เปรียบเทียบความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

วรพร ปู่สูงเนิน[1] ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ที่มา: โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ เป็นโรคติดต่อร้ายแรง เกิดได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด ห่าน ไก่งวง รวมทั้งนกหลายชนิด สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A การป้องกันที่ได้ผลมากที่สุดคือการทำวัคซีน ซึ่งวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ผลิตในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอริน (ไม่ผสมแอดจูแวนท์) มีขนาดฉีด 1 ml และต้องฉีดทุก 3 เดือน รวมทั้งไม่สามารถให้ความคุ้มโรคในสัตว์ปีกได้ครอบคลุมหลายชนิด จึงมีการวิจัยตำรับวัคซีนชนิดใหม่ที่มีการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ที่มีการแนะนำให้ใช้ในวัคซีนสัตว์ปีก ในเบื้องต้นผู้วิจัยเลือกเป็ดเป็นสัตว์ชนิดแรกที่จะทำการศึกษา เนื่องจากเป็นกลุ่มเป้าหมายหลักที่ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และเป็นสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพวัคซีนของสทช. ในปัจจุบัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

วิธีการ: ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 สเตรนท้องถิ่น โดยใช้แอดจูแวนท์สำเร็จรูปพร้อมผสม (MONTANIDE™ ISA 71 VG) มีจำนวนเชื้อ $1.0x10^9$ CFU/ml (ขนาดฉีดโด๊สละ 0.5 ml) นำวัคซีนไปทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ และทดสอบในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ (เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์) ได้แก่ ทดสอบความปลอดภัย ทดสอบความคุ้มโรค (แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้งและฉีดวัคซีนจำนวน 2 ครั้ง) และเจาะเลือดเป็ดทดลองทุกสัปดาห์ เพื่อไปทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ผล: วัคซีนที่ผลิตมีคุณสมบัติตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด วัคซีนมีความปลอดภัย เป็ดทดลองไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ไม่มีอาการหรือวิการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ ให้ความคุ้มโรคได้ 100% ทั้งการฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ทั้ง 4 สายพันธุ์ สำหรับผลการตรวจหาระดับแอนติบอดี พบว่าเป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่งและเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์และเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี แต่มีระดับแอนติบอดีที่แตกต่างกันไม่มาก รวมทั้งเป็ดทุกสายพันธุ์มีระดับแอนติบอดีสูงตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน จนสิ้นสุดการทดลอง

สรุป: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ขนาดฉีดโด๊สละ 0.5 ml มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคได้ 100% ในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว และให้ระดับแอนติบอดีสูง ภายใน 7 วัน ทุกสายพันธุ์

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ระดับแอนติบอดี ความคุ้มโรค เป็ดเนื้อ เป็ดไข่

