การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ

นลินี หงษ์ชุมพล[1] ละมูล โม้ลี[2]

บทคัดย่อ

ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับต้นแบบโดยเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ FS-L3 ในขวดเพาะเซลล์พลาสติกขนาด 225 ตารางเซนติเมตร ใช้อาหารเลี้ยงไวรัสที่มีซีรัมโค 10% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน นำมาผสมกับสารคงสภาพประกอบด้วยโพลิไวนิลไพโรลิโดนและแลคโตส ผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง 3 ชุด จำนวน 26,600, 33,870 และ 34,110 โด๊ส ตามลำดับ ปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนทำแห้งและหลังทำแห้งเท่ากับ 6.83±0.58 log $TCID_{50}$/มล. และ 5.22±0.63 log$TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ ทดสอบความปลอดภัยพบว่าวัคซีนทุกชุดมีความปลอดภัยไม่พบอาการแพ้หรือผิดปกติบริเวณที่ฉีด องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศกำหนดความคุ้มโรคของวัคซีนในสุกรต้องไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส ซึ่งการทดสอบความคุ้มโรควัคซีนระดับต้นแบบทั้ง 3 ชุด มีความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319.890 PD_{50}/โด๊ส ทุกชุด

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพในห้องปฏิบัติการ วัคซีนมีความปลอดภัยและมีความคุ้มโรคในสุกรตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคตได้

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 ระดับต้นแบบ

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกร เกิดจากเชื้อไวรัส Classical swine fever อยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus (สุพล, 2543) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก ติดต่อโดยการสัมผัสกับสัตว์ป่วย สิ่งขับถ่าย น้ำเชื้อ หรือสารคัดหลั่งจากสัตว์ที่ป่วยหรือตาย การเข้าออกฟาร์มที่เกิดโรค การใช้เครื่องมืออุปกรณ์ร่วมกันระหว่างฟาร์ม ประเทศไทยมีรายงานการพบโรคอหิวาต์สุกรตั้งแต่ พ.ศ. 2493 สถานการณ์ของโรคล่าสุดในปี 2560 พบการระบาด 1 ครั้ง ในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์ (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุตรดิตถ์, 2560) แม้ว่าอุบัติการณ์ของโรคจะลดลงแต่ยังมีความจำเป็นต้องควบคุม ป้องกันและเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการป้องกันโรคที่สำคัญคือการฉีดวัคซีนและการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ของฟาร์ม

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส เป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดผ่านกระต่าย ซึ่งเป็นวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่การผลิตวัคซีนแต่ละชุดต้องใช้กระต่ายในการเพิ่มปริมาณไวรัสอย่างน้อยชุดละ 100 ตัว จึงจำเป็นต้องมีแหล่งเพาะเลี้ยงที่ผลิตกระต่ายได้อย่างต่อเนื่องและกระต่ายต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ ซึ่งแหล่งเพาะเลี้ยงกระต่ายเพาะพันธุ์กระต่ายไม่ทันกับความต้องการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ที่มีความต้องการปีละ 5,000 – 6,000 ตัว หรือบางแหล่งเลี้ยงกระต่ายที่สายพันธุ์ไม่ตรงตามความต้องการ เป็นกระต่ายที่เลี้ยงเพื่อความสวยงามทำให้ใช้ในงานผลิตวัคซีนค่อนข้างยาก เป็นผลให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนได้อย่างสม่ำเสมอและเพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ปริมาณการใช้วัคซีนอหิวาต์สุกรของกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ ปี 2554–2558 เฉลี่ยปีละ 6.26 ล้านโด๊ส เมื่อพบปัญหากระต่ายไม่เพียงพอหรือไม่ตรงกับการใช้งาน จึงทำให้ปริมาณการผลิตลดลงไม่ทันกับความต้องการของเกษตรกร เสียดุลการค้ากับต่างประเทศในการนำเข้าวัคซีน

