การพัฒนาวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] วรพร ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ทดลองผลิตวัคซีนเชื้อตาย โดยผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน จำนวน 3 ตำรับ ได้แก่ ตำรับที่ 1 วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน ตำรับที่ 2 วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน และตำรับที่ 3 วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จากนั้นนำวัคซีนไปทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การทดสอบชนิดอิมัลชัน การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบความหนืด และการทดสอบความคงตัว และนำวัคซีนไปทดสอบในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัย การทดสอบความคุ้มโรค และการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่า วัคซีนทุกตำรับผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทางห้องปฏิบัติการ มีความปลอดภัย โดยเป็ดไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ไม่มีอาการและวิการทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ และผลการทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าเป็ดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน และวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด 100% ทั้ง 2 กลุ่ม รวมทั้งเป็ดทดลองที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันและวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ 100% ทั้ง 2 กลุ่มเช่นเดียวกัน และเป็ดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซีนทุกตัว ไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ และจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองกลุ่มมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังฉีดวัคซีน 14 วัน ในขณะที่ผลตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองกลุ่มมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังฉีดวัคซีนนาน 7 และ 14 วัน

ดังนั้นสรุปได้ว่าวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน มีความปลอดภัย ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวสามารถให้ความคุ้มโรคได้ 100% ทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

คำสำคัญ: วัคซีนรวมชนิดเชื้อตายแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน โรคกาฬโรคเป็ด โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ปัจจุบันพบว่าเกษตรกรทั่วประเทศมีการเลี้ยงเป็ดมากถึง 33,604,921 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2565) ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเลี้ยงเป็ดประสบความสำเร็จด้วยดี คือ ต้องมีการควบคุมและป้องกันโรคได้ ซึ่งโรคสำคัญที่มักพบในการเลี้ยงเป็ด คือ โรคกาฬโรคเป็ด และโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ ทั้งสองเป็นโรคติดต่อร้ายแรง มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง การทำวัคซีนเป็นมาตรการในการป้องกันโรคที่ดีที่สุด

