ประสิทธิภาพของวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] วรพร ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ทดลองผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน โดยใช้ 2% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์กำจัดฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ก่อนผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน แล้วนำวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดดูดแห้ง จากนั้นนำวัคซีนรวมไปทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบหาปริมาณไวรัสในวัคซีน และนำวัคซีนรวมไปทดสอบในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ได้แก่ ทดสอบความปลอดภัย ทดสอบความคุ้มโรค และตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่าวัคซีนรวมผ่านการทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. มีความปลอดภัย เป็ดไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ไม่มีอาการและวิการทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ และผลการทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าเป็ดทดลองที่ฉีดวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้ 100% ทั้ง 2 โรค โดยไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ และจากการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งสองกลุ่มมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังฉีดวัคซีน 14 วัน ในขณะที่ผลตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีน อหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งวันที่ 7 และวันที่ 14 หลังฉีดวัคซีน

ดังนั้นสรุปได้ว่าวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน มีความปลอดภัย ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวสามารถให้ความคุ้มโรคได้ 100% ทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

คำสำคัญ: วัคซีนรวม วัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง
วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน ประสิทธิภาพ

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคกาฬโรคเป็ด (Duck plague) เกิดจากเชื้อไวรัส Herpesvirus และโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* เป็นโรคติดต่อร้ายแรง มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง พบในไก่ เป็ด ห่าน ไก่งวง สัตว์ปีกอื่นๆ ทุกอายุสัตว์ ในสัตว์ที่มีอายุมากพบว่ามีอัตราการป่วยและตายสูงกว่าสัตว์อายุน้อย ในช่วงฤดูร้อนหรือช่วงเปลี่ยนฤดูกาลจะมีการระบาดมากที่สุด จึงเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งการเลี้ยงเป็ดในฟาร์มและเป็ดไล่ทุ่ง การทำวัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ทั่วโลกใช้ลดความชุกและอุบัติการณ์การเกิดโรค (Zander *et al*., 1997)

การฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดให้แก่เป็ดจะต้องฉีดแยกกัน ทำให้เกษตรกรผู้ใช้สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน อีกทั้งยังเป็นสาเหตุให้สัตว์เครียด ทำให้เกิดปัญหาตามมา เช่น เป็ดกินอาหารได้น้อย ปริมาณไข่ลดลง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ดสำหรับป้องกันโรคทั้งสองชนิด โดยสุวรรณีและวันชัย (2537) ได้ทดลองผลิตและทดสอบวัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด จากวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นที่อ่อนกำลังลงแล้ว (attenuated vaccine) รวมกับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อ (inactivate) โดยผ่านขบวนการพาสเจอไรส์เซชันแล้วนำมารวมกันผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง ในขนาดฉีด 1 มล. ซึ่งวัคซีนรวมที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน แต่เนื่องการจากการผลิตวัคซีนรวมดังกล่าวมีขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยากและหากจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตในรูปแบบอุตสาหกรรมต้องปรับปรุงหรือเพิ่มเติมอุปกรณ์การผลิต รวมทั้งต้องนำแอนติเจนมารวมกันก่อนการทำแห้งและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้ง และต้องฉีดวัคซีนขนาด 1 มล. ถือว่าเป็นปริมาณที่สูงในการฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ปีก ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็ก อาจทำให้พบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนในสัตว์บางตัว สำหรับวีรชายและคณิตา (2561) ได้ทดลองหาปริมาณโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่เหมาะสมที่สามารถกำจัดหรือลดปริมาณฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์ เป็ด-ไก่ เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด แล้วนำไปทดสอบคุณภาพในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2% เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้กำจัดฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้หมด สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ตามมาตรฐาน ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นยังขาดข้อมูลในเรื่องระดับภูมิคุ้มกันจากการการฉีดวัคซีนรวม นอกจากนี้วัคซีนทั้งสองชนิดมีระยะคุ้มโรคต่างกัน คือ วัคซีนกาฬโรคเป็ดให้ความคุ้มโรคได้นาน 6 เดือน แต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ มีระยะคุ้มโรคสั้น เพียง 3 เดือน จึงต้องฉีดวัคซีนซ้ำทุก 3 เดือน เนื่องจากวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่ สทช. ผลิตเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ (ชนิดบรอทแบคเทอริน) เกษตรกรต้องฉีดวัคซีนหลายครั้ง จึงอาจไม่ได้ฉีดวัคซีนตามเวลาที่กำหนด และทำให้เกิดโรคตามมาได้ ซึ่งวรพรและวีรชาย (2562) ได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันขนาดฉีด 0.5 มล. เพื่อลดขนาดฉีดให้เหมาะสม เพิ่มระยะคุ้มโรค และเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่าวัคซีนให้ความปลอดภัย และให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดโด๊สฉีดเหลือตัวละ 0.5 มล. ในจำนวนเชื้อที่ลดลง ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าการใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันเป็นตัวทำละลายวัคซีนไวรัสเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง พบว่าสามารถละลายวัคซีนได้ดีและทำให้ระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีกสูงขึ้น (Bertrand *et al*., 2010)

