		
	1	2	3
แอนติเจน	<i>P. multocida</i> ซีโรไทป์ B:2,5 จำนวน 2×10^{10} CFU/โดส และเชื้อ <i>Cl. chauvoei</i> สเตรนท้องถิ่น จำนวน 6.5×10^8 CFU/โดส (2 มล.)		
แอดจูแวนต์	MONTANIDE™ ISA 201 VG	MONTANIDE™ ISA 61 VG	aluminum hydroxide gel
ชนิดของแอดจูแวนต์	water in oil in water	water in oil	aqueous
อัตราส่วน บรอฟแบคทีเรีย: แอดจูแวนต์	50:50	40:60	90:10
ความหนืดที่ 25°C (mPa.s)	30	35	-

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมแบคทีเรีย และเฮโมรายิกเซพติซีเมียในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบ	ตำรับที่		
	1	2	3
1. ความเป็นกรด-ด่างของวัคซีน*	6.95±0.0080	7.01±0.0049	6.78±0.0133
2. Sterility test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
3. Viscosity test** (centipoises)	14.67±0.4714	20.33±0.4714	ไม่ทดสอบ
4. Stability test** (%)	1.05±0.0500	2.05±0.0500	ไม่ทดสอบ

หมายเหตุ *ค่าความเป็นกรด-ด่างของวัคซีนอยู่ในช่วง 7.0 ± 0.3 ถือว่าผ่าน
 **การทดสอบรายการที่ 3-4 เป็นการทดสอบคุณภาพวัคซีนชนิดน้ำมัน

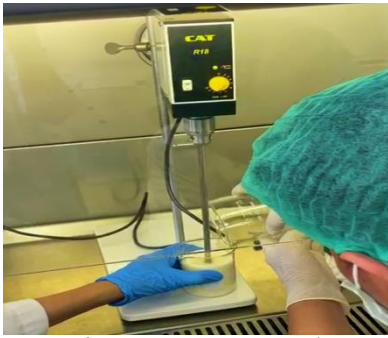
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมแบคทีเรีย และเฮโมรายิกเซพติซีเมียในสัตว์ทดลอง

การทดสอบ	ตำรับที่		
	1	2	3
ความปลอดภัยของวัคซีน			
แบคทีเรียในแกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
เฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
ความคุ้มโรค			
แบคทีเรียในหนูขาว			
- กลุ่มฉีดวัคซีนคุ้มโรค [*]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)
- กลุ่มควบคุม ^{**} (ใช้ร่วมกัน)		80% (16/20)	
เฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว ^{***}	6.182	5.500	4.334
(log protection)			
ความคงสภาพแบบเร่ง			
ความปลอดภัย			
แบคทีเรียในแกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
เฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
ความคุ้มโรค			
แบคทีเรียในหนูขาว			
- กลุ่มฉีดวัคซีนคุ้มโรค [*]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)
- กลุ่มควบคุม ^{**} (ใช้ร่วมกัน)		80% (16/20)	
เฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว ^{***}	6.182	5.500	4.334
(log protection)			

* มากกว่า 60% ถือว่าคุ้มโรค

** กลุ่มควบคุมต้องตายไม่น้อยกว่า 80%

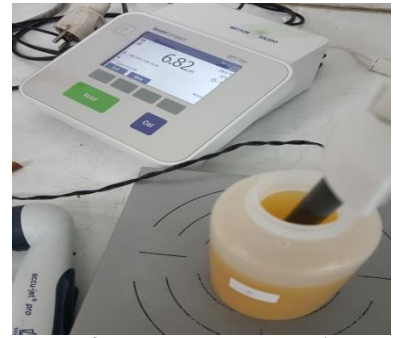
*** อย่างน้อย 4 ถือว่าคุ้มโรค



รูปที่ 1 เตรียมวัคซีนตัวรับที่ 1



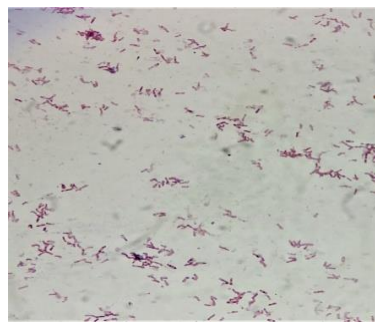
รูปที่ 2 เตรียมวัคซีนตัวรับที่ 2



รูปที่ 3 เตรียมวัคซีนตัวรับที่ 3



รูปที่ 4 การเตรียมเชื้อพิษโรคแบลคเลก



รูปที่ 5 สปอร์ *Cl. chauvoei*



รูปที่ 6 โคโลนี *P. multocida*



รูปที่ 7 การเตรียมเชื้อพิษ *P. multocida*



รูปที่ 8 ทดสอบความปลอดภัยของ
วัคซีนแบลคเลกในแกะ



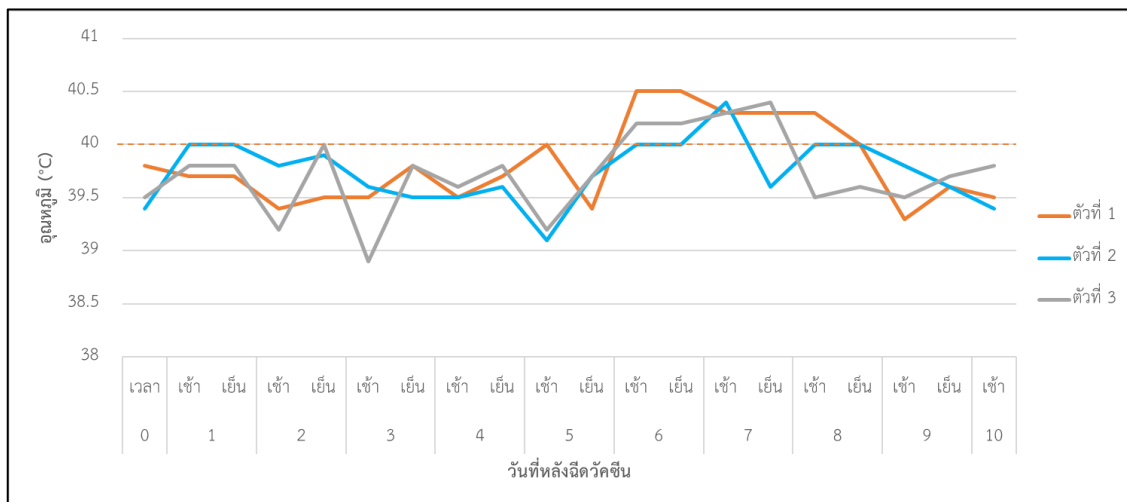
รูปที่ 9 ทดสอบความปลอดภัยของ
วัคซีนเอมร่ายิกเซพติซีเมียในหนูขาว



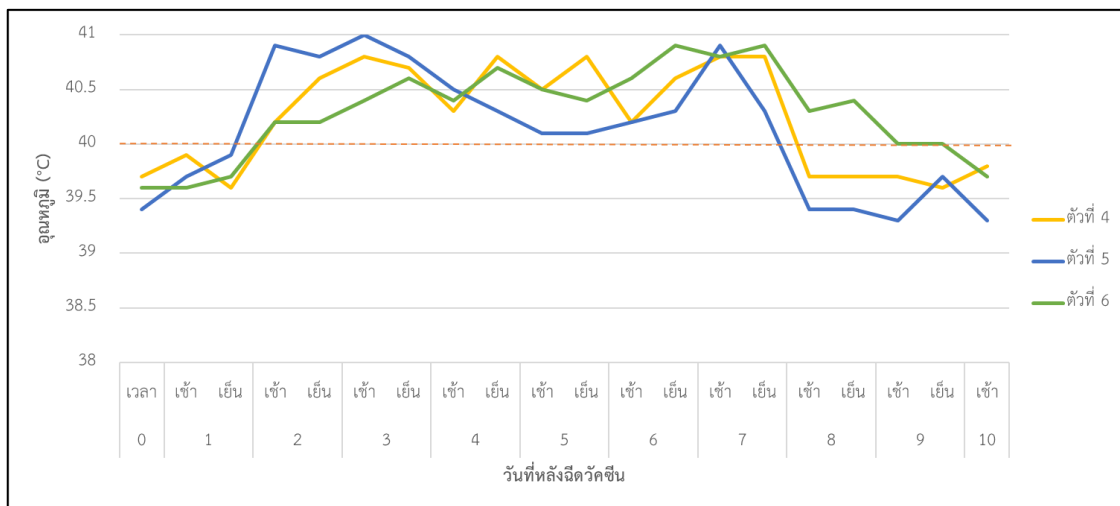
รูปที่ 10 ฉีดพิษด้วยเชื้อ *Cl. chauvoei*



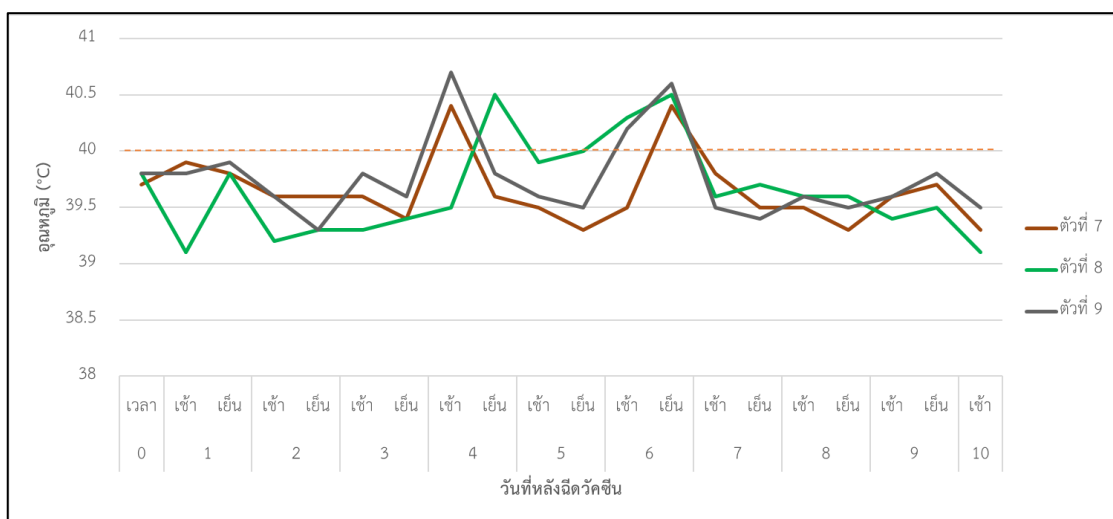
รูปที่ 11 ฉีดพิษด้วยเชื้อ *P. multocida*



รูปที่ 12 อุณหภูมิแกทตลอด วัคซีนดำรับที่ 1



รูปที่ 13 อุณหภูมิแกทตลอด วัคซีนดำรับที่ 2



รูปที่ 14 อุณหภูมิแกทตลอด วัคซีนดำรับที่ 3



แกะตัวที่ 1



แกะตัวที่ 2



แกะตัวที่ 3

รูปที่ 15 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีน ตัวรับที่ 1



แกะตัวที่ 4



แกะตัวที่ 5



แกะตัวที่ 6

รูปที่ 16 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีน ตัวรับที่ 2



แกะตัวที่ 7

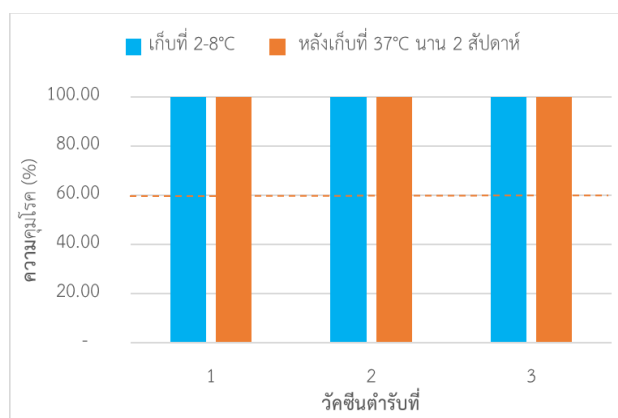


แกะตัวที่ 8

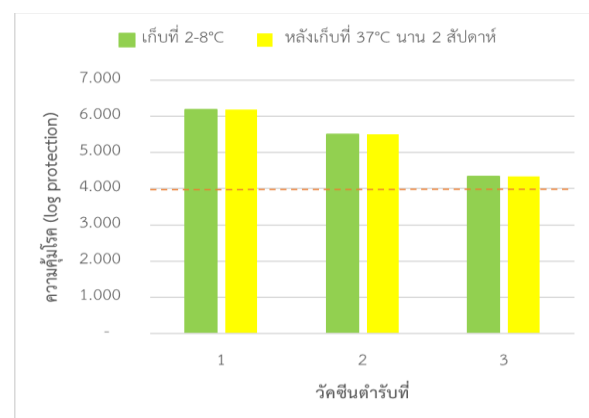


แกะตัวที่ 9

รูปที่ 17 เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีน ตัวรับที่ 3



รูปที่ 18 ความคุ้มโรคแบคทีเรีย



รูปที่ 19 ความคุ้มโรคเฮโมราจิกเซฟติซีเมีย

Comparison efficacy of combined blackleg and hemorrhagic septicemia vaccine using different adjuvant

Anan Thaopech¹Khemchomphu Atikanyapak¹Ditee Prasertsuwan¹

Abstract

This study aimed to compare the efficacy of combined blackleg and hemorrhagic septicemia vaccine using different adjuvant. Combined blackleg and hemorrhagic septicemia vaccine were prepared using MONTANIDE™ ISA 201 VG, MONTANIDE™ ISA 61 VG and aluminum hydroxide gel as adjuvants. Three formulations vaccine were tested for quality according to the ASEAN standard.

The determination of pH showed the value at 6.95 ± 0.0080 , 7.01 ± 0.0049 and 6.78 ± 0.0133 , respectively. The sterility test showed the absence of bacteria and fungi. Safety test in sheep and mice showed no untoward reaction. Potency test in mice for blackleg showed 100%, 100% and 100% protection challenge against *Cl. chauvoei* virulence, respectively. The potency test in mice for hemorrhagic septicemia showed 6.182, 5.500 and 4.334 log protection against *P. multocida* virulence challenge, respectively. Accelerated stability test after incubation 37°C for 2 weeks in sheep and mice showed no untoward reaction. Potency test for blackleg showed same 100% protection. While potency test for hemorrhagic septicemia showed 6.182, 5.500 and 4.334 log protection, respectively.

In conclusion, three formulations vaccine were effectively produced for laboratory scale according to the ASEAN standard and can be developed to reproduce in the pilot scale. Comparative evaluation of the potency test in mice for blackleg showed same 100% protection. Potency test in mice for hemorrhagic septicemia showed formulation 1 induced the highest immunity followed by formulation 2 and 3, respectively.

Keywords: Combined vaccine, Blackleg, Hemorrhagic septicemia, Adjuvant

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

เปรียบเทียบความไวของเซลล์ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line และเซลล์ปฐมภูมิจากไตแกะ primary lamb kidney cell สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

วิไล ลินจงสุขงกช¹กานต์รวี ชวนพัฒน์²จรรยา สมานิต²ชาลีณี ดีแปลง²

บทคัดย่อ

ทำการเปรียบเทียบความไวของเซลล์ 2 ชนิดที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease virus isolation) ได้แก่ ZZ-R 127 cell line มีต้นกำเนิดจากเซลล์ fetal goat tongue และเซลล์ primary lamb kidney ซึ่งเป็นเซลล์ปฐมภูมิเตรียมจากไตแกะ อ่านผลการเปลี่ยนแปลงทาง cytopathic effect (CPE) ของเซลล์และตรวจยืนยันการจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี ELISA typing ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ ZZ-R 127 และ primary lamb kidney ให้ผลบวกโดย virus isolation และ ELISA typing เท่ากับ 65.9% (56/85) และ 50.6% (43/85) ตามลำดับ และให้ผลลบต่อ virus isolation และ ELISA typing เท่ากับ 34.1% (29/85) และ 49.4% (42/85) ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าเซลล์ ZZ-R 127 ให้ความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดีกว่าเซลล์ primary lamb kidney การศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ ZZ-R 127 ให้ข้อดีหลายประการ เช่น เกิดเซลล์ CPE รวดเร็วและรุนแรงภายใน 24 ชั่วโมง ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายน้อยในการเตรียมเซลล์ สะดวกและง่ายต่อการเพาะเลี้ยงได้ยาวนานใน passage สูงๆ ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้เซลล์ ZZ-R 127 ในการเพิ่มปริมาณไวรัสจากตัวอย่างพื้นที่และสามารถนำมาใช้ทดแทน primary lamb kidney cell ได้

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เซลล์แซท แซท อาร์ 127 เซลล์ปฐมภูมิจากไตแกะ

¹ ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

² ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดสัตว์ที่ร้ายแรง ติดต่อง่าย และแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว เกิดขึ้นในสัตว์กบคู่ทุกชนิดได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร ช้าง อูฐ กวาง กระต่าย เป็นต้นและสัตว์กบคู่อื่นๆ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์อย่างมหาศาล ทำให้ไม่สามารถส่งออกสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังต่างประเทศได้เนื่องจากต่างประเทศใช้เป็นการกีดกันทางการค้า โรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งหมด 7 ไทป์ (serotype) คือ O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 (Brooksby and Rogers, 1975) ซึ่งในแต่ละไทป์ไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังแบ่งเป็นไวรัสชนิดย่อย (subtype) มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 64 subtype (Pereira, 1977) ประเทศไทยเคยพบการระบาดอยู่ 3 ไทป์คือ O, A และ Asia1 ปัจจุบันมีการระบาดอยู่เพียง 2 ไทป์เท่านั้นคือ O และ A ดังนั้นการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคจึงจำเป็นต้องเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมและตรงกับชนิดไวรัสที่กำลังระบาดอยู่ในพื้นที่ รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วให้ผลถูกต้องและแม่นยำจะช่วยสนับสนุนการควบคุมโรคและการกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ประสิทธิผล การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ร่วมกับการเพิ่มปริมาณไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) และการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี real time RT-PCR (Callahan *et al.*, 2002) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัส (antigen detection) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ (epithelium tissue) หรือ vesicular fluid ที่เก็บจากสัตว์ป่วย ส่วนการตรวจตัวอย่างที่มาจากซีรัมสัตว์จะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein (Mackay *et al.*, 1998) วิธีการเหล่านี้ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง ปัจจัยที่สำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ผลถูกต้องและแม่นยำคือคุณภาพตัวอย่าง ดังนั้นการเก็บตัวอย่างที่ดีและมีคุณภาพได้แก่ การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือตุ่มน้ำใส (vesicular fluid) ในตำแหน่งหรือบริเวณรอยโรคที่มีไวรัสอยู่และเก็บในช่วงที่สัตว์เริ่มแสดงอาการใหม่ๆเริ่มมีตุ่มใสหรือแผลที่ลิ้น (fresh lesion) ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วในการตอบผล จากรายงาน Linchongsubongkoch *et al.*, (2018) ทำการประเมินคุณภาพตัวอย่างสำหรับส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดไวรัสจากตัวอย่างที่เป็น initial extraction fluid และ virus isolation พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีคุณภาพดีหรือขนาดมากกว่า 1 กรัม ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคมีประสิทธิภาพได้ผลสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีคุณภาพหรือปริมาณน้อยมาก (น้อยกว่า 0.4 กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างผ่านการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือ virus isolation ยิ่งส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคเพิ่มประสิทธิภาพได้ดีกว่าตัวอย่าง initial extraction fluid (initial typing ได้ผลบวก = 61.75% และ virus isolation ได้ผลบวก = 94.7%) ปัจจุบันการทำ virus isolation สามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมจาก primary cell และ cell line ที่มีคุณสมบัติให้ความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (House and House, 1989) primary cell ที่นิยมใช้และให้ความไวสูงได้แก่ primary bovine thyroid cell (Snowdon, 1966) และ primary lamb kidney cell (Singha *et al.*, 2014) ส่วน cell line ที่ใช้ได้แก่ IB- RS2 (De Gastro, 1964), BHK21 (Hassan, 2016), PK-15 (Kasza *et al.*, 1972), LFBK α ,B₆ (LaRocco *et al.*, 2013) และ ZZ- R 127 (Brehm *et al.*, 2009) เป็นต้น การเพิ่มปริมาณไวรัสลงบน ZZ-R 127 ซึ่งเป็น cell line ต้นกำเนิดจาก fetal goat tongue epithelium พบว่าให้ความไวสูงเท่าเทียมกับการใช้ primary cell ปัจจุบันงาน virus isolation ของหน่วยงานศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใช้ primary lamb kidney cell เป็นหลักในการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการผ่านตัวอย่างไวรัสจำนวน 3 passage และทำการตรวจจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing เพื่อยืนยันผลครั้งสุดท้าย primary lamb kidney cell เป็นเซลล์ที่ต้องทำการเตรียมจากไตและจากสัตว์ทดลอง จำเป็นต้องเตรียมลักษณะสด ใหม่และใช้ทันที ไม่สามารถทำการเพาะอย่างต่อเนื่องได้เหมือน cell line ซึ่งเซลล์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตเซลล์ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ดังนั้น

การศึกษารังนี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบการใช้ primary lamb kidney cell และ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell ในการทำ virus isolation เพื่อเปรียบเทียบความไวของเซลล์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียม Primary lamb kidney cell

เป็นการเตรียมเซลล์ปฐมภูมิจากไตแกะ อายุประมาณ 5-6 เดือน ต้องเลือกแกะที่ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ขั้นตอนการเตรียมและวัสดุอุปกรณ์ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อและทำใน Biohazard ทำการเก็บเฉพาะส่วนไตทั้งสองข้าง ทำการล้างด้วย PBS ให้สะอาด ลอกส่วน capsule และ fibrous tissue ออก ตัดเนื้อเยื่อไตให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ใน trypsinize flask ที่มีสารละลาย 0.45% trypsin ใน PBS นำไปปั่นบน magnetic stirrer เพื่อย่อยให้เซลล์ไตเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ทำการเก็บสารละลาย suspension ทำการย่อยเซลล์ไตแกะ ทำซ้ำหลายๆครั้ง จากนั้นนำไปกรองเพื่อแยกกากเซลล์และ fibrous tissue ที่ใช้ไม่ได้ออก นำไป centrifuge เพื่อแยกเซลล์ที่ตกตะกอนออกจากส่วนน้ำใส นำส่วน sediment ที่เป็นเซลล์ไปใส่ในขวดที่มี growth medium ที่ประกอบด้วย MEM + 10% FCS + 10% glucose solution + 3% glutamine solution + 5.6% sodium bicarbonate solution + antibiotics, pH 7.4 ใช้ปริมาณเซลล์ประมาณ 1.2×10^4 เซลล์/ซีซี นำไปแกลงในขวดเพาะเซลล์ขนาด 25 cm^2 ปริมาตรขวดละ 5 ซีซี นำไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เซลล์จะโตเต็มที่พร้อมนำไปใช้งาน

ในการเตรียมเซลล์ครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์ primary lamb kidney cell จากหน่วยผลิตเซลล์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ปากช่อง กรมปศุสัตว์ ให้การสนับสนุนเซลล์มาโดยตลอดทั้งงานประจำและงานศึกษาวิจัย

เตรียม fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line

เซลล์ ZZ-R 127 มีคุณลักษณะเป็น cell line ทำการเพาะเลี้ยงง่าย โดยทำการย่อยเซลล์จากขวดที่มีเซลล์เจริญเต็มที่แล้วด้วย versine trypsin ผ่านลงในขวดใหม่ที่มี growth medium ประกอบด้วย Iscove's Dullbecco modified eagle medium (IDMEM) และ DMEN/Ham's medium supplement ในอัตราส่วน 1:1 เติม 10% fetal calf serum (FCS), pH 7.2-7.4 ใช้ปริมาณเซลล์ประมาณ 3×10^4 เซลล์/ซีซี ทำการแกลงเซลล์ใส่ขวดเพาะเซลล์ขนาด 25 cm^2 ปริมาตรขวดละ 5 ซีซี ตามจำนวนที่ต้องการใช้ นำไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เซลล์จะโตเต็มที่พร้อมนำไปใช้งาน (เซลล์ ZZ-R 127 จะเจริญเติบโตได้ดีใน growth medium ที่ไม่มี antibiotic)

ในการศึกษารังนี้ได้รับการสนับสนุน ZZ-R127 cell line จากหน่วยงาน France Agency for food, environmental and occupational health safety (ANSES) ประเทศฝรั่งเศส