การป้องกันโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ โดยการใช้วัคซีนป้องกันโรคแต่ละชนิด เป็นวิธีการที่ปฏิบัติกันมาเป็นเวลานานแล้ว การฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ให้แก่เป็ดจะต้องฉีดต่างช่วงเวลากัน ทำให้เกษตรกรผู้ใช้สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน สัตว์เครียดง่าย ทำให้เกิดปัญหาตามมา เช่น เป็ดกินอาหารได้น้อย ปริมาณไข่ลดลง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ดสำหรับป้องกันโรคทั้งสองชนิด โดยสุวรรณีและวันชัย (2537) ได้ทดลองผลิตและทดสอบวัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด จากวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นที่อ่อนกำลังลงแล้ว (attenuated vaccine) รวมกับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อ (inactivate) โดยผ่านขบวนการพาสเจอไรส์เซชันแล้วนำมารวมกันผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง ในขนาดฉีด 1 มล. ซึ่งวัคซีนรวมที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน แต่เนื่องการจากการผลิตวัคซีนรวมดังกล่าวมีขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยากและหากจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตในรูปแบบอุตสาหกรรมต้องปรับปรุงหรือเพิ่มเติมอุปกรณ์การผลิต รวมทั้งต้องนำแอนติเจนมารวมกันก่อนการทำแห้งและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้ง ในขณะที่วีรชายและคณิตา (2561) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ โดยใช้ วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายเป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็น จากนั้นนำไปทดสอบคุณภาพในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ พบว่า มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ตามมาตรฐาน ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นต้องฉีดวัคซีนขนาด 1 มล. ถือว่าเป็นปริมาณที่สูงในการฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ปีก ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็ก อาจทำให้พบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนในสัตว์บางตัว นอกจากนี้วัคซีนทั้งสองชนิดมีระยะคุ้มโรคต่างกัน คือ วัคซีนกาฬโรคเป็ดให้ความคุ้มโรคได้นาน 6 เดือน แต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระยะคุ้มโรคสั้น เพียง 3 เดือน เนื่องจากวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ผลิตเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ (บรอทแบคเทอริน) เกษตรกรต้องฉีดวัคซีนหลายครั้ง จึงอาจไม่ได้ฉีดวัคซีนตามเวลาที่กำหนด และทำให้เกิดโรคตามมาได้ ซึ่งวรพรและวีรชาย (2562) ได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันขนาดฉีด 0.5 มล. เพื่อลดขนาดฉีดให้เหมาะสม พบว่าวัคซีนให้ความปลอดภัย และให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดโด๊สฉีดเหลือตัวละ 0.5 มล. ในจำนวนเชื้อที่ลดลง ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน ในขณะที่วัคซีนกาฬโรคเป็ดมีการทดลองผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อตาย โดยใช้ 0.12% ฟอร์มาลิน inactivate ก่อนผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน จากนั้นนำวัคซีนไปฉีดในเป็ด พบว่าหลังฉีดวัคซีน 14 วัน เป็ดมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) (Soma *et al*., 2018)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจทดลองผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน โดยใช้ฟอร์มาลิน inactivate จากนั้นผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน แล้วนำวัคซีนรวมไปทดสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ ทดสอบความปลอดภัย ความคุ้มโรค และตรวจหาระดับแอนติบอดีในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เพื่อลดปริมาณการฉีดเหลือ 0.5 มล. ลดต้นทุนการผลิตแอนติเจนจากกระบวนการทำแห้งวัคซีน ลดต้นทุนการผลิตน้ำยาละลายและการใช้บรรจุภัณฑ์ เพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บ การขนส่งวัคซีน รวมทั้งช่วยประหยัดแรงงาน เวลา และงบประมาณ ลดการสูญเสียของฟาร์มซึ่งมาจาก

ความเครียดของเป็ด นอกจากนี้การฉีดวัคซีนครั้งเดียว แต่สามารถป้องกันโรคได้ถึงสองโรคและให้ความคุ้มโรคได้นาน ทำให้สามารถควบคุมโรคระบาด ลดอุบัติการณ์การเกิดโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ในพื้นที่ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจโดยส่วนรวม

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 45 วัน จำนวน 90 ตัว ไม่เคยฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและสังเกตอาการ อย่างน้อย 1 สัปดาห์

แอนติเจน

เตรียมแอนติเจน จำนวน 2 ชนิดๆ ละ 1 ลิตร ดังนี้

แอนติเจนกาฬโรคเป็ด

เพาะเลี้ยงเซลล์คัพภะลูกไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast; 1° CEF) จำนวน $1.4x10^{6}$ เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 39 $^{\circ}$C นาน 48 ชั่วโมง แล้วใส่เชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด Jansen strain ขนาด MOI 0.05 ในอาหารเลี้ยงไวรัส บ่มที่อุณหภูมิ 39°C นาน 48 ชั่วโมง จะเกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบูรณ์ (ธวัชชัยและฤทธิ์ลือชัย, 2555) แล้วเก็บไวรัสโดยปั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนกากเซลล์ นำไวรัสปริมาณไม่น้อยกว่า $10^{5.5}$ fifty percent tissue culture infective dose ($TCID_{50}$/ 0.5 มล.) ฆ่าเชื้อด้วย 0.12% ฟอร์มาลิน[1] เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

แอนติเจนอหิวาต์เป็ด-ไก่

ละลายเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่น ด้วย tryptose phosphate broth[2] (TPB) แล้ว streak เชื้อลงบน dextrose starch agar[3] (DSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ลงในขวดเริ่มต้นที่มี TPB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพมีออกซิเจน นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเฟอร์เมนเตอร์[4] ที่มี TPB อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบใบพัด150 รอบต่อนาที นาน 9ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วย 0.3% ฟอร์มาลิน เก็บตัวอย่างไปตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์[5] (นิตยาและคณะ, 2547) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้มาผสมกับ 0.85% normal saline ให้ได้จำนวนเชื้อ $1.0x10^{9}$ CFU/โด๊ส (0.5 มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