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน สามารถใช้ร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นที่อยู่ในรูปดูดแห้งได้ โดยใช้ 2% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์กำจัดฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ก่อนผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบต่อเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดซึ่งเป็น

เชื้อเป็น แล้วนำวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด จากนั้นทดสอบความปลอดภัย ความคุ้มโรค และหาระดับแอนติบอดีในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เพื่อลดต้นทุนการผลิตน้ำยาละลาย ลดต้นทุนการใช้บรรจุภัณฑ์ เพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บ การขนส่งวัคซีน รวมทั้งช่วยประหยัดแรงงาน เวลา และงบประมาณ ลดการสูญเสียของฟาร์มซึ่งมาจากความเครียดของเป็ด นอกจากนี้การฉีดวัคซีนครั้งเดียว แต่สามารถป้องกันโรคได้ถึงสองโรคและให้ความคุ้มโรคได้นาน ทำให้สามารถควบคุมโรคระบาด ลดอุบัติการณ์การเกิดโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ในพื้นที่ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจโดยส่วนรวม

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 45 วัน จำนวน 70 ตัว ไม่เคยฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและสังเกตอาการอย่างน้อย 1 สัปดาห์

วัคซีนกาฬโรคเป็ด

เตรียมวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์คัพภะลูกไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast, 1° CEF) จำนวน $1.4x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 39 °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 นำไปทำแห้งเป็นวัคซีนขนาดบรรจุขวดละ 100 มล. (200 โด๊ส) (ฤทธิ์ลือชัยและธวัชชัย, 2555) และต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.5 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/มล. (ASEAN Secretariat, 1998) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่

เตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน โดยละลายเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่น ด้วย tryptose phosphate broth[1] (TPB) แล้ว streak เชื้อลงบน dextrose starch agar[2] (DSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว ลงในขวดเริ่มต้นที่มี TPB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพมีออกซิเจน นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเฟอร์เมนเตอร์[3] ที่มี TPB อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบใบพัด150 รอบต่อนาที นาน 9 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน[4] 0.3% (v/v) ใช้ 2% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์[5] กำจัดฟอร์มาลิน เก็บตัวอย่างไปตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์[6] (นิตยาและคณะ, 2547) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้มาผสมกับ 0.85% normal saline ให้ได้จำนวนเชื้อ $1.0x10^9$ CFU/โด๊ส (0.5 มล.) แล้วนำไปผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน[7] ในอัตราส่วน บรอทแบคเทอริน:แอดจูแวนท์ เท่ากับ 30:70 (w/w) ทำการผสมที่อุณหภูมิ 20°C ดังนี้ ปั่นผสมแอดจูแวนท์ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน[8] ความเร็วรอบ7,600 รอบ/นาที จากนั้นค่อยๆ เติม บรอทแบคเทอรินลงในแอดจูแวนท์ (ภายในเวลา 10 วินาที) เพิ่มความเร็วของเครื่อง

[1]ALPHA™ BIOSCIENCES, USA [2]Difco™, France [3]B.Braun Melsungen AG, Germany
[4]GPO, Thailand [5]Kemaus, Australia [6]Biochrom Libra S32, UK
[7]MONTANIDE™ ISA 71 VG, France [8]IKA Ultra Turrax® T25, Germany

เป็น 11,600 รอบ/นาที ปั่นนาน 3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 100 มล. (200 โด๊ส) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

ดูดตัวอย่างวัคซีน ลงใน Fluid Thioglycollate Medium[9], Tryptic Soy Broth[10] และ Sabouraud 2% Dextrose Broth[11] 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)

การหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี $TCID_{50}$/มล.