Virus isolation

รวบรวมตัวอย่างไวรัสพื้นที่ (field isolated virus) และตัวอย่างจาก initial extraction fluid ที่ส่งเข้ามาทำการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยในปี 2559-2560 จำนวน 85 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผ่านการเพาะเลี้ยงไวรัสเบื้องต้นแล้ว และทำการเก็บเป็นสต็อกไวรัสในตู้แช่แข็ง -80°C สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่างๆในการศึกษารังนี้ได้นำ primary lamb kidney และ ZZ-R 127 cell ที่อายุเซลล์ 6-7 วันเพื่อใช้สำหรับผ่านเชื้อไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) เพื่อทำการเปรียบเทียบความไวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยแสดงอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทาง cytopathic effect (CPE) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้ นำเซลล์ที่โตเต็มที่พร้อมใช้งานมาทำการดูดมีเดียออกมา และล้างเซลล์ด้วยมีเดียใหม่ หรือ maintenance medium (MM) ที่ประกอบด้วย MEM+ antibiotics+3% NaHCO_3 จากนั้นดูด MM ทั้ง ทำการ inoculate ตัวอย่างไวรัสพื้นที่ ปริมาตรตัวอย่างละ 0.8 ซีซี/ขวด ลงบนขวดที่มี primary lamb kidney และขวดที่มี ZZ-R 127 cell เขย่าขวดเบาๆ เพื่อให้ไวรัสครอบคลุมได้ทั่วพื้นผิวเซลล์ใน

ขวด ทำการ absorb ไวรัสใน 37°C incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนำขวดตัวอย่างไวรัสไปวางบน shaker board นำขวดตัวอย่างไวรัสออกจาก incubator ทำการเติมมีเดีย MM ปริมาตรขวดละ 3-4 ซีซี นำไปวางใน 37°C incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลการเปลี่ยนแปลงเซลล์ทาง CPE ทุกวันเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเก็บน้ำยาไวรัสโดยนำไปปั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนตะกอน ทำการตรวจยืนยันการจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing

ELISA typing test

เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพเพื่อจำแนกชนิดของไวรัสโดยใช้วิธี Indirect double antibody ELISA ตามวิธีการของ Roeder and Le Blanc Smith (1987) ขั้นตอนมีดังนี้ ทำการ coat plate ด้วย rabbit antiserum (type O, A และ Asia1) และ normal rabbit serum ด้วย coating buffer นำไปเก็บที่ 4°C ค้างคืน วันรุ่งขึ้นนำเพลทมาล้างด้วย PBS ทำการเตรียมตัวอย่างที่ต้องการตรวจ พร้อมกับชุด control antigen ของแต่ละไทป์ โดยทำการเจือจางเป็น 1:1, 1:2 และ 1:4 ตามลำดับ ถ่ายลงบนเพลทที่ได้ทำการ coat ไว้แล้ว นำเพลทไป incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ทำการล้างเพลทด้วย PBS เตรียมสารละลาย guinea pig antiserum (type O, A และ Asia1) และ normal guinea pig serum ถ่ายใส่ในเพลทให้ตรงกับแต่ละไทป์ นำเพลทไป incubate ที่ 37°C 30 นาที ทำการล้างเพลทด้วย PBS เตรียมสารละลาย anti guinea pig immunoglobulin conjugate-horseradish peroxidase เติมลงในเพลททุกหลุม นำเพลทไป incubate ที่ 37°C 30 นาที ทำการล้างเพลทด้วย PBS เตรียมสารละลาย TMB substrate เติมลงในเพลท วางในอุณหภูมิ ห้อง 20 นาที เติม 1N H₂SO₄ เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำเพลทไปอ่านค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง Multiscan ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm การอ่านผลค่า OD ที่เกิน 0.2 แสดงว่าได้ผลบวกตรงกับไทป์นั้นๆ

ผล

ผลการผ่านตัวอย่างเชื้อไวรัสจากพื้นที่จำนวนทั้งสิ้น 85 ตัวอย่าง เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือ virus isolation โดยใช้เซลล์ 2 ชนิดคือเซลล์ที่เตรียมจาก fetal goat tongue ZZ-R 127 และ primary lamb kidney cell อ่านผลการเปลี่ยนแปลงทาง CPE ของเซลล์ทั้งสองชนิด ภายใน 48 ชั่วโมง ผลดังแสดงใน table 1, 2 และ 3 ตามลำดับ การอ่านผลความรุนแรงทาง CPE แบ่งเป็นระดับต่างๆ ดังนี้

- ++++ หมายถึงเกิด CPE 76-100% ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์
 - +++ หมายถึงเกิด CPE 51-75% ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์
 - ++ หมายถึงเกิด CPE 26-50% ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์
 - +
 -
- หมายถึงเกิด CPE น้อยกว่า 25% ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์
- หมายถึงเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทาง CPE

Table 1 Virus isolation of field viruses using ZZ-R127 cell line and primary lamb kidney cell, CPE reading within 48 hours.

No.	Sample name	CPE result by ZZ-R 127	Confirm by ELISA typing	CPE result by pri. Lamb kidney	Confirm by ELISA typing
1	31/17-R2	++++	A	++	A
2	MYA20/17R2	+	O	-	NVD
3	MYA21/17 R2	+++	O	-	NVD
4	32/17 R2	++++	A	+	A
5	39/17 R2	++++	A	++	A
6	MYA19/17 R1	+	O	-	NVD
7	MYA12/17 R1	+	O	-	NVD
8	40/17	-	NVD	-	NVD
9	41/17	-	NVD	-	NVD
10	26-2/17 R1	-	NVD	-	NVD
11	28/17 R2	++++	A	+	A
12	MYA 6/17 R1	++++	O	-	NVD
13	MYA7/17 R1	-	NVD	-	NVD
14	MYA 9/17 R2	+	O	-	NVD
15	MYA10/17 R2	-	NVD	-	NVD
16	29-1/17 R1	-	NVD	+	A
17	S15-3/17 R2	++	O	-	NVD
18	S15-4/17 R2	-	NVD	-	NVD
19	S15-5/17 R2	++++	O	-	NVD
20	S15-6/17 R2	++	O	-	NVD
21	S15-7/17 R2	+	O	-	NVD
22	S15-8/17 R2	-	NVD	-	NVD
23	286/16 R2	++++	O	-	NVD
24	264-1/16 R2	+	O	-	NVD
25	315/16R1	-	NVD	-	NVD
26	317/17R1	+	O	-	NVD
27	337/16 R2	-	NVD	-	NVD
28	284/16R1	-	NVD	-	NVD
29	285-1/16R1	++	O	+	O
30	285-2/16R1	++	O	+	O
31	285/16R1	+	O	+	O
32	288-1/16R1	-	NVD	-	NVD
33	288-2/16R1	-	NVD	-	NVD
34	289/16R1	++++	O	++++	O
35	290/16R1	++++	O	++++	O
36	291/16R1	++++	A	++	A
37	292/16R1	++++	O	++	O
38	293/16R1	++++	O	++	O
39	348/16R1	++++	O	++++	O
40	349/16R1	-	NVD	-	NVD
41	354-4/16R1	++++	O	++++	O
42	19-2/17	++++	O	+	O

NVD - No virus detected - - no CPE occurrence

+ - CPE < 25% ++ - CPE 26-50% +++ - CPE 51-75% ++++ - CPE 76-100%

Table 1 Virus isolation of field viruses using ZZ-R127 cell line and primary lamb kidney cell, CPE reading within 48 hours. (continued)

No.	Sample name	CPE result by ZZ-R 127	Confirm by ELISA typing	CPE result by pri. Lamb kidney	Confirm by ELISA typing
43	44/17	++++	O	+++	O
44	276/16R1	++++	O	+++	O
45	278-1/16R1	++++	O	+	O
46	280/16R1	++++	O	+	O
47	281-3/16R1	++++	O	-	NVD
48	282-2/16R1	++++	O	++	O
49	283/16R1	++++	A	++++	A
50	331/16R1	-	NVD	-	NVD
51	333-2/16R1	++++	O	+++	O
52	336-2/16R1	++++	A	++	A
53	398-2/16R1	++++	O	++++	O
54	399-3/16R1	++++	A	++++	A
55	401-3/16	++++	O	-	NVD
56	403-1/14	++++	A	++++	A
57	390/16R1	++++	O	++++	O
58	391/16R1	++++	O	+	O
59	392/16R1	-	NVD	-	NVD
60	394-1/16R1	++++	O	-	NVD
61	396-1/16B1	++++	O	++++	O
62	396-2/16B1	++++	O	++++	O
63	397-2/16B1	++++	O	+++	O
64	398-1/16B1	-	NVD	-	NVD
65	431-1/16B1	-	NVD	-	NVD
66	431-2/16B1	-	NVD	-	NVD
67	434-2/16B1	++++	A	+++	A
68	435/16B1	+++	O	-	NVD
69	437/16B1	-	NVD	-	NVD
70	438/16B1	++++	A	++++	A
71	45/17	++++	O	++++	O
72	46/17	-	NVD	-	NVD
73	520-1/17	-	NVD	-	NVD
74	520-2/17	+	O	+	O
75	429-1/16 B1	+	O	+	O
76	429-2/16 B1	++++	O	++	O
77	430-1/16 B1	-	NVD	-	NVD
78	430-2/16 B1	-	NVD	-	NVD
79	421-2/16 B1	-	NVD	-	NVD
80	422-1/16 B1	-	NVD	-	NVD
81	422-2/16 B1	-	NVD	-	NVD
82	422-3/16 B1	-	NVD	-	NVD
83	425/16 B1	++++	A	++++	A
84	426/16 B1	-	NVD	++++	A
85	427/16 B1	++++	A	++	A

NVD = No virus detected - = no CPE occurrence

+ = CPE < 25% ++ = CPE 26-50% +++ = CPE 51-75% ++++ = CPE 76-100%

Table 2. Virus isolation by CPE reading and confirming by ELISA typing, n = 85 (50-100% CPE, less than 50% CPE and NVD)

Type of sample	Confirm by ELISA typing	CPE 50-100% , observed within 48 hours		CPE less than 50% , observed within 48 hours		No virus detected (NVD)	
		ZZ-R	Pri. lamb	ZZ-R	Pri. lamb	ZZ-R	Pri. lamb
VI fluid, used at 1 st or 2 nd passage n = 75	O	27	13	11	11	25	37
	A	12	8	0	6		
Initial fluid n = 10	O	4	2	1	2	4	5
	A	1	1	0	0		
Total n = 85		44/85 (51.8%)	24/85 (28.2%)	12/85 (14.1%)	19/85 (22.4%)	29/85 (34.1%)	42/85 (49.4%)

• VI = virus isolation, used at 1st or 2nd passage only,
Pri. = primary lamb kidney cell , ZZ-R 127= fetal goat tongue cell line

Table 3. Summary result of virus isolation/ELISA typing comparing between ZZ-R 127 and primary lamb kidney cell (n=85)

	Total	ZZ-R 127 cell Total positive	Pri. Lamb kidney Total positive	No virus detected (NVD)	
				ZZ-R	Pri
Virus isolation fluid*	75	50/75 (66.7%)	38/75 (50.7%)	25	37
Initial fluid	10	6/10 (60%)	5/10 (50%)	4	5
CPE cell occurred	85	56/85 (65.9%)	43/85 (50.6%)	29/85 (34.1%)	42/85 (49.4%)

สรุปและวิจารณ์

การผ่านเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง fetal goat tongue ZZ-R127 cell line และ primary lamb kidney cell พบว่าเซลล์ ZZ-R 127 ให้ความไวสูงกว่า primary lamb kidney จากตัวอย่างไวรัสพื้นที่จำนวน 85 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากตัวอย่างไวรัส isolation fluid ที่เก็บสต็อกในตู้ -80°C จำนวน 75 ตัวอย่างและตัวอย่าง initial extraction fluid จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำ virus isolation โดยใช้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด อ่านผล CPE ตามระดับความรุนแรงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ ภายใน 48 ชั่วโมง (table 1) จะเห็นว่าเซลล์ ZZ-R 127 ให้ความไวในการเกิด CPE ได้เร็วกว่าและระดับความรุนแรงสูงกว่า primary lamb kidney ดังนั้นคือ ผลความรุนแรงของการเกิด CPE ที่ 50-100% (มากกว่า++) ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์ใน ZZ-R127 พบถึง 51.9% (44/85) ในขณะที่ primary lamb kidney พบเพียง 28.2% (24/85) เป็นที่สังเกตว่าการเกิด CPE ในเซลล์ ZZ-R127 เกิดอย่างรวดเร็วและเกิดสมบูรณ์ 100% ภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนการอ่านผลความรุนแรงที่ระดับ CPE ที่ต่ำกว่า 50% (น้อยกว่า ++) ของเซลล์ทั้งหมดบนผิวขวดเพาะเซลล์ ใน ZZ-R127 พบเพียง 14.1% (12/85) ในขณะที่

primary lamb kidney พบถึง 22.4% (19/85) ดังแสดงใน table 2 และ 3 ในขณะที่เซลล์ที่ไม่เกิด CPE จาก ZZ-R127 และ primary lamb kidney มีจำนวน 34.1% (29/85) และ 49.4% (42/85) ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างสูงอาจมีปัจจัยมาจาก live virus ในตัวอย่างที่เก็บสต็อก-80°C เป็นเวลานาน อาจถูก inactivate ด้วยสภาวะอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างในมีเดียไม่เหมาะสมเท่าที่ควร ประกอบกับตัวอย่าง isolate virus ที่ใช้เป็นเพียง passage ต้นๆ คือที่ passage 1 และ 2 เท่านั้น จึงมีปริมาณไวรัสเพียงเล็กน้อยมีโอกาสที่จะไม่เกิด replication ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ แม้ว่าเซลล์ดังกล่าวจะมีความไวสูงก็ตาม โดยปกติ primary cell ที่เตรียมจาก bovine thyroid cell และ lamb kidney cell จะให้ความไวสูงต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Snowdon, 1966) และให้ความไวได้สูงกว่า cell line ทั่วไป เช่น IB-RS2, BHK21, PK-15 เป็นต้น (De Gastro, 1964; Hassan, 2016; Kasza *et al.*, 1972) ซึ่งเซลล์เหล่านี้ให้ความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในระดับหนึ่งแต่ให้ virus yield ค่อนข้างสูง ดังนั้นการเลือกใช้เซลล์ชนิดต่างๆจึงมีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่นเซลล์ BHK21 เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงง่ายและเพิ่มปริมาณเซลล์ได้รวดเร็ว วัตถุประสงค์จึงเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสในปริมาณมากๆ เพื่อการผลิตวัคซีนให้ได้ปริมาณสูงเช่นกัน การทำ virus isolation มีประโยชน์ในด้านการตรวจวินิจฉัย โรคกรณีที่คุณภาพตัวอย่างไม่ดีและมีปริมาณไวรัสน้อย ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี ELISA typing จาก initial extraction fluid โดยตรงจะไม่ได้ผล (no virus detected) จึงจำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) อีกขั้นตอนหนึ่ง เซลล์ที่นำมาใช้ต้องคัดเลือกเซลล์ที่มีความไวสูงระดับหนึ่ง เพื่อให้การอ่านผลได้อย่างรวดเร็ว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมและกำจัดโรคให้สงบได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน จากการศึกษาของ Linchongsubongkoch *et. al* (2018) พบว่าผลการตรวจ ELISA typing จากตัวอย่างที่ทำ virus isolation จะให้ผลบวกเพิ่มขึ้นถึง 26% เมื่อเทียบกับตัวอย่างจาก initial extention fluid

ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนา cell line ที่สามารถให้ความไวต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดีพอกับการใช้ primary cell จากรายงานของ Brehm *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาวิจัยใช้ fetal goat tongue ZZ-R 127 cell มาใช้ในงาน virus isolation โดยเปรียบเทียบการใช้หลายชนิดได้แก่ BHK21, IB-RS2 โดยการผ่านตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจำนวน 7 type (O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3) ลงบนเซลล์ดังกล่าว อ่านผลการเกิด CPE ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า ZZ-R127 เกิด CPE ได้อย่างรวดเร็วและเกิดสมบูรณ์ 100% ภายใน 24 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่เซลล์ IB-RS2 ส่วนเซลล์ BHK21 นั้นเกิด CPE ช้าและใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยและพัฒนา cell line อีกชนิดหนึ่งซึ่งให้ความไวสูงเช่นเดียวกับเซลล์ ZZ-R127 คือเซลล์ LFBK α_B ซึ่งเป็น Bovine kidney cell line expressing bovine α_B integrin (LaRocco *et al.*, 2013) ปัจจุบันได้มีหลายหน่วยงานในต่างประเทศใช้เซลล์ 2 ชนิดนี้มาทดแทนการใช้ primary cell อย่างแพร่หลาย เนื่องจากการเตรียมและเพาะเลี้ยงง่ายกว่า primary lamb kidney cell ดังที่กล่าวมาแล้วว่าจำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองและทำการตัดเอาส่วนไตและมาเข้ากระบวนการย่อยและเพาะเลี้ยงเซลล์และต้องทำการเตรียมในลักษณะใหม่และสดทุกครั้ง ใช้เวลาการเตรียมนาน ค่าใช้จ่ายสูงและมีข้อจำกัดหลายอย่าง ส่วนการใช้ cell line ชนิดต่างๆดังกล่าวนั้นเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง สะดวกและง่ายกว่า primary cell และต้องทำการคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมและให้ความไวกับชนิดไวรัสที่ทำการศึกษา (House and House, 1989) การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการทำ virus isolation โดยใช้เซลล์ ZZ-R 127 ให้ความไวสูงกว่า primary lamb kidney cell ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้ primary cell ได้ในอนาคต เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสะดวก รวดเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน passage สูงๆซึ่งยังให้คุณลักษณะเซลล์คงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ปรีชา วงษ์วิจารณ์ อดีตผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนงานศึกษาวิจัยครั้งนี้และงบประมาณค่าใช้จ่ายในการขนส่งเซลล์ ZZ-R 127 จากหน่วยงาน ANSES ประเทศฝรั่งเศสและค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ มีเดียสำหรับงานเพาะเซลล์ ขอขอบคุณ Dr. Labib Bakkali Kassimi จากหน่วยงาน ANSES ประเทศฝรั่งเศสที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ ZZ-R127 ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และเจ้าหน้าที่หน่วยเพาะเซลล์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ปากช่อง นครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุน primary lamb kidney cell อย่างต่อเนื่องมาตลอด ทำให้การดำเนินงานศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- Brehm, K.E., Ferris, N. P., Lenk, M., Riebe, R. and Haas, B. 2009. Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot and mouth disease virus. *Journal of clinical microbiology* : 47 (10) 3156-3160.
- Brooksby, J. B. & Rogers, J. 1957. Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950-1955. In: *Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses*, Paris O.E.E.C. Project 208 pp. 31-34.
- Callahan, J.D., Brown, F., Osorio, F.A., Sur, J.H., Kramer, E., Long, G.W., Lubroth, J., Ellis . S. J., Shoulars. K.S., Gaffney, K.L. and Nelson, W.M., 2002. Use of a portable real time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot and mouth disease virus. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* 220 : 1636-1642.
- De Gastro, M.P. 1964. Behaviour of the foot and mouth disease virus in cell cultures susceptibility of the IB-RS-2 line. *Arc. Inst. Biol. Sao Paulo.* 31: 63-78.
- Hassan, A.I. 2016. Effect of different culture system on the production of foot and mouth disease trivalent vaccine. *Vet. World.* EISSN: 2231-0916, p. 32-37.
- House C, and House, J.A. 1989. Evaluation technique to demonstrate foot and mouth disease virus in bovine tongue epithelium: Comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet. Microbiol.* 20: 99-109.
- Kasza, L., Shadduck, J. A. and Christofinis, J. G. 1972. Establishment virus susceptibility and biological characteristics of swine kidney cell SK-6. *Res. Vet. Sci.* 13:147-151.
- Mackey, D.K.J., Forsyth, M.A., Davies, P.R. and Salt, J.S. 1998. Antibody to the non structural protein of foot and mouth disease virus in vaccinated and animal exposed to infection. *The Veterinary Quarterly.* 20: 9-11.
- LaRocco, M., Krug, P.W., Kramer, E., Ahmed, Z., Pacheco, M.J., Duque, H., Baxt, B. and Rodriguez, L. 2013. A continuous bovine kidney cell line constitutively expressing bovine $\alpha_5\beta_1$ integrin has increase susceptibility to foot and mouth disease virus. *J. Clin. Micro.* 51:(6) 1714-1720.
- Linchongsubongkoch, L. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. *Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference.* 62-72.

- Linchongsubongkoch, L., Boonsuya seeyo, K., Choornasard, A., Ungvanijban, S., Panthumart, A., Samanit, J. and Deepang, C. 2018. Evalusation of sample quality effecting to the foot and mouth disease laboratory diagnostic results. *J. Vet. Biologics*. 27: (1-2) 44-54.
- Pereira, H.G. 1977. Subtyping of foot and mouth disease virus. International symposium of foot and mouth disease , Lyon. *Develop. Biol. Standard*. 35: 167-174.
- Roder, P.L. & Le Blanc Smith, P.M. (1987). Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis . *Res. Vet. Sci.*, 43: 225-232.
- Snowdon , W.A. 1966. Growth of foot and mouth disease virus in monolayer culture of calf thyroid cells. *Nature* 210: 1079-1080.
- Singha, A., Sarkar, S., Devi, U. and Roy, B.B. 2014. Study on cryopresearation of primary goat kidney cell and its susceptibility to infection in vitro. *Explor. Anim. Med. Res.* 4:(1) 108-112.

Comparative sensitivity of fetal goat tongue ZZ-R127 cell line and primary lamb kidney cell for isolation of foot and mouth disease virus

Wilai Linchongsubongkoch¹ Karnrawee Chuanpat² Janya Samanit² Chalineee Deepang²

Abstract

The sensitivity of the two tissue culture cells, fetal goat tongue ZZ-R127 cell line and primary lamb kidney cell for virus isolation of foot and mouth disease virus (FMDV), were investigated and compared. The result was demonstrated by reading the cytopathic effect (CPE) of monolayer cell that could be observed within 48 hours, then confirmed the FMDV serotype identification by ELISA typing test. The result found that ZZ-R127 and primary lamb kidney cell gave the positive by virus isolation and ELISA typing were 65.9% (56/85) and 50.6% (43/85), respectively. While the negative result by both tests were 34% (29/85) and 49.4% (42/85), respectively. In conclusion, the ZZ-R127 cell used for virus isolation was indicated to be higher sensitive to FMDV rather than primary lamb kidney cell. Interestingly, there was several advantages of the ZZ-R127 cell has indicated in this studied, such as rapid and strong CPE occurred within 24 hours, less time consuming in cell preparation, convenience and easy to maintain cell passaging for long term. Hence, it should be recommended to use the ZZ-R127 cell for performing the virus isolation in field samples and also useful to replace an existing primary lamb kidney cell.