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง เป็นโรคติดต่อร้ายแรง พบได้ในไก่ เป็ด ห่าน ไก่งวง สัตว์ปีกอื่นๆ รวมทั้งนกหลายชนิด ทุกระดับอายุ แต่สัตว์อายุมากมีอัตราการป่วยและตายสูงกว่าสัตว์อายุน้อย ระบาดได้ทุกฤดูกาล แต่ในช่วงฤดูร้อนหรือช่วงเปลี่ยนฤดูกาลจะมีการระบาดรุนแรงมากที่สุด (สุรวัฒน์และจารุณี, 2558) จึงเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งการเลี้ยงสัตว์ปีกในฟาร์มและสัตว์ปีกที่เลี้ยงตามหลังบ้าน การทำวัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ทั่วโลกใช้ลดความชุกและอุบัติการณ์การเกิดโรค เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีราคาแพง ใช้เวลานาน ไม่ได้ผลเท่าที่ควร และเพิ่มโอกาสให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ แม้ว่าการมีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดีจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ไม่เพียงพอในการจัดการกับโรคนี้ ดังนั้น วัคซีนจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกัน และป้องกันการสูญเสียจากการเกิดโรค (Ahmad *et al*., 2014)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอริน จากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ โดยแนะนำให้ฉีดในเป็ดและไก่พื้นเมืองตัวละ 1 ml ทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) แต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ส่วนใหญ่จากผู้ผลิตรายอื่น รวมทั้งวัคซีนสัตว์ปีกหลายชนิด เช่น วัคซีนกัมโบโร วัคซีนกาฬโรคเป็ด วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตาย แนะนำให้ฉีดวัคซีนในสัตว์ปีกตัวละ 0.5 ml และการฉีดวัคซีนตัวละ 1 ml ทำให้พบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนในสัตว์บางตัว รวมทั้งวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินมีข้อจำกัด คือ มีระยะคุ้มโรคสั้นเพียง 3 เดือน ทำให้เกษตรกรต้องฉีดวัคซีนหลายครั้ง จึงไม่ได้ฉีดวัคซีนตามเวลาที่กำหนด และทำให้เกิดโรคตามมาได้ นอกจากนี้มีการศึกษาประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอรินของ สทช. ในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น ผดุงวิทย์และสวนีย์ (2547) ได้ทำการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอรินของสทช. ในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ พบว่าหลังการฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินในเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์เพียงครั้งเดียว ให้ความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 85% ส่วนการฉีดวัคซีนในเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารีครั้งเดียว มีความคุ้มโรคต่ำกว่า 65% แต่เมื่อฉีดวัคซีนสองครั้ง มีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 85% ต่อมาผดุงวิทย์และคณะ (2549) ศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอรินของ สทช. ในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ พบว่าหลังการฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินในไก่พื้นเมืองเพียงครั้งเดียว ให้ความคุ้มโรคน้อยกว่า 80% และเมื่อฉีดวัคซีนสองครั้ง ให้ความคุ้มโรคมากกว่า 80% แต่เมื่อฉีดวัคซีนในไก่เนื้อ พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคน้อยกว่า 20% ทั้งการฉีดวัคซีนครั้งเดียวและสองครั้ง ซึ่งตามมาตรฐาน World Organisation for Animal Health; WOAH (2018a) กำหนดเกณฑ์การทดสอบความคุ้มโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องไม่ตายอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค แสดงว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอรินที่สทช. ผลิตในปัจจุบันไม่สามารถให้ความคุ้มโรคในสัตว์ปีกได้ครอบคลุมหลายชนิด ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันอยู่ในรูปของอิมัลชัน เป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน โดยได้รับการแนะนำให้ใช้ในวัคซีนสัตว์ปีก เนื่องจากมีความปลอดภัย ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันและให้ความคุ้มโรคได้สูง เพิ่มระยะ คุ้มโรคให้นานขึ้น ช่วยลดโด๊ส ลดขนาดฉีด ลดปริมาณแอนติเจน ลดจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีน (รัชนี, 2553; Spickler and Roth, 2003)

ผู้วิจัยจึงได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันจากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 สเตรนท้องถิ่น พบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดโด๊สฉีดเหลือตัวละ 0.5 ml ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน (วรพรและวีรชาย, 2562) และในปี พ.ศ. 2563-2564 ผู้วิจัยได้ทำการทดลองศึกษาความ

คุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์-เบลล์ พบว่าเป็ดทดลองมีความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังจากฉีดวัคซีน 3 วัน และวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้นานอย่างน้อย 12 เดือน (ผลงานรอการตีพิมพ์) ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ เพิ่มเติม ดังนั้นในเบื้องต้นผู้วิจัยจึงเลือกเป็ดเป็นสัตว์ชนิดแรกที่จะทำการศึกษา เนื่องจากเป็นกลุ่มเป้าหมายหลักที่ใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และเป็นสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพวัคซีนของสทช. ในปัจจุบัน โดยทำการเปรียบเทียบความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่สายพันธุ์ต่างๆ หลังการการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันว่าสามารถให้ความคุ้มโรคใน สัตว์ปีกได้หลายชนิด และเป็นข้อมูลในการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่น เก็บในสภาพทำแห้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย เชื้อนี้ใช้ในการผลิตวัคซีนและทดสอบความคุ้มโรค