วัคซีน

ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตายจำนวน 3 ตำรับๆ ละ 200 มล. ดังนี้

วัคซีนตำรับที่ 1

เป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อตาย โดยนำแอนติเจนกาฬโรคเป็ดผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน[6] ในอัตราส่วน แอนติเจน:แอดจูแวนท์ เท่ากับ 30:70 (w/w) ทำการผสมที่อุณหภูมิ 20°C ดังนี้ ปั่นผสมแอดจูแวนท์ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน[7] ความเร็วรอบ 7,600 รอบ/นาที

---

[1]GPO, Thailand
[2]ALPHA™ BIOSCIENCES, USA
[3]Difco™, France
[4]B.Braun Melsungen AG, Germany
[5]Biochrom Libra S32, UK
[6]MONTANIDE™ ISA 71 VG, France
[7]IKA Ultra Turrax® T25, Germany

จากนั้นค่อยๆ เติมแอนติเจนลงในแอดจูแวนท์ (ภายในเวลา 10 วินาที) เพิ่มความเร็วของเครื่องเป็น 11,600 รอบ/นาที ปั่นนาน 3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับที่ 2

เป็นวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตาย โดยนำแอนติเจนอหิวาต์เป็ด-ไก่ผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เช่นเดียวกับวัคซีนตำรับที่ 1 จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับที่ 3

เป็นวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตาย โดยนำแอนติเจนกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เช่นเดียวกับวัคซีนตำรับที่ 1 จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

ดูดตัวอย่างวัคซีน ลงใน Fluid Thioglycollate Medium[8], Tryptic Soy Broth[9] และ Sabouraud 2% Dextrose Broth[10] โดยดูดตัวอย่าง 1 มล./อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 หลอด แยก Fluid Thioglycollate Medium และ Tryptic Soy Broth ชนิดละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30-35°C และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดๆ ละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 20-25°C เพื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ รา และแบคทีเรีย เมื่อครบ 14 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จึงจะถือว่าทดสอบผ่าน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2564ก; WOAH, 2018c)

การทดสอบชนิดอิมัลชัน (Drop test)

หยดตัวอย่างวัคซีนลงในน้ำ หากเป็นอิมัลชันชนิด W/O ต้องคงอยู่เหนือน้ำ และไม่กระจายตัวในน้ำ (Aucouturier *et al*., 2001)

การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic aspect)

หยดตัวอย่างวัคซีนลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์[11] วัคซีนต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน (Aucouturier *et al*., 2001)

การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย[12] ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก)

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์[13] ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข)

---

[8] HIMEDIA, India
[9] BD™, Germany
[10] Difco™, France
[11] OLYMPUS BX 51, USA
[12] Brookfield DV-I, USA
[13] SIGMA 3K 18, UK

การทดสอบความปลอดภัย

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 1 มล. โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 2 วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มที่ 3 วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ สังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เป็ดทดลองทุกตัวต้องไม่พบการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและวิการของโรคทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ข; สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2565ก; ASEAN secretariat, 1998; WOAH, 2018a; WOAH, 2018b)