Keywords: Foot and mouth disease virus, ZZ-R 127 cell, primary lamb kidney cell

¹ Consultant of Department of Livestock Development on foot and mouth disease, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development

² Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima

การประเมินชุดตรวจสอบ non structure protein (NSP) ชนิดต่างๆ สำหรับแยกระหว่าง สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

วิไล ถิ่นจงสูงบกข¹

บทคัดย่อ

ทำการประเมินชุดตรวจสอบ non structure protein (NSP) ชนิดต่างๆที่ผลิตจาก World Reference Laboratory (WRL)/United Kingdom, United Biochemical Inc. (UBI)/USA, Bommeli/Switzerland และ CEDI Diagnostic B.V. (CEDI หรือ PRIONIC)/Switzerland ซึ่งใช้สำหรับตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ virus infection associated (VIA) antigen ด้วยวิธี agar gel immunodiffusion (AGID) test และตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) ไทป์โอ เอ และเอเชียวันด้วยวิธี LP ELISA ผลการตรวจซีรัมสัตว์จำนวน 1197 ตัวอย่าง (โค=918, กระบือ=40, สุกร=239) พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP ในโคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนโดยใช้ชุดตรวจสอบ WRL, UBI, Bommeli, CEDI (PRIONIC) และ VIA test ให้ค่า specificity สูง เท่ากับ 100%, 99.7%, 99%, 100% และ 100% ตามลำดับ ส่วนในสุกรโดยใช้ WRL, UBI และ VIA test ให้ค่า specificity สูงเท่ากับ 100% ทั้งหมด กลุ่มสัตว์ที่ได้รับวัคซีนเพียง 1 ครั้ง ให้ค่า specificity ค่อนข้างสูงโดยใช้ WRL UBI และ VIA test เท่ากับ 99.03%, 98.4% และ 97.7% ตามลำดับ กลุ่มสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนซ้ำจำนวนหลายครั้ง ให้ค่า specificity โดยใช้ชุดตรวจสอบ WRL UBI และ VIA test เท่ากับ 97.73%, 100% และ 65.45% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มโคที่ได้รับการติดเชื้อในพื้นที่โดยใช้ WRL, UBI, Bommeli, CEDI (PRIONIC) และ VIA test พบว่าให้ผล NSP positive สูงมาก ให้ค่า sensitivity เท่ากับ 98.33%, 88.9%, 84.6%, 90.1% และ 100% ตามลำดับ ในสุกรให้ค่า sensitivity โดยใช้ WRL, UBI และ VIA test เท่ากับ 73.33%, 80% และ 100% ตามลำดับ ส่วนการประเมินค่า sensitivity analysis โดยทำการวิเคราะห์ค่า serum dilution สูงสุดที่ยังตรวจพบ NSP โดยใช้ชุดตรวจสอบจาก UBI, CEDI (PRIONIC) และ Bommeli พบว่า CEDI (PRIONIC) และ Bommeli ให้ค่าวิเคราะห์ความไวสูงกว่า UBI ส่วนการเลือกใช้ชุดตรวจสอบที่ให้ความจำเพาะ ความไว รวมทั้งข้อดีและข้อเสียของชุดตรวจสอบแต่ละชนิดนั้นเมื่อพิจารณาโดยภาพรวมแล้วเห็นว่าชุดตรวจสอบจาก CEDI (PRIONIC) เหมาะสมและสะดวกที่สุดสำหรับใช้ตรวจตัวอย่างซีรัมได้ทุกชนิดสัตว์โดยไม่ต้องแยกเป็นชนิดสัตว์และยังสามารถใช้ตรวจซีรัมสัตว์ป่าได้ทุกชนิด นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจ sero-surveillance ในสัตว์ฝูงหรือสัตว์เคลื่อนย้ายภายในประเทศและระหว่างประเทศได้และยังเป็นวิธีมาตรฐานตามข้อกำหนดของ OIE สำหรับการยื่นขอจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อขอการรับรองอย่างเป็นทางการโดย OIE ในระดับ zoning หรือระดับประเทศโดยการใช้วัคซีนหรือไม่ใช้วัคซีน

คำสำคัญ: ชุดตรวจสอบ non structure protein (NSP) ชนิดต่างๆ, ความจำเพาะและความไว, ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

¹ ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์และผู้เชี่ยวชาญ OIE ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

บทนำ

สืบเนื่องจากกรมปศุสัตว์มีนโยบายรณรงค์ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ในโค กระบือ แพะ แกะ และสุกร อย่างอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง เพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันสัตว์ในพื้นที่ ให้ได้รับการฉีดวัคซีนโดยมีเป้าหมายครอบคลุมไม่ต่ำกว่า 80% ของฝูงหรือของประชากรสัตว์ทั่วประเทศ เพื่อให้มั่นใจว่าสัตว์ในพื้นที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูงเพียงพอต่อการป้องกันโรคได้ การตรวจสอบทางซีรัมวิทยาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Hamblin et al., 1997 ; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเซียวัน ควบคู่กับการตรวจสอบสถานะการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน non structure protein (NSP) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) ได้แก่ 3A, 3B, 3C, 3ABC, 3AB, 2B หรือ 2C ด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการของ Bruderer et al. (2004), De Deigo et al. (1997) และวิธี blocking ELISA ตามวิธีการของ Sorensen et al. (1998) การตรวจสอบด้วยวิธีเหล่านี้เพื่อแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อและสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน ซึ่งให้ผลถูกต้อง แม่นยำ และ ให้ความไวได้สูงกว่าวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน virus infection associated antigen (VIA) ซึ่งเป็นส่วนของ 3D ของ FMDV ด้วยวิธี agar gel immunodiffusion (AGID) ตามรายงานของ Linchongsubongkoch et al. (2000) พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธี VIA-AGID test ให้ความจำเพาะและความไวค่อนข้างต่ำกว่าวิธี indirect ELISA และยังพบว่าให้ผล false positive สูงในสัตว์ที่ไม่เคยได้รับการติดเชื้อมาก่อนแต่เกิดจากการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายจำนวนหลายครั้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ McVicar and Suttmoller (1970) และ Pinto and Garland (1979) โดยหลักการทางวิชาการ FMDV จะมีองค์ประกอบที่เป็นส่วน structure protein (SP) ได้แก่ VP1, VP2, VP3 และ VP4 อีกส่วนหนึ่งคือส่วนที่เป็น non structure protein (NSP) ได้แก่ 3A, 3B, 3C, 2B, 2C และ 3D ซึ่งจะเกิดขึ้นในขบวนการ virus replication ในร่างกายสัตว์ขณะได้รับการติดเชื้อ ดังนั้นร่างกายสัตว์จะสร้างแอนติบอดีต่อส่วนที่เป็น structure protein และ non structure protein ซึ่งจะสามารถตรวจพบในซีรัมสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่เคยได้รับการติดเชื้อไวรัสมาก่อน แต่จะไม่พบแอนติบอดีต่อ NSP ในซีรัมสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายหรือ inactivated vaccine ในการนี้ ต้องคำนึงถึงชนิดของวัคซีนที่ใช้จะต้องผลิตแบบ purified vaccine เท่านั้น เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตวัคซีนได้มีการกำจัดส่วนของ non structure protein ออกหมดแล้วเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน NSP ในวัคซีน ปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจสอบ NSP สำเร็จรูปชนิดต่างๆจากต่างประเทศจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยด้านคุณภาพและประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาในสัตว์พื้นที่ในประเทศไทย ได้แก่ โค กระบือ และสุกร โดยทำการรวบรวมข้อมูลผลการตรวจทางซีรัมวิทยา ด้วยวิธี LP ELISA ควบคู่ VIA-AGID และ NSP-ELISA ซึ่งใช้ชุดตรวจสอบ NSP ชนิดต่างๆที่ได้รับความอนุเคราะห์และสนับสนุนจากหน่วยงาน International Atomic Energy Agency (IAEA) ประเทศออสเตรีย ภายใต้โครงการ IAEA Co-ordinated Research Programme (CRP) D3.20.20 “The use of non structural (NS) antigens of FMD virus to assess antibodies in vaccinated and infected livestock” ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินชุดตรวจสอบ จำนวน 4 ชนิด ซึ่งผลิตจาก World Reference Laboratory/United Kingdom, United Biochemical Inc. (UBI)/USA, Bommeli/Switzerland และ CEDI Diagnostic B.V. (CEDI หรือ PRIONIC)/Netherlands เพื่อคัดเลือกชุดตรวจสอบที่เหมาะสม มีคุณภาพและประสิทธิภาพในด้านความจำเพาะ ความไว และความแม่นยำสูง สำหรับตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างซีรัม

รวบรวมตัวอย่างซีรัมจากพื้นที่และห้องปฏิบัติการ รวมทั้งสิ้น 1197 ตัวอย่าง (โค = 918, กระบือ = 40 และ สุกร = 239) แบ่งตามประวัติได้ 4 กลุ่มดังนี้

- | | | |
|--|-------------------|----------------------|
| 1) กลุ่มที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีน | โค = 379 ตัวอย่าง | สุกร = 101 ตัวอย่าง |
| 2) กลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนเพียง 1 ครั้ง | โค = 179 ตัวอย่าง | สุกร = 123 ตัวอย่าง |
| 3) กลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนหลายครั้ง | โค = 180 ตัวอย่าง | กระบือ = 40 ตัวอย่าง |
| 4) กลุ่มที่ได้รับการติดเชื้อในพื้นที่ | โค = 180 ตัวอย่าง | สุกร = 15 ตัวอย่าง |

2. Virus infection associated antigen (VIA test)

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ virus infection associated (VIA) antigen ด้วยวิธี agar gel immunodiffusion (AGID) test ตามวิธีการของ Linchongsubongkoch *et al.* (1993)

3. Non structure protein (NSP) test

ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่ผลิตจากหน่วยงานต่างประเทศ ดังนี้

3.1 ชุดตรวจสอบผลิตจากหน่วยงาน World Reference Laboratory (WRL) ประเทศอังกฤษ เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structure protein ของ FMDV โดยวิธี indirect ELISA ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบ ดำเนินการตามคู่มือผู้ผลิต

3.2 UBI[®] FMDV NS EIA (UBI) เป็นชุดตรวจสอบที่ผลิตจากหน่วยงาน United Biochemical Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3B non structure protein ของ FMDV โดยวิธี indirect ELISA ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือผู้ผลิต

3.3 Checkit FMDV-3ABC (Bomm) เป็นชุดตรวจสอบที่ผลิตจากหน่วยงาน Bommeli ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC non structure protein ของ FMDV โดยวิธี indirect ELISA ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือผู้ผลิต

3.4 CEDITest[®] FMDV-NS (CEDI) เป็นชุดตรวจสอบที่ผลิตจากหน่วยงาน CEDI Diagnostic B.V. หรือ PRIONIC ประเทศเนเธอร์แลนด์ เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC non structure protein ของ FMDV โดยวิธี blocking ELISA ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือผู้ผลิต

4. Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ เอและเอเซียวัน ด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) ตามวิธีการของ Hamblin *et al.* (1997) และ Linchongsubongkoch and Janukit (1994)

ผล

ผลการตรวจสอบตัวอย่างทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี LP ELISA, VIA test และ NSP test ซึ่งใช้ชุดตรวจสอบผลิตจาก World Reference Laboratory (WRL)/United Kingdom, United Biochemical Inc. (UBI)/USA, Bommeli/Switzerland และ CEDI Diagnostic B.V. (CEDI or PRIONIC)/Netherlands ซึ่งเป็นซีรัมสัตว์จากกลุ่มที่ไม่เคยได้รับวัคซีน กลุ่มฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้ง กลุ่มฉีดวัคซีนจำนวนหลายครั้งและกลุ่มที่ได้รับการติดเชื้อ ซึ่งให้ความจำเพาะและความไวค่อนข้างสูง (specificity and sensitivity) ดังแสดงใน figure 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ส่วนการเปรียบเทียบการประเมินด้าน sensitivity analysis ของชุดตรวจสอบ โดยใช้ซีรัมโคจากสัตว์ทดลองที่ทราบประวัติการฉีดวัคซีนและการติดเชื้อที่แน่นอน ได้แก่ post vaccination, post challenge ดังแสดงใน figure 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

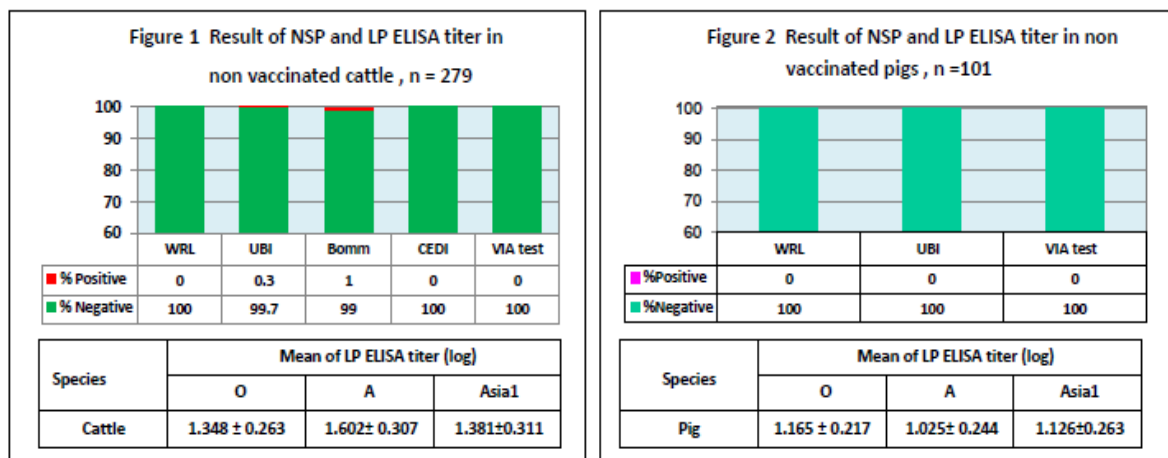


Figure 1 และ 2 ผลการตรวจสอบ NSP ชนิดต่างๆ และค่าเฉลี่ย LP ELISA titer ต่อ FMDV ไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน จากโคและสุกรที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีน

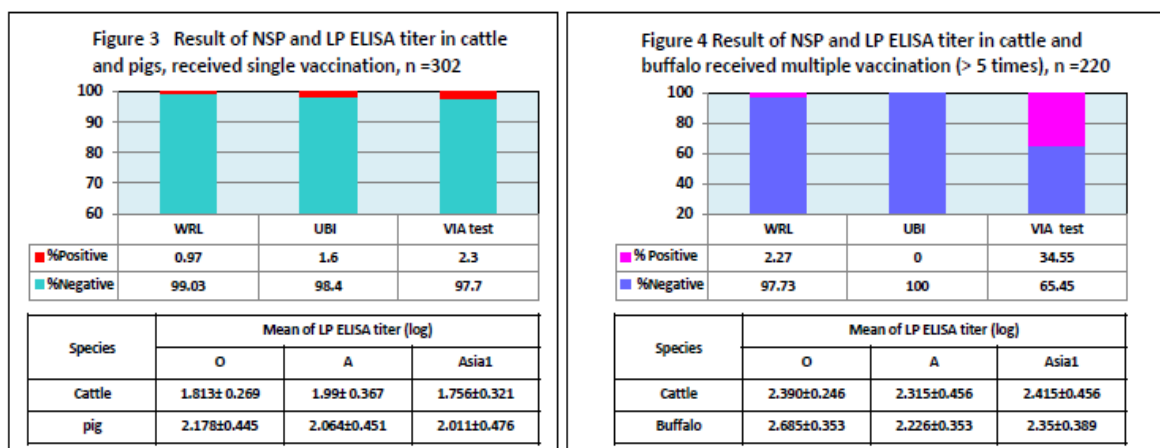


Figure 3 และ 4 ผลการตรวจสอบ NSP ชนิดต่างๆ และค่าเฉลี่ย LP ELISA titer ต่อ FMDV ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน จากโค กระบือและสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 1 และจำนวนหลายครั้ง

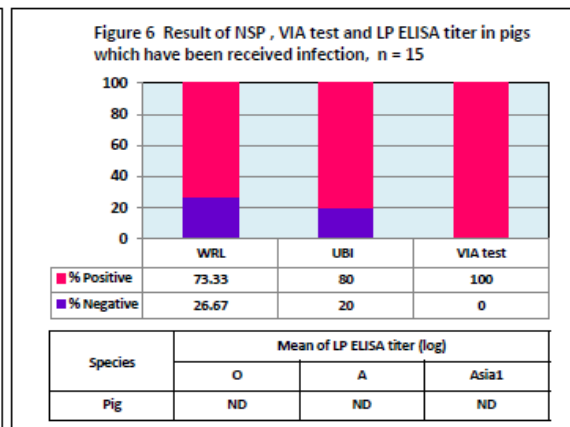
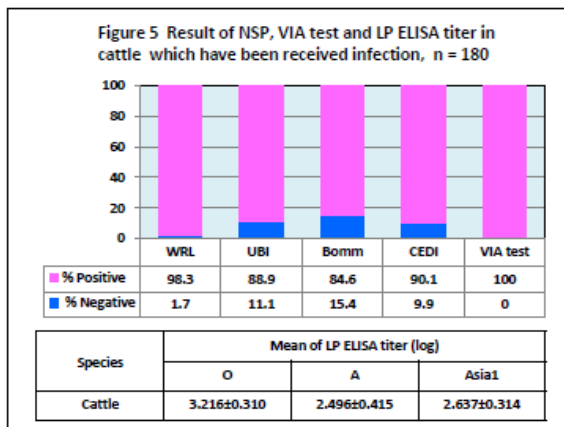
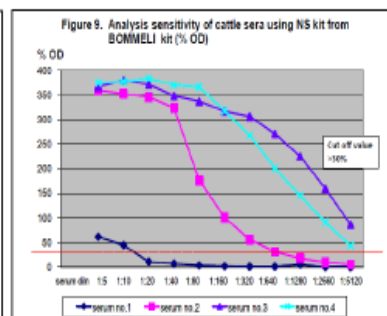
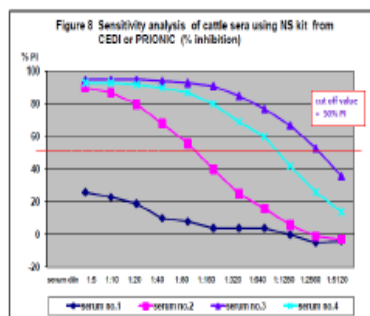
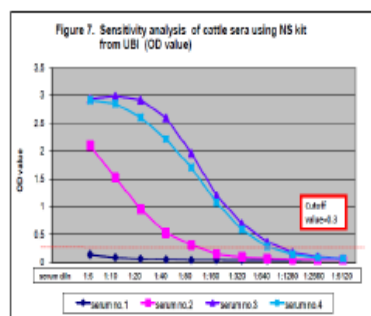


Figure 5 และ 6 ผลการตรวจสอบ NSP ชนิดต่างๆ และค่าเฉลี่ย LP ELISA titer ต่อ FMDV ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน จากโคและสุกรที่เคยได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ในพื้นที่



serum no.1 = 3 weeks post vaccinated cattle # 16
 serum no. 2 = 6 weeks post challenged cattle #198
 serum no.3 = 6 weeks post challenged cattle#214
 serum no. 4 = 4 weeks post challenged #446

Figure 7, 8 และ 9 ผลการวิเคราะห์ sensitivity analysis ของซีรัมโคทดลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่ได้รับการติดเชื้อพิษทับ โดยใช้ชุดตรวจสอบจาก UBI, CEDI (PRIONIC) และ BOMMELI ตามลำดับ

Table 1 สรุปการประเมินชุดตรวจสอบ NSP ชนิดต่างๆ และข้อดี ข้อเสียในการเลือกใช้ชุดตรวจสอบที่เหมาะสม

NSP kit	Technique	Specificity	Sensitivity	Sensitivity analysis (example:serum no 3)	Advantage/Disadvantage
3ABC NSP, WRL	Indirect ELISA	high	high	Not Done	kit สำหรับตรวจ ruminant และสุกร ต้องใช้แยกชนิดกัน ไม่สามารถใช้รวมกันทุก species ได้
3B NSP, UBI	Indirect ELISA	high	Moderate	dilution สูงสุดที่ detect ได้ = 1:640	kit สำหรับตรวจ ruminant และสุกร ต้องใช้แยกชนิดกัน ไม่สามารถใช้รวมกันทุก species ได้
3ABC NSP, Bommeli	Indirect ELISA	high	high	dilution สูงสุดที่ detect ได้ = 1:5120	kit สำหรับตรวจ ruminant และสุกร ต้องใช้แยกชนิดกัน ไม่สามารถใช้รวมกันทุก species ได้ ปัจจุบันมีการผลิตแบบสารละลายพร้อมใช้ทันที แต่เสื่อมคุณภาพเร็ว ทำให้เกิด false positive สูง
3ABC NSP, CEDI or PRIONIC	Blocking ELISA	high	High	dilution สูงสุดที่ detect ได้ = 1:2560	kit สามารถตรวจสัตว์ได้ทุก species โดยไม่ต้องแยกชนิด kit และใช้ตรวจสัตว์ป่าได้ทุกชนิด
3D NSP, VIA antigen	Immuno-diffusion	low	high	Not Done	ตรวจได้ทุก species แต่ให้ผล false positive สูงในสัตว์ที่ได้รับวัคซีนซ้ำหลายครั้ง

สรุปและวิจารณ์

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ชุดตรวจสอบที่ผลิตจาก WRL, UBI, Bommeli และ CEDI (PRIONIC) และตรวจ VIA test ให้ผลความจำเพาะ (specificity) สูงมาก ถึง 99-100% ในกลุ่มสัตว์ที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน ในซีรัมโคให้ ค่า specificity โดยใช้ชุดตรวจสอบ WRL, UBI, Bommeli, CEDI และ VIA test เท่ากับ 100%, 99.7%, 99%, 100% และ 100% ตามลำดับ (figure 1) ในซีรัมสุกรโดย WRL, UBI และ VIA test ให้ค่า specificity เท่ากับ 100% ทั้งหมด (figure 2) ในการนี้มีการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอและเอเซียวัน โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย LP ELISA titer หากค่าต่ำกว่า 1.6 (log) หมายถึงไม่มีแอนติบอดีต่อ FMDV ซึ่งระดับภูมิคุ้มกันเหล่านี้ไม่มีผลต่อการประเมินประสิทธิภาพและความไวของชุดตรวจสอบ NSP แต่อย่างไรแต่เป็นเพียงข้อมูลประกอบการวิเคราะห์เท่านั้น ส่วนในกลุ่มสัตว์ที่ได้รับวัคซีนเพียง 1 ครั้ง ให้ค่า specificity ค่อนข้างสูงโดยใช้ WRL UBI และ VIA test เท่ากับ 99.03%, 98.4% และ 97.7% ตามลำดับ (figure 3) กลุ่มสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนซ้ำจำนวนหลายครั้ง (มากกว่า 5 ครั้ง) ให้ค่า specificity โดยใช้ชุดตรวจสอบ WRL UBI และ VIA test เท่ากับ 97.73%, 100% และ 65.45% (figure 4) จะเห็นว่าการตรวจ VIA test ให้ค่าความจำเพาะต่ำมากเนื่องจากเกิด false positive สูงถึง 34.55% แสดงให้เห็นว่า VIA test ไม่สามารถใช้กับสัตว์พื้นที่ในประเทศที่มีการใช้ฉีดวัคซีนอย่างสม่ำเสมอหรือได้รับการฉีดวัคซีนซ้ำหลายๆครั้ง (McVicar and Suttmoller, 1970; Pinto and Garland 1979) หากพิจารณาความจำเพาะและความแม่นยำในการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อพบว่า NSP test ให้ความถูกต้องและแม่นยำกว่า VIA test ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Silberstein *et al.*, 1997 ในขณะที่เดียวกันเมื่อพิจารณาการซีรัมในกลุ่มสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัส ดังแสดงใน figure 5 และ 6 จากผลการตรวจสอบ NSP, VIA test และ LP ELISA ในกลุ่มสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอและระบาดไปทั่วทั้งฝูงสัตว์ ส่วนใหญ่แสดงอาการป่วยและได้รับการฉีดวัคซีนชนิดไตรวาเลนท์แบบปูพรมทั้งฝูงสัตว์ป่วยและสัตว์พื้นที่ข้างเคียง ผลการตรวจ NSP โดยใช้ WRL, UBI, Bommeli, CEDI (PRIONIC) และ VIA test พบว่าให้ผล positive สูงมาก แสดงว่าให้ความไวสูงเท่ากับ 98.33%, 88.9%, 84.6%, 90.1% และ 100% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ เอ และเอเซียวันสูงทั้ง 3 ไทป์ โดยเฉพาะไทป์โอ เท่ากับ 3.216 ± 0.310 (log), 2.496 ± 0.415 และ 2.637 ± 0.314 ตามลำดับ (figure 5) ส่วนผล NSP test โดยใช้ WRL, UBI และ VIA test ในสุกรที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ให้ผล positive ค่อนข้างสูง และให้ความไว เท่ากับ 73.33%, 80% และ 100% ตามลำดับ (figure 6)