นำวัคซีนรวมที่ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด มาตรวจหาปริมาณไวรัส โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Primary chicken embryo fibroblast (1° CEF) ใน 96 well-plate โดยมีเซลล์ประมาณ $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5% CO_2 นาน 2 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มก้นเพลท ถ่ายมีเดียมเก่าทิ้ง เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางแบบ 10-fold dilution ที่ความเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} ด้วย PBS pH 7.2-7.4 เติมตัวอย่างลงใน 96 well-plate ความเจือจางละ 10 หลุมๆ ละ 10 หลุม เติม Maintenance medium หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 อ่านผลการเกิด cytopathic effect (CPE) จนครบ 5 วัน คำนวณหาปริมาณไวรัสเป็นค่า $TCID_{50}$/มล. ซึ่งวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดทำแห้ง ต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ข)

การทดสอบความปลอดภัย

นำเป็ดทดลองจำนวน 10 ตัว ฉีดวัคซีนรวม เข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 1 มล. โดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันเป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด สังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เป็ดทดลองทุกตัวต้องไม่พบการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและวิการของโรค ทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ค; สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2565ก; ASEAN secretariat, 1998; WOAH, 2018a; WOAH, 2018b)

การทดสอบความคุ้มโรค

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 0.5 มล. ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่เจือจางด้วยน้ำยาละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนรวมโดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ฉีดวัคซีน หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 14 วัน นำเป็ดทดลองมาฉีดเชื้อพิษทับเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 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, 2564ง; ASEAN secretariat, 1998) ในขณะที่เป็ดที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ต้องรอดอย่างน้อย 70% และเป็ดกลุ่ม

[9] HIMEDIA, India [10] BD™, Germany [11] Difco™, France

ควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2565ข; WOAH, 2018b) และเจาะเลือดเป็ดทดลอง 3 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7 และ 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด ด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป[12] 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[13] แล้วนำค่าเฉลี่ย OD_{450} ที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดีและหาค่า cut off (negative control + 0.15) โดยตัดสินผลที่ค่า $OD_{450} \geq$ cut off เป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด และ OD_{450} < cut off เป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป[14] 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} ที่ได้มาคำนวณหาค่าระดับแอนติบอดีและค่า %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

[12] Abbexa®, UK [13] Infinite M200 PRO, Switzerland [14] ID Screen®, France

ผล

การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

วัคซีนกาฬโรคเป็ด วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดอหิวาต์เป็ด-ไก่ ผ่านการทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ตำรับ

การหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี $TCID_{50}$/มล.

ผลการหาปริมาณไวรัสในวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดอหิวาต์เป็ด-ไก่ ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $10^{7.08}$ $TCID_{50}$/มล.

การทดสอบความปลอดภัย

ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดอหิวาต์เป็ด-ไก่ พบว่ามีความปลอดภัยในเป็ดทดลอง ไม่พบอาการแพ้วัคซีน และไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและวิการทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่

การทดสอบความคุ้มโรค

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

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดด้วยวิธี ELISA พบว่าหลังฉีดวัคซีนวันที่ 0 และวันที่ 7 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มควบคุมมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่หลังฉีดวัคซีนวันที่ 14 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดและกลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยที่ทั้งสองกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ด้วยวิธี ELISA พบว่าหลังฉีดวัคซีนวันที่ 0 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกลุ่มควบคุมมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่หลังฉีดวัคซีนวันที่ 7 และวันที่ 14 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และกลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองผลิตวัคซีนรวมระหว่างเชื้อไวรัส (เชื้อกาฬโรคเป็ด) และเชื้อแบคทีเรีย (เชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่) โดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด เช่นเดียวกับงานวิจัยต่างๆ ได้แก่ Edmund and William (1991) ได้ศึกษาการทำวัคซีนชนิดมัลติวาเลนท์ในสุนัข โดยผลิตวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งจากไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ Canine distemper virus, Infectious canine hepatitis virus, Canine adenovirus type 2, Canine parainfluenza virus และ Canine parvovirus แล้วใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira canicola* และ *Leptospiraictero haemorrhagiae* เป็นตัวทำละลายพบว่าวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อจุลชีพ