วัคซีนอหิวาต์สุกรมีหลายชนิดมีทั้งชนิดผ่านกระต่าย (Lapinized vaccine) ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) และชนิด Subunit ซึ่งวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัย กระตุ้นแอนติบอดีและให้ความคุ้มโรคได้ดีสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคในวันที่ 5 หลังสุกรได้รับวัคซีน และให้ความคุ้มโรคมากกว่า 1 ปี (ฉาย, 2529) วัคซีนชนิดนี้จึงยังเป็นที่นิยมใช้และมีบริษัทผู้ผลิตวัคซีนยังคงดำเนินการผลิตอยู่หลายชนิด เช่น Chinese strain (C strain) และ Lapinized Philippines Coronel (LPC) เป็นต้น (Pan et al., 2008) การพัฒนาไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยงมีการศึกษาโดยใช้เซลล์หลายชนิด เช่น ไตหนูตะเภา (ฉายและคณะ, 2529) SK-6 (Terpstra et al., 1990) และ PK-15 (Wu et al., 2013) เป็นต้น ปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ซึ่งข้อดีของวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงคือ ควบคุมการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ ให้ความคุ้มโรคได้เช่นเดียวกันกับชนิดผ่านกระต่ายแต่ผลิตได้ปริมาณที่เพียงพอมากกว่า (Nath et al., 2016) ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Coglapest และ Green cross เป็นต้น ส่วนการพัฒนาวัคซีนชนิด Subunit ซึ่งสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรได้เช่นกันแต่อาจใช้เวลานานกว่าและมีราคาสูง ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Porcilis Pesti (Coronado et al., 2021) ในประเทศไทยการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง วาสนาและคณะ (2544) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด พบว่าเชื้อไวรัสสามารถเจริญได้ในเซลล์ SK6 และเซลล์ FS-L3 ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร รวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อโค (Bovine Fetal Muscle; BFM) จากนั้นจึงทดลองเพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ FS-L3 ที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ แล้วนำเชื้อไวรัสที่ได้มาทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสุกร พบว่าเชื้อไวรัสมีความปลอดภัยต่อสุกร ไม่พบเชื้อไวรัสในเลือด ไม่พบการแพร่เชื้อไวรัสไปยังสุกรที่นำมา

เลี้ยงรวมกันและเป็นไวรัสวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคสูง สามารถนำไปพัฒนาผลิตเป็นวัคซีนชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (วาสนาและคณะ, 2548) ข้อดีของเซลล์ FS-L3 คือเพาะเลี้ยงได้โดยไม่ต้องใช้ซีรัมเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Sakoda and Fukusho, 1998) ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆจากซีรัม

สทช.จึงมีแนวคิดพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง เพราะสามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมาเพิ่มปริมาณไวรัสแทนกระต่ายได้ เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มปริมาณได้ตามความต้องการใช้งาน ควบคุมคุณภาพของเซลล์ในระหว่างการผลิตได้ง่ายกว่าการใช้กระต่าย หากมีการเก็บรักษาที่เหมาะสมจะเก็บสต็อกเซลล์เพื่อใช้งานได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะสามารถนำมาผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรได้ต่อเนื่องและควบคุมคุณภาพการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ อีกทั้งเป็นการลดปริมาณกระต่ายในกระบวนการผลิตวัคซีนด้วย ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 มาใช้เพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรและผลิตเป็นวัคซีน เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ (pilot scale) และทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองตามมาตรฐานสากล

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3

ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดผ่านกระต่ายที่สทช. ได้รับมาจากประเทศฮังการี (วาสนา, 2548ก) และ adapt ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (Growth medium, GM) : Eagle's Minimum essential medium (MEM) Nissui No.1[1] ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptose phosphate broth[2] 0.295%, Bacto Peptone[3] 0.5%, 10 m*M* N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid[4] (BES), L-glutamine[5] 0.292 มก./มล., sodium bicarbonate[6] 2.25 มก./มล. และ antibiotic[7] 1%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium, MM) : Eagle's Minimum essential medium (MEM) Nissui No.1[1] ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptose phosphate broth[2] 0.295%, Bacto Peptone[3] 0.5%, 10 m*M* N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid[4] (BES), L-glutamine[5] 0.292 มก./มล., sodium bicarbonate[6] 2.25 มก./มล., antibiotic[7] 1% และ fetal bovine serum[8]

สารคงสภาพ (Stabilizer)

ประกอบด้วย polyvinyl pyrrolidone[9] 10% และ lactose[10] 0.3% ในน้ำกลั่น สำหรับผสม virus stock ในการทำแห้งวัคซีน

สัตว์ทดลอง

สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large white, Landrace, Duroc) คละเพศ อายุ 6-10 สัปดาห์ จำนวน 45 ตัว เป็นสุกรจากฟาร์มเอกชนที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร ดำเนินการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สทช. อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา มีระบบการเลี้ยงแบบ Conventional หลังสิ้นสุดการทดลองทำการุณยฆาตด้วยวิธี frontal shock (Gunshot) (American Association of Swine Veterinarians and National Pork Board, 2008) ปลดสัตว์ทดลองด้วยวิธีการเผาซาก

---

[1]Nissui, Japan [2]BD, USA [3]BD, USA [4]Sigma, USA [5]Merck, Germany [6]Sigma, USA [7]Jiangxi dongfang, China [8]Capricorn, South America [9]Kollidon^{R} 90F, Germany [10]SuperTab^{R} 21AN, Germany

การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L3

เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L3 ในขวดเพาะเซลล์พลาสติกขนาด 225 ตารางเซนติเมตร[11] บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จึงนำมาใช้งาน

การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส

เปรียบเทียบความเข้มข้นของซีรัมโค (Fetal bovine serum, FBS)

เพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ โดยคำนวณให้ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ (Multiplicity of Infection; MOI) เท่ากับ 0.1 (กัญญา, 2550) เติม MM ที่มีความเข้มข้นของ FBS เป็น 2%, 5% และ 10% บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 7-14 หลังเพาะ ส่งตรวจหาปริมาณไวรัส เปรียบเทียบความเข้มข้นของ FBS และวันที่ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดหลังเพาะ

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสเมื่อเพาะต่อเนื่อง

นำไวรัสจากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ FBS ที่ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดมาเพาะต่อเนื่องในสภาวะเดียวกัน เปรียบเทียบปริมาณไวรัสแต่ละครั้ง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเลือก Working seed virus (WSV) ของการศึกษาในครั้งนี้

เพาะเลี้ยงเก็บเป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน

เพาะเชื้อไวรัส WSV ในเซลล์ FS-L3 ที่เตรียมไว้ จำนวน 3 ชุดๆละ 20 ขวด เก็บตัวอย่างน้ำไวรัสแต่ละชุดส่งตรวจปริมาณไวรัส และเก็บเป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน

การผลิตวัคซีนระดับต้นแบบ (pilot scale)

นำ virus stock มาผสมกับสารคงสภาพในอัตราส่วน 1:1 บรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 6 มล. ขวดละ 1 มล. นำไปทำแห้งนานประมาณ 27 ชั่วโมง ได้เป็นวัคซีนสำเร็จรูปเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การทดสอบคุณภาพ

ทดสอบคุณลักษณะทั่วไปทางกายภาพ (property test) เป็นวัคซีนชนิดแห้ง สีขาวนวล ละลายง่าย ไม่มีสิ่งแปลกปลอม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ก)

ทดสอบหาปริมาณความชื้น (moisture test) ด้วยเครื่องหาปริมาณความชื้นแบบ Karl Fisher method ต้องไม่เกิน 4% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ข)

ทดสอบสภาพสุญญากาศในขวดบรรจุวัคซีน ด้วยเครื่องวัดสภาพสุญญากาศ (vacuum tester coil) ขวดวัคซีนที่มีสภาพสุญญากาศจะเปล่งแสงสีม่วง/เขียว ภายในขวดบรรจุ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก)

การตรวจหาเชื้อ Mycoplasma ด้วยวิธี MycoAlert™ Plus ต้องปราศจากเชื้อ mycoplasma (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข)

ทดสอบความปลอดเชื้อของเชื้อราและแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (sterility test) ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2563)

ตรวจปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนและหลังทำแห้งด้วยวิธีย้อมสี Immunoperoxidase (วาสนา, 2548ข)

ทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง (safety test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ค) เตรียมสุกรทดลอง 3 ตัว ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติ ให้กับสุกรทุกตัว สังเกตอาการ 21 วัน สุกรทุกตัวต้องไม่แสดงอาการป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร และไม่พบความผิดปกติบริเวณที่ฉีดหรืออาการแพ้อื่นๆ

---

[11]Corning, USA

ทดสอบความคุ้มโรคในสุกรทดลอง (potency test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560) เตรียมสุกรทดลอง 12 ตัว ฉีดวัคซีนที่เจือจางขนาด 40 เท่า และ 160 เท่าของโด๊สปกติ ให้กับสุกรความเจือจางละ 5 ตัว สุกรกลุ่มควบคุม 2 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ฉีดด้วยเชื้อพิษอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID_{50}/มล. (50% pig infective dose) ให้สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนทั้ง 10 ตัว และกลุ่มควบคุม 2 ตัว สังเกตอาการ 14 วัน นำข้อมูลสุกรที่แสดงอาการป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรมาคำนวณด้วยวิธีการมาตรฐาน (Reed and Muench, 1938) ค่าความคุ้มโรคที่ได้ต้องไม่น้อยกว่า 100 PD_{50} (50% protective dose) ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมต้องตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรภายใน 14 วัน หลังจากฉีดเชื้อพิษ

ผล

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสในอาหารที่มีความเข้มข้นของ FBS ที่แตกต่างกัน พบว่าไวรัสที่เพาะในอาหารที่มี FBS 10% ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดวันที่ 12 หลังเพาะ เท่ากับ 6.33 log $TCID_{50}$/มล. (50% tissue culture infective dose) (รูปที่ 1)