การทดสอบความคุ้มโรค

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 0.5 มล. ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีน กาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ฉีดวัคซีน หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 14 วัน นำเป็ดทดลองมาฉีดเชื้อพิษทับเข้ากล้ามเนื้อขา ตัวละ 1 มล. ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 5 ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดปริมาณ 100 fifty percent lethal dose (LD_{50})/ตัว กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 6 ฉีดพิษทับด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 LD_{50}/ตัว จากนั้นสังเกตอาการและนับจำนวนเป็ดตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งเป็ดที่ได้รับวัคซีนกาฬโรคเป็ดต้องรอดอย่างน้อย 90% และไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด และเป็ดกลุ่มควบคุมตายทั้งหมด จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2564ค; ASEAN secretariat, 1998) ในขณะที่เป็ดที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ต้องรอดอย่างน้อย 70% และเป็ดกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2565ข; WOAH, 2018b) และเจาะเลือดเป็ดทดลอง 3 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7 และ 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด ด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป[14] ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม 1:5 ด้วย sample dilution buffer แล้วเติมซีรัมที่เจือจางลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 5 ครั้ง จากนั้นเติม TMB Substrate A หลุมละ 50 µl และ TMB Substrate B หลุมละ 50 µl เขย่าเบาๆ 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 50 µl และอ่านผลค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader[15] แล้วนำค่าเฉลี่ย OD_{450} ที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดีและหาค่า cut off (negative control + 0.15) โดยตัดสินผลที่ ค่า $OD_{450} \geq$ cut off เป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด และ OD_{450} < cut off เป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

[14] Abbexa®, UK [15] Infinite M200 PRO, Switzerland

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป[16] ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม 1:50 ด้วย sample dilution buffer แล้วเติมซีรัมที่เจือจางลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง และเติม anti-duck horseradish peroxidase conjugate หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (TMB) หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 100 µl และอ่านผลค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader แล้วนำค่าเฉลี่ย OD_{450} ที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดี และค่า %S/P ตามสูตร โดยตัดสินผลที่ %S/P > 50% เป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และ %S/P $\leq$ 50% เป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

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

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในซีรัมเป็ดทดลองแต่ละกลุ่มด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนชนิดน้ำมันทั้ง 3 ตำรับในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 1)

การทดสอบความปลอดภัย

ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนชนิดน้ำมันทั้ง 3 ตำรับ เมื่อฉีดวัคซีน จำนวน 2 เท่าของโด๊สปกติ พบว่าวัคซีนทั้ง 3 ตำรับ มีความปลอดภัยในเป็ดทดลอง ไม่พบอาการแพ้วัคซีน และไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและวิการทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

การทดสอบความคุ้มโรค

ผลการทดสอบความคุ้มโรค กลุ่มที่ฉีดวัคซีน ให้ความคุ้มโรค 100% ทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่มที่ 1-4) และไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ สำหรับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5-6) เป็ดทดลองตายทั้งหมด (ตารางที่ 2)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดด้วยวิธี ELISA พบว่าหลังฉีดวัคซีนวันที่ 0 และวันที่ 7 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มควบคุม มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่หลังฉีดวัคซีนวันที่ 14 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและกลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยที่ทั้งสองกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

---

[16] ID Screen®, France

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ด้วยวิธี ELISA พบว่าหลังฉีดวัคซีนวันที่ 0 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มควบคุม มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่หลังฉีดวัคซีนวันที่ 7 และวันที่ 14 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยที่ทั้งสองกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

ปัจจุบันมีการพัฒนาแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันสำเร็จรูปพร้อมผสม ซึ่งมีวิธีการเตรียมง่าย ทำให้วัคซีนมีความหนืดลดลง ฉีดง่ายขึ้น มีความคงตัวสูง และมีการใช้ในการผลิตวัคซีนอย่างแพร่หลาย เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในด้านต่างๆ ได้แก่ ลดโด๊สที่ฉีด ลดปริมาณแอนติเจน ลดจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีน เพิ่มระยะคุ้มโรคให้นานขึ้น สร้างความคุ้มโรคได้สูง มีความปลอดภัย ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการแพ้ กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงและยาวนาน ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์ (humoral immune response) และแบบพึ่งเซลล์ (cellular immune response) สามารถใช้ผสมกับแอนติเจนได้หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไมโคพลาสมา ไวรัส และปรสิต (Arous *et al*., 2013; Aucouturier *et. al*., 2001; Belloc *et al*., 2008; Shah *et al*., 2015) ตัวอย่างของการนำแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันมาผสมในวัคซีนสัตว์ปีกทั้งในรูปแบบวัคซีนเดี่ยวและวัคซีนรวม เช่น Arous *et al*. (2013) ทดลองผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเชื้อตาย พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพ และสามารถลดขนาดฉีดได้ โดยฉีดวัคซีนเพียง 0.1 มล. สามารถกระตุ้นให้เกิดความคุ้มโรคและให้ระดับแอนติบอดีที่สูงและยาวนาน Jang *et al*. (2010; 2011; 2012; 2013) ใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันผสมในวัคซีนชนิด subunit พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์และแบบพึ่งเซลล์ได้สูงในการป้องกันโรคบิด (เชื้อโปรโตซัว) และโรคลำไส้อักเสบแบบมีเนื้อตายในไก่ (เชื้อแบคทีเรีย) Salama *et al*. (2010) ทดลองผลิตวัคซีนรวมนิวคาสเซิล หลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และไมโคพลาสมาโดยผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน พบว่าวัคซีนรวมที่ผลิตสามารถให้ความคุ้มโรคได้ทั้งสามโรคและให้ระดับแอนติบอดีสูงทั้งการฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง Sobhic *et al*. (2023) ผลิตวัคซีนรวม bivalent ชนิดน้ำมัน จากเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลและเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritis* พบว่าวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคได้ทั้งโรคนิวคาสเซิลและโรคติดเชื้อซัลโมเนลลา โดยพบว่าไก่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมมีค่าความคุ้มโรคสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนแบบเดี่ยวและมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนแบบเดี่ยวทั้งสองโรค

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองผลิตวัคซีนรวมระหว่างเชื้อไวรัส (เชื้อกาฬโรคเป็ด) และเชื้อแบคทีเรีย (เชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่) โดยผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน และถือเป็นการทดลองผลิตวัคซีนชนิดใหม่ 2 ตำรับ ได้แก่ วัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อตายชนิดน้ำมันและวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน ในขนาดฉีด 0.5 มล.ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นที่น่าพอใจกล่าวคือวัคซีนทั้งสองตำรับผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัยเมื่อฉีดในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์และสามารถให้ความคุ้มโรคกาฬโรคเป็ดได้ 100% หลังฉีดวัคซีนนาน 2 สัปดาห์ รวมทั้งให้ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 14 วัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Soma *et al*. (2018) ที่ทดลองผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อตายโดยผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน จากนั้นนำวัคซีนไปฉีดในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ พบว่าหลังฉีดวัคซีน 14 วัน เป็ดมีระดับแอนติบอดีสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) เช่นเดียวกับวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิด

ชนิดดูดแห้งที่สทช. ผลิตในปัจจุบันที่ให้ความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีนนาน 2 สัปดาห์ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) ในส่วนของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน ขนาดฉีด 0.5 มล. ผู้วิจัยได้เริ่มการทดลองผลิตวัคซีนตำรับนี้เมื่อปี พ.ศ. 2562 (วรพรและวีรชาย, 2562) พบว่าวัคซีนให้ความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว ให้ระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่สูงหลังจากฉีดวัคซีน 7 วันและให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดหลังฉีดวัคซีน 14 วันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมันและกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมันที่ให้ความคุ้มโรคได้ 100% จากการฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว ให้ระดับแอนติบอดีสูงหลังจากฉีดวัคซีน 7 วันและให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดหลังฉีดวัคซีน 14 วันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้สามารถผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สามารถลดขนาดฉีดเหลือตัวละ 0.5 มล. ได้ อาจช่วยลดโอกาสพบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนได้ เพราะการบวมและอักเสบบริเวณฉีดมากหรือน้อย นอกจากขึ้นกับคุณสมบัติและปริมาณแอนติเจนในวัคซีน คุณสมบัติการเป็นอิมัลชันของวัคซีน ชนิดและสายพันธุ์สัตว์แล้วยังขึ้นกับปริมาณที่ฉีดด้วย (วุฒิพร และคณะ, 2542) รวมทั้งข้อดีของการลดขนาดฉีดลงได้นั้นช่วยเพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บ และการขนส่งวัคซีน