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

นำตัวอย่างบรอทแบคเทอรินที่ถูกฆ่าเชื้อแล้ว (inactivation) มาผสมกับ 0.85% normal saline โดยนำไปตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์[1] (นิตยาและคณะ, 2547) นำไปผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน[2] ในอัตราส่วนบรอทแบคเทอริน:แอดจูแวนท์ เท่ากับ 30:70 (w/w) ให้มีปริมาณเชื้อ $1.0x10^9$ CFU/ml ทำการผสมที่อุณหภูมิ 20°C ดังนี้ ปั่นผสมแอดจูแวนท์ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน[3] (high shear mixer) ความเร็วรอบ7,600 รอบ/นาที เติมบรอทแบคเทอรินลงในแอดจูแวนท์ เพิ่มความเร็วของเครื่องเป็น 11,600 รอบ/นาที ปั่นนาน 3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 ml (ผลิตทั้งหมด 200 ml หรือ 400 โด๊ส) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

สัตว์ทดลอง

ใช้เป็ดเนื้อและเป็ดไข่จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ พันธุ์ละ 50 ตัว รวมเป็ดทดลองทั้งหมด 200 ตัว ไม่จำกัดเพศ อายุ 8 สัปดาห์ ไม่เคยฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและสังเกตอาการ อย่างน้อย 1 สัปดาห์

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในกระบวนการผลิต (In-process)

1) การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial concentration)

นำตัวอย่างบรอทแบคเทอรินไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์และคำนวณหาปริมาณเชื้อด้วยสมการ Y=37.563X-47.777 (นิตยาและคณะ, 2547)

2) การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาย้อมสีแกรม ต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก *P. multocida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง รูปร่างแท่งสั้น หรือแท่งสั้นค่อนข้างกลม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก; ASEAN Secretariat, 1998)

---

[1] Biochrom Libra S32, UK [2] MONTANIDE™ ISA 71 VG, France [3] IKA Ultra Turrax® T25, Germany

3) การทดสอบการฆ่าเชื้อโดยสมบูรณ์ (Inactivation test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร dextrose starch agar[4] (DSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ต้องไม่มี *P. multocida* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร (ASEAN Secretariat, 1998)

การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป (Finished product)

1) การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

ดูดตัวอย่างวัคซีน ลงใน Fluid Thioglycollate Medium[5], Tryptic Soy Broth[6] และ Sabouraud Dextrose Broth[7] โดยดูดตัวอย่าง 1 ml/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 aerobic bacteria และ anaerobic bacteria เมื่อครบ 14 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จึงจะถือว่าทดสอบผ่าน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข; WOAH, 2018b)

2) การทดสอบชนิดอิมัลชัน (Drop test)

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

3) การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic aspect)

เมื่อหยดตัวอย่างวัคซีนลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์[8] วัคซีนต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 µm (Aucouturier *et al*., 2001)

4) การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย[9] ใช้ Spindle No.1 ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ค)

5) การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์[10] ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ง)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

1) การทดสอบความปลอดภัย

นำเป็ดเนื้อและเป็ดไข่สายพันธุ์ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา จำนวน 2 เท่าของโด๊สปกติ (ตัวละ 1 ml) จากนั้นสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เป็ดทดลองทุกตัวต้องไม่พบอาการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและวิการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562จ; WOAH, 2018a)

2) การทดสอบความคุ้มโรค

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง กลุ่มที่ 2 เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี กลุ่มที่ 3 เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ กลุ่มที่ 4 เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ กลุ่มที่ 5 เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง กลุ่มที่ 6 เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี กลุ่มที่ 7 เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และกลุ่มที่ 8 เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ ทำการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา ตัวละ 0.5 ml ดังนี้ กลุ่มที่ 1-4 ฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้ง และกลุ่มที่ 5-8 ฉีดวัคซีนจำนวน 2 ครั้ง โดยฉีดวัคซีน ห่างจากเข็มแรก 14 วัน หลังจากฉีดวัคซีนในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ทำการฉีดพิษทับด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 fifty percent lethal dose (LD_{50})