ทุกชนิดได้ เช่นเดียวกับในมนุษย์มีการศึกษาการใช้วัคซีนรวมที่ผลิตจากแบคทีเรียและไวรัส เช่น Poovorawan *et al*. (1997) ศึกษาการฉีดวัคซีนรวมโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน (แบคทีเรีย) ก่อน แล้วฉีดวัคซีนโรคไวรัสตับอักเสบบี เปรียบเทียบกับการฉีดวัคซีนรวม 4 โรค คือ โรคคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ซึ่งผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งแล้วใช้วัคซีนโรคไวรัสตับอักเสบบีเป็นตัวทำละลาย พบว่าการฉีดวัคซีนรวม 4 โรค ให้ภูมิคุ้มกันสูงและยาวนานกว่าการฉีดแยกเข็มกัน ทางด้านของ Shieh *et al*. (2008) ศึกษาการใช้วัคซีนชนิดน้ำมันเป็นตัวทำละลายวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง โดยศึกษาประสิทธิภาพของการฉีดวัคซีนรวมอหิวาต์สุกรเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเชื้อตายชนิดน้ำมัน จากการใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นตัวทำละลายวัคซีนอหิวาต์สุกร จากนั้นตรวจหาระดับแอนติบอดีทุก 2 สัปดาห์ พบว่าสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนรวม มีระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรและโรคปากและเท้าเปื่อยไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเดี่ยวและกลุ่มที่ฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดให้สุกรพร้อมกัน บริเวณแต่ละด้านของแผงคอ

นอกจากนี้การทดลองผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมันในขนาดฉีด 0.5 มล. ได้ผลเป็นที่น่าพอใจกล่าวคือวัคซีนรวมผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัยเมื่อฉีดในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์และสามารถให้ความคุ้มโรคกาฬโรคเป็ดได้ 100% หลังฉีดวัคซีนนาน 2 สัปดาห์ รวมทั้งให้ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 14 วัน สอดคล้องวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดชนิดดูดแห้งที่ใช้น้ำยาละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่สทช. ผลิตในปัจจุบัน ซึ่งเริ่มให้ความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีนนาน 2 สัปดาห์เช่นเดียวกัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) ในด้านการให้ความคุ้มโรคต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ พบว่าวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคได้ 100% และมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรพรและวีรชาย (2562) ที่เป็ดกลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีนเช่นกัน นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้สามารถผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สามารถลดขนาดฉีดเหลือตัวละ 0.5 มล. ได้ รวมทั้งได้วัคซีนที่มีระยะคุ้มโรคนานขึ้น เนื่องจากวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในปัจจุบันเป็นชนิดบรอทแบคเทอริน ซึ่งมีขนาดฉีดตัวละ 1 มล. และมีระยะคุ้มโรค 3 เดือน ในขณะที่วัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดชนิดดูดแห้งมีขนาดฉีดตัวละ 0.5 มล. และมีระยะคุ้มโรค 6 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) เมื่อทำการพัฒนาวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นชนิดน้ำมันพบว่าสามารถลดขนาดฉีดเหลือ ตัวละ 0.5 มล. และมีความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีนได้ 100% นานถึง 12 เดือน (วรพรและฤทธิ์ลือชัย, 2566) จึงมีความเป็นไปได้ว่าวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน ขนาดฉีด 0.5 มล. อาจให้ความคุ้มโรคได้ไม่ต่ำกว่า 6 เดือน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน ควรมีการศึกษาในด้านต่างๆ เพิ่มเติม เช่น ระยะคุ้มโรค (Duration of immunity) ความคุ้มโรคแรกเริ่ม (Onset of immunity) คุณภาพการเก็บรักษา (Keeping quality) เป็นต้น

สรุป

วัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน มีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคทั้งโรคกาฬโรคเป็ดและอหิวาต์เป็ด-ไก่ในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% ทั้ง 2 โรค ในขนาดโด๊สฉีดตัวละ 0.5 มล. มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด 14 วัน และมีระดับ

แอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่เพียง 7 วันหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก จึงสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตวัคซีนรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และธวัชชัย ปัจฉานุกูล 2555 การสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนแช่แข็งและทำแห้งของการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 20(1-2); 21(1-2): 31-39

วรพร ปู่สูงเนิน และฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2566 ความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 31(1): 41-52

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

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

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ข เรื่องทดสอบหาปริมาณไวรัสในวัคซีนกาฬโรคเป็ด (SOP-QCSD-006) หน้า 1-6

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

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2564ง 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.