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่องจำนวน 7 passage ด้วยสภาวะความเข้มข้น FBS 10% บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส และเก็บไวรัส (harvest) วันที่ 12 หลังเพาะ มีปริมาณไวรัส P.1 - P.7 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่ง P.5, P.6 และ P.7 มีปริมาณไวรัสสูงที่สุดเท่ากับ 6.50 log $TCID_{50}$/มล. เท่ากัน จึงใช้ไวรัส P.7 เป็น WSV เพื่อใช้เพาะไวรัสผลิตเป็นวัคซีนต้นแบบสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ผลการเพาะไวรัส 3 ชุด เพื่อใช้เป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน เก็บไวรัสวันที่ 12 หลังเพาะ ได้ปริมาตรแต่ละชุดเป็น 1,400 มล., 1,800 มล. และ 1,790 มล. นำมาผลิตวัคซีนต้นแบบได้จำนวนวัคซีนทั้งสิ้น 94,580 โด๊ส (ตารางที่ 2) เนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกระบวนการเพาะเซลล์จึงทำให้ปริมาตรแต่ละชุดไม่เท่ากัน

ผลการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ วัคซีนทุกชุดผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ภายในขวดวัคซีนมีสภาพสุญญากาศ ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและ Mycoplasma ปริมาณความชื้นเฉลี่ยหลังทำแห้งเท่ากับ 2.58±0.24% ปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนและหลังทำแห้งเท่ากับ 6.83±0.58 และ 5.22±0.63 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง ไม่พบความผิดปกติ การบวม หรืออักเสบบริเวณที่ฉีด ไม่พบอาการแพ้วัคซีน สุกรไม่แสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 2)

ผลการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรทดลอง สุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนขนาดความเจือจาง 40 เท่าของโด๊สปกติ สุกรมีความคุ้มโรคต่อไวรัสอหิวาต์สุกร เมื่อฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID_{50}/มล. สุกรทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีสุกรตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร คิดเป็นร้อยละ 100 สุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนขนาดความเจือจาง 160 เท่าของโด๊สปกติ ซึ่งมีความเจือจางมากกว่ากลุ่มแรก สุกรมีความคุ้มโรคต่อไวรัสอหิวาต์สุกร เมื่อฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID_{50}/มล. สุกรทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีสุกรตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร คิดเป็นร้อยละ 100 เช่นกัน เมื่อนำจำนวนสุกรรอด/ตาย ของแต่ละชุดมาคำนวณด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อหาระดับความคุ้มโรค พบว่าวัคซีนต้นแบบทั้ง 3 ชุด มีระดับความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319.890 PD_{50}/โด๊ส ทุกชุด ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 5)

วิจารณ์

จากผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณซีรัมตัวอ่อนลูกโค หรือ FBS ในอาหารเลี้ยงไวรัส พบว่าไวรัสที่เพาะในอาหารที่มี FBS 10% ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุด (รูปที่ 1) การศึกษาในครั้งนี้ได้นำไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสจาก

การเพาะด้วยซีรัมตัวอ่อนลูกโค 10% มาผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งและทดสอบความปลอดภัยในสุกร ปรากฏว่าวัคซีนมีความปลอดภัยไม่พบอาการแพ้วัคซีนหรือความผิดปกติบริเวณที่ฉีด ซึ่งวาสนาและคณะ (2545) ทดสอบวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรน GPE$^-$ ที่ผลิตจากไวรัสที่เพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของซีรัมโค 5% สุกรที่ฉีดวัคซีนไม่พบอาการแพ้วัคซีน ไม่มีไข้ และไม่พบปฏิกิริยาบริเวณที่ฉีดเช่นกัน วัคซีนมีส่วนประกอบของสารหลายชนิด เช่น ไวรัส (active immunizing antigens) สารคงสภาพ ยาปฏิชีวนะ ซีรัม และอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดเหล่านี้มีแนวโน้มเป็นสาเหตุของอาการแพ้วัคซีนได้ โดยไม่อาจระบุได้ชัดเจนว่าการแพ้แต่ละครั้งมาจากสาเหตุใด (Chung, 2014) จึงควรสังเกตอาการของสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนและจัดเตรียมอุปกรณ์หรือยาที่จำเป็นสำหรับแก้ไขหากพบสัตว์แพ้วัคซีน ทั้งนี้ซีรัมโคที่ใช้ในการผลิตวัคซีนถือเป็นต้นทุนที่มีราคาสูงหากจะพัฒนาผลิตในระดับอุตสาหกรรม ต้องศึกษาการใช้ในระดับที่ต่ำกว่าแต่ได้ปริมาณไวรัสที่เพียงพอที่จะผลิตวัคซีนเพื่อเป็นการลดต้นทุน

จากผลการเพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่อง 7 passage พบว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพิ่มขึ้นในแต่ละ passage และมีปริมาณไวรัสสูงที่สุดเท่ากับ 6.50 log $TCID_{50}$/มล. จำนวน 3 passage เท่ากัน ได้แก่ P.5, P.6 และ P.7 จึงกำหนดให้ P.5 เป็น master seed virus (MSV), P.6 เป็น working seed virus 1 (WSV1) และ P.7 เป็น working seed virus 2 (WSV2) เนื่องจากมีปริมาณไวรัสสูงและเป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับการผสมกับสารคงสภาพ นำเข้ากระบวนการทำแห้งเป็นวัคซีนสำเร็จรูปแล้ว ยังคงมีปริมาณไวรัสหลังทำแห้งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ ASEAN (1998) ซึ่งไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายที่เพาะในเซลล์ FS-L3 เป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อสุกรและให้ความคุ้มโรคได้ดี สามารถนำไปใช้เป็นไวรัสวัคซีนตั้งต้น (seed vaccine virus) สำหรับผลิตวัคซีนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (วาสนาและคณะ, 2548) การกำหนด MSV และ WSV เป็นการวางแผนใช้ไวรัสวัคซีนตั้งต้นในการผลิตวัคซีน (seed lot system) เพื่อสร้างความมั่นใจว่าวัคซีนที่ผลิตทุกครั้งมาจากไวรัสวัคซีนตั้งต้นแหล่งเดียวกัน สามารถผลิตเป็นวัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่สม่ำเสมอและผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งไวรัสที่จะนำมาใช้เป็นไวรัสวัคซีนตั้งต้นต้องมีปริมาณไวรัสที่สูงและสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไวรัสเป็นที่น่าพอใจ (Harrak et al., 2021) เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดด้านระยะเวลาจึงทำให้เพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่องได้เพียงครั้งเดียวโดยไม่ได้ทำซ้ำ ข้อมูลปริมาณไวรัสที่ได้จึงอาจมีความคลาดเคลื่อน แต่สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อวางแผนการศึกษาที่ละเอียดครอบคลุมเพื่อเลือก MSV และ WSV ที่เหมาะสมได้

วัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ จำนวน 3 ชุด มีปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนทำแห้ง 6.83±0.58 log $TCID_{50}$/มล. เมื่อนำไวรัสที่ได้มาผสมกับสารคงสภาพ บรรจุลงขวดแก้ว ผ่านการทำแห้งแล้ววัคซีนมีปริมาณไวรัสเฉลี่ยหลังทำแห้ง 5.22±0.63 log $TCID_{50}$/มล. คิดเป็นอัตราการสูญเสียไวรัสร้อยละ 23.57 แม้จะมีการสูญเสียไวรัสระหว่างการผลิตแต่ปริมาณไวรัสหลังทำแห้งยังคงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ ASEAN (1998) คือ วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 2.3 log $TCID_{50}$/มล. การผลิตวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งพบการสูญเสียไวรัสระหว่างการผลิตได้จากหลายขั้นตอน เช่น การแช่แข็งไวรัส การละลายไวรัส การทำแห้งวัคซีนและชนิดของสารคงสภาพ เป็นต้น ฤทธิ์ลือชัยและธวัชชัย (2554) เปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีนกาฬโรคเป็ดก่อนและหลังทำแห้ง ซึ่งสารคงสภาพที่ใช้ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเป็นโพลิไวนิลไพโรลิโดนและแลคโตสเช่นเดียวกับวัคซีนอหิวาต์สุกร แต่วัคซีนกาฬโรคเป็ดมีทริปโตนเป็นส่วนประกอบเพิ่ม พบว่ามีการสูญเสียไวรัสหลังทำแห้งร้อยละ 7.08 แต่วัคซีนกาฬโรคเป็ดสำเร็จรูปยังมีปริมาณไวรัสอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน จึงแนะนำให้เตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดก่อนผลิตวัคซีนให้มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 6.5 log $TCID_{50}$/มล.