นอกจากนี้ยังได้มีการประเมินค่า sensitivity analysis ของชุดตรวจสอบที่ผลิตจากต่างประเทศจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ UBI, CEDI (PRIONIC) และ Bommeli โดยใช้ซีรัมที่มีประวัติแน่นอน เพื่อการประเมินและวิเคราะห์ผลได้ถูกต้องใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด ในที่นี้ใช้ โคทอลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนระยะ 3 สัปดาห์ (post vaccination) จำนวน 1 ตัวอย่างและโคที่ได้รับการฉีดพิษทับริยะ 4 และ 6 สัปดาห์ (post challenge) จำนวน 3 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ค่าความไว โดยดูจากค่า dilution สูงสุดของซีรัมที่ยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ NSP ผลการประเมินดังแสดงใน figure 7, 8 และ 9 พบว่าค่า dilution สูงสุดที่สามารถตรวจพบ NSP antibody โดยเทียบกับชุดตรวจสอบทั้ง 3 ชนิด คือ UBI, CEDI (PRIONIC) และ Bommeli ดังนี้ serum no.2 ให้ค่า dilution สูงสุด เท่ากับ 1:80, 1:80 1:640 ตามลำดับ ส่วน serum no.3 ให้ค่า dilution สูงสุด เท่ากับ 1:640, 1:2560 และ 1:5120 ตามลำดับ ส่วน serum no.4 ให้ค่า dilution สูงสุด เท่ากับ 1:640, 1:910 และ 1:5120 ตามลำดับ กรณี serum no. 1 เป็น vaccinated serum ทำให้ตรวจไม่พบ NSP antibody ทั้งนี้ในทางปฏิบัติตัวอย่างซีรัมก่อนจะนำมาทดสอบนั้นจะมีการเตรียม dilution เริ่มต้นจะไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการและขั้นตอนการทดสอบของแต่ละบริษัทผู้ผลิต ตัวอย่างเช่น UBI จะเริ่มต้นที่ dilution 1:20, CEDI (PRIONIC) จะเริ่มที่ 1:5 และ Bommeli จะเริ่มต้นที่ dilution 1:100 ดังนั้นโดยภาพรวมชุดตรวจสอบของ Bommeli อาจจะทำให้ความไวสูงกว่าของ UBI และ CEDI (PRIONIC) แต่เมื่อพิจารณาผล

serum no. 1 ซึ่งเป็น vaccinated serum พบว่าที่ dilution 1:5 และ 1:10 ให้ผลการตรวจเป็น positive (ค่า % OD สูงเกินค่า cut off) ซึ่งประเมินได้ว่าเป็น false positive จากชุดตรวจสอบ Bommeli แต่ในทางปฏิบัติผู้ผลิตแนะนำให้เริ่มต้นที่ dilution 1:100 จึงไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้วิเคราะห์ ในปัจจุบันทางผู้ผลิต Bommeli ได้พัฒนาชุดตรวจสอบรุ่นใหม่โดยมีการเปลี่ยนชนิดของสารละลาย buffer และ reagent ให้อยู่ในรูปสารละลายพร้อมใช้งานทันที โดยไม่จำเป็นต้องทำการเจือจางก่อนใช้ ซึ่งสารละลายเหล่านี้ต้องปฏิบัติการในสภาวะอุณหภูมิ 25°C ตลอดการทดสอบ ซึ่งนิยมใช้ในประเทศแถบยุโรปแต่ไม่เหมาะสมสำหรับประเทศร้อนในแถบเอเชีย เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ reagent และ buffer เสื่อมคุณภาพทำให้การอ่านผลผิดพลาดสูง ทั้งนี้ได้เคยมีประสบการณ์ในการทดสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบรุ่นใหม่ ผลปรากฏว่าได้ผล false positive สูงมากในสัตว์ที่ไม่ได้รับการติดเชื้อหรือแม้แต่สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเป็นต้น (ผลงานไม่ได้ตีพิมพ์) ด้วยเหตุนี้จึงไม่แนะนำให้ใช้ชุดตรวจสอบรุ่นใหม่ของ Bommeli ในประเทศไทยหรือประเทศในแถบเอเชียซึ่งมีสภาวะอากาศร้อนเป็นต้น

สรุปโดยภาพรวมการประเมินผลและข้อดี ข้อเสียของชุดตรวจสอบชนิดต่างๆที่ผลิตจาก WRL, UBI, Bommeli, CEDI และ VIA test นั้น ส่วนใหญ่ให้ผลทางด้านความจำเพาะและความไวสูงเป็นที่น่าพอใจ ดังแสดงใน table 1 ส่วนการเลือกใช้ชุดตรวจสอบที่เหมาะสมนั้นต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์หลักหรือการนำมาใช้ประโยชน์ด้านใดบ้าง ต้องคำนึงถึงสภาวะสัตว์ในพื้นที่ ประวัติการฉีดวัคซีนหรือการติดเชื้อเป็นต้น และยังต้องคำนึงถึงชนิดสัตว์ต้องเลือกใช้ชุดตรวจสอบให้ตรงกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น indirect ELISA ต้องใช้ conjugate ที่จำเพาะต่อชนิดสัตว์ หากใช้ผิดชนิดการตรวจสอบจะไม่ได้ผล ส่วนชุดตรวจสอบของ CEDI (PRIONIC) นั้นจะเป็น blocking ELISA สามารถใช้ตรวจสอบกับสัตว์ได้ทุกชนิด ในการประเมินครั้งนี้แนะนำให้ใช้ชุดตรวจสอบของ CEDI (PRIONIC) ด้วยความเหมาะสมหลายอย่างเช่น วิธีการทดสอบเป็นแบบ blocking ELISA ซึ่งวิธีนี้ให้ความจำเพาะสูงและลด non specific reaction ทำให้ไม่เกิด false positive นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบได้กับสัตว์ทุกชนิดโดยไม่ต้องแยกชนิดเหมือน kit อื่นๆ และยังสามารถใช้ตรวจสอบสัตว์จากสัตว์ป่าได้ทุกชนิดเช่นกัน จากผล sensitivity analysis พบว่าให้ความไวสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Brocchi *et al.* (2006) ส่วนการศึกษา duration of NSP antibody ระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบแอนติบอดีต่อ non structure protein ในสัตว์ป่วยระยะ 8-10 วันหลังการติดเชื้อจนถึงระยะ 395 วัน (1 ปี) จากการศึกษาในประเทศยุโรป (Sorensen *et al.*, 1998) และตรวจพบถึงระยะ 742 วัน (2 ปี) ในประเทศบราซิล (Bergman *et al.*, 1993) ส่วนการตรวจสอบ VIA test นั้นพบว่าให้ความจำเพาะต่ำและยังผล false positive สูงถึง 34.55% ในสัตว์ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนจำนวนหลายครั้ง วิธีนี้ไม่เหมาะสมกับประเทศที่มีการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เป็นประจำและต่อเนื่อง ส่วนระยะเวลาที่สามารถตรวจพบ antibody ต่อ ViA antigen พบตั้งแต่ระยะ 1 สัปดาห์จนถึงระยะ 4 เดือนหลังการติดเชื้อ (Linhongsubongkoch *et al.*, 2000)

ประโยชน์และวัตถุประสงค์การตรวจ NSP พบว่าปัจจุบันใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเฝ้าระวัง FMDV sero-surveillance และเป็นข้อกำหนดในการยื่นขอจัดตั้งเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อขอการรับรองโดย OIE ในระดับ zoning หรือระดับประเทศโดยการใช้วัคซีนหรือไม่ใช้วัคซีน ตามข้อกำหนด OIE นั้นจะต้องมีหลักฐานหรือข้อมูลการเพื่อพิสูจน์ว่าสัตว์ในพื้นที่นั้นไม่เคยได้รับการติดเชื้อหรือสัมผัสเชื้อไวรัสมาก่อนเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปี ด้วยวิธีการตรวจสอบ NSP และจะต้องไม่ตรวจพบแอนติบอดีต่อ NSP ของ FMDV อย่างแท้จริง นอกจากนี้ประโยชน์ของการตรวจ NSP นั้นยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสัตว์เคลื่อนย้ายทั้งภายในประเทศหรือระหว่างประเทศได้ เพื่อลดข้อกีดกันทางการค้าด้านปศุสัตว์ได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับความช่วยเหลือทางวิชาการจากหน่วยงาน International Atomic Energy Agency (IAEA) ประเทศออสเตรเลีย Dr. John Crowther หัวหน้าหน่วยงาน Animal Health and Production, IAEA ขอขอบคุณ World Reference Laboratory (WRL) ประเทศอังกฤษ ที่ให้การสนับสนุนชุดตรวจสอบสำหรับใช้ในโครงการนี้จนบรรลุผลสำเร็จ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมซีรัม สารละลาย บัฟเฟอร์ต่างๆและดำเนินการตรวจสอบทางซีรัมวิทยา

เอกสารอ้างอิง

- Bergman, I.E., Mello, P.A., Neitzert, E., Beck, E. and Gomes, J. 1993. Diagnosis of persistent Aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural virus antigens. *Am J. Vet. Res.* 54 (6): 825-831.
- Bruderer, U., Swam, H., Visser, N., Brocchi, E., Grazioli, S., Esterhuysen, J.J., Vosloo, W., Forsyth, M., Aggarwal, N., Cox, S., Armstrong, R. and Anderson, J. 2004. Differentiating infection from vaccination in foot and mouth disease: evaluation of an ELISA based on recombinant 3ABC. *Vet. Microbiol.* 101: 187-197.
- Brocchi, E., Bergmann, I.E., Dekker, A., Paton, D.J., Sammine, D.J., Greiner, M., Grazioli, S., De Simone, F., Yadin, H., Haas, B., Bulut, N., Malirat, V., Neitzert, E., Goris, N., Parida, S., Sørensen, K. and De Clercq, K. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 24: 6966-6979.
- De Deigo, M., Brocchi, E., Mackay, D.K.J., De Simone, F. 1997. The non structural of polyprotein 3ABC of foot and mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to Differentiate infected and vaccinated cattle, *Arch. Virol.* 142: 2021-2033.
- Hamblin, C., Kitching, R.P., Donaldson, A., Crowther, J.R. and Barnett, R. I. T. 1997. Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for detection of antibodies against foot and mouth disease virus. *J. Immun. Methods.* 93: 122-129.
- Linchongsubongkoc, W., Nilchawee, S. and Sinsuwongwat, W. 1993. Diagnosis of foot and mouth disease virus from infected animal serum. *J. Vet. Biologics*, 1-10.
- Linchongsubongkoc, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibodies titer to foot and mouth disease virus by liquid phase blocking ELISA. *Proceedings on the 1st Annual Veterinary Biologics Conference.* 62-72.
- Linchongsubongkoc, W., Phusirimongkol, A., Patanaprosit, N., Aunpromma, D. and Thongtha, P. 2000. Development of ELISA technique for detection of antibody to 3ABC non structural protein of foot and mouth disease virus to differentiate vaccinated from infected animals. *Proceedings on the 17th Annual Livestock Seminar.* 27-42.
- Mc Vicar, J. W. and Suttmoller, P. 1970. Foot and mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection associated (VIA) antigen as a tool for epidemiological surveys. *Am.J. Epidemiol.* 94(4): 273-278.

- Pinto, A, A. and Garland, A.J.M. 1979. Immuno response to virus infection associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot and mouth disease activated by formalin or acethylethyleneimine. *J. Hyg.* 82: 41-50.
- Silberstein, E., Kaplan, G., Tobogo,O., Duffy, S. and Palma, E. 1997. Foot and mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3ABC non structural protein. *Arch. Virol.* 142: 795-805.
- Sorensen, K., Hansen, C.M., Madsen, E.S. and Madsen< K,G. 1998. Blocking ELISA using non structural protein 3D, 3AB and 3ABC produced in the baculovirus expression system. *J. Clin. Sci. Epidemiol.* 20: S17-S20.

Evaluation of various types of non structural protein kit to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus

Wilai Linchongsubongkoch¹

Abstract

The used of various types of non structural protein (NSP) kit produced by World Reference Laboratory (WRL)/United Kingdom, United Biochemical Inc. (UBI)/USA, Bommeli/ Switzerland and CEDI Diagnostic B.V. (CEDI or PRIONIC)/Switzerland to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus (FMDV) were evaluated. The tests were carried out in parallel with the detection of antibody to virus infection associated (VIA) antigen by agar gel immunodiffusion (AGID) test and the measurement of antibody to FMDV type O, A and Asia1 by LP ELISA. One thousand one hundred and ninety seven serum samples (cattle=918, buffaloes=40, pigs= 239) were used for this studied. The results found that the NSP test using kit from WRL, UBI, CEDI (PRIONIC), Bommeli and VIA test gave the high specificity in non vaccinated cattle were 100%, 99.7%, 99%, 99% and 100%, respectively. For non vaccinated pigs gave the high specificity as all 100% by WRL, UBI and VIA test. Also in single vaccination cattle and pigs, the specificity by WRL, UBI and VIA test were 99.03% 98.4% and 97.7% respectively. In the multiple vaccinated cattle and buffaloes, the specificity by WRL, UBI and VIA test were 97.73%, 100% and 65.45%, respectively. While in the FMD field outbreak area, the infected cattle were distinguished giving the high positive results by WRL, UBI, CEDI, Bommeli and VIA test, the sensitivity were 98.33%, 88.9%, 84.6%, 90.1% and 100%, respectively. In infected pigs shown the positive results by WRL, UBI and VIA test, the sensitivity were 73.33%, 80% and 100%, respectively. In addition, the sensitivity analysis by using NSP kits from UBI, CEDI (PRIONIC) and Bommeli were investigated by determining the highest dilution of serum where NSP can be detected. In overall, the NSP kit from CEDI (PRIONIC) seem to be more appropriate kit to be selected in term of high specificity, sensitivity, convenience to use for all species and wildlife animals. However, the application of this assay would be useful in sero-surveillance at national and regional level, as well as to be used as the standard test for application to the OIE recognition of FMD free zone or country with vaccination or without vaccination.

Keywords: non structural protein kit, specificity and sensitivity, foot and mouth disease virus

¹ Consultant of Department of Livestock Development and OIE Expert on foot and mouth disease, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development

เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน

คณิตา ภาสขุติ¹นพคุณ มูลสิน¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน โดยนำวัคซีนที่ละลายแล้วหยอดตาไก่อายุ 7 วัน ตัวละ 2 หยด (50 ไมโครลิตร) โดยแบ่งไก่เป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้กลุ่มที่ 1 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง (วันที่ 0, 14) กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14, 42) กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนจากบริษัทเอกชน ตามคำแนะนำของบริษัท 2 ครั้ง (วันที่ 0, 21) กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ให้วัคซีน ทั้ง 5 กลุ่ม ทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 เพื่อนำซีรัมไปตรวจหาความคุ้มโรคโดยวิธี Virus neutralization เพื่อหาค่า Neutralization Index (NI) และตรวจแอนติบอดี โดยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่า การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง และการทำวัคซีนของบริษัทเอกชน 2 ครั้งให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อสเตรปโทกอกคัส โดยมีค่า NI เท่ากับ 2.90, 3.46, 5.10 และ 2.67 ตามลำดับ และความคุ้มโรคต่อสเตรปโทกอกคัส มีค่า NI เท่ากับ 2.46, 2.25, 2.51 และ 3.34 ตามลำดับเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 70 วัน และทุกกลุ่มให้ความคุ้มโรคโดยมีค่า NI มากกว่า 2 ตั้งแต่วันที่ 14 หลังการทำวัคซีน จึงผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ASEAN ทั้งหมด สำหรับการตรวจแอนติบอดีโดยวิธี ELISA พบว่ามีเพียงกลุ่มไก่ที่ได้รับการทำวัคซีนจากบริษัทเอกชนเท่านั้น ที่มีค่า sample to positive ratio (S/P ratio) มากกว่า 0.20 ขณะที่ไก่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ มีค่า S/P น้อยกว่า 0.2 ทุกกลุ่ม อาจเนื่องจากแอนติเจนของชุดทดสอบเป็นสเตรปโทกอกคัสเดียวกับวัคซีนจากบริษัทเอกชน จึงควรพัฒนาชุดทดสอบแอนติบอดีให้ตรงกับสเตรปโทกอกคัสของวัคซีนกรมปศุสัตว์ การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ โดยให้วัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง และวัคซีนเอกชนสามารถให้ความคุ้มโรคตามเกณฑ์มาตรฐานได้ทุกกลุ่มการทดลอง แต่สำหรับวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์แนะนำให้ทำวัคซีนจำนวน 2 ครั้ง เพื่อการทำวัคซีนมีประสิทธิภาพ คุ้มค่ากับค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับการทำงานในพื้นที่

คำสำคัญ: วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน นิวทราไลซิง แอนติบอดี อีไลซ่า นิวทราไลซ์เซชัน อินเด็กซ์

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อในไก่ (Avian infectious bronchitis, IB) เป็นโรคติดต่อแบบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนต้นของไก่ มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Infectious bronchitis virus (IBV) การติดต่อโรคนี้ จากการสัมผัสไก่ป่วยหรือ พาหะ ไก่ป่วยถ่ายเชื้อไวรัสปนมากับอาหาร น้ำ สิ่งรองนอน โดยการหายใจ ไก่แม่พันธุ์จะถ่ายเชื้อไวรัสผ่านไข่ได้ มีการแพร่กระจายในฝูงอย่างรวดเร็ว (ทัศนีย์และคณะ, 2539) ไก่ป่วยจะแสดงอาการน้ำมูกน้ำตาไหล อ้าปากหายใจ ในไก่ไข่ เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในท่อนำไข่ (oviduct) เป็นผลทำให้ผลผลิตไข่ลดลง เปลือกไข่มีสีซีด และไข่ขาวเหลว นอกจากนี้เชื้อไวรัสบางสายพันธุ์เพิ่มจำนวนในไตทำให้เกิดไตอักเสบ (interstitial nephritis) พบโรคนี้ได้ทั่วโลก ในฝูงไก่ที่ติดเชื้อไวรัส เชื้อจะแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว อัตราป่วยอาจสูงถึง 100% แต่มีอัตราการตายต่ำ อย่างไรก็ตามอัตราการตายอาจเพิ่มขึ้น ในกรณีติดเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดไตอักเสบ (nephropathogenic type) หรือในรายที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสอื่นแทรกซ้อน (ช้องมาศและคณะ, 2551)

เชื้อ IBV จัดอยู่ใน แฟมมีลี Coronaviridae ซับแฟมมีลี Orthocoronavirinae จีนัส Gammacoronavirus สปีชีส์ Avian coronavirus หรือเรียกว่า Avian infectious bronchitis virus หรือ Infectious bronchitis virus มีลักษณะสายพันธุ์กรรม (genome) เป็นแบบ RNA สายเดี่ยว มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิดคือ spike glycoprotein, envelope, membrane glycoprotein และ nucleocapsid protein โปรตีนส่วน spike (S) ที่อยู่บริเวณเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส ประกอบด้วย glycopolyptide 2 ส่วนย่อย คือ S1 และ S2 โปรตีนส่วน S1 มีหน้าที่สำคัญในการจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (receptor) เพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ และเป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์สร้าง neutralizing antibodies ซึ่งเป็น protective immunity ที่ร่างกายสัตว์ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ IB และแอนติบอดีนี้ยังแสดงถึงซีโรไทป์จำเพาะของเชื้อไวรัสอีกด้วย (Cavanagh, 2007) เนื่องจากโรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ เกิดจากเชื้อไวรัส จึงไม่มียารักษาเฉพาะ วิธีที่ดีที่สุด คือ การควบคุมป้องกันโรค การทำวัคซีนร่วมกับการเน้นระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ ถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (ช้องมาศ, 2561) ปัจจุบัน ฟาร์มเลี้ยงไก่ส่วนใหญ่นิยมให้วัคซีนป้องกันโรค IBV ทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย ทำให้ระดับภูมิคุ้มกันค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในไก่ระยะไข่ ซึ่งหากไก่ระยะไข่ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรค IBV ติดเชื้อไวรัส จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเปลือกไข่และส่วนประกอบภายในไข่เท่านั้น โดยมีผลกระทบน้อยมากต่อการให้ผลผลิต (นิวัตร, 2551)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ได้ผลิตวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดเชื้อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง สำหรับป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดเชื้อในไก่ วิธีใช้ในไก่กระทาง โดยการหยอดตาหรือจุ่ม ตัวละ 2 หยด ครั้งแรกเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 3-4 สัปดาห์ สำหรับไก่ไข่ให้วัคซีนสองครั้งแรกเช่นเดียวกับในไก่กระทาง ครั้งที่สามเมื่ออายุ 6-8 สัปดาห์และซ้ำทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก) ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ได้มีการรณรงค์ การทำวัคซีนในไก่ ตามท้องที่ต่างๆของประเทศทุก 3 เดือน ทางสทช. ร่วมกับสำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ ได้ลงพื้นที่ ติดตามประสิทธิภาพวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดเชื้อในไก่ และพบปัญหาในแต่ละท้องที่ไก่ที่ได้รับวัคซีนของกรมปศุสัตว์ มีระดับแอนติบอดีแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากจำนวนครั้งในการทำวัคซีน สายพันธุ์ไก่ อายุไก่ และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดเชื้อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 1, 2, 3 ครั้ง และวัคซีนของบริษัทเอกชน จำนวน 2 ครั้ง (ตามคำแนะนำของบริษัท) แล้วทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 เพื่อนำซีรัมไปตรวจหาความคุ้มโรคต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดเชื้อด้วยวิธี Virus neutralization (VN) และตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดเชื้อ ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลในการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดเชื้อในท้องที่ และสร้างความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพของวัคซีนให้แก่เกษตรกรในการใช้วัคซีนของกรมปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

1. วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นวัคซีนเชื้อเป็น สเตรนทองถิ่น ชนิดดูดแห้ง ซึ่งมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ fifty percent embryo infectious dose (EID₅₀) ต่อโดส ขนาดบรรจุ ขวดละ 100 โดส ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ชุดผลิตที่ 25/62 วันผลิต 21/2/62 วันหมดอายุ 21/2/63

2. วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นวัคซีนเชื้อเป็น สเตรนแมสซาชูเซตส์ (H120) ชนิดดูดแห้ง ปริมาณไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ EID₅₀ ต่อโดส ขวดละ 1,000 โดส ผลิตจากบริษัทเอกชน ชุดผลิตที่ 812820 วันผลิต 9/2561 วันหมดอายุ 3/2563

สัตว์ทดลอง

1. ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะโรค (SPF) ตามระบุ 18 โรค สายพันธุ์ Lohmann Selected Leghorn (LSL) จากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ สห. อายุ 7 วัน จำนวน 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มๆละ 10 ตัว ทำการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยมีระบบการเลี้ยงแบบ Strict Hygienic Conventional และปลดสัตว์ทดลองด้วยวิธี การใช้สารเคมีประเภทยาฉีด (Injectable agent) (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, 2014) ได้แก่ แอลกอฮอล์ (AVMA, 2020) ฉีดบริเวณกระดูกท้ายทอย (Occipital bone) และทำลายด้วยวิธีเผาซาก

2. ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ สายพันธุ์ LSL จากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ สห.อายุ 9-10 วัน จำนวน 1,440 ฟอง โดยมีระบบการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อก่อโรคเฉพาะ และหลังเสร็จสิ้นการทดลองทำลายด้วยวิธีการเผา

การเตรียมและให้วัคซีน

1. นำวัคซีนผลิตจากกรมปศุสัตว์ มาจำนวน 3 ขวด ละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน ขวดละ 5 ซีซี นำวัคซีนที่ละลายแล้วทั้ง 3 ขวดมาผสมรวมเป็นขวดเดียวกัน เขย่าให้เข้ากัน และนำวัคซีนผลิตจากบริษัทเอกชน มาจำนวน 3 ขวด ละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน ขวดละ 30 ซีซี นำมาผสมรวมเป็นขวดเดียวกันเช่นเดียวกับวัคซีนของกรมปศุสัตว์

2. นำวัคซีนที่เตรียมแล้ว มาหยอดตาไก่ ตัวละ 2 หยด (50 ไมโครลิตร) แบ่งไก่เป็น 5 กลุ่มๆละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง ห่างกัน 14 และ 28 วันตามลำดับ นับจากให้วัคซีนครั้งแรก กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนผลิตจากบริษัทเอกชน 2 ครั้ง ตัวละ 1 โดส ห่างกัน 21 วัน ตามคำแนะนำของบริษัท กลุ่มที่ 5 หยอดตาไก่ด้วยน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม) และทั้ง 5 กลุ่ม ทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70

การทดสอบหาความคุ้มโรคโดยวิธี Virus neutralization (VN) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559)

ทำการทดสอบความคุ้มโรคโดยวิธี VN ทั้งหมด 6 ครั้ง จากตัวอย่างซีรัมไก่ที่เจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ในแต่ละครั้งมีการเตรียม virus control 2 ชุด และ virus mixture 10 ชุด จากไก่ทดลองกลุ่ม 1 – 5 โดยใช้ไวรัสอ้างอิงสเตรนทองถิ่น และสเตรนแมสซาชูเซตส์ แบ่งเป็น virus control 1 ชุด และ virus mixture 5 ชุดในแต่ละสเตรน

1. การเตรียมซีรัม

เตรียมซีรัมที่ต้องการทดสอบ โดยการเก็บเลือดจากไก่ SPF ตำแหน่งเส้นเลือดดำบริเวณปีก (wing vein) ตัวละ 2 ซีซี ซึ่งในแต่ละกลุ่มนำมาใส่ลงใน pettridish เดียวกัน นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 °C นาน 4-6 ชั่วโมง เมื่อส่วนของซีรัมแยกตัวแล้ว จึงดูดเก็บซีรัมใสหลอดทดลอง จากนั้นนำไป inactivated ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที (OIE, 2018)

2. การเตรียมไวรัส โดยการเตรียมไวรัสอ้างอิงสเตรนทองถิ่น และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ได้มาจากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 °C ก่อนนำมาใช้ ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-20 นาที แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยการเตรียมไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนทองถิ่น และสเตรน แมสซาชูเซตส์ ดังนี้