สรุป

วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ในขนาดฉีดตัวละ 0.5 มล. ผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% ทั้ง 2 โรค มีระดับแอนติบอดีสูงต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดภายใน 14 วัน และมีระดับแอนติบอดีสูงต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ภายใน 7 วันหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก จึงสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียน เพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำการใช้สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้าราชการและพนักงานฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด ฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก กลุ่มสัตว์ทดลอง และกลุ่มวิจัยและพัฒนา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ 2565 สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนเกษตรกร-เป็ด ใน ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2565 หน้า 110

นิตยา รักศรี ธนรัตน์ จานุกิจ และจันทร์ทิพย์ แสงทอง 2547 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(2): 19-25

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 55-56

พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ 2558 (2 มีนาคม 2558) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 14 ก หน้า 22-41

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล และฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2555 ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัส กาฬโรคเป็ด วารสารผลิตชีวภัณฑ์ 20(1-2); 21(1-2): 40-47

วรพร ปู่สูงเนิน และวีรชาย ปู่สูงเนิน 2562 ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 28(1): 27-42

วีรชาย ปู่สูงเนิน และคณิตา ภาสะฐิติ 2561 การเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 27(1-2): 6-14

วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชนี อัตถิ และวันชัย ตีรถะวรวรรณ 2542 การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน 3. การทดลองใช้วัคซีนในท้องที่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9(1-2): 7-18

สุรวัฒน์ ชลอสันติสกุลและจารุณี เกษรพิกุล 2558 โรคอหิวาต์เป็ดไก่ ในโรคไก่ (Common Chicken Diseases) คณะ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพชรบุรี หน้า 21-22

สุวรรณี ท้วมแสง และวันชัย ตีรถะวรวรรณ 2537 การทดสอบวัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกาฬโรคเป็ด ตอนที่ 1 ขบวนการผลิต และประสิทธิภาพวัคซีนรวม เวชชสารสัตวแพทย์ 24(1): 43-53

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2557 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ ศูนย์สื่อสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ หน้า 13

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก เรื่องการทดสอบความหนืด (Viscosity test) ของบรอทแบคเทอรินเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-027) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข เรื่องการทดสอบความคงตัว (Stability test) ของบรอทแบคเทอรินเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-028) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ก เรื่องการทดสอบความปลอดเชื้อของเชื้อรา และแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (SOP-QCP-031) หน้า 1-7

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ข เรื่องการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนกาฬโรคเป็ด (SOP-QCSD-012) หน้า 1-5

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ค เรื่องการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด (SOP-QCSD-014) หน้า 1-5

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2565ก เรื่องการทดสอบความปลอดภัย (safety test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-026) หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2565ข เรื่องการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-025) หน้า 1-4

Arous, J. B., Deville, S., Pal, J. K., Baksi, S., Bertrand, F. and Dupuis, L. 2013. Reduction of Newcastle Disease Vaccine Dose Using a Novel Adjuvant for Cellular Immune Response in Poultry. Proc. Vac. 7: 28–33.

ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for DUCK PLAGUE VACCINE, LIVE. *In* ASEAN standards for animal vaccines, Livestock publication series 2A, 2nd ed. Penehar Swadaya, Indonesia. pp. 8-9.

Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine. 19: 2666-2672.

Belloc, C., Dupuis, L., Deville, S., Aucouturier, J. and Laval, A. 2008. Evaluation of safety and immune response induced by several adjuvants included in *Pasteurella multocida* vaccines in chickens. Revue. Med. Vet. 159(7): 371-375.

Jang, S. I., Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., Ben, Arous. J. and Lillehoj, E. P. 2013. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis. PLoS One. 8(4): 1-12.

Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P, Bertrand, F., Dupuis, L. and Deville, S. 2011. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. Exp. Parasitol. 127(1): 178-183.

Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Hong, Y. H., An, D. J., Jeong, W., Chun, J. E., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S. and Arous. J. B. 2012. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. Vaccine. 30(36): 5401-5406.

Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Park, K. W., Bauchan, G. R., Lillehoj, E. P., Bertrand, F., Dupuis, L. and Deville, S. 2010. Immunoenhancing effects of Montanide ISA oil-based adjuvants on recombinant coccidia antigen vaccination against *Eimeria acervulina* infection. Vet. Parasitol. 172(3-4): 221-228.

Jansen, T., Hofmans, M. P., Theelen, M. J., Manders, F., and Schijns, V. E. 2006. Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. Vaccine. 24(26): 5400-5405.

Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M. and Krut, O. 2015. Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. Scand. J. Immunol. 81(5): 291-297.

Rajagopal, R., Nair, G. K., Mangattumuruppel, M., Leo, J. and Mapranath, S. R. 2012. Immunopotency of novel oil adjuvant vaccines employing *Pasteurella multocida* biofilm and capsule enhanced organisms in ducklings. J. Vet. Anim. Sci. 36(4): 367-372.

Richeter, J. H. M. and Horzinek, M. C. 1993. Duck Plague. *In* Mc Ferran, J. B. and McNulty, M. S. (ed), Virus Infections of Birds, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, Netherlands. pp. 77–90.

Salama, S. S., Hasan, E.A., Mohammed H. E., Ahmed, E. S., Ebrahim, N. and El-Mahdy, S. S. 2010. Trial for preparation and evaluation of combined vaccine against ND, IB and *M. gallisepticum* diseases in chickens. BS. VET. MED. J. 20(1): 263-267.

Shah, R. R., Brito, L. A., O'Hagan, D. T. and Amiji, M. M. 2015. Emulsions as Vaccine Adjuvants. *In* Foged, C., Rades, T., Perrie, Y. and Hook,S.(eds.), Advances in Delivery Science and Technology, Springer Science+Business Media. New York. pp. 59-61.

Shawky, S. and Schat, K. A. 2002. Latency sites and reactivation of duck enteritis virus. Avian Dis. 46: 308–313.

Sobhy, S., El-Safty, M. M., Marouf, S., Mahmoud, H. and EL-Jakee, J. 2023. Preparation and evaluation of formalized bivalent Newcastle and *Salmonella* poultry vaccine. Vaccimonitor. 32: 1-10.

Soma, S. S., Nazir, KHM N. H., Rahman, M. T., Rahman, M. M., Ara, M. S., Sultana R., Haydar, M.R., Siddique, M. P. and Rahman, M. D. 2018. Isolation and molecular detection of duck plague virus for the development of vaccine seed. Asian Australas. J. Biosci. Biotechnol. 3(1): 78-85.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018a. Duck virus enteritis. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris, France. pp. 1-11.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018b. Fowl cholera. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris, France. pp. 895-905.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018c. Test for sterility and freedom from contamination of biological materials intended for veterinary use. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris, France. pp. 109-122.

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

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน และวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบ	วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน
1. Sterility test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
2. Drop test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
3. Microscopic aspect	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
4. Viscosity test (centipoises)	19.42	22.75	20.53
5. Stability test (%)	2	2	2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความคุ้มโรคหลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	**วัคซีน**	**% ความคุ้มโรค (จำนวนสัตว์คุ้มโรค/จำนวนสัตว์ทั้งหมด)**	
		กาฬโรคเป็ด	**อหิวาต์เป็ด-ไก่**
1	วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน	100% (10/10)	-
2	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	-	100% (10/10)
3	วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	100% (10/10)	-
4	วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	-	100% (10/10)
5	ไม่ฉีดวัคซีน	0% (0/10)	
6	ไม่ฉีดวัคซีน		0% (0/10)