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรระดับต้นแบบ วัคซีนมีระดับความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319.890 PD_{50}/โด๊ส สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส (OIE, 2019) สุกรที่ได้รับวัคซีนไม่แสดงอาการป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในต่อมน้ำเหลือง ม้ามและต่อมทอนซิลหลังฉีดเชื้อพิษทับ สามารถป้องกันโรคอหิวาต์สุกรได้เช่นเดียวกับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชนีส ที่กรมปศุสัตว์ผลิตในปัจจุบันซึ่งความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319 PD_{50}/โด๊ส วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันโรคได้อย่างสมบูรณ์ ภายหลังฉีดวัคซีนไม่พบอาการของโรค ไม่พบไวรัสในกระแสเลือดและไม่พบการแพร่เชื้อไปยังสุกรตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยังป้องกันการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้หลายสายพันธุ์ (Coronado et al., 2021)

อย่างไรก็ตาม แม้วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ ที่ผลิตได้จะมีปริมาณไวรัสของวัคซีนหลังทำแห้งตามมาตรฐาน ASEAN และมีความคุ้มโรคตามมาตรฐาน OIE ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะการให้ความคุ้มโรคหลังจากสุกรได้รับวัคซีน (Duration of immunity) และความคงตัวของวัคซีนเมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างกัน (Stability) ซึ่งจะได้วางแผนการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุป

การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ จำนวน 3 ชุด ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพในห้องปฏิบัติการ วัคซีนมีความปลอดภัยและมีระดับความคุ้มโรคในสุกรตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิงรื่นฤดี บุณยะโหตระ สัตวแพทย์หญิงสุจิรา ปาจริยานนท์ และสัตวแพทย์หญิงวาสนา ภิญโญชนม์ ผู้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการดำเนินงาน คณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่ายที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับโครงการวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้ข้อแนะนำและข้อเสนอแนะระหว่างการดำเนินงานวิจัย นายสัตวแพทย์ดิถี ประเสริฐสุวรรณ คุณธีระพงษ์ เจริญ และบุคลากรกลุ่มไวรัสวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ทำให้การวิจัยบรรลุตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

กัญญา สุวินทรากร 2550 เกร็ดความรู้จากการพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 17 ฉบับที่ 1 หน้า 23-30

ฉาย จอมเกาะ 2529 วัคซินอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร รายงานทางวิชาการ 2526 – 2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 384-390

ฉาย จอมเกาะ สละ กองสมัคร มิโนรุ ซาวาดา 2529 การทดลองผลิตวัคซินอหิวาต์สุกรเชื้อเป็นชนิดทิชชูคัลเจอร์ รายงานทางวิชาการ 2526 – 2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 357-365

วาสนา ภิญโญชนม์ 2548ก โรคอหิวาต์สุกร : การวิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN 974-682-214-4 หน้า 43

วาสนา ภิญโญชนม์ 2548ข คู่มือการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทางห้องปฏิบัติการ โรคอหิวาต์สุกร : การวิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN 974-682-214-4 หน้า 14 – 17

วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากร สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน และสุรพงษ์ อุดมพันท์ 2548 การทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคของเชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสที่พัฒนาในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตวแพทยสาร 56(1): 45-56

วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากร สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน และฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2544 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนิสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ไลน์ สัตวแพทยสาร 52(3) : 21-30

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากร ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ และดุลยทัต คันธวร 2545 การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง รายงานฉบับสมบูรณ์ : การวิจัยและพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย สำนักวิจัยและบริการวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ISBN 974-326-121-4 หน้า 177–178

สุพล เลื่องยศลือชากุล 2543 บทที่ 1 โรคอหิวาต์สุกร ใน โรคติดเชื้อของสุกร โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ หน้า 1-17

สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุตรดิตถ์ 2560 เรื่อง ขอส่งสำเนาประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว ชนิดโรคอหิวาต์สุกร (Classical Swine Fever) แหล่งที่มา http://www.dld.go.th/th/images/stories/warning/2560/256011/25601102_1.pdf 7 พฤศจิกายน 2563

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร SOP-QCSD-013 หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจสอบคุณลักษณะทั่วไปและการละลายของวัคซีนอหิวาต์สุกร SOP-QCSD-002 หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบหาปริมาณความชื้น SOP-QCSD-004 หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ค มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์สุกร SOP-QCSD-011 หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบสภาพสุญญากาศในขวดบรรจุวัคซีน SOP-QCP-033 หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจหาเชื้อ Mycoplasma โดยวิธี MycoAlert™ Plus SOP-QCR-019 หน้า 1-8

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2563 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบความปลอดเชื้อของเชื้อราและแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป SOP-QCP-031 หน้า 1-7

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และธวัชชัย ปัจฉานุกูล 2554 การสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนแช่แข็งและทำแห้งของการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 20 ฉบับที่ 1-2 และปีที่ 21 ฉบับที่ 1-2 หน้า 40–47

American Association of Swine Veterinarians and National Pork Board. 2008. On-farm euthanasia of swine recommendations for the producer. p.7 https://www.aasv.org/aasv/documents/SwineEuthanasia.pdf [Accessed 7 November 2020].