2.1 การไตเตรทชุด virus control โดยการใช้ไวรัสอ้างอิงในการไตเตรทไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ สำหรับเป็นแอนติเจนทดสอบแบบ 10 fold dilutions ด้วยสารละลาย PBS ตั้งแต่ dilution ที่ $10^{-1} - 10^{-7}$ โดยใช้ไวรัส 0.5 มล. และสารละลาย PBS 4.5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า¹

2.2 การไตเตรทชุด virus mixture โดยนำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ $10^{-1} - 10^{-4}$ จากข้อ 2.1 มา dilution ละ 0.5 มล. ผสมกับตัวอย่างซีรัมที่จะทำการทดสอบ 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

3. การฉีดไข่ โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ ทาง Allantoic cavity โดยการใช้กระบอกฉีดยา Tuberculin พร้อมเข็มขนาด 26Gx0.5 นิ้ว ดูดสารละลายไวรัสที่เจือจาง แหงเข็มเข้าไขไก่ฟัก ให้ทะลุเยื่อ Air sac เข้าไปใน Allantoic cavity แบ่งฉีดเป็น 2 ชุดดังนี้

3.1 ฉีดชุด virus control นำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ $10^{-4} - 10^{-7}$ dilution เข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 9-10 วัน dilution ละ 5 ฟองๆ ละ 0.1 มล. นำเข้าตู้ฟักไข่² ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน

3.2 ฉีดชุด virus mixture นำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ $10^{-1} - 10^{-4}$ dilution เข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 9-10 วัน dilution ละ 5 ฟองๆ ละ 0.1 มล. นำเข้าตู้ฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน

4. คำนวณหาค่า virus titer

4.1 ส่องไข่ และบันทึกการตายของตัวอ่อนหลังฉีดเชื้อทุกวัน จนครบ 7 วัน แล้วนับจำนวนไข่ตาย

4.2 คำนวณหาปริมาณ virus titer ของชุด virus control และ virus mixture ซึ่งมีหน่วยเป็น $\text{EID}_{50}/0.1$ มล. ตามวิธี Reed and Muench (Ramakrishnan, 2016; Reed and Muench, 1938; OIE, 2018)

4.3 นำค่า virus titer ของ virus control ลบด้วย virus mixture ผลต่างระหว่างค่า virus titer ของ virus control และ virus mixture ที่ได้คือค่า Neutralization index (NI) ซึ่งซีรัมไก่ที่ได้รับวัคซีนที่มีความคุ้มโรคตามมาตรฐานจะมีค่า NI ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป (ASEAN, 2018)

การตรวจหาระดับแอนติบอดี โดยวิธี ELISA (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561)

ตรวจแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป³ ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม ด้วย sample dilution reagent ในอัตราส่วน 1:50 ในไมโครเพลท โดยใช้ซีรัม 5 μl ต่อ sample dilution reagent 245 μl จากนั้นเจือจางต่อ โดยการนำซีรัมที่เจือจาง 1:50 มา 10 μl รวมกับ sample dilution reagent 90 μl ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1:500 แล้วนำซีรัมที่เจือจางแล้วใส่ลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 100 μl ใส่ตัวควบคุมผลบวกและตัวควบคุมผลลบ ลงใน ELISA plate อย่างละ 2 หลุมๆละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างเพลทด้วย wash solution 3 ครั้ง และเติม Anti-chicken Alkaline Phosphatase conjugate หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างเพลทด้วย wash solution 3 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (pNPP) หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 100 μl นำ ELISA plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง ELISA reader⁴ ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร นำค่า OD ที่อ่านผลได้ไปคำนวณหาค่า Sample to positive ratio (S/P ratio) ตามสูตรดังนี้

$$\text{S/P} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมบวก} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}$$

การแปลผล

ค่า S/P ratio มีค่าน้อยกว่า 0.2 แปลผลเป็นลบ แสดงว่า ซีรัมไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ และในกรณีที่ค่า S/P ratio มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.2 แปลผลเป็นบวก แสดงว่า ซีรัมมีแอนติบอดีต่อเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่

¹ IKA MS1, Germany

² Deltavet, Thailand

³ Biochek®, UK

⁴ ASYS UVM340, UK

ผล

ผลการทดสอบหาความคุ้มโรคด้วยวิธี VN จากการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อของกรมปศุสัตว์ ในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ ในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ทั้งการทำวัคซีน จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยให้ความคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการทำวัคซีนของบริษัทเอกชน สามารถคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลองเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1) และจากการสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อน เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ พบว่า ตัวอ่อนไขไก่ฟักมีลักษณะแคระแกรน และขดม้วนตัวแน่น แตกต่างจากตัวอ่อนไขไก่ฟักปกติ ดังรูปที่ 1

สำหรับผลการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ทั้งการทำวัคซีน จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือตรวจไม่พบแอนติบอดีตลอดระยะเวลาการทดลอง ต่างจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ให้ผลบวกตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

ตามมาตรฐาน ASEAN (2018) กำหนดเกณฑ์การทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดเชื้อเป็น วัคซีนต้องมีค่า Neutralization index (NI) จากการทดสอบด้วยวิธี VN ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป จึงถือว่าผ่านการทดสอบ และมีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ทั้ง 1, 2 และ 3 ครั้ง ผ่านการทดสอบทั้งหมด โดยให้ความคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง เช่นเดียวกับวัคซีนของบริษัทเอกชน (ตารางที่ 1) การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ทั้ง 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ค่า NI มากกว่า 2 ทั้งหมด แต่การทำวัคซีน 2 และ 3 ครั้งจะให้ความคุ้มโรคสูง ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายที่เรียกว่า Anamnestic response (Winterfield et al., 1976) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ IBV เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immune response) และระบบแอนติบอดี (Chhabra et al., 2015) ไม่ว่าจะเป็น IgG, IgA และ CD8 T-Lymphocyte ทั้งที่เกิดจากรับเชื้อโดยธรรมชาติ หรือวัคซีน จึงควรทำวัคซีนกรมปศุสัตว์มากกว่า 1 ครั้ง เพื่อรักษาระดับ Neutralizing antibody ให้อยู่ในระดับสูง และยาวนาน แต่ในการปฏิบัติงานในท้องที่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายและเวลา ดังนั้นเพื่อให้การทำวัคซีนมีประสิทธิภาพ คำนึงถึงค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับการทำงานในท้องที่สำหรับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จึงแนะนำให้ทำวัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน หรือปฏิบัติตามคำแนะนำการใช้วัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถคุ้มโรคได้เทียบเท่าวัคซีนของบริษัทเอกชน และมีภูมิคุ้มกันที่ยาวนานมากขึ้น สามารถป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับรายงานของ De Wit and Cook (2014) กล่าวถึงปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการทำวัคซีน ได้แก่ สายพันธุ์ไก่ อายุ ความถี่ในการให้วัคซีน ระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ (maternal immunity) ประสิทธิภาพของวัคซีน และสภาพแวดล้อมที่เลี้ยงที่มีสุขลักษณะที่ดี

การตรวจด้วยวิธี VN ในการทดลองนี้เลือกใช้ไวรัสอ้างอิง 2 สเตรน ได้แก่ สเตรนทองถิ่นและสเตรนแมสซาชูเซตส์ เพื่อทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกรมปศุสัตว์ และวัคซีนบริษัทเอกชน เพื่อให้เกิดความครบถ้วนสมบูรณ์ของกระบวนการทดสอบทั้งที่เป็น Homologous strain (ใช้ไวรัสอ้างอิงสเตรนเดียวกับวัคซีน) และ Heterologous strain (ใช้ไวรัสอ้างอิงคนละ สเตรนกับวัคซีน) โดยพบว่าความคุ้มโรคที่เกิดจากการทำวัคซีนทั้งของกรมปศุสัตว์ และบริษัทเอกชนโดยใช้ไวรัสอ้างอิงทั้ง 2 สเตรน ให้ผลในแนวทางเดียวกัน แต่การใช้ไวรัสอ้างอิงที่มีสเตรนตรงกับสเตรนที่ผลิตวัคซีน จะให้ค่าความคุ้มโรคสูงกว่าการใช้ไวรัสอ้างอิงต่างกับสเตรนที่ผลิตวัคซีน (ตารางที่ 1) โดยค่า

NI อาจสูงถึง 4.5 - 7 เมื่อใช้ Homologous strain และอาจต่ำกว่า 1.5 ได้ ถ้าเป็น Heterologous strain ระหว่างไวรัสอ้างอิงกับวัคซีน (OIE, 2018)

การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ตรวจไม่พบแอนติบอดีตลอดระยะเวลาการทดลอง ต่างจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ให้ผลบวกตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 2) สาเหตุที่วัคซีนของกรมปศุสัตว์ ตรวจไม่พบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA อาจเกิดจากการทดสอบที่มีความเฉพาะต่อซีโรไทป์ (Serotype-specific test) ซึ่งเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่มีหลายซีโรไทป์ และเชื้อต่างซีโรไทป์กันจะไม่ให้ภูมิคุ้มกันโรคข้ามกัน (ช้องมาศและคณะ, 2551) โดยตามรายงานผลงานวิจัยของราชวิทยาลัยและคณะ (2558) ได้ทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนโครงสร้างส่วนไกลโคโปรตีน spike (S1) โดยการวิจัยได้วิเคราะห์แยกกลุ่มลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ที่องถิ่นจากวัคซีนกรมปศุสัตว์ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์แมสซาชูเซตส์ สอดคล้องกับงานวิจัยของช้องมาศและคณะ (2551) ได้ศึกษาซีโรไทป์จากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ระบาดในไก่ทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่างด้วยวิธี Virus neutralization โดยใช้ไวรัสอ้างอิง 5 สเตรน คือ Massachusetts, Connecticut, H52, H120 และวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ พบว่า 2 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็น ซีโรไทป์เดียวกับไวรัสวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ส่วนอีก 3 ตัวอย่างไม่จัดอยู่ในซีโรไทป์ใดๆ และตัวอย่างเชื้อไวรัส 5 ตัวอย่างนี้ไม่ได้เป็นซีโรไทป์เดียวกันกับสเตรนแมสซาชูเซตส์ แสดงให้เห็นว่าสเตรนแมสซาชูเซตส์ กับ สเตรนของวัคซีนกรมปศุสัตว์อยู่คนละกลุ่มกัน แอนติเจนที่ใช้เคลือบผิวชุดทดสอบ ELISA ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเป็นสายพันธุ์แมสซาชูเซตส์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ผลิตวัคซีนของบริษัทเอกชน แต่วัคซีนของกรมปศุสัตว์ผลิตจากสายพันธุ์ที่องถิ่น ซึ่งเป็นไวรัสคนละกลุ่มสายพันธุ์จากเชื้อไวรัสที่ใช้แอนติเจนมาผลิตเป็นชุดทดสอบ ELISA ทำให้ตรวจพบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA เฉพาะไก่ที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ดังนั้นกรมปศุสัตว์ควรพัฒนาชุดทดสอบ ELISA โดยใช้สายพันธุ์ที่องถิ่นเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจหาแอนติบอดีในฝูงสัตว์หลังจากทำวัคซีน

การใช้วัคซีนเพื่อควบคุม และลดการสูญเสียเนื่องจากการระบาดของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ยังเป็นเรื่องที่มีความยุ่งยากเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมเรื่อยมา และยังคงเป็นปัญหาอีกต่อไป เนื่องจากการใช้วัคซีนที่มีความคุ้มโรคไม่ดีพอ และไม่ครอบคลุมสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในท้องที่ (Field strain) ที่มากพอ และใช้ไม่ถูกต้องเหมาะสม เช่น เจือจางมากเกินไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไวรัสจากสเตรนอ่อนกำลัง เป็นสเตรนรุนแรง และทำให้พันธุกรรมของไวรัสไม่เสถียร (Genetic instability) (Bijlenga, et al., 2004) ในประเทศไทย จากการศึกษาของ Munyahongseและคณะ (2020) พบว่า IBV เกิดการ Recombination ระหว่างไวรัส GI-19 และ GI-13 ทำให้เกิด variant strain ใหม่ซึ่งสร้างความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่มากขึ้น เพื่อให้การทำวัคซีนเกิดประสิทธิผลมากที่สุด จากการทบทวนคำแนะนำการทำวัคซีน (Update vaccination strategies) โปรแกรมแนะนำการทำวัคซีนล่าสุด ณ ปัจจุบันคือ การใช้วัคซีนเชื้อเป็นในไก่กระหวดและไก่สาวแรกรุ่น ส่วนวัคซีนเชื้อตายควรใช้ variant strain เตรียมเป็น Autogenous inactivated vaccine เพื่อควบคุมโรคในไก่ไข่และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Jackwood and De Wit, 2020)

สรุป

การศึกษานี้เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ สามารถให้ความคุ้มโรคได้เทียบเท่าวัคซีนเอกชน โดยแนะนำให้วัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน เพื่อให้การทำวัคซีนมีประสิทธิภาพ คำนวณค่ากับค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับการทำงานในพื้นที่ ส่วนการตรวจแอนติบอดีเพื่อติดตาม

ประเมินผลการให้วัคซีนควรใช้วิธี Virus neutralization หรือวิธี ELISA ที่ใช้ชุดทดสอบที่ผลิตจากแอนติเจนที่ตรงกัน (homologous) กับสายพันธุ์ของไวรัสวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ รศ.สพ.ญ.ดร. กรรณภรณ์ สุริยผล ที่มอบเอกสารอ้างอิง ประกอบการเขียนรายงานฉบับเต็ม คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำการใช้สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้าราชการและพนักงาน ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก และกลุ่มสัตว์ทดลอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ช่องมาศ อันตรเสน ศศิวิมล ทองมี บัณฑิต นวลศรีฉาย และมณฑิรา อินทรสาร 2551 วิเคราะห์ชิ้นส่วน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ในภาคใต้ของประเทศไทย วารสารสัตวแพทย์ 18(3): 163-176
- ช่องมาศ อันตรเสน 2561 Infectious bronchitis บทความโรคสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก จ.ราชบุรี กรมปศุสัตว์
<http://vrd-wp.dld.go.th/webnew/index.php/th/public-article> 21 พฤศจิกายน 2561
- ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ สุรีย์ ธรรมศาสตร์ ปณันท์ ธนเจริญวัชร จิรา คงครอง และเอกรินทร์ วัฒนพลาชัยกุล (บรรณาธิการ) 2539 คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย
- ธวัชชัย โพธิ์เสียง สุชีวา จันทร์หนู และสุวิทย์ โชติพันธ์ 2558 ลักษณะทางโมเลกุลของยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไตซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย เชียงใหม่สัตวแพทย์สาร 13(2) : 81-91
- นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย 2551 การพัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 11-29
http://cuir.car.chula.ac.th/bitstream/123456789/8698/3/Nivat_ELISA.pdf 30 พฤศจิกายน 2562
- ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล 2014 การการุณฆาต (Euthanasia) โดยการใช้สารเคมี
และแหล่งที่มา www.nlac.mahidol.ac.th/acth/index.php/km-Lab-animals/39-km-animals/130-euthanasia-physical-method-2 24 เมษายน 2563
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการทดสอบหาความคุ้มโรคของวัคซีนเชื้อเป็นหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (SOP-QCP-095) ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-5
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโรค Infectious bronchitis virus ของไก่ปลอดเชื้อเฉพาะด้วยชุดทดสอบ ELISA ยี่ห้อ Biochek (SOP-QCP-108) ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-6
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2562 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ หจก.วนิดาการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 14
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการ Ten-fold Dilution (SOP-QC-002) ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3

- American Veterinary Medical Association. 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Pp35
<http://www.avma.org/sites/default/files/2002-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf>.
24 เมษายน 2563
- ASEAN. 2018. ASEAN Standard requirements for infectious bronchitis vaccine, Live. In Manual of ASEAN standard for animal vaccine, Livestock Publication series No. 2A, 3rd ed. pp. 3-5.
- Bijlenga, G., Cook, J.K., Gelb, J. and De Wit, J. J. 2004. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from The Netherlands as a vaccine : a review. 2004. Avian Pathology. 33: 550-557.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 38: 281-297.
- Chhabra, R., Forrester, A., Lemiere, S., Awad, F., Chantrey, J. and Ganapathy. K. 2015. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain. Clinical and Vaccine Immunology. 22: 1050-1059.
- De Wit, J. J. and Cook, J.K. 2014. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. Avian Pathology. 43: 485-497.
- Jackwood, M. W., De Wit, S. 2020. Infectious Bronchitis. In : David E. Swayne, chief editors. Diseases of Poultry. 14. UK: Wiley-Blackwell. pp. 167-188
- Munyahongse, S., Pohuang, T., Nonthabenjawan, N., Sasipreeyajan, J. and Thontiravong, A. Genetic characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014-2016 : identification of a novel recombinant variant. 2020. Poultry Science. 99: 1888-1895.
- Office International des Epizooties, OIE. 2018. Avian infectious bronchitis. In manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 3.3.2 . pp. 796-809
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27:493-497.
- Ramakrishnan, M. A. 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J. virol. 5(2): 85-86
- Winterfield, R. W., Fadly, A. M. and Hoerr, F. J. 1976. Vaccination and revaccination with a Holland (H) strain of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 20: 369-374.

ตารางที่ 1 ความคุ้มโรคในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนท้องถิ่นและสเตรนแมสซาชูเซตส์จากการทำวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน ตามลำดับ

กลุ่มที่	การให้วัคซีน	ไวรัสอ้างอิง	ค่า Neutralization index (NI)					
			วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	วันที่ 56	วันที่ 70
1	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง วันที่ 0	สเตรนท้องถิ่น	1.95	5.78	2.25	3.45	3.85	2.90
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	1.10	2.00	2.40	2.00	2.30	2.46
2	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง วันที่ 0 และ 14	สเตรนท้องถิ่น	1.28	5.38	2.78	5.15	5.46	3.46
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	1.13	2.25	3.49	2.30	2.18	2.25
3	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง วันที่ 0, 14 และ 42	สเตรนท้องถิ่น	1.28	5.38	2.60	5.07	5.73	5.10
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	0.85	2.61	4.54	2.40	2.25	2.51
4	ให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง วันที่ 0 และ 21	สเตรนท้องถิ่น	1.10	5.78	2.63	5.73	4.00	2.67
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	0.80	5.07	4.48	5.87	3.85	3.34
5	กลุ่มควบคุม (ไม่ทำวัคซีน)	สเตรนท้องถิ่น	0.85	1.28	1.13	1.28	1.13	1.10
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	1.13	1.28	1.10	1.80	1.15	1.40

หมายเหตุ ค่า Neutralization index (NI) มากกว่า 2.00 ถือว่าให้ความคุ้มโรค (ASEAN, 2018)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย S/P ratio (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ 0, 14, 28, 42, 56, และ 70 วัน หลังการให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกับไก่ของกรมปศุสัตว์ 1, 2 และ 3 ครั้ง และให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง

กลุ่มที่	การให้วัคซีน	ค่าเฉลี่ย S/P ratio (Mean $\pm$ SD)					
		วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	วันที่ 56	วันที่ 70
1	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง	0.0536 $\pm$ 0.0373	0.0673 $\pm$ 0.0606	0.0696 $\pm$ 0.0535	0.0707 $\pm$ 0.0571	0.0631 $\pm$ 0.0605	0.0731 $\pm$ 0.0384
2	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง	0.0561 $\pm$ 0.0371	0.0391 $\pm$ 0.0265	0.0577 $\pm$ 0.0307	0.0576 $\pm$ 0.0480	0.0713 $\pm$ 0.0267	0.0540 $\pm$ 0.0365
3	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง	0.0586 $\pm$ 0.0402	0.0603 $\pm$ 0.0797	0.0614 $\pm$ 0.0604	0.0520 $\pm$ 0.0415	0.0563 $\pm$ 0.0387	0.0609 $\pm$ 0.0506
4	ให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง	0.0594 $\pm$ 0.0376	0.3250 $\pm$ 0.1782	0.5219 $\pm$ 0.1831	0.4731 $\pm$ 0.2134	0.5143 $\pm$ 0.1506	1.1664 $\pm$ 0.3674
5	กลุ่มควบคุม (ไม่ทำวัคซีน)	-0.1816 $\pm$ 0.0116	-0.1545 $\pm$ 0.0220	0.0198 $\pm$ 0.0712	0.0289 $\pm$ 0.0126	0.0383 $\pm$ 0.0114	0.0239 $\pm$ 0.0197

หมายเหตุ ค่า S/P ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 0.2000 แสดงว่าซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกับ
ค่า S/P ratio น้อยกว่า 0.2000 แสดงว่าซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกับ



รูปที่ 1 embryo อายุ 7 วัน negative control (ซ้าย) embryo อายุ 7 วัน ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (ขวา)

Comparison of neutralizing antibody titer in specific pathogen- free chicken after vaccination with Department of Livestock Development and commercial infectious bronchitis vaccine

Kanita Bhasathiti¹ Noppakun Moolsin¹

Abstract

This study aimed to compare the neutralizing antibody titer in specific pathogen-free (SPF) chickens after vaccination between the Department of Livestock Development (DLD) and infectious bronchitis virus (IBV) commercial vaccine. Fifty SPF chickens were divided into five groups of 10 chickens each. Group 1 was vaccinated by a local strain live IBV vaccine (DLD) once. Group 2 was vaccinated by the DLD vaccine twice, and group 3 was immunized by the DLD vaccine thrice, while group 4 was vaccinated by Massachusetts strain (H120) live IBV commercial vaccine twice as recommended. Group 5 was free from the IBV vaccine (control). Blood samples were collected on days 0, 14, 28, 42, 56, and 70 after vaccination. Sera samples of all animal groups were inspected for immune responses and protection by virus neutralization assay to defined the value as Neutralization index (NI). Moreover, the chicken sera were detected for total antibody against IBV antigen by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique.

The results showed that chicken vaccinated with DLD vaccine 1, 2, and 3 times compare with IBV commercial vaccine vaccinated 2 times protected from IBV local strain; NI were 2.9, 3.46, 5.10, and 2.67, respectively. Meanwhile, all vaccinated groups protected from IBV mass strain, NI were 2.46, 2.25, 2.51, and 3.34, respectively. All sera showed NI above 2 at day 14 post-vaccination until day 70 implies that both vaccines complied with regulatory standards. The antibody detection by ELISA considers positive only sera from chicken group 4, vaccinated with the Massachusetts strain, with S/P greater than 0.2, whereas all sera samples vaccinated with a local strain were negative. It is possible that owing to the coating antigen on the ELISA plate is the homologous antigen as a commercial vaccine (mass). Consequently, the In-house ELISA with local strain IBV should be developed.

Therefore, IBV vaccination with the DLD or commercial vaccine provides the same protective immunity.