---

[4] Difco™, France [5] HIMEDIA, India [6] BD™, Germany [7] Difco™, France
[8] OLYMPUS BX 51, USA [9] Brookfield DV-I, USA [10] SIGMA 3K 18, UK

ตัวละ 1 ml เข้ากล้ามเนื้อขา พร้อมกลุ่มควบคุม พันธุ์ละ 10 ตัว ซึ่งไม่ฉีดวัคซีน เจาะเลือดเป็ดทดลอง 3 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7 และ 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี และกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง ฉีดพิษทับ หลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน พร้อมกลุ่มควบคุม พันธุ์ละ 10 ตัว เจาะเลือดเป็ดทดลอง 6 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 7, 14, 21 และ 28 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี หลังจากฉีดพิษทับแล้ว สังเกตอาการและนับจำนวนสัตว์ตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องรอดอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ฉ; WOAH, 2018a)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป[11] 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[12] แล้วนำค่าเฉลี่ย OD_{450} ที่ได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio ตามสูตร

$$\text{ค่า S/P ratio} = \frac{\text{ค่า } OD_{450} \text{ ตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - \text{ค่า } OD_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}{\text{ค่า } OD_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมบวก} - \text{ค่า } OD_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}$$

โดยตัดสินผลที่ ค่า S/P ratio>0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และค่า S/P ratio $\leq$0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างค่า S/P ratio เฉลี่ยในเป็ดทดลองแต่ละสายพันธุ์ ระหว่างการฉีดวัคซีนจำนวน 1 และ 2 ครั้ง ด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

1) การทดสอบความปลอดภัย

ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เมื่อฉีดวัคซีน จำนวน 2 เท่าของโด๊สปกติ (ตัวละ 1 ml) พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยในเป็ดทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่พบอาการแพ้วัคซีน และไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและวิการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่

2) การทดสอบความคุ้มโรค

ผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน พบว่าเป็ดทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความคุ้มโรค 100% ทั้งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง โดยกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีน เป็ดทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ มีอัตราการตาย 100% และตายภายใน 24 ชั่วโมง ทุกกลุ่ม (ตารางที่ 2)

---

[11] ID Screen®, France

[12] Infinite M200 PRO, Switzerland

3) ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่าการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จำนวน 1 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีน (วันที่ 0) เป็ดทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio≤0.5) แต่หลังวันที่ 7 เป็ดทดลองทุกกลุ่มมีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio>0.5) โดยหลังฉีดวัคซีน 7 วัน เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่งมีค่า S/P ratio เฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ และเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี ตามลำดับ และหลังฉีดวัคซีน 14 วัน เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่งมีค่า S/P ratio เฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ ตามลำดับ รวมทั้งเป็ดทุกสายพันธุ์ มีค่า S/P ratio เฉลี่ยสูงขึ้นตามระยะเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 3)

สำหรับการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จำนวน 2 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีน (วันที่ 0) เป็ดทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio≤0.5) แต่หลังวันที่ 7 เป็ดทดลองทุกกลุ่มมีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio>0.5) โดยหลังฉีดวัคซีน 7 วัน เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ มีค่า S/P ratio เฉลี่ย สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ ตามลำดับ หลังฉีดวัคซีน 14 วัน เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ มีค่า S/P ratio เฉลี่ย สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์และเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี ตามลำดับ หลังฉีดวัคซีน 21 วัน และ 28 วัน เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง มีค่า S/P ratio เฉลี่ย สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์และเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี ตามลำดับ รวมทั้งเป็ดทุกสายพันธุ์ มีค่า S/P ratio เฉลี่ยสูงขึ้นตามระยะเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