Asean standard for animal vaccines. 1998. Asean standard requirements for swine fever vaccine (cell culture origin), live. ASEAN Cooperation in Food, Agriculture and Forestry. pp.60-61.

Chung, E.H. 2014. Vaccine allergies. Clinical and experimental vaccine research. 3:50-57.

Coronado, L., Perera C.L., Rios L., Frias M.T., and Perez L.J. 2021. A critical review about different vaccines against classical swine fever virus and their repercussions in endemic regions. Vaccine.9(2):1-22 https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/154 [Accessed 1 August 2021].

Harrak, M.E., Belkourati, I., Boumart, Z., Fakri, F., and Hamdi, J. 2021. Chapter 12 The manufacture of veterinary vaccines: quality control of the manufacturing process. Veterinary vaccines: Principles and applications. 1st ed. John Wiley & Sons Ltd. pp.147-159. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119506287.ch12 [Accessed 29 October 2021].

Nath, M.K., Sarma, D.K., Das, B.C., Deka, P., Kalita, D., Dutta, J.B., Mahato, G., Sarma, S., and Roychoudhury, P. 2016. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated with cell culture adapted classical swine fever vaccine. Veterinary world, EISSN: 2231-0916. pp.308-312.

Office International des Epizooties (OIE). 2019. Classical swine fever (infection with classical swine fever virus) *In* Terrestrial Manual chapter 3.8.3. pp.1-26.

Pan, C.H., Jong, M.H., Huang, Y.L., Huang, T.S., Chao, P.H., and Lai S.S. 2008. Rapid detection and differentiation of wild-type and three attenuated lapinized vaccine strains of classical swine fever virus by reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 20:448-456.

Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. The American Journal of Hygiene. 27(3):493-497.

Sakoda, Y., and Fukusho, A. 1998. Establishment and characterization of a porcine kidney cell line, FS–L3, which forms unique multicellular domes in serum-free culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 34:53-57.

Terpstra, C., Woortmeyer, R., and Bartelling, S.J. 1990. Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. Deutsch Tieraztliche Wochenschrift. 97(2):77-79.

Wu, S.C., Liau, M.Y., Lin, Y.C., Sun, C.J., and Wang, C.T. 2013. The feasibility of a novel bioreactor for vaccine production of classical swine fever virus. Vaccine. 31:867-872.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส (log $TCID_{50}$/มล.) ที่เพาะในเซลล์ FS-L3 ต่อเนื่อง

Passage (P.)	1	2	3	4	5	6	7
ปริมาณไวรัส (log $TCID_{50}$/มล.)	5.00	4.33	5.33	6.00	6.50	6.50	6.50

ตารางที่ 2 ปริมาตร Virus stock ก่อนและหลังผสมกับสารคงสภาพ และจำนวนวัคซีนทำแห้งสำเร็จรูป

ชุดที่	Virus stock (มล.)	สารคงสภาพ (มล.)	Vaccine bulk (มล.)	วัคซีนสำเร็จรูป (ขวด)	คิดเป็นวัคซีน (โด๊ส)
1	1,400*	1,400	2,800	2,660**	26,600
2	1,800*	1,800	3,600	3,387**	33,870
3	1,790*	1,790	3,580	3,411**	34,110
รวม	4,990	4,990	9,980	9,458	94,580

* สูญเสียจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกระบวนการเพาะเซลล์

** สูญเสียจากการบรรจุ bulk vaccine ลงขวด

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพทางปฏิบัติการห้องวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ

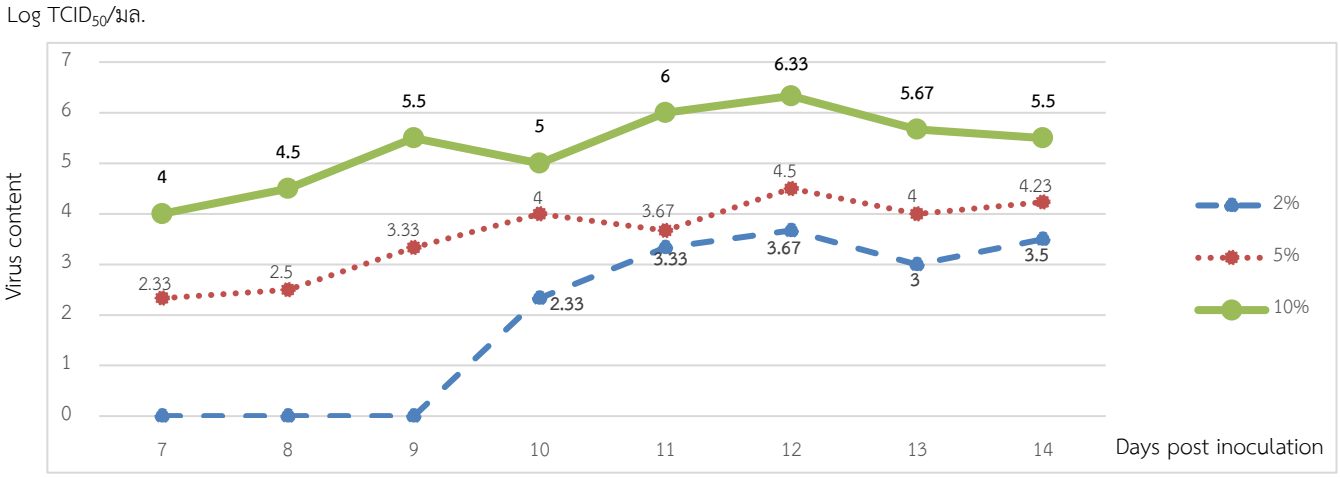
การทดสอบ	การตัดสิน	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	Mean ±SD
1. คุณลักษณะทั่วไปทางกายภาพ	ตามมาตรฐาน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
2. ความเป็นสุญญากาศ	เป็นสุญญากาศ	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
3. ความชื้น	ไม่เกิน 4%	2.57%	2.82%	2.35%	2.58±0.24
4. ไม่ปนเปื้อนเชื้ออื่น	ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและ Mycoplasma	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
5. ปริมาณไวรัส (log $TCID_{50}$/มล.)					
5.1 ก่อนทำแห้ง		6.5	6.5	7.5	6.83±0.58
5.2 หลังทำแห้ง	ไม่น้อยกว่า 2.3	4.5	5.5	5.67	5.22±0.63

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ ในสุกรทดลอง

การทดสอบ	การตัดสิน	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3
1. ความปลอดภัย	ไม่พบความผิดปกติ บวม หรืออักเสบบริเวณที่ฉีด สุกรไม่มีอาการแพ้	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
2. ความคุ้มโรค	ไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส	319.890	319.890	319.890

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคุ้มโรควัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ ในสุกรทดลอง

ชุดวัคซีน	สุกรกลุ่มทดลอง (รอด/ตาย)		สุกรกลุ่มควบคุม (รอด/ตาย)	ความคุ้มโรค
	เจือจาง 40 เท่า (%รอด)	เจือจาง 160 เท่า (%รอด)	(%รอด)	(PD_{50}/โด๊ส)
1	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890
2	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890
3	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890



รูปที่ 1 ปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส (log $TCID_{50}$/มล.) ที่เพาะในเซลล์ FS-L3 ในอาหารเลี้ยงที่มี FBS 2%, 5%, และ 10%

(ก) **(ข)**

รูปที่ 2 การทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง (ก) ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติให้กับสุกรทดลอง (ข) สุกรที่ได้รับวัคซีนไม่มีอาการของโรค ไม่พบความผิดปกติบริเวณที่ฉีด

Development of classical swine fever vaccine; Chinese strain in tissue culture, pilot scale

Nalinee Hongchumpon[1] Lamul Molee[2]

Abstract

The tissue-based classical swine fever vaccine, Chinese strain, was developed from a lab scale to pilot production. The FS-L3 cell line cultured in 225 cm^2 plastic tissue culture flask was inoculated with Chinese strain virus in growth media adding 10% fetal bovine serum and incubated at 37°C. After 12 days, three batches of the harvested virus were formulated with polyvinyl pyrrolidone and lactose to produce lyophilized vaccine equal to 26,600, 33,870, and 34,110 doses respectively. The mean of virus content before and after the lyophilized process were 6.83±0.58 and 5.22±0.63 log $TCID_{50}$/ml. respectively. None of the allergic and local reactions were found in vaccinated animals. The OIE Terrestrial Manual required the minimum protective dose in vaccinated animals not less than 100 PD_{50}/dose and all vaccine batches reached the requirement given not less than 319.890 PD_{50}/dose.

In summary, the pilot vaccine passed physical property test in laboratory, safety test, and potency test in swine comply with international standards. The improvement of industrial-scale vaccine production can be developing in further study.

Key words: classical swine fever vaccine Chinese strain tissue culture FS-L3 pilot scale

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

[2]National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok, 10900