Keywords: Infectious bronchitis vaccine, Neutralizing antibody, ELISA, Neutralization Index

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19

จิณณพัต ปัญจพันธ์พงศ์¹สุพายา ตรีกมล¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการหาสูตรตำรับที่เหมาะสมเพื่อนำไปปรับปรุงการผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิสชนิดทำแห้งของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ การทดลองแบ่งเป็น 5 สูตรตำรับ ซึ่งเป็นการผสมกันระหว่างเชื้อ *Brucella abortus* 1 มล. กับสเตบิไลเซอร์ 1 มล. ซึ่งแต่ละสูตรตำรับมีสเตบิไลเซอร์ดังนี้ สูตรตำรับ 1 ประกอบด้วย 2.5% w/v enzymatic digest of casein, 5% w/v sucrose และ 1% w/v sodium glutamate ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สูตรตำรับ 2 ประกอบด้วย 5% w/v enzymatic digest of casein, 10% w/v sucrose และ 2% w/v sodium glutamate ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สูตรตำรับ 3 ประกอบด้วย 5% w/v polyvinylpyrrolidone (PVP), 10% w/v lactose ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สูตรตำรับ 4 ประกอบด้วย 10% w/v PVP และ 20% w/v lactose ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสูตรตำรับ 5 ประกอบด้วย 2.5% w/v enzymatic digest of casein, 5% w/v sucrose, 1% w/v sodium glutamate, 5% w/v PVP และ 10% w/v lactose ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการทำแห้งและตรวจสอบคุณภาพวัคซีนที่ได้ ได้แก่ การทดสอบคุณสมบัติทั่วไป การทดสอบหาปริมาณความชื้น การทดสอบความบริสุทธิ์ และการทดสอบปริมาณเชื้อมีชีวิต

ผลทดสอบวัคซีนทั้ง 5 สูตรตำรับได้ผลดังนี้ ผลทดสอบคุณสมบัติทั่วไปและผลทดสอบความบริสุทธิ์ผ่านเกณฑ์ทุกตำรับ ผลทดสอบปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งของสูตรตำรับที่ 1 ถึง 5 เท่ากับ 86.67 ± 4.16 , 88.00 ± 6.63 , 6.80 ± 0.84 , 34.93 ± 1.10 และ $24.80 \pm 0.87 \times 10^9$ CFU/dose ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าสูตรวัคซีนตำรับที่ 2 และสูตรตำรับที่ 1 เป็นสูตรตำรับที่มีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งสูงที่สุดตามลำดับ แม้ไม่แตกต่างกันชัดเจน จึงเห็นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณความเข้มข้นที่ดีที่สุดเพื่อให้เห็นความแตกต่างชัดเจนกว่านี้ และศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งต่อไป

คำสำคัญ: การทำแห้งแบบเยือกแข็ง สูตรตำรับ วัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคบริูเซลโลซิสหรือโรคแท้งติดต่อเป็นโรคติดต่อชนิดเรื้อรังในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Burcella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ non-spore-forming intracellular bacteria (Godfroid and Kasbohrer, 2002; Moreno, 2002; Rafai, 2002) มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ เนื่องจากทำให้ผลผลิตลดลง จากการเป็นหมัน ผสมไม่ติด โดยสัตว์ที่ป่วยจะมีอาการไม่ชัดเจนจึงเป็นตัวแพร่โรคที่สำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์สู่คน (Zoonosis) โรคบริูเซลโลซิสในคน ที่พบในประเทศไทย ตามสถิติของกระทรวงสาธารณสุข ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) รองลงมาคือเชื้อ *Brucella abortus* (*B. abortus*) (มนยา, 2552 ; สมพงษ์ และคณะ, 2556) ซึ่งผู้ป่วยจะมีการไข้ ปวดเมื่อยตามตัว และข้อ ในรายที่ติดเชื้อจากแพะ แกะ เป็นเชื้อ *B. melitensis* เรียกว่า Malta fever ถ้าติดเชื้อจากโค เป็นเชื้อ *B. abortus* เรียกว่า Undulant fever (Quinn et al., 1994) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มคนที่มีอาชีพเลี้ยงสัตว์หรือเคยสัมผัสกับตัวสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคเป็นประจำในงานอาชีพ การรักษาผู้ป่วยต้องใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันหลายชนิด และใช้ระยะเวลานาน (Eric et al., 2013) จึงมีความพยายามจะป้องกันโรคโดยใช้วัคซีน (Nicoletti, 1990) ในประเทศไทยมีมาตรการควบคุมป้องกันและกำจัดโรคนี้นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2499 เป็นต้นมา (มนยา, 2546) โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) สังกัดกรมปศุสัตว์ มีหน้าที่ผลิตวัคซีนบริูเซลโลซิสจากเชื้อ *B. abortus* สเตรน 19 ชนิดลดความรุนแรง (reduce virulence) ที่มีประสิทธิภาพให้ภูมิคุ้มกันสูง และไม่แพร่กระจายจากสัตว์สู่สัตว์ (Hannan et al, 2014) ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

สูตรตำรับมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของวัคซีนที่เปลี่ยนไป ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพหลังทำแห้งแตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละสูตรมีองค์ประกอบ 3 ส่วนที่สำคัญสำหรับการทำแห้งทั่วไปคือ 1) ส่วนที่เป็นสารสำคัญ (active ingredient) คือ แบคทีเรีย *B. abortus* สเตรน 19 ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ 2) ส่วนที่เป็นสารเพิ่มปริมาณหรือส่วนผสมอื่น ๆ ที่ผสมลงไป (excipient) ได้แก่ สารต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของสเตบิลไลเซอร์ และ 3) ส่วนที่เป็นตัวทำละลาย (solvent) ได้แก่ สเตบิลไลเซอร์ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลายหลัก

สเตบิลไลเซอร์ประกอบด้วยสารหลายชนิดเติมลงในวัคซีนเพื่อวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่น sodium glutamate เติมลงในวัคซีนเพื่อช่วยให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อสัมผัสกับความร้อน แสง ความเป็นกรดและ ความชื้น sugar และ gelatin เติมเพื่อรักษาประสิทธิภาพของวัคซีนในระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา thiourea และ ascorbic acid มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ช่วยปกป้องเชื้อในขั้นตอนการทำแห้ง PVP เป็นโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำ มีสูตรเคมี $(C_6H_9NO)_n$ มาจาก monomer N-vinylpyrrolidone ในทางการแพทย์ใช้เป็นสารยึดเกาะ (binder) ในการผลิตยาเม็ด ใช้เติมในไอโอดีน เป็นสารประกอบ povidone-iodine มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) การใช้สารคงสภาพ 5% PVP ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล (lactose 10%) น้ำตาลจะช่วยควบคุมการแห้งของผลิตภัณฑ์และป้องกันไม่ให้เกิดการแห้งเกินไป แต่ถ้าน้ำตาลมากเกินไปจะทำให้ผิวหน้าวัคซีนแห้งมีลักษณะใสคล้ายแก้ว และป้องกันการระเหยของน้ำขณะอยู่ในขั้นตอนการทำแห้ง จากการศึกษาการทำแห้งวัคซีน *B. abortus* สเตรน 19 ของ Zakhlebnaia และ Laukner (1991) รายงานว่าการใช้ 5% PVP เป็นสเตบิลไลเซอร์ให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งสูง แต่การใช้ sucrose-agar-gelatin (SAG) ให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งต่ำ Garcia-Carrillo (1981) ได้ศึกษาสเตบิลไลเซอร์ 10 ตำรับ พบว่า 6 ตำรับให้ผลคล้ายกัน ซึ่งหนึ่งในตำรับที่ใช้เป็นสเตบิลไลเซอร์ที่ประกอบด้วย 2.5% enzymatic digest of casein, 5% sucrose และ 1% sodium glutamate ซึ่งเป็นสเตบิลไลเซอร์มาตรฐานที่ OIE (2016) แนะนำให้ใช้ในปัจจุบันมีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งสูงกว่าการใช้ 5% PVP ซึ่งให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งต่ำสุด Nabila และคณะ (2017) ซึ่งศึกษาการทำแห้งวัคซีน *B. mellitensis* Rev-1 ก็แนะนำให้ใช้ 7% sucrose และ 7.5% skimmed milk หรือ 2.5% enzymatic digest of casein, 5% sucrose และ 1% sodium glutamate ซึ่งเป็นสเตบิลไลเซอร์มาตรฐานที่ OIE (2016) แนะนำให้ใช้ในปัจจุบันเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้มีการศึกษาสูตรสเตบิไลเซอร์อื่นๆ เช่น Zavarella และคณะ (1984) ทดลองผสมเชื้อ 70% (v/v) กับสเตบิไลเซอร์ 30% ซึ่งประกอบด้วย 3% lactose, 2% ascorbic acid, 3% glycine และ 2% thiourea ใน skim med milk พบเชื้อมีชีวิตรอดค่อนข้างสูง และการศึกษาสัดส่วนของปริมาณเชื้อต่อปริมาณสเตบิไลเซอร์ของ Drimmelen และ Steyn (1958) พบว่าการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเป็นสองเท่าต่อสัดส่วนของปริมาณสเตบิไลเซอร์เท่าเดิม ทำให้อัตราการสูญเสียเชื้อหลังทำแห้งสูง ซึ่งเกิดจากความเข้มข้นของเชื้อสูง ทำให้แอนติออกซิแดนท์ต่ำ บ่งบอกว่าปริมาณแอนติออกซิแดนท์ในวัคซีนทำแห้งต้องสมดุลกับความเข้มข้นของเชื้อ เพื่อเพิ่มทั้งอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งและความคงตัวระหว่างการเก็บรักษา

การศึกษาการทำแห้งแบบเยือกแข็งในหลายสูตรตำรับเพื่อหาคู่ประกอบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำแห้งโดยปรับใช้ส่วนประกอบจากสูตรตำรับจากวัคซีนแบคทีเรียหลายชนิดและนำมาปรับเปลี่ยนองค์ประกอบบางส่วนเพื่อหาสูตรตำรับที่เหมาะสมกับกระบวนการทำแห้ง (lyophilization process) และเครื่องทำแห้งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะพิจารณาปัจจัยดังนี้ มีจำนวนแบคทีเรียตามมาตรฐานกำหนด มีอัตราการสูญเสียจำนวนแบคทีเรียจากการทำแห้งต่ำ มีลักษณะของเนื้อวัคซีนที่ดี มีปริมาณความชื้นต่ำ การตรวจสอบปริมาณความชื้นเป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญสำหรับการทำแห้งวัคซีน โดยเปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นเป็นตัวชี้วัดโดยตรงว่าวัคซีนจะสามารถเก็บไว้ได้นานหรือไม่ สห.กำหนดปริมาณความชื้นไม่เกิน 4% ตามมาตรฐาน ASEAN (1998) ซึ่งความชื้นต่ำประมาณ 0.1- 2.9% ขึ้นกับชนิดวัคซีนหรือชีววัตถุ และสารเพิ่มปริมาณ (excipient) ที่ใช้

ปัจจุบันสห.ผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิสชนิดทำแห้งจากเชื้อ *B. abortus* สเตรน 19 โดยใช้สเตบิไล-เซอร์มาตรฐาน OIE (2016) (2.5% enzymatic digest of casein, 5% sucrose และ 1% sodium glutamate) ผสมกับเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้งโดยประมาณ $200-400 \times 10^9$ colony forming unit/dose (CFU/dose) และหลังจากทำแห้งจะต้องมีปริมาณเชื้อมีชีวิต ไม่น้อยกว่า 50×10^9 CFU/dose แต่พบว่าวัคซีนสำเร็จรูปบางชุดได้ต่ำกว่าที่กำหนด จึงทำให้ไม่ผ่านการทดสอบคุณภาพด้านปริมาณเชื้อมีชีวิต ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าอาจเกิดจากปริมาตรบรรจุ ความเข้มข้นของเชื้อ และสูตรตำรับในการทำแห้งที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้มีการสูญเสียปริมาณเชื้อมีชีวิตสูงและคงสภาพไม่นาน จึงเป็นที่มาของการศึกษาเพื่อหาสูตรตำรับในการทำแห้งที่เหมาะสม สำหรับการผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิสชนิดทำแห้งของสห.ต่อไป เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน มีปริมาณเพียงพอ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคบรูเซลโลซิสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การเตรียม เชื้อ *B. abortus* สเตรน 19

นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเฟอร์เมนเตอร์¹ มาปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์² ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเชื้อออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2 ลิตร ละลายเชื้อจากโรเตอร์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย แล้วปรับจำนวนเชื้อให้ได้ $1,000 \times 10^9$ CFU/ml.

2.การเตรียมตำรับสำหรับทำแห้งวัคซีน จำนวน 5 ตำรับ

แต่ละสูตรตำรับเป็นการผสมกันระหว่างเชื้อ *B. abortus* 1 มล.กับสเตบิไลเซอร์ 1 มล. ซึ่งแต่ละสูตรตำรับมีสเตบิไลเซอร์แตกต่างกัน ดังนี้

สูตรตำรับ 1 ประกอบด้วย 2.5% w/v enzymatic digest of casein³, 5% w/v sucrose⁴, 1% w/v sodium glutamate⁵ ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

สูตรตำรับ 2 ประกอบด้วย 5% w/v enzymatic digest of casein, 10% w/v sucrose, 2% w/v sodium glutamate ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

¹BioFlo[®] 610, USA

²Kokusan, Japan

³Bacto[™], USA

⁴Merck, Switzerland

⁵Alfa Aesar, England

สูตรตำรับ 3 ประกอบด้วย 5% w/v PVP⁶, 10% w/v lactose⁷ ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

สูตรตำรับ 4 ประกอบด้วย 10% w/v PVP, 20% w/v lactose ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

สูตรตำรับ 5 ประกอบด้วย 2.5% w/v enzymatic digest of casein, 5% w/v sucrose, 1% w/v sodium glutamate, 5% w/v PVP, 10% w/v lactose ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.การบรรจุวัคซีน

บรรจุวัคซีนบรรจุเซลล์โลซีส สเตรน 19 ตำรับละ 50 ขวด ในขวดแก้ว (Borosilicate glass type I) ขนาด 12 มล. ปริมาตรขวดละ 2 มล. ด้วย automatic syringe ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ ปิดขวดด้วยจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง (half stoppering) นำขวดเข้าเครื่องทำแห้ง โดยทุกสูตรจะเข้าสู่กระบวนการทำแห้งพร้อมกัน

4.การทำแห้งวัคซีน

ใช้เครื่องทำแห้งขนาดใหญ่⁸ โดยกำหนดโปรแกรมให้อุณหภูมิสุดท้ายของการทำแห้งแบบเยือกแข็งเท่ากับ -45 °ซ นาน 3 ชั่วโมง (freezing step) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น -40 °ซ และปรับความดันเท่ากับ 0.2 มิลลิบาร์ นาน 1 ชั่วโมง -35 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -30 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -25 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -20 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -15 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -10 °ซ นาน 1 ชั่วโมง -5 °ซ นาน 1 ชั่วโมง 0 °ซ นาน 1 ชั่วโมง 10 °ซ นาน 1 ชั่วโมง 20 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หลังทำแห้งวัคซีนเสร็จทำการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 2-8 °ซ รอการทดสอบต่อไป

5.การทดสอบวัคซีน หลังการทำแห้งมีดังนี้

5.1 การตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป ได้แก่

5.1.1 ลักษณะทางกายภาพ ตำรับละ 15 ขวด โดยการดูลักษณะเนื้อวัคซีนในขวดต้องมีเนื้อเป็นเค้ก (cake) เนื้อวัคซีนสม่ำเสมอมีผิวหน้าเรียบเป็นมัน วัคซีนเป็นก้อนพองตัวดี สีขาวนวล (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560)

5.1.2 การตรวจสอบสภาพสุญญากาศ ตำรับละ 50 ขวด โดยใช้เครื่องมือตรวจสอบสุญญากาศผ่านประจุไฟฟ้า เข้าบริเวณสุญญากาศ จะเกิดสีเขียวยอมฟ้าไปจนถึงสีม่วงเข้มในขวดบรรจุวัคซีน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559)

5.1.3 การทดสอบการละลาย (Reconstitution) ตำรับละ 3 ขวด ละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลาย (0.1% NaCl) ปริมาตร 10 มล. เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2-5 นาที ต้องไม่พบตะกอนหรือส่วนที่ไม่ละลาย เกาะบริเวณขวดวัคซีน จึงผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ก)

5.2 การทดสอบหาปริมาณความชื้น ตำรับละ 5 ขวด โดยวิธีการของ Karl Fischer ผลที่ได้ต้องมีปริมาณความชื้นของวัคซีนทำแห้งไม่เกิน 4% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ข)

5.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน (Purity test) ตำรับละ 3 ขวด โดยนำตัวอย่างวัคซีนมาละลายด้วยน้ำยาละลาย 10 มล. แล้วดูตามา 0.1 มล. หยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วย้อมแกรม เชื้อ *B. abortus* จะติดสี Gram's negative รูปร่าง shot rod ขนาดยาวประมาณ 0.6-1.5 ไมครอน กว้างประมาณ 0.5-0.7 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ และไม่ติดสี bipolar จากนั้นดูตัวอย่างวัคซีนที่เหลือมา 0.1 มล. เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose agar slant ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 4 วัน ลักษณะโคโลนีของเชื้อจะยอมให้แสงผ่านได้ซึ่งจะต่างจากเชื้อปนเปื้อนทั่วไป (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ค)

5.4 การทดสอบปริมาณเชื้อมีชีวิต (viable organism) ตำรับละ 3 ขวด โดยนำตัวอย่างวัคซีนมาละลายด้วยน้ำยาละลาย 10 มล. แล้วดูตามา 1 มล. ทำ ten-fold dilution ด้วย peptone saline ปริมาตร 9 มล. ในหลอดทดลองขนาด 25x150 มม. จาก 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้วดูตามา 0.1 มล. หยดลงบน tryptose agar plate ขนาด 100x15 มม. จานละ 0.1 มล. จำนวน 3 จาน ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม

⁶Kollidon[®] 90 F, Germany ⁷SuperTab[®] 21AN, Germany

⁸Telstar, Spain

เกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยคว่ำหน้าอาหารลง นาน 4 วัน
จึงนำออกมานับจำนวนโคโลนี หาค่าเฉลี่ยต่อ มล. ผลผ่านต้องมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 50×10^9
CFU/dose (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ง)

6. การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบผลการทดสอบของวัคซีนแต่ละตำรับเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน โดยผลการทดสอบปริมาณเชื้อ
มีชีวิต (viable organism) แสดงผลเป็น $\text{mean} \pm \text{SD}$ หน่วยเป็น CFU/dose

ผล

ผลทดสอบวัคซีนทั้ง 5 สูตรตำรับได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 1) ผลทดสอบคุณสมบัติทั่วไปพบว่า การทดสอบ
ลักษณะทางกายภาพทุกตำรับ เนื้อวัคซีนเป็นเค้ก มีความสม่ำเสมอ ผิวหน้าเรียบเป็นมัน ผ่านเกณฑ์สภาพ
สุญญากาศ การละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำยาละลายหลังผสมประมาณ 2-5 นาที แต่พบว่าสูตรตำรับ 3, 4 และ
5 ละลายได้ยากกว่าสูตรตำรับ 1 และ 2 อย่างชัดเจน ซึ่งสูตรตำรับที่ 1 และ 2 สามารถละลายได้ทันทีหลังผสม
น้ำยาละลายวัคซีน ขณะที่สูตรตำรับที่ 3, 4 และ 5 ใช้เวลานานกว่าและสารละลายมีความหนืดกว่ามาก แม้จะ
สามารถละลายได้ใน 5 นาที ผลทดสอบปริมาณความชื้นทุกสูตรตำรับน้อยกว่า 4% โดยได้ค่าความชื้นที่ 1.25%,
1.72%, 0.97%, 0.79% และ 1.25% ตามลำดับ ผลทดสอบความบริสุทธิ์ผ่านเกณฑ์ทุกตำรับ ผลทดสอบปริมาณ
เชื้อมีชีวิตก่อนทำแห้งได้ 294.67 ± 8.33 , 301.33 ± 8.33 , 217.33 ± 2.31 , 205.00 ± 6.63 และ $225.78 \pm 8.97 \times 10^9$
CFU/dose ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ผลทดสอบปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งของสูตรตำรับที่ 1 ถึง 5 เท่ากับ
 86.67 ± 4.16 , 88.00 ± 6.63 , 6.80 ± 0.84 , 34.93 ± 1.10 และ $24.80 \pm 0.87 \times 10^9$ CFU/dose ตามลำดับ (ตารางที่

2) พบว่าสูตรตำรับที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ 50×10^9 CFU/dose ได้แก่ สูตรตำรับที่ 1 และ 2 เท่านั้น (ตารางที่ 2)
จากผลการทดลองพบว่าสูตรวัคซีนตำรับที่ 2 เป็นสูตรตำรับที่มีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งสูงที่สุดแต่ยัง
ใกล้เคียงกับสูตรตำรับที่ 1

วิจารณ์

จากตารางที่ 2 พบว่าทุกสูตรตำรับมีปริมาณเชื้อมีชีวิตลดลงหลังทำแห้งไปในทางเดียวกัน แต่เมื่อ
เปรียบเทียบสเตบิไลเซอร์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มปกติที่ใช้ในการผลิตวัคซีนปัจจุบัน ได้แก่ สูตรตำรับ 1 และ 2 ที่ใช้
อาหารเลี้ยงเชื้อและสเตบิไลเซอร์ ได้แก่ enzymatic digest of casein, sucrose และ sodium glutamate กับ
สูตรตำรับ 3 และ 4 ที่ใช้สเตบิไลเซอร์ชุดใหม่ ได้แก่ PVP และ lactose พบว่าสูตรตำรับที่ 3 และ 4 ตามสัดส่วนที่
ทดลองอาจไม่เหมาะในการใช้เป็นสเตบิไลเซอร์สำหรับเชื้อ *B. abortus* สเตรน 19 เนื่องจากมีปริมาณเชื้อมีชีวิต
หลังทำแห้งน้อยกว่าสูตรเดิม ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Garcia-Carrillo (1981) ที่พบว่า 5% PVP ให้ปริมาณเชื้อมี
ชีวิตหลังการทำแห้งต่ำสุด ถึงแม้จะไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Zakhlebnaia และ Laukner (1991) ที่ใช้ 5%
PVP เป็นสเตบิไลเซอร์และให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งสูง นอกจากนี้พบว่า PVP และ lactose ทำให้
วัคซีนหนืดกว่าปกติส่งผลต่อการทำละลายเวลานำวัคซีนไปใช้ โดยความหนืดในการละลายจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณ
ของ PVP และ lactose ในสัดส่วนที่เพิ่มขึ้น ส่วนการใส่สเตบิไลเซอร์ทุกชนิดรวมกันตามสูตรตำรับที่ 5 ได้แก่
enzymatic digest of casein, sucrose, sodium glutamate, PVP และ lactose นั้นไม่มีส่วนช่วยให้ปริมาณ
เชื้อคงเหลือหลังการทำแห้งคงเหลือมากขึ้นเมื่อเทียบกับสูตรตำรับที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังทำให้วัคซีนมีการ
ละลายช้าที่สุดและหนืดที่สุดจากสูตรตำรับทั้งหมด

วัคซีนสูตรตำรับที่ 1 ซึ่งใช้สเตบิไลเซอร์มาตรฐาน คือ 2.5% enzymatic digest of casein, 5%
sucrose และ 1% sodium glutamate ให้ปริมาณเชื้อหลังทำแห้งที่ 86.67 ± 4.16 ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

ในขณะที่สูตรตำรับที่ 2 คือ สูตรที่ใช้สเตปิลเซอร์ เป็น 2 เท่าของวัคซีนสูตรตำรับที่ 1 พบว่ามีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งมากกว่าสูตรตำรับที่ 1 แต่ยังใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าชนิดของสเตปิล-เซอร์มาตรฐานที่เป็นสูตรตำรับที่ใช้ในปัจจุบันมีความเหมาะสมต่อการผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิส สูตร 19 ของสทช.มากที่สุด แต่จากผลการทดลองที่เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสเตปิลเซอร์เป็นสองเท่าจากสูตรตำรับเดิม ได้แก่ สูตรตำรับที่ 2 นั้น ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่แตกต่างกันชัดเจน แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเรื่องปริมาณความเข้มข้นของสเตปิลเซอร์ แม้มีผลกับปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งเพียงเล็กน้อยแต่ยังมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือ หากเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสเตปิลเซอร์จะทำให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งเพิ่มขึ้นด้วย จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมกับปริมาณเชื้อมีชีวิตก่อนทำแห้งเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งมากที่สุด เช่น การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสเตปิลเซอร์มากกว่า 2 เท่าอาจทำให้ปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งเพิ่มขึ้นชัดเจน เป็นต้น

นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังช่วยให้เห็นว่าถ้าตัดเรื่องปัจจัยความเข้มข้นของสเตปิล-เซอร์ตามที่ได้กล่าวไป ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเชื้อหลังการทำแห้งอาจไม่ได้มาจากปัญหาสูตรตำรับหรือชนิดของสเตปิลเซอร์ แต่อาจเกิดจากปัญหาอื่น จึงเห็นว่าควรมีการศึกษาต่อถึงปัจจัยด้านอื่นที่อาจมีผลต่อปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังการทำแห้ง เช่น กระบวนการทำแห้ง คุณภาพของเชื้อตั้งต้น และสารเคมีที่นำมาใช้ทำสเตปิลเซอร์ เป็นต้น เพื่อนำมาปรับปรุงให้มีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งมากกว่านี้และเพื่อนำไปปรับปรุงคุณภาพวัคซีนให้ดีขึ้นต่อไป

สรุป

จากการทดลองนี้พบว่าสูตรวัคซีนตำรับที่ 1 และ 2 มีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งใกล้เคียงกัน จึงเห็นว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เห็นความแตกต่างชัดเจนกว่านี้ และศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อปริมาณเชื้อมีชีวิตหลังทำแห้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสทช. นายสัตวแพทย์อนันต์ ท้าวเพชร ที่ปรึกษาโครงการ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่หน่วยผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิสและแอนติเจน ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย สำหรับความช่วยเหลือในการผลิตวัคซีนสูตรต่างๆ ฝ่ายทดสอบวัคซีนแบคทีเรีย สำหรับความอนุเคราะห์ในการทดสอบวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

- มนยา เอกทัตร์ 2546 โรคบรูเซลโลซิส หนังสือประกอบการฝึกอบรม Zoonosis โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ ฯ หน้า 98-108
- มนยา เอกทัตร์ 2552 โรคบรูเซลโลซิสและการชันสูตรในประเทศไทย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ ฯ หน้า 47-64
- สมพงษ์ บันลือพงศ์พันธุ์ อีระ รักความสุข อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ อติสร ยะวงศา วราพร พิมพ์ประไพ สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ ศรีสมัย วิริยะรัมย์ มณิชา สุวรรณวงศ์ สมยศ ก้านขุนทด และ ลักษณะ เพ็ญชัย 2556 กรณีศึกษาการติดเชื้อบรูเซลลา (*Brucella* spp.) ในเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะหรือแกะที่มีอาการไข้และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลในจังหวัดนครปฐม เอกสารการประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หน้า 3233-3288

- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การใช้เครื่อง Vacuum Leak Detector, SOP - Br - 038 งานผลิตวัคซีนบรูเซลโลซิสและแอนติเจน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 Finished Product Specification วัคซีนบรูเซลโลซิส, FPS - QCB - 003 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบการละลาย (Reconstitution) ของ วัคซีนบรูเซลโลซิส, SOP - QCB - 019 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบหาปริมาณความชื้น, SOP - QCSD - 004 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ค มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test) ของวัคซีน บรูเซลโลซิส, SOP - QCB - 018 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรม ปศุสัตว์ หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ง มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบหาจำนวนเชื้อของวัคซีนบรูเซลโลซิส, SOP - QCB - 020 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3
- ASEAN 1998. General requirements for veterinary vaccines: ASEAN standard for animal vaccines. 2nd edition. Livestock publication Series No.2A. Jakarta. Indonesia. p 105.
- Drimmelen, G. C. van. and Steyn, H. S. 1958. The Keeping Quality of Freeze-Dried *Brucella abortus* strain 19 Vaccine. Journal gen. Microbiology. 19: 324-329.
- Eric, D. A. C., Ahide, L. M., Nammalwar, S., Stephen, M. B. and Araceli, C. D. 2013. A History of Development of Brucella Vaccines. BioMed Research International Volume 2013. Available from <http://dx.doi.org> [Accessed 9 January 2017].
- Garcia-Carrillo, C. 1981. Cell survival of the Brucella abortus strain 19 vaccine during the lyophilization process according to the vehicle used. Revista Argentina de microbiologia. 13(1): 31-4.
- Godfroid, J. and Kasbohrer, A. 2002. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Vet. Microbiol. 90: 135-145.
- Hannan, L. T. S., Alisha, W. B. R., Huynh, T. H., Lauren, T. A., Wongi, M., Hu, J. L., Hong, H. C. and Suk, K. 2014. Strategies for the development of an effective vaccine against Brucellosis. J. Prev. Vet. Med. 38(2): 53-60.
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central America. Vet. Microbiol. 90: 31-38.
- Nabila, A. Ghazy, Waffa, R. Abd El-Aziz, Ibrahim, H. M., Shell, W. S. and Hosein, H. I. 2017. The use of different stabilizers for improving integrity of the locally prepared lyophilized *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. Journal of Veterinary Medical Research. 24(1): 198-204.
- Nicoletti, P. 1990. Vaccination. In Animal Brucellosis, Nielsen, K., Duncan, J.R. ed. CRC Press. Boca Raton. pp. 284-299.
- Office International des Epizooties. 2016. Bovine brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE. Paris, France. pp. 1-44.

- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology
Brucella species. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limite , Spain. pp. 261-267.
- Rafai, M. 2002. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet. Microbiol. 90:
81-110.
- Zakhlebnaia, O. D. and Laukner, I. V. 1991. The use of polyvinylpyrrolidone as a stabilizer in the
lyophilization of Brucella. Laboratornoe delo. 2: 62-3.
- Zavanella, M., Nigrelli, A., Ciuchini, F. and Sala, V. 1984. Production and control of freeze-dried
Brucella abortus strain 19 vaccine by using cells produced by fermentation units.
Applied Microbiology Biotechnology.19: 229-231.

ตารางที่ 1 ผลทดสอบลักษณะวัคซีนทางกายภาพ การทดสอบการละลาย สภาพสุญญากาศ ความบริสุทธิ์ของเชื้อและปริมาณความชื้นของวัคซีน 5 สูตรตำรับ

สูตร	ลักษณะทางกายภาพ (n=15)	การละลาย (n=3)	สภาพสุญญากาศ (n=50)	ความบริสุทธิ์ (n=3)	ค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้น(%) (n=5)
1	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	1.25
2	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	1.72
3	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	0.97
4	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	0.79
5	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	1.25
หมายเหตุ					
ลักษณะทางกายภาพ เนื้อวัคซีนต้องเป็นก้อนพองตัว สีขาวนํานม					
การทดสอบการละลาย ต้องละลายภายใน 5 นาที					
ความบริสุทธิ์ ต้องมีเฉพาะเชื้อ <i>B. abortus</i> เท่านั้น					
ปริมาณความชื้น ไม่มากกว่า 4%					

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อมีชีวิตก่อนและหลังทำแห้งวัคซีน (n=3)

สูตรตำรับ	ปริมาณเชื้อก่อนทำแห้ง ($\times 10^9$ CFU/dose)	ปริมาณเชื้อหลังทำแห้ง ($\times 10^9$ CFU/dose)
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
1	294.67 $\pm$ 8.33	86.67 $\pm$ 4.16
2	301.33 $\pm$ 8.33	88.00 $\pm$ 6.63
3	217.33 $\pm$ 2.31	6.80 $\pm$ 0.84
4	205.00 $\pm$ 6.63	34.93 $\pm$ 1.10
5	225.78 $\pm$ 8.97	24.80 $\pm$ 0.87

Study on optimal lyophilization formulation of Brucellosis vaccine strain 19

Jinnapat Panchaphanpong¹

Supaya Trekamon¹

Abstract

The objective of the study is to find the best formulation of Brucellosis strain 19 lyophilized-vaccine production for the Bureau of Veterinary Biologics (BVB). There are 5 formulations that each formulation included 1 ml of *Brucella abortus* strain 19 and various 1 ml of stabilizers. The formulations of each stabilizer are the formulation no.1; 2.5% w/v enzymatic digest of casein, 5% w/v sucrose, 1% w/v sodium glutamate in sterile distilled water, the formulation no.2; 5% w/v enzymatic digest of casein, 10% w/v sucrose, 2% w/v sodium glutamate in sterile distilled water, the formulation no.3; 5% w/v PVP, 10% w/v lactose in sterile distilled water, the formulation no.4; 10% w/v PVP, 20% w/v lactose in sterile distilled water and the formulation no.5; 2.5% w/v enzymatic digest of casein, 5% w/v sucrose, 1% w/v sodium glutamate, 5% w/v PVP, 10% w/v lactose in sterile distilled water. The finished formulated vaccines are tested for property test, moisture extent test, purity test and viable count test before and after lyophilization.

The result of this study is all of the formulations pass for property test and purity test. The results of moisture extent test are 1.25%, 1.72%, 0.97%, 0.79% and 1.25%, respectively. The results of viable bacteria count tests after lyophilization are 86.67 ± 4.16 , 88.00 ± 6.63 , 6.80 ± 0.84 , 34.93 ± 1.10 and $24.80 \pm 0.87 \times 10^9$ CFU/dose, respectively. However, the number of viable bacteria of the formulation no. 2 after lyophilization is similar to the formula no.1.

In conclusion, the kind of stabilizer in formulation no.1 and 2 is suitable for Brucellosis stain 19 lyophilized-vaccine production of BVB. However, the further studying about concentrations of the stabilizer is suggested. The other factors that affect the viable bacteria after lyophilization are necessarily study.

Keywords: Lyophilization, formulation, Brucellosis vaccine strain 19

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การวิเคราะห์แนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและปริมาณไวรัสของ วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก

สุพายา ตรีภมม¹จิณณพัต ปัญจพันธ์พงศ์¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก จำนวน 3 ปีย้อนหลัง ตั้งแต่ปี พ.ศ.2560-2562 จัดทำเป็นกราฟวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) ปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นโดยการคำนวณค่า standard deviation เพื่อประเมินความสม่ำเสมอของ
คุณภาพวัคซีน (consistency) ซึ่งเป็นการทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ (Annual Product Review) ตาม
ข้อกำหนด GMP และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้น โดยการคำนวณค่า
Correlation coefficient

จากการรวบรวมข้อมูลจัดทำกราฟและคำนวณค่า standard deviation เพื่อวิเคราะห์แนวโน้มของ
ผลิตภัณฑ์ (Trend Analysis) พบว่าผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรณ ลาโซต้า และหลอดลม
อักเสบติดต่อนไก โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง $\pm 3SD$ แต่พบว่ามีเพียง 2 ชุดการผลิตอยู่นอกช่วง $\pm 3SD$ แต่มากกว่า
เกณฑ์ยอมรับขั้นต่ำของผลิตภัณฑ์ (lower specification limit, LSL) และผลการทดสอบปริมาณความชื้น โดย
ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง $\pm 3SD$ มีเพียง 2 ชุดการผลิตที่ค่าอยู่นอกช่วง $\pm 3SD$ แต่ไม่เกินเกณฑ์ยอมรับสูงสุดของ
ผลิตภัณฑ์ (upper specification limit, USL) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก
มีความสม่ำเสมอในคุณภาพของผลิตภัณฑ์

จากการคำนวณค่า Correlation coefficient ของปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรณ ลาโซต้า และ
ปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนไก พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน
แต่มีทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณความชื้น ซึ่งจากผลที่ได้ทำให้สามารถนำไปคาดการณ์ทิศทางปริมาณเชื้อไวรัส
ทั้งสองชนิดและปริมาณความชื้นในวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไกของสำนักเทคโนโลยีชีว
ภัณฑ์สัตว์ได้ โดยถ้าหากปริมาณไวรัสชนิดใดมีค่าสูงขึ้น ปริมาณไวรัสอีกชนิดหนึ่งจะมีค่าสูงไปด้วยแต่ปริมาณ
ความชื้นจะลดลง

คำสำคัญ: การวิเคราะห์แนวโน้ม
ปริมาณไวรัส

วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก
ปริมาณความชื้น

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน และแก้ไขเพิ่มเติมหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนโบราณตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559 หมวดที่ 1 การบริหารคุณภาพ ข้อ 8 การทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ กำหนดว่าสถานที่ผลิตยาต้องมีการทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ยา (Annual Product Review) โดยให้ทำเป็นระยะอย่างสม่ำเสมอหรือหมุนเวียนกันทำ วัตถุประสงค์ในการทบทวนจะต้องครอบคลุมเรื่องความสม่ำเสมอของกระบวนการผลิตและการควบคุมความเหมาะสมของข้อกำหนดที่ใช้ในปัจจุบันสำหรับวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูป เพื่อพิจารณาแนวโน้มและเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์และกระบวนการให้ดียิ่งขึ้น การทบทวนเหล่านี้ ต้องทำเป็นลายลักษณ์อักษรเป็นประจำทุกปี ข้อมูลที่รวบรวมในแต่ละรายการควรจัดทำให้อยู่ในรูปแบบที่แสดงผลชัดเจนสะดวกในการพิจารณา เช่น อยู่ในรูปแบบตาราง กราฟ ที่สามารถวิเคราะห์แนวโน้มของผลในอนาคตได้ (Trend analysis) (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2559)

การทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ยา (Annual Product Review) ด้วยการวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) จะทำให้ผู้ผลิตได้ข้อมูลที่สามารถทำให้ทราบถึงความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์และความสม่ำเสมอของกระบวนการผลิตเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนากระบวนการผลิตให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งการวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) ต้องมีการประเมินผลการทบทวน เพื่อนำผลการทบทวนนั้นมาหาแนวทางการแก้ไข และป้องกันการเกิดซ้ำต่อไป การดำเนินการดังกล่าวเป็นเครื่องมือหนึ่งในการตรวจสอบตนเองของผู้ผลิตที่ช่วยทำให้การบริหารจัดการคุณภาพเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นหลักประกันว่าผู้ผลิตมีขีดความสามารถในการผลิตยาชีววัตถุที่มีคุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับของสากล นอกจากนั้นยังทำให้สามารถคาดการณ์ขีดจำกัดเตือน (Alert limit) ซึ่งหมายถึง เกณฑ์หรือขอบเขตที่กำหนดขึ้นเพื่อเป็นการเตือนถึงแนวโน้มที่ค่าแสดงความเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติซึ่งไม่จำเป็นต้องปฏิบัติการแก้ไข แต่ต้องมีการสืบสวนติดตาม และขีดจำกัดปฏิบัติการ (Action limit) หมายถึง เกณฑ์หรือขอบเขตที่กำหนดขึ้น ซึ่งถ้าอยู่นอกเหนือจากเกณฑ์นี้จะต้องได้รับการติดตามและปฏิบัติการแก้ไขโดยทันที ถ้าหากผู้ผลิตทราบถึงเกณฑ์เหล่านี้ก็จะสามารถหาแนวทางแก้ไขป้องกันการเกิดซ้ำได้ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2559) นอกจากนั้นการประเมินผลการวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) ของผลการทดสอบคุณภาพเชิงปริมาณโดยการคำนวณทางสถิติด้วยวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ยังทำให้เห็นถึงแนวโน้มทิศทางและระดับความสัมพันธ์ของผลการทดสอบแต่ละอย่างของผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันส่งผลให้สามารถคาดการณ์แนวโน้มทิศทางของปริมาณได้ (อรุณ, 2558)

โรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นโรคระบาดที่ร้ายแรงของไก่ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก ปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ผลิตวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นรวมกันสองชนิดคือวัคซีนนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า ซึ่งเป็นเชื้อชนิดไม่รุนแรงและวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนทองถิ่น ซึ่งเป็นชนิดเชื้ออ่อนสามารถให้ความคุ้มโรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ได้ดี ผลิตจากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (SPF) ในรูปแบบวัคซีนผงแห้ง (lyophilized vaccine) บรรจุในขวดภายใต้สุญญากาศ วัคซีน 1 โดส ประกอบไปด้วยไวรัสนิวคาสเซิล สเตรนลาโซต้าไม่น้อยกว่า 10^6 EID₅₀ และไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนทองถิ่นไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ EID₅₀ (นันทนาและคณะ, 2539; OIE, 2008) และมีค่าความชื้นไม่เกิน 4% (ASEAN, 1998)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ระหว่างปีพ.ศ. 2560-2562 จำนวน 125 ชุด โดยส่งทดสอบคุณภาพโดยการหาปริมาณเชื้อไวรัสและปริมาณความชื้นที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ แต่ยังไม่มีการวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) คุณภาพของวัคซีน โดยผลการทดสอบที่แสดงถึงคุณภาพของวัคซีนเชื้อเป็นคือ ปริมาณเชื้อไวรัส เนื่องจากปริมาณแอนติเจนมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรค (Layton and Sandhy, 1984)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบคุณภาพของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ จำนวน 3 ปีซ้อนหลัง ตั้งแต่ปี พ.ศ.2560-2562 จัดทำเป็นกราฟวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) ปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า ปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่และปริมาณความชื้น โดยการคำนวณค่า standard deviation เพื่อประเมินความสม่ำเสมอของคุณภาพวัคซีน (consistency) และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า ปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่และปริมาณความชื้นโดยการคำนวณค่า Correlation coefficient

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก ตั้งแต่ปี พ.ศ.2560-2562
2. คำนวณหาค่า mean ,ค่า standard deviation (SD) เพื่อประเมินความสม่ำเสมอของคุณภาพวัคซีน
3. คำนวณหาค่า $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ และ $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ เพื่อหาช่วงเกณฑ์ขีดจำกัดเตือน (Alert limit) และขีดจำกัดปฏิบัติการ (Action limit) ตามลำดับ และกำหนดให้ค่า $\text{mean} + 3\text{SD}$ เป็น upper control limit (UCL) และค่า $\text{mean} - 3\text{SD}$ เป็น lower control limit (LCL) (เพียรกิจ,2559)
4. คำนวณหาค่า Correlation coefficient (r) เพื่อวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า,ปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่และปริมาณความชื้น โดยใช้สูตร (อรุณ,2558)

$$r = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

กำหนดให้ r เป็น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
 $\sum D^2$ เป็น ผลรวมของกำลังสองของผลต่างของอันดับแต่ละคู่
 N เป็น ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

โดยถ้าหาก r มีเครื่องหมาย + หมายถึง การมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน (ตัวแปรหนึ่งมีค่าสูง อีกตัวหนึ่งจะมีค่าสูงไปด้วย) และหาก r มีเครื่องหมาย - หมายถึง การมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางตรงกันข้าม (ตัวแปรหนึ่งมีค่าสูง ตัวแปรอีกตัวหนึ่งจะมีค่าต่ำ) ประเมินระดับความสัมพันธ์จากค่า r โดยหากมีค่าเข้าใกล้ -1 หรือ 1 แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันในระดับสูง แต่หากมีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันในระดับน้อยหรือไม่เลย โดยใช้เกณฑ์ดังนี้ (Hinkle, 1998)

ค่า r ระดับของความสัมพันธ์

0.90 - 1.00	มีความสัมพันธ์กันสูงมาก
0.70 - 0.90	มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง
0.50 - 0.70	มีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง
0.30 - 0.50	มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ
0.00 - 0.30	มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก

5. นำข้อมูลที่ได้มาจัดทำในรูปแบบกราฟ ดังนี้

- 5.1 กราฟแนวโน้มปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า
- 5.2 กราฟแนวโน้มปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่
- 5.3 กราฟแนวโน้มปริมาณความชื้น

5.4 กราฟแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า และปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

5.5 กราฟแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณความชื้น

5.6 กราฟแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันและปริมาณความชื้น

6.วิเคราะห์ผล

7.สรุปผลและจัดทำรายงานการวิจัย

ผล

การรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกัน จำนวน 3 ปีย้อนหลัง ตั้งแต่ ปีพ.ศ.2560-2562 จำนวน 125 ชุดการผลิต พบว่าผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า มีค่า $\text{mean} \pm \text{SD}$ เท่ากับ $10^{6.84} \pm 0.59 \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ มีค่า $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ อยู่ในช่วง $10^{5.66} - 10^{8.02} \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ มีค่า $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ อยู่ในช่วง $10^{5.07} - 10^{8.61} \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ (ตารางที่1, กราฟที่1)

การทดสอบการหาปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน มีค่า $\text{mean} \pm \text{SD}$ เท่ากับ $10^{4.46} \pm 1.09 \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ มีค่า $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ อยู่ในช่วง $10^{2.28} - 10^{6.64} \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ มีค่า $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ อยู่ในช่วง $10^{1.08} - 10^{7.91} \text{ EID}_{50}/\text{dose}$ (ตารางที่1, กราฟที่2)

การทดสอบการหาปริมาณความชื้นมีค่า $\text{mean} \pm \text{SD}$ เท่ากับ $2.69 \pm 0.41\%$ มีค่า $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ อยู่ในช่วง $1.87 - 3.52\%$ มีค่า $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ อยู่ในช่วง $1.45 - 3.94\%$ (ตารางที่1, กราฟที่3)

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ได้ค่า Correlation coefficient เท่ากับ $+0.3261$ (ตารางที่ 2, กราฟที่ 4)

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณความชื้น ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ -0.5921 (ตารางที่2, กราฟที่5)

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน และปริมาณความชื้น ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ -0.0780 (ตารางที่2, กราฟที่ 6)

วิจารณ์

จากผลการรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกัน จำนวน 125 ชุดการผลิต เพื่อเป็นการทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ (Annual Product Review) พบว่าผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลสเตรน ลาโซต้าและหลอดลมอักเสบติดต่อกัน โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3\text{SD}$ แต่พบว่ามีเพียง 2 ชุดการผลิตอยู่นอกช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3\text{SD}$ แต่มากกว่าเกณฑ์ยอมรับขั้นต่ำของผลิตภัณฑ์ (lower specification limit, LSL) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกัน มีความสม่ำเสมอในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (สถาบันชีววัตถุ, 2560) แต่พบว่าค่า LCL ของการทดสอบการหาปริมาณไวรัสน้อยกว่า ค่า LSL ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถของกระบวนการผลิตวัคซีนในปัจจุบันยังไม่สามารถควบคุมให้ปริมาณไวรัสอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับของผลิตภัณฑ์ได้อย่างสม่ำเสมอ (เพียรกิจ, 2559) จึงเห็นควรให้มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ (Method validation) การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (Process validation) และควรวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend Analysis) ผลการหา

ปริมาณไวรัสของวัคซีนเป็นประจำทุกปี เพื่อจัดทำแผนการแก้ไขและป้องกัน (Corrective Action Preventive Action, CAPA) วิธีการ,เครื่องมือและอุปกรณ์ได้อย่างถูกต้องเหมาะสมและทันเวลา

ผลการทดสอบปริมาณความชื้น โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง $\pm 3SD$ มีเพียง 2 ชุดการผลิตที่ค่าอยู่นอกช่วง $\pm 3SD$ แต่ไม่เกินเกณฑ์ยอมรับของผลิตภัณฑ์ (upper specification limit, USL) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ มีความสม่ำเสมอในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (สถาบันชีววัตถุ, 2560) โดยจะเห็นได้ว่าค่า UCL ของการทดสอบการหาปริมาณความชื้นมีค่าน้อยกว่า USL ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถของกระบวนการผลิตวัคซีนในปัจจุบันสามารถควบคุมให้ปริมาณความชื้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับของผลิตภัณฑ์ได้อย่างสม่ำเสมอ (เพียร์กิง, 2559)

ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ +0.3261 แสดงให้เห็นถึงการมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน (ตัวแปรหนึ่งมีค่าสูง อีกตัวหนึ่งจะมีค่าสูงไปด้วย) และมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ (Hinkle, 1998) ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณความชื้น ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ -0.5921 แสดงให้เห็นถึงการมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางตรงกันข้าม (ตัวแปรหนึ่งมีค่าสูง ตัวแปรอีกตัวหนึ่งจะมีค่าต่ำ) และมีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง (Hinkle, 1998) ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ และปริมาณความชื้น ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ -0.0780 แสดงให้เห็นถึงการมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางตรงกันข้าม (ตัวแปรหนึ่งมีค่าสูง ตัวแปรอีกตัวหนึ่งจะมีค่าต่ำ) และมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก (Hinkle, 1998) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ แต่มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณความชื้น ตรงกับที่ Bangel dorff (1972) เคยรายงานไว้ว่ากระบวนการทำแห้งอาจทำให้ปริมาณไวรัสของวัคซีนลดลง ซึ่งปริมาณความชื้นหรือน้ำที่อยู่ในยาสามารถทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา oxidation และ hydrolysis ส่งผลให้เกิดอัตราการเสื่อมสลายทางเคมีและทำให้มีผลกระทบต่อคุณภาพของยาโดยอาจทำให้ปริมาณตัวยาสำคัญลดน้อยลงส่งผลต่อประสิทธิภาพและความแรงของยา และยังทำให้เพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (ศศิประภา, 2561) ซึ่งผลที่ได้ทำให้สามารถนำไปคาดการณ์ปริมาณไวรัสทั้งสองชนิดและปริมาณความชื้นในวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ของ สทช.ได้ โดยถ้าหากปริมาณไวรัสชนิดใดมีค่าสูงขึ้น ปริมาณไวรัสอีกชนิดหนึ่งจะมีค่าสูงไปด้วยแต่ปริมาณความชื้นจะลดลง นอกจากนั้นยังสามารถนำแนวโน้มปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า ไปคาดการณ์แนวโน้มปริมาณความชื้นได้เนื่องจากมีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง ซึ่งถ้าหากสามารถควบคุมให้ปริมาณความชื้นอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จะมีผลทำให้วัคซีนมีความคงสภาพดีขึ้น เนื่องจากปริมาณความชื้นมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของยาชีววัตถุที่อยู่ในรูปผงแห้งโดยอาจมีผลทำให้ความคงสภาพของยาลดลง (ธีรนารถและคณะ, 2558)

แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้น คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาวัคซีน เนื่องจากระยะเวลามีผลกับความคงสภาพของวัคซีน ซึ่งการเก็บวัคซีนไว้เป็นเวลานาน อาจทำให้ความชื้นเพิ่มมากขึ้น (สถาบันชีววัตถุ, 2560) ซึ่งการหาความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นในงานวิจัยนี้เป็นการคำนวณจากผลการทดสอบคุณภาพของวัคซีนสำเร็จรูป ซึ่งไม่มีตัวแปรเรื่องระยะเวลาการเก็บรักษามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยเรื่องระยะเวลาการเก็บรักษาวัคซีนที่มีผลต่อปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อนไก่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประเมินหาทิศทางความสัมพันธ์ ทำให้สามารถคาดการณ์แนวโน้มปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นได้ ช่วยให้การวางแผนการแก้ไขหรือป้องกันได้ทันเวลา หากปริมาณไวรัสหรือปริมาณความชื้นมีแนวโน้มออกนอกเกณฑ์ข้อกำหนดของวัคซีน ส่งผลให้วัคซีนมีคุณภาพตามที่กำหนดไว้