สายพันธุ์ของเป็ดถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดโรคที่แตกต่างกัน เช่น เป็ดเทศจะไวต่อการเกิดโรค Derzsy's disease หรือเป็ดพันธุ์ปี๊วฉ่าย ซึ่งเป็นลูกผสมเป็ดเทศกับเป็ดพื้นเมือง อาจแสดงอาการป่วยได้เป็นบางราย ในขณะที่เป็ดพันธุ์แคมป์เบลล์ พันธุ์ปักกิ่ง หรือพันธุ์เชอร์รี่จะไม่แสดงอาการป่วยของโรคนี้ (ทวีศักดิ์, 2546) และสายพันธุ์มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน ดังเช่น ผดุงวิทย์และสวนีย์ (2547) ได้ทำการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอริน พบว่าการให้วัคซีนเพียงครั้งเดียวในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ให้ความคุ้มโรคสูง ขณะที่เป็ดพันธุ์บาร์บารีไม่มีความคุ้มโรค แต่เมื่อให้วัคซีนสองครั้ง เป็ดพันธุ์บาร์บารีถึงมีความคุ้มโรคตามมาตรฐานที่กำหนด กมลทิพย์และดิถี (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ด ในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์และเป็ดพันธุ์บาร์บารี พบว่าการให้วัคซีนเพียงครั้งเดียวในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ให้ความคุ้มโรคได้ 100% ต่างจากเป็ดพันธุ์บาร์บารีที่ให้ความคุ้มโรคต่ำกว่ามาตรฐานทั้งการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง และมีระดับแอนติบอดีต่ำกว่าเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ในขณะที่Rana *et al*. (2010) ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในเป็ดสายพันธุ์ต่างๆ หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่และวัคซีนกาฬโรคเป็ด พบว่าเป็ดพันธุ์ Deshi มีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์เป็ดไก่และกาฬโรคเป็ดสูงสุด รองลงมา คือ เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดพันธุ์ Jinding ตามลำดับ และ Cagle *et al*. (2011) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนไข้หวัดนกชนิดเชื้อตายในเป็ดพันธุ์ปักกิ่งและเป็ดเทศ พบว่าเป็ดพันธุ์ปักกิ่งมีระดับแอนติบอดีและให้ความคุ้มโรคสูงกว่าเป็ดเทศ

ปัจจุบันพบว่าเกษตรกรทั่วประเทศไทยมีการเลี้ยงเป็ดมากถึง 30 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2564) เป็ดที่นิยมเลี้ยงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เป็ดเนื้อและเป็ดไข่ สายพันธุ์เป็ดเนื้อที่นิยม ได้แก่ พันธุ์ปักกิ่ง (Pekin) เป็ดเทศ (Muscovy) พันธุ์บาร์บารี (Barbary) พันธุ์ปี๊วฉ่าย (Mule) เป็นต้น สำหรับสายพันธุ์เป็ดไข่ที่นิยม ได้แก่ พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ (Khaki

Campbell) พันธุ์กบินทร์บุรี พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ เป็นต้น (สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์, 2559) โดยโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ เป็นโรคหนึ่งที่ต้องมีการทำวัคซีน เพื่อป้องกันการเกิดโรค

