วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 1 เล่มที่ 1 กันยายน 2533

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS Vol.1 No.1 Sept.1990

การตรวจหาระยะของความคุ้มโรค ของวัคซีนกาฬโรคเป็ด.....1

การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ สุกรแบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์.....5

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ด เมื่อใช้สเทบิไลเซอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ.....10

การเสริมระดับภูมิคุ้มและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอในโคซึ่งเคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ.....15

การศึกษาการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ Escherichia Coli.....19

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคอายุต่างๆกัน23

การใช้เครื่องกรองหมุนเหวี่ยงในการ Clarify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน.....27

การประเมินผลความคุ้มโรค ของวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อHaemophilus Paragallinarum(Infectious Coryza)ในไก่ไข่.....31

ความสัมพันธ์ด้านทางชีวภาพ และการเจริญ กับจำนวนลูกต่อแม่ (ขนาดครอก) ของหนูตะเภาพันธุ์ Thai-Local Black Ear Harley.....36

ความคงรอดของสารแขวนลอยสปอร์แอนแทรกซ์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°- 8°C และที่อุณหภูมิห้อง.....42

อิทธิพลของการเก็บและการเตรียมสาร Binary Ethylene Imine(BEI) ต่อการเป็นพิษ และคุณสมบัติในการ Inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย.....47

วัคซีน,แอนติเจน ป้องกันโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร.....53

การเพาะเซลล์ BHK21C13แบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด5%เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย...61

การตรวจหาความคุ้มของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด โอ ในสุกร ซึ่งใช้ฟอร์มาลิน และ ไบนารี่เอทธิลีนอิมีน (BEI)เป็นสาร Inactivantเมื่อเก็บในระยะเวลาต่าง ๆกัน.....66

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

บรรณาธิการแถลง

หนังสือวารสารชีวผลิตภัณฑ์ (The Journal of Veterinary Biologics) เป็นหนังสือเผยแพร่งานทางวิชาการ ของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ มีจุดประสงค์เพื่อจะให้นักวิชาการของกองฯ และหน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ใช้เป็นแหล่งเผยแพร่งานทางด้านวิชาการ ที่จะเป็นประโยชน์ต่อทางราชการต่อไป

โดยปกติแล้ว กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ได้จัดทำหนังสือรายงานประจำปีของกองฯ อย่แล้วแต่ยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควร กองฯ จึงได้ดำริให้มีการจัดทำหนังสือวารสารชีวผลิตภัณฑ์ขึ้น โดยกำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคม และ เดือนกันยายน

นอกจากเผยแพร่งานทางด้านวิชาการแล้ว ยังประสงค์จะให้เป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับวัคซีนสำหรับสัตว์ในแง่มมต่างๆอีกด้วย

จึงหวังว่าวารสารฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการ, เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์, สัตวแพทย์ และผู้สนใจทั่วไป.

บรรณาธิการ

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ที่พิมพ์ออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน กันยายน และเดือน มีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ นั้น แยกได้เป็น 2 ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ หรือรวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ควรพิมพ์ดีดบนกระดาษขนาด 8.5 × 11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ความยาวประมาณ 25 บรรทัดต่อหน้า มีความยาวทั้งหมด 8 หน้าพิมพ์ โดยประมาณ

2. ชื่อเรื่อง บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. ชื่อผู้เขียน ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. บทคัดย่อ (Abstract) ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่อง เป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของตัวเรื่อง

5. เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัย ควรประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้

5.1 คำนำ (Introduction) เพื่ออธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ และอาจรวมการตรวจเอกสาร (literature review) เข้าไว้ด้วยกัน

5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ควรประกอบด้วย

5.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการที่ใช้ทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับ ซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 ผล (Results) เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็น ถ้ามีตาราง กราฟ หรือรูปภาพ ก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 คำขอบคุณ (Acknowledgement) อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 เอกสารอ้างอิง (Literature cited)

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกัน ให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a, b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อตัวนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละติน โดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น. หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิต ให้ใช้ตัวเอน หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายกัน ให้ใช้ตัวเอนหรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกทอดหนึ่ง ทุกคำจะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือตำรา ให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. ภาพประกอบ (Illustration)