สรุป

จากการการทบทวนคุณภาพผลิตภัณฑ์ (Annual Product Review) โดยการรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของ สทช. จำนวน 3 ปีย้อนหลัง ตั้งแต่ ปี พ.ศ.2560-2562 นำมาจัดทำเป็นกราฟวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend analysis) ของปริมาณเชื้อไวรัสและปริมาณความชื้น โดยการคำนวณค่า standard deviation เพื่อประเมินความสม่ำเสมอของคุณภาพวัคซีน (consistency) พบว่าวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ มีความสม่ำเสมอในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นช่วงค่า $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ ที่คำนวณได้สามารถใช้กำหนดเป็นช่วง Alert limit ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่กำหนดเพื่อเป็นการเตือนถึงแนวโน้มที่ค่าแสดงแสดงความเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติ ซึ่งไม่จำเป็นต้องปฏิบัติการแก้ไข แต่ต้องมีการสืบสวนติดตามหาสาเหตุ และช่วงค่า $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ สามารถใช้กำหนดเป็นช่วง Action limit ซึ่งหากผลการทดสอบอยู่นอกเหนือจากเกณฑ์นี้ จะต้องได้รับการติดตามและปฏิบัติการแก้ไขโดยทันที ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า ปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และปริมาณความชื้นโดยการคำนวณค่า Correlation coefficient พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ แต่ปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณความชื้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายประกันคุณภาพสำหรับความช่วยเหลือในการรวบรวมผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน เจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำหรับความอนุเคราะห์ในการรายงานผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

ธีรนารถ จิระไพศาลพงศ์ จิรเดช ปัจฉิม อัจฉรย์ อาเมน ญัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ และสุภาพร ภูมิอมร 2558

ประสิทธิภาพของการทำแห้งและความคงตัวที่สภาวะเร่งของวัคซีนหัดอ้างอิงมาตรฐาน วารสารวิชาการสาธารณสุข 24(1):161-173

นันทนา โพชนเจริญ วิมล ปริญญก และกมลทิพย์ อนุสกุลเจริญพร 2539 การศึกษาวัคซีนรวมหลอดลมอักเสบในไก่และนิวคาสเซิล วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6(1):20-30

เพียรกิจ แดงประเสริฐ 2559 ความสามารถของกระบวนการ (Process Capability) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต กรุงเทพฯ หน้า 1-7

ศศิประภา ชิตรัตตา 2561 ความคงสภาพของยา (Drug stability) มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพฯ หน้า 7

สถาบันชีววัตถุ 2559 รายงานประจำปี 2559 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพฯ หน้า 30

สถาบันชีววัตถุ 2560 ข้อมูลเกี่ยวกับความคงตัวของวัคซีนในประเทศไทย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพฯ หน้า 1-5

สถาบันชีววัตถุ 2560 รายงานประจำปี 2560 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพฯ หน้า 22-23

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2559 ประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องการกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน และแก้ไขเพิ่มเติมหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนโบราณตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ.2559 กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี หน้า 4-5

- อรุณ จิรวัฒน์กุล 2558 สถิติเพื่องานทางวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อการวิจัย โรงพิมพ์วิทย์พัฒน์ กรุงเทพฯ หน้า115-130
- ASEAN 1998.General requirements for veterinary vaccines:ASEAN standard for animal vaccines.2nd edition.Livestock publication Series No.2A. Jakarta.indonesia.p105.
- Bangel dorff,H.J.1972. Protective effect of vaccination and the antibody production after combined administration of Newcastle Disease Infection Bronchitis vaccine.Blue book for the veterinary Profession. Hoechst Aktiengesellschaft. New York .USA.pp.144-151
- Hinkle, D.E, William,W. and Stephen, G. J.1998. Applied Statistics for the Behavior Sciences. 4th ed. Houghton Mifflin.New York.USA.pp.76-80.
- Layton, H.W.and Sandhy,T.S.1984.Protection of ducking with a broth grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin.Avian Dis. 28(3):718-726.
- World Organisation for Animal Health (OIE) 2008.Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial Animals ,6th ed. OIE. Paris.France.pp.576-586.

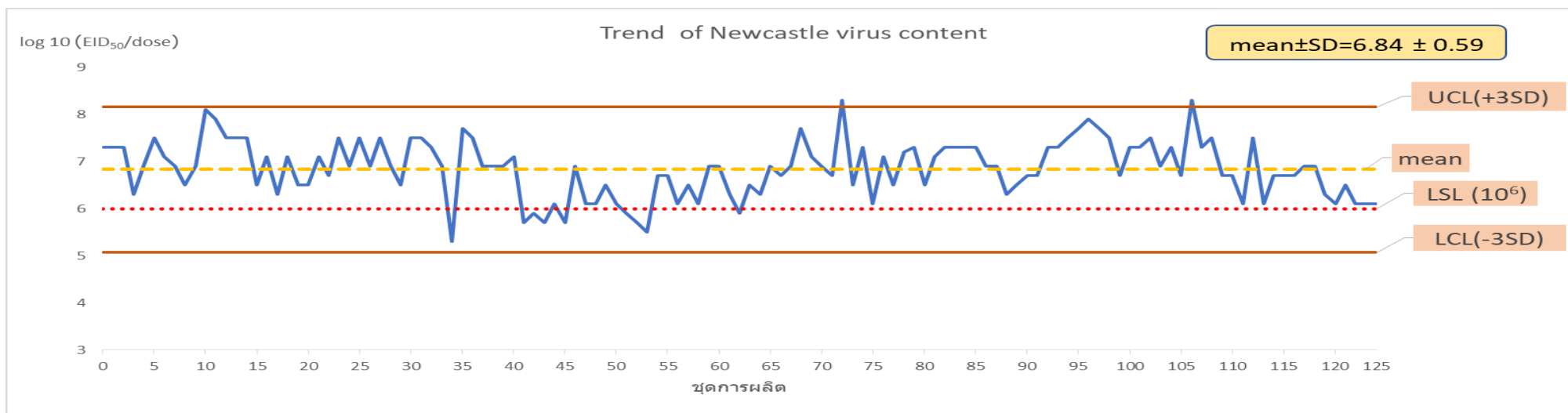
ตารางที่ 1 ข้อมูลผลการทดสอบการหาปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ตั้งแต่ปี พ.ศ.2560-2562

ค่า	ปริมาณ NDL (EID ₅₀ /dose) ($\geq 10^{6.0}$)	ปริมาณ IB (EID ₅₀ /dose) ($\geq 10^{3.5}$)	ปริมาณความชื้น (%) (≤ 4)
mean	$10^{6.84}$	$10^{4.46}$	2.69
SD	0.59	1.09	0.41
mean $\pm$ 2SD	$10^{5.66}$ - $10^{8.02}$	$10^{2.28}$ - $10^{6.64}$	1.87-3.52
mean $\pm$ 3SD	$10^{5.07}$ - $10^{8.61}$	$10^{1.08}$ - $10^{7.91}$	1.45-3.94

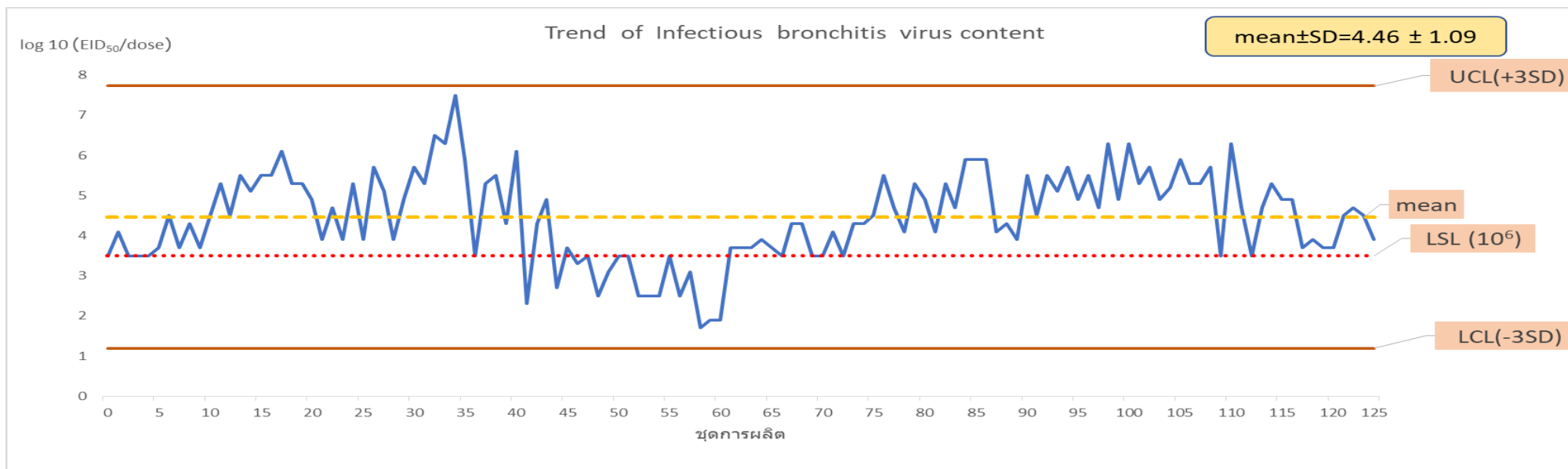
ตารางที่ 2 ผลการคำนวณหาค่า correlation coefficient ปริมาณไวรัสและปริมาณความชื้นของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่

ค่า	ปริมาณไวรัส (NDL+IB)	ปริมาณไวรัส (NDL) และ ปริมาณความชื้น	ปริมาณไวรัส (IB)และ ปริมาณความชื้น
Correlation Coefficient (r)	0.3261	-0.5921	-0.0780

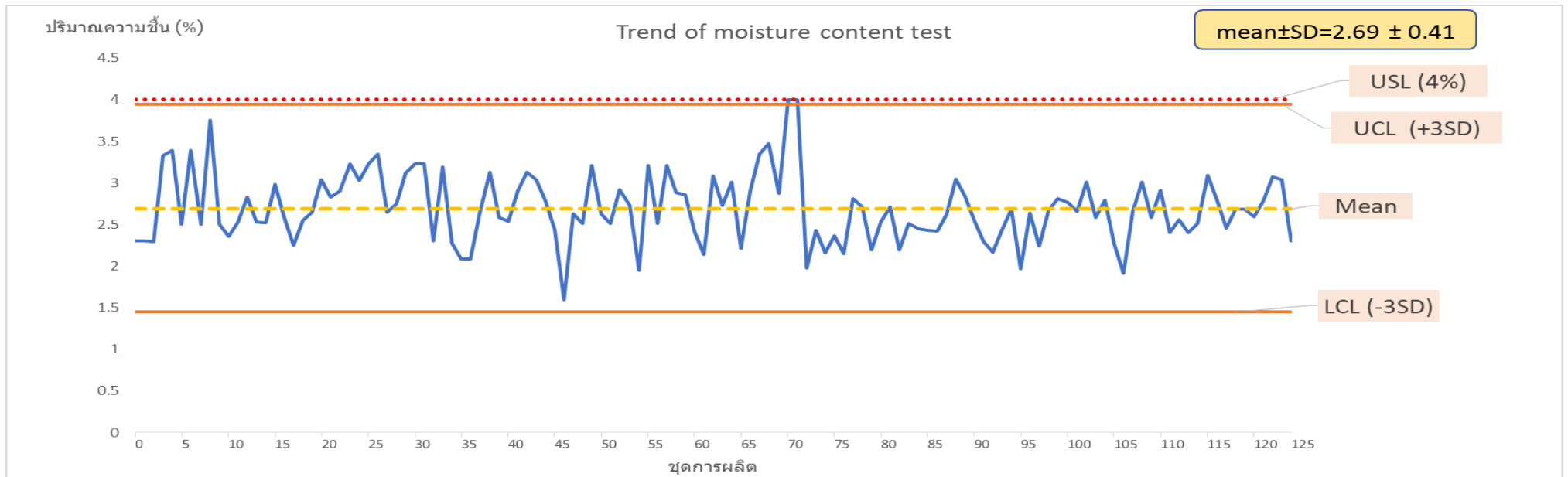
กราฟที่ 1 แนวโน้มปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้า



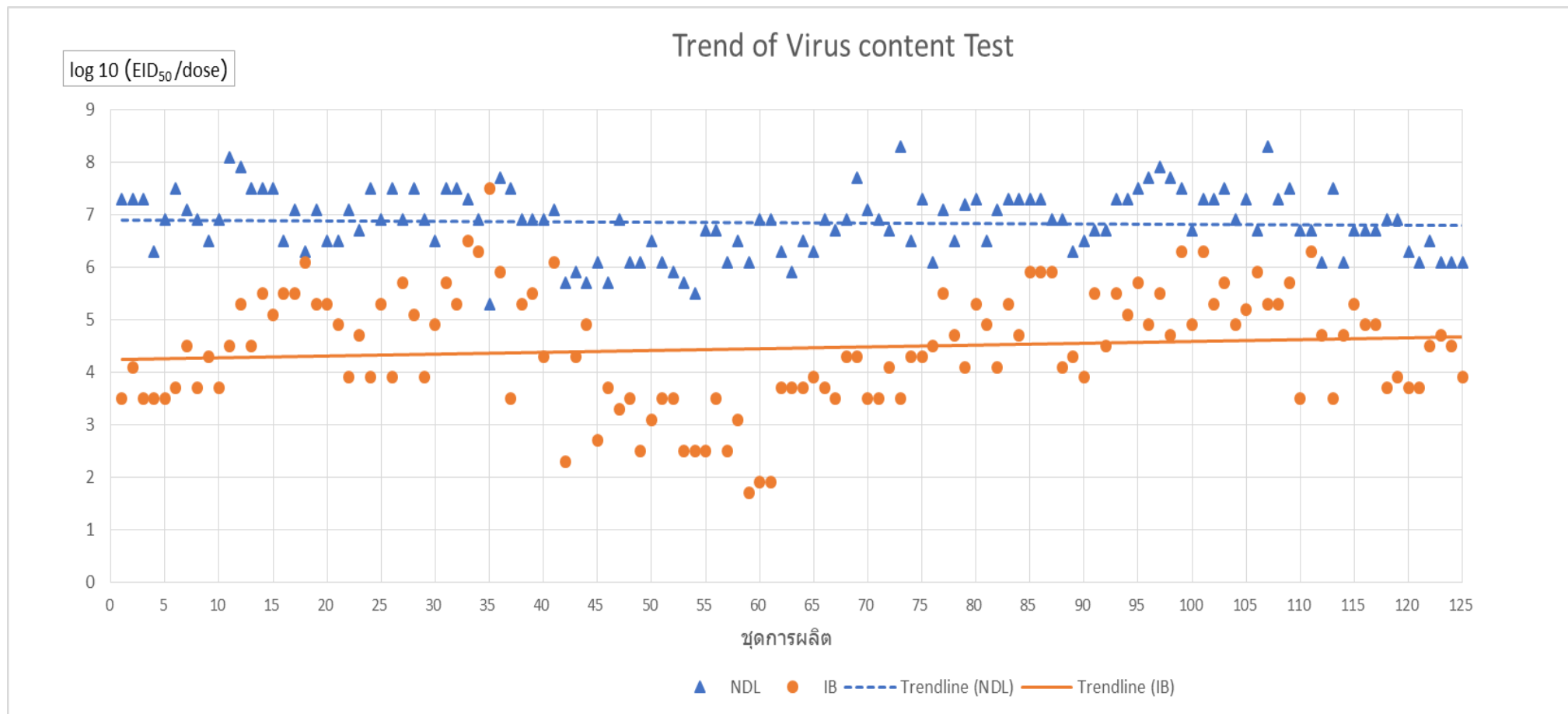
กราฟที่ 2 แนวโน้มปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน



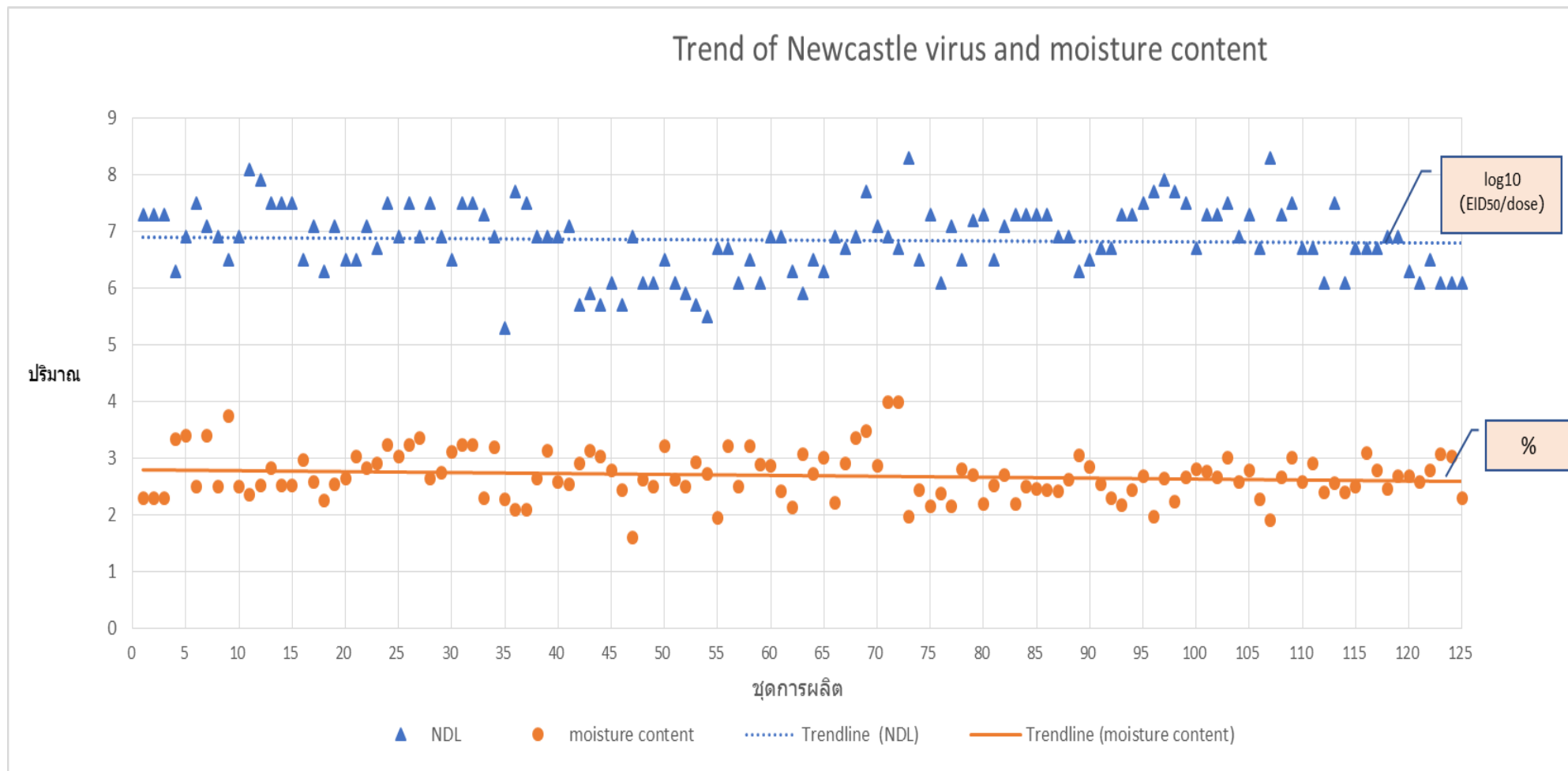
กราฟที่ 3 แนวโน้มปริมาณความชื้น



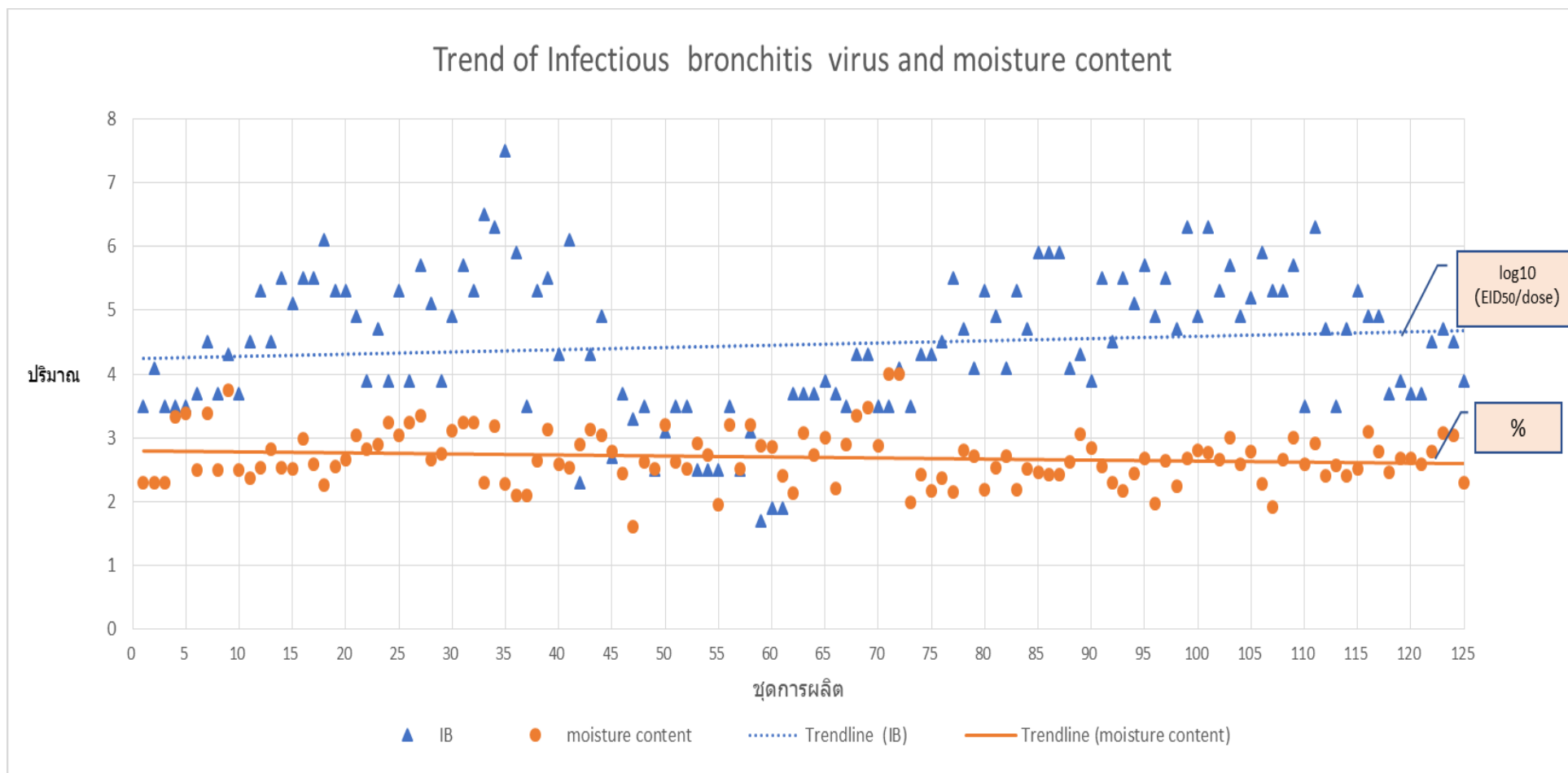
กราฟที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่



กราฟที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน ลาโซต้าและปริมาณความชื้น



กราฟที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน และปริมาณความชื้น



The Relationship between moisture and virus content of combined Newcastle disease and Infectious bronchitis vaccine: Trend analysis

Supaya Trekamon¹ Jinnapat Panchaphanpong¹

Abstract

The objective of the study is trend analysis of quality tests in combined Newcastle and Infectious bronchitis vaccine since 2017 – 2019. The correlation coefficient is used to evaluate relation of virus content and virus moisture. The standard deviation is used to evaluate consistency of the vaccine. The all of them are important for annual product review according to the GMP regulation.

The results of the correlation coefficient in Newcastle stain Lasota and infectious bronchitis virus content is same direction and the relation is medium level. The results of the correlation coefficient in Newcastle stain Lasota and moisture content is opposite direction and the relation is medium level. The results of the correlation coefficient in infectious bronchitis virus content and moisture content is opposite direction and the relation is low level. The result can predict the direction of virus content is the same direction while the moisture content is opposite. The results of the standard deviation in trend analysis show the most of the virus content and the moisture content are in the range of $\text{mean} \pm 3\text{SD}$.

In conclusion, the combined Newcastle and Infectious bronchitis vaccines are consistent quality product.

Keywords: Trend analysis, combined Newcastle and Infectious bronchitis vaccine, virus content, moisture content

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130