Bertrand, F., Deville, S. and Dupuis, L. 2010. Live vaccine for avian diseases. France. Patent: FR2957933A1. March, 24, 2010.

Edmund, P. B. and William, H. K. 1991. Multivalent canine distemper virus vaccine. Available from http://www.google.com/patents/US5000951 [Accessed 5 June 2020].

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.

Poovorawan, Y., Theamboonlers, A., Sanpavat, S., Chumdermpadetsuk, S., Safary, A. and Vandepapeliere, P. 1997. Long-term antibody persistence after booster vaccination with combined tetravalent diphtheria tetanus, whole-cell Bordetella pertussis and hepatitis B vaccine in healthy infants. Ann. Trop. Paediatr. 17(4): 301-308.

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.

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

Shieh, H. K., Lin, Y. L. and Jong, M. H. 2008. Efficacy of Simultaneous Vaccination of Piglets Against Foot and Mouth Disease and Classical Swine Fever. The 15th Congress of FAVA - OIE Joint Symposium on Emerging Diseases. 27-30 October 2008. pp. 105-106.

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

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

World Organisation for Animal Health (WOAH). 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. WOAH. 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 ผลการทดสอบความคุ้มโรคหลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

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

ตารางที่ 2 ระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (Mean±SD ค่า OD) ต่อเชื้อกาฬโรคเป็ด หลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	วัคซีน	Mean±SD ค่า OD หลังฉีดวัคซีน		
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
1	วัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง	0.18±0.05[a]	0.22±0.07[a]	0.34±0.04[a]
3	วัคซีนรวมรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน	0.17±0.03[a]	0.23±0.08[a]	0.37±0.02[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 3 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	0.28±0.05[a] (27.90%)	3.71±0.20[a] (533.15%)	3.81±0.12[a] (549.74%)
4	วัคซีนรวมรวมกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งและวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำมัน	0.33±0.12[a] (34.41%)	3.00±0.44[b] (428.45%)	3.34±0.44[b] (572.44%)
6	ไม่ฉีดวัคซีน	0.27±0.08[a] (26.06%)	0.24±0.09[c] (21.64%)	0.26±0.09[c] (28.74%)

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

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

Efficacy of lyophilized live attenuated duck plague and inactivated oil adjuvant fowl cholera combining vaccine

Ritluechai Poosungnoen [1] Woraporn Poosungnoen [1]

Abstract

An experiment was conducted to produce a lyophilized live attenuated duck plague and inactivated oil adjuvant fowl cholera combining vaccine. The vaccine for fowl cholera was first mixed with a 2% sodium metabisulfite solution to eliminate formalin residues. Then, this fowl cholera vaccine, in oil form, was used to dilute the duck plague vaccine, which was in the form of a freeze-dried virus. The combined vaccine was then tested for its laboratory properties, including testing for sterility test, virus content test, and conducting efficacy test in Khaki Campbell ducks. The safety and potency of the vaccine were evaluated, and antibody levels were measured using ELISA. The results indicated that the combined vaccine passed sterility test and the viral content was not less than $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/ml. The ducks showed no signs of allergic reactions or adverse effects from the vaccine. Moreover, there were no symptoms or clinical signs of duck plague or fowl cholera observed in the tested ducks. Potency test involving a challenge with the respective pathogens showed that the ducks vaccinated with the combined vaccine were 100% protected against both duck plague or fowl cholera, without any indication of disease occurrence. 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 significantly higher average antibody levels than the control group ($P<0.05$) from day 7 after vaccination. Moreover, the group vaccinated with fowl cholera vaccine had significantly higher average antibody levels than the group vaccinated with a combination of duck plague and fowl cholera vaccines ($P<0.05$) on both day 7 and day 14 after vaccination.

In conclusion, the combined vaccine for duck plague in the form of a lyophilized live attenuated virus and fowl cholera in the form of an oil-emulsion inactivated bacterium demonstrated both safety and efficacy. A single vaccination with

this combined vaccine provided 100% protection against both duck plague and fowl cholera.

Keywords: combining vaccine, lyophilized live attenuated duck plague vaccine, inactivated oil adjuvant fowl cholera vaccine, efficacy

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