6.1 ภาพถ่าย ควรเป็นภาพขาว–ดำ ภาพสีหากจำเป็นจึงใช้ ขนาดอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสการ์ด (3.5 × 5 นิ้ว) หรือเท่าตัวจริงที่จะปรากฏในหนังสือ ผิวเรียบชัดมัน เขียนคำอธิบายแยกไว้ต่างหาก อย่าเขียนลงในรูป อย่าหนีบด้วยคลิป หรือกลัดด้วยเข็มหมุด

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอสมควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการฯ ขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่องตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียนเพื่อความเห็นชอบอีกครั้งหนึ่ง

การตรวจหาระยะของความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด

DURATION OF IMMUNITY OF DUCK PLAQUE VACCINE

สวรรณี ท้วมแสง[1] สายชล จันทร์สาราญ[1]

Suwonnee Tuamsang Saiphon Junsumran

ABSTRACT

A study on the duration of immunity of duck plaque vaccine was carried out on 216 Kaki-cambell-native ducklings. They were devided into 18 groups, each groups had 12 ducklings. Group 1-18 were challenged with 10^4-10^5 DLD_{50} /dose of the virulent duck plaque virus after they have been vaccinated with attenuated duck plaque vaccine 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13, 14,15,16,17 and 18 months, respectively. Protection rate was 100,91 67,100,91.67, 83.33, 91.67 100,91.67, 91.67,91.67,91.67,100,83.33,100,83.33,91.67,83.33 and 83.33% in group 1-18, respectively.

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดในเป็ดพันเมืองผสมกากีแคมเบล จำนวน 216 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 18 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว หลังจากฉีดวัคซีนหมด ๆ เดือน ตั้งแต่เดือนที่ 1-18 นำเป็ดแต่ละกลุ่มไปฉีดเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดทับด้วยขนาด 10^4-10^5DLD_{50} ต่อตัวเพื่อดูอัตราการให้ความคุ้มโรค พบว่าหลังฉีดวัคซีนเดือนที่ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 11,12,13,14,15,16,17 และ18 เดือนเป็ดจะมีอัตราความคุ้มโรคเป็น 100,91.67,100,91.67,83.33,91.69,100, 91.67,91.67,91.67,91.67, 100,83.33,100,83.33, 91.67,83.33 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำนำ

ปัจจุบันนี้วัคซีนกาฬโรคเป็ดที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่อ่อนกำลังลงแล้ว เตรียมจากการเพาะเชื้อไวรัสลงบนเซลล์คัลเจอร์ ซึ่งการเพาะด้วยวิธีนี้จะได้วัคซีนที่มีคุณภาพ และจำนวนไวรัสต่อมิลลิลิตร ดีกว่าการเพาะแบบเดิม คือการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไข่ฟักทาง ALLANTOIC SAC ดังนั้นจึงได้มีโครงการนี้ขึ้นมา เพื่อศึกษาระยะของความคุ้มโรคในเป็ด เมื่อฉีดวัคซีนชนิดนี้เพียงครั้งเดียว ว่าสามารถคุ้มโรคได้กี่เดือน

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็น ที่เตรียมจากการเพาะไวรัส Strain Jensen ลงบนทิชชูคัลเจอร์ชุด DT-PC 31/30 หมดอายุ 19 -9 -31 มี virus titer $10^{5.5}$

1 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา กรมปศุสัตว์ 30130

$TCID_{50}/ml$ เป็นวัคซีนที่ผ่านการทดสอบคุณภาพและผลิตออกใช้ในท้องที่

2. ไวรัสเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดชนิด Local strain ซึ่งเก็บมาจากชลบุรี

3. เป็ดลูกผสมกากีนคมเบล กับพื้นเมือง อายุ 1 จำนวน 215 ตัว ซึ่งไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดมา

4. เป็ดควบคุม (Control group)จำนวน 90 ตัว

5. เซลล์ตัวอ่อนไก่อายุ 11 วัน (Chick-embryo fibroblast, CEF)

วิธีการศึกษา

1. สุ่มเจาะเลือดเป็ดก่อนฉีดวัคซีน เพื่อหาภูมิคุ้มโรคกาฬหอด (passive immunity)

2. ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดกับเป็ดจำนวน 216 ตัว ขนาดโด๊สในท้องที่เข้ากล้ามเนื้ออก

3. หลังฉีดวัคซีนแล้วทุก ๆ เดือน จนถึง 18 เดือน นำเป็ดที่ฉีดวัคซีนมาฉีดเชื้อพิษไวรัสกาฬโรคเป็ด ทับด้วยขนาด 10^4-$10^5 DLD_{50}$ ต่อตัว ตัวละ 12 ตัว โดยมีเป็ดควบคุม (Control group) ตัวละ 5 ตัว

4. ก่อนฉีดพิษทับทุกครั้ง เจาะเลือดเก็บตัวอย่างเพื่อไปหาระดับแอนติบอดี้ต่อไป

5. การตรวจหาระดับแอนติบอดี้ โดยวิธี Neutralization test เพื่อหาค่า Neutralizing Index (NI) (Constant serum, Varying Virus) ตามวิธีดังนี้

5.1 เพาะเซลล์ตัวอ่อนลูกไก่ (CEF) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 mm โดยใช้ตัวอ่อนลูกไก่อายุ 11 วัน โดยมีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (Growth media) ซึ่งมี M_{199} with Earles' salt เป็นองค์ประกอบ

5.2 ซีรั่มเป็ดที่ต้องการทดสอบนำมา inactivate ที่ 56°ซ. นาน 30 นาที

5.3 Standard virus เป็น ไวรัสที่ได้จาก Seed Jansen strain ต้องมี Virus titer สูง ๆ

5.4 ซีรั่มที่ต้องการทดสอบ นำมาใส่หลอดแก้วหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด (Constant serum)

5.5 Virus control ใช้ TPB เป็น diluent นำมาใส่หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด

5.6 Standard virus นำมาทำ 10-fold dilution จาก 10^{-1}- 10^{-6} จากนั้นนำ virus นี้แต่ละ dilution ไปผสมลงในซีรั่มข้อ 5.4 และใน Virus control ตามข้อ 5.5 โดยเริ่มจาก 10^{-6}- 10^{-1} ตามลำดับ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

5.7 เขย่าให้ผสมกันดีแล้วนำไปอุ่นใน Water bath อุณหภูมิ 39°ซ.นาน 30 นาที เพื่อให้ไวรัสทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่มีอยู่ในซีรั่ม

5.8 ครบ 30 นาที นำ Serum-Virus mixture แต่ละ dilution นำไปเพาะลงใน CEF ที่เคี้ยวโตเต็มที่ (24-48 ชั่วโมง) โดยใส่หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยน Growth media เป็น Maintenance media นำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิ 39°ซ. เป็นเวลา 5 วัน

5.9 อ่านผลโดยดูการเกิด Cytopthic effect (CPE) ต่อเซลล์ หาค่า Virus titer ของ Serum-virus mixture และ Virus control ผลต่างของค่า Virus titer ที่ได้คือค่า NI

ผล

พบว่าเมื่อนำเป็ดหลังฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดไปฉีดเชื้อพิษไวรัสกาฬโรคเป็ด ในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 18 เป็ดจะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคอยู่ระหว่าง 83.33 ถึง 100 % (ตามตารางที่ 2)

ซีรั่มเป็ดหลังการฉีดวัคซีน ในแต่ละเดือนจะมีค่าเฉลี่ยของ Neutralizing index อยู่ระหว่าง 1.8 - 5.22 (ตามตารางที่ 2)

เป็ดควบคุมแต่ละกลุ่ม เมื่อนำไปฉีดเชื้อพิษไวรัสกาฬโรคเป็ด อัตราการตายจะเป็น 100 % นั่นคือไม่มีความคุ้มโรคต่อโรคนี้เลย และค่าเฉลี่ยของ Neutralizing index ของซีรั่ม ในเป็ดกลุ่มนี้อยู่ระหว่าง 0.1-1.37

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการตายของเป็ดหลังฉีดวัคซีนแต่ละเดือน โดยการฉีดเชื้อพิษ