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่มีการนิยมเลี้ยงชนิดละ 2 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคได้ 100% และให้ระดับแอนติบอดีสูง ภายใน 7 วัน โดยมีระดับแอนติบอดีสูงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการฉีดวัคซีนและมีระดับแอนติบอดีสูงที่สุดในวันที่ฉีดพิษทับทั้งการฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง ในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2562 ผู้วิจัยได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันและทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในเป็ดไข่พันธุ์กากี-แคมป์เบลล์ พบว่าวัคซีนตำรับที่มีจำนวนเชื้อ $1.0x10^{9}$ CFU/ml (ขนาดฉีดโด๊สละ 0.5 ml) ให้ความคุ้มโรคได้ 100% ทั้งการฉีดวัคซีน และและให้ระดับแอนติบอดีสูง ภายใน 7 วัน โดยมีระดับแอนติบอดีสูงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการฉีดวัคซีนและมีระดับแอนติบอดีสูงที่สุดในวันที่ฉีดพิษทับ ทั้งการฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินที่มีจำนวนเชื้อ $1.0x10^{9}$ CFU/ml (ขนาดฉีดโด๊สละ 1 ml) พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคได้ 90% และ 100% จากการวัคซีนจำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้งตามลำดับ และกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินมีระดับแอนติบอดีต่ำกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) รวมทั้งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิด บรอทแบคเทอรินมีระดับแอนติบอดีลดลงหลังฉีดวัคซีนเข็มแรก21 วัน เมื่อฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 7 วัน ระดับแอนติบอดีจึงสูงขึ้นมาใหม่ และลดลงอีกครั้งหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 14 วัน (วรพรและวีรชาย, 2562) เมื่อนำวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอทแบคเทอรินของสทช. ไปทดสอบหาความคุ้มโรคในเป็ดสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคต่ำกว่า 65% จากการฉีดวัคซีนครั้งเดียว และมีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 85% จากการฉีดวัคซีนสองครั้ง ในขณะวัคซีนให้ความคุ้มโรคในเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ ไม่ต่ำกว่า 85% ทั้งการฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง (ผดุงวิทย์และสวนีย์, 2547) ซึ่งตามมาตรฐาน WOAH (2018a) กำหนดเกณฑ์การทดสอบความคุ้มโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องรอดอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค แสดงว่าต้องฉีดวัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินในเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี จำนวน 2 ครั้งจึงให้ความคุ้มโรคต่างจากเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ที่ฉีดวัคซีนเพียงเข็มเดียวก็ให้ความคุ้มโรค แต่วัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินไม่สามารถให้ผลความคุ้มโรคได้ 100% ต่างจากวัคซีนชนิดน้ำมันที่ให้ความคุ้มโรคได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงเข็มเดียวทั้งในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ เมื่อพิจารณาระดับแอนติบอดีหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ พบว่าเป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่งและเป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์และเป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี แต่มีระดับแอนติบอดีที่แตกต่างกันไม่มาก และถือว่ามีระดับแอนติบอดีสูงตลอดการทดลอง ซึ่งจากการวิจัยครั้งเป็นการยืนยันได้ว่าการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ช่วยให้ความคุ้มโรคและสร้างระดับภูมิคุ้มโรคได้สูงในเป็ดได้หลายสายพันธุ์ ทั้งเป็ดเนื้อและเป็ดไข่

สรุป

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ขนาดฉีดโด๊สละ 0.5 ml ที่ผลิตผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทางห้องปฏิบัติการ มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์ และเป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์ ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวและให้ระดับแอนติบอดีสูง ภายใน 7 วัน ทุกสายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ ธัญพิมล และ ดิถี ประเสริฐสุวรรณ 2556 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดในเป็ดพันธุ์กากี แคมป์เบลล์และพันธุ์บาร์บารี วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 22(1): 17-24

กรมปศุสัตว์ 2564 สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนเกษตรกร-เป็ด ประจำเดือนกุมภาพันธ์ 2564 แหล่งที่มา https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/monthly/2564/feb64/7---Duck.pdf 23 มีนาคม 2564

ทวีศักดิ์ ส่งเสริม 2546 โรคเป็ดและห่านในประเทศไทย พยาธิวิทยาและการวินิจฉัยโรค ศิริโรจน์การพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 5

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

ผดุงวิทย์ รักทอง ภาวศุทธิ์ จันทร์กระจ่าง และจารุณี สาตรา 2549 ศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(1): 21-26

ผดุงวิทย์ รักทอง และสวนีย์ ตระการรังสี 2547 การศึกษาผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ในเป็ด 2 สายพันธุ์ การประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19 วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2547 หน้า 133-134

รัชนี อัตถิ 2553 โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและการควบคุมป้องกัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 19(1-2): 37-51

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

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

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2557 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ ศูนย์สื่อสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ หน้า 13

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก เรื่องการทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-024) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข เรื่องการทดสอบความปลอดเชื้อของเชื้อรา และแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (SOP-QCP-031) หน้า 1-6

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

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

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562จ เรื่องการทดสอบความปลอดภัย (safety test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่(SOP-QCB-026) หน้า 1-3

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ฉ เรื่องการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-025) หน้า 1-3

สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2559 คู่มือการเลี้ยงเป็ด โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ หน้า 1-4

Ahmad, T. A., Rammah, S. S., Sheweita, S. A., Haroun, M. and El-Sayed, L. H. 2014. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. Vaccine. 32(8): 909-917.

ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for fowl cholera bacterin. *In* ASEAN standards for animal vaccines, Livestock publication series 2A, 2nd ed. Penehar Swadaya, Indonesia. pp. 14-15.

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

Cagle, C., To, T. L., Nguyen, T., Wasilenko, J., Adams, C. S., Cardona, J. C., Spackman, E., Suarez, L. D. and Pantin-Jackwood, J. M. 2011. Pekin and Muscovy ducks respond differently to vaccination with a H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) commercial inactivated vaccine. Vaccine. 29(38): 6549-6559.

Rana, M., Hossain, M. T., Islam, M. A., Rahman, M. M., Alam, M. K. and Dutta, U. K. 2010. Comparative immunogenicity study in ducks of different breeds available at costal regions of Bangladesh against duck plague and duck cholera vaccines. Int. J. BioRes. 2(8): 23-27.

Spickler, A. R. and Roth, J. A. 2003. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. J. Vet. Intern. Med. 17: 273–281.

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

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

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบ	เกณฑ์	ผล	การตัดสิน
การทดสอบในกระบวนการผลิต			
1. การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย	$1.0x10^9$ CFU/ml	$1.0x10^9$ CFU/ml	ผ่าน
2. การทดสอบความบริสุทธิ์	ไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก *P. multocida*	ไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก *P. multocida*	ผ่าน
3. การทดสอบการฆ่าเชื้อโดยสมบูรณ์	ไม่มี *P. multocida* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร	ไม่มี *P. multocida* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร	ผ่าน
การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป			
1. การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	ผ่าน
2. การทดสอบชนิดอิมัลชัน	คงอยู่เหนือน้ำและไม่กระจายตัวในน้ำ	คงอยู่เหนือน้ำและไม่กระจายตัวในน้ำ	ผ่าน
3. การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์	เป็นเนื้อเดียวกัน และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน	เป็นเนื้อเดียวกัน และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน	ผ่าน
4. การทดสอบความหนืด	น้อยกว่า 100 centipoises	20.45	ผ่าน
5. การทดสอบความคงตัว	แยกชั้นไม่เกิน 5%	2%	ผ่าน

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความคุ้มโรคหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในเป็ดสายพันธุ์ต่างๆ

กลุ่มที่	พันธุ์เป็ด	กลุ่มที่ฉีดวัคซีน				กลุ่มควบคุม		
		จำนวนที่ฉีดวัคซีน (ครั้ง)	จำนวนสัตว์คุ้มโรค (ตัว)	จำนวนสัตว์ทั้งหมด (ตัว)	% ความคุ้มโรค	จำนวนสัตว์ตาย (ตัว)	จำนวนสัตว์ทั้งหมด (ตัว)	% การตาย
1	เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง	1	10	10	100	10	10	100
2	เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี	1	10	10	100	10	10	100
3	เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์	1	10	10	100	10	10	100
4	เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์	1	10	10	100	10	10	100
5	เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง	2	10	10	100	10	10	100
6	เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี	2	10	10	100	10	10	100
7	เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์	2	10	10	100	10	10	100
8	เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์	2	10	10	100	10	10	100

ตารางที่ 3 ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD) ในเป็ดสายพันธุ์ต่างๆ หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จำนวน 1 ครั้ง

วันที่หลังฉีดวัคซีน	ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD)			
	เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง	เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี	เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์	เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์
0	0.37 ± 0.08^{Aa}	0.34 ± 0.09^{Aa}	0.33 ± 0.07^{Aab}	0.25 ± 0.09^{Ab}
7	4.74 ± 0.46^{Ba}	2.49 ± 1.10^{Bb}	3.23 ± 0.83^{Bb}	3.20 ± 0.53^{Bb}
14	5.24 ± 0.23^{Ca}	3.89 ± 0.76^{Cc}	4.74 ± 0.20^{Cb}	3.73 ± 0.58^{c}