ตารางที่ 3 ระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (Mean±SD ค่า OD) ต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด หลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	**วัคซีน**	**Mean±SD ค่า OD หลังฉีดวัคซีน**		
		วันที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**
1	วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดน้ำมัน	0.19 ± 0.05^{a}	0.20 ± 0.03^{a}	0.38 ± 0.04^{a}
3	วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	0.20 ± 0.05^{a}	0.21 ± 0.05^{a}	0.35 ± 0.05^{a}
5	ไม่ฉีดวัคซีน	0.17 ± 0.03^{a}	0.19 ± 0.04^{a}	0.18 ± 0.02^{b}

หมายเหตุ 1. ค่า Mean OD $\geq$ 0.30 ให้ผลเป็นบวก และ Mean OD < 0.30 ให้ผลเป็นลบ

2. ตัวอักษร a และ b ที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 ระดับแอนติบอดี (Mean±SD ค่า OD และ %S/P เฉลี่ย) ต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ หลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	วัคซีน	Mean±SD ค่า OD และ %S/P เฉลี่ยหลังฉีดวัคซีน		
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
2	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	0.34±0.28[a] (36.61%)	3.65±0.30[a] (523.98%)	3.78±0.21[a] (565.51%)
4	วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน	0.36±0.13[a] (38.66%)	3.71±0.38[a] (532.84%)	3.89±0.08[a] (567.87%)
6	ไม่ฉีดวัคซีน	0.22±0.11[a] (18.69%)	0.24±0.09[b] (21.64%)	0.26±0.09[b] (28.74%)

หมายเหตุ 1. %S/P > 50% ให้ผลเป็นบวก และ %S/P $\leq$ 50% ให้ผลเป็นลบ

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

Development of inactivated duck plague and fowl cholera combining vaccine; using oil adjuvant

Ritluechai Poosungnoen [1] Woraporn Poosungnoen [1]

Abstract

An experiment was conducted to produce three types of oil adjuvant inactivated vaccines. The first vaccine was for duck plague, the second vaccine was for fowl cholera, and the third vaccine was a combination of duck plague and fowl cholera. These vaccines were then tested for their laboratory properties, including tests for sterility test, Drop test, Microscopic aspect, Viscosity test, and stability test. Additionally, the vaccines were tested in Khaki Campbell ducks for safety, potency, and antibody levels using ELISA. The results showed that all three vaccines met the laboratory standards and were safe for the ducks, as they did not show any allergic reactions or adverse effects after vaccination. Moreover, the ducks did not exhibit any signs or symptoms of either duck plague or fowl cholera, indicating the vaccines' effectiveness in preventing both diseases.

Potency tests involving a challenge with the respective pathogens showed that ducks vaccinated with the first vaccine (duck plague alone) and the third vaccine (combination of duck plague and fowl cholera) were 100% protected against duck plague. Similarly, ducks vaccinated with the second vaccine (fowl cholera alone) and the third vaccine were 100% protected against fowl cholera. All vaccinated ducks remained free from any symptoms or indications of duck plague or fowl cholera. And from the examination of antibody levels against duck plague virus, it was found that the group vaccinated with duck plague vaccine and the group vaccinated with a combination of duck plague and fowl cholera vaccines had no significant difference in average antibody levels. However, both groups had significantly higher average antibody levels than the control group ($P<0.05$) 14 days after vaccination. Regarding the examination of antibody levels against fowl cholera, it was found that the group vaccinated with fowl cholera vaccine and the group vaccinated with a combination of duck plague and fowl cholera vaccines had no significant difference in average antibody levels. However, both groups had significantly higher average antibody levels than the control group ($P<0.05$) at both 7 and 14 days after vaccination.

In conclusion, the combination of duck plague and fowl cholera vaccines in oil-emulsion form was proven to be safe and highly effective. A single vaccination provided 100% protection against both duck plague and fowl cholera.

Keywords: inactivated combining vaccine, duck plague, fowl cholera, oil adjuvant

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