1. ตัวอักษร A, B และ C ที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
   ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
2. ค่า S/P ratio >0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และ ค่า S/P ratio≤0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ตารางที่ 4 ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD) ในเป็ดสายพันธุ์ต่างๆ หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันจำนวน 2 ครั้ง

วันที่หลังฉีดวัคซีน	ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD)			
	เป็ดเนื้อพันธุ์ปักกิ่ง	เป็ดเนื้อพันธุ์บาร์บารี	เป็ดไข่พันธุ์กากีแคมป์เบลล์	เป็ดไข่พันธุ์ซีพี ซุปเปอร์
0	0.31 ± 0.10^{Aabc}	0.39 ± 0.08^{Ab}	0.28 ± 0.14^{Ac}	0.34 ± 0.09^{Aabc}
7	3.55 ± 0.74^{Ba}	2.89 ± 1.14^{Bac}	3.61 ± 0.37^{Bab}	2.51 ± 1.00^{Bc}
14	4.77 ± 0.46^{Ca}	3.47 ± 1.05^{BCb}	4.90 ± 0.24^{Ca}	4.17 ± 0.74^{Cb}
21	5.11 ± 0.23^{CDa}	4.11 ± 0.76^{CDb}	4.94 ± 0.35^{Cac}	4.56 ± 0.74^{Cbc}
28	5.25 ± 0.11^{Da}	4.70 ± 0.52^{Db}	4.99 ± 0.29^{Cab}	4.81 ± 0.88^{Cb}

1. ตัวอักษร A, B, C และ D ที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
   ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
2. ค่า S/P ratio >0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และ ค่า S/P ratio≤0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

Comparison of potency and antibody titer after vaccinated with oil adjuvant fowl cholera vaccine in meat-type and egg-type ducks

Woraporn Poosungnoen [1] Ritluechai Poosungnoen [1]

Abstract

Backgrounds: Fowl cholera is a contagious bacterial disease that affects chickens, ducks, geese, turkeys, and birds; caused by *Pasteurella multocida* infection (*P. multocida*) serotype A. Immunization methods were considered the most effective prevention measures. Until now, the Bureau of Veterinary Biologics (BVB) produced inactivated fowl cholera vaccine (broth bacterin) vaccination by injecting 1 ml/dose every three months and the broth bacterin can not prevent fowl cholera in various poultry .Oil adjuvant (recommended use in poultry) improves the effectiveness of vaccines. Preliminary, the author study oil adjuvant fowl cholera vaccine immunization in the ducks because they are target species which immunized with fowl cholera vaccine and tested in quality control at BVB. The objective of this research was to compare of potency and antibody titer after vaccinated with oil adjuvant fowl cholera vaccine in meat-type and egg-type ducks.

Methods: The oil adjuvant fowl cholera vaccine was produced from a bacterium *P. multocida* serotype A:1 (local strain) and ready-to-use adjuvant (MONTANIDE™ ISA 71 VG) containing $1.0x10^9$ CFU/ml (0.5 ml/dose). The vaccine was tested in a laboratory and tested in meat-type ducks and egg-type ducks (Pekin ducks, Babary ducks, Khaki Campbell ducks and CP super ducks): safety, potency (single and twice vaccinations) and serum antibody (collected blood every week) was detected by ELISA.

Results: It was found that the vaccine has met the quality standard requirement in laboratory tests, is safe, and no symptoms or deviation of fowl cholera showed in ducks. For the potency test, all ducks were 100% protection both single and twice vaccination in meat-type ducks and egg-type ducks (4 breeds). The results of the antibody determination showed that the antibody titer of Pekin ducks and Khaki Campbell ducks were higher than that the antibody titer of CP super ducks and Babary ducks but the antibody titer of 4 duck breeds were not different and high at 7 days after vaccination throughout the experiment.

Conclusion: The oil adjuvant fowl cholera vaccine (0.5 ml/dose) was safe and completely prevent fowl cholera (100%) when single vaccination and providing high antibody titer at 7 days after vaccination tested in meat-type ducks and egg-type ducks (Pekin ducks, Babary ducks, Khaki Campbell ducks and CP super ducks).

Keywords: Oil adjuvant fowl cholera vaccine, Antibody titer, Potency, Meat-type ducks, Egg-type ducks

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 3013