จำนวนเดือนหลังการฉีดวัคซีน กลุ่มเป็ดฉีดวัคซีน และกลุ่มเป็ดควบคุม	อัตราการตายของเป็ดหลังการฉีดพิษหับ (จำนวนตาย/จำนวนฉีดพิษหับ)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
กลุ่มฉีดวัคซีน	0/12	1/12	0/12	1/12	2/12	1/12	0/12	1/12	1/12	1/12	1/12	0/12	2/12	0/12	2/12	1/12	2/12	2/12
กลุ่มควบคุม	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

สรุปและวิจารณ์

การทดลองในครั้งนี้ เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ เป็ดที่ใช้ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ได้ผลิตขึ้นเอง ซึ่งเป็นเป็ดพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ไม่เคยได้รับวัคซีนการโรคเป็ดและวัคซีนอย่างอื่นมาก่อน สุขภาพของเป็ดทดลองแข็งแรงและสมบูรณ์ดี และบริเวณที่ทำการทดลองไม่เคยมีการระบาดของโรคการโรคเป็ดมาก่อน ดังนั้นการทดลองครั้งนี้พบว่าเป็ดทดลองที่ฉีดวัคซีนการโรคเป็ดเพียงครั้งเดียว เมื่ออายุได้ 1 เดือน สามารถมีภูมิคุ้มโรคได้ถึงเดือนที่ 18 คือ คุ้มโรคได้ถึง 83.33 % (ตามตารางที่ 2) และค่าเฉลี่ยของ Neutralizing index ของเป็ดหลังฉีดวัคซีนแต่ละเดือน จะมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8 - 5.22 และมีอัตราการให้ความคุ้มโรคอยู่ระหว่าง 83.33 - 100 % ซึ่งถือว่าคุ้มโรค และในกลุ่มเป็ดควบคุมที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีน พบว่าค่าเฉลี่ยของ Neu - tralizing index อยู่ระหว่าง 0.1-1.37 เมื่อนำไปฉีดเชื้อพิษไวรัสการโรคเป็ด เป็ดกลุ่มนี้จะตายหมด คือไม่มีภูมิคุ้มโรค ซึ่งตรงกับ Dardiri,1967 พบว่าค่า Neutralizing index ระหว่าง 0 - 1.5 พบได้ในเป็ดที่ไม่เคยผ่านการติดเชื้อโรคนี้มาก่อน และเป็ดที่ผ่านการเป็นโรคหรือได้รับเชื้อจะสร้างแอนติบอดีขึ้น จะให้ค่า Neutralizing index เท่าดับหรือมากกว่า 1.75 เช่นเดียวกับ Gough, 1984 พบ

ตารางที่ 2 แสดงค่า NI และ Protection rate ของกลุ่มเป็ดหลังฉีดวัคซีนตั้งแต่เดือนที่ 1 - 18

เดือนหลังฉีด	NI ก่อน Challange($\bar{X}$)	%Protection
1	5.22	100.00
2	1.81	91.67
3	2.57	100.00
4	1.82	91.67
5	2.4	83.33
6	2.4	91.67
7	2.49	100.00
8	2.9	91.67
9	1.9	91.67
10	1.9	91.67
11	2.25	91.67
12	2.0	100.00
13	2.6	83.33
14	1.8	100.00
15	4.0	83.33
16	4.5	91.67
17	1.56	83.33
18	3.0	83.33

ว่าเป็ดปกติจะมีค่า Neutralizing index น้อยกว่า 1.5 และเป็ดที่ฉีดวัคซีนแล้วจะให้ค่า Neutralizing index อยู่ระหว่าง 2.0-4.3

จากการทดลองครั้งนี้ทดลองในพื้นที่ปลอดโรคการใช้วัคซีนการป้องกันโรคเป็ดบ้องกันโรคเพียงครั้งเดียวก็สามารถป้องกันโรคได้เป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าในการเลี้ยงเป็ดจำนวนมาก และมีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว ผลการทดลองดังกล่าว อาจจะไม่สามารถคุ้มโรคได้นานในบริเวณนั้น ดังนั้นจำเป็นต้องมีการทดลองในพื้นที่มีระบาดของโรคนี้ต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงค่า Neutralizing index และ Protection rate (%) ของกลุ่มเป็ดควบคุมแต่ละกลุ่ม ตั้งแต่เดือนที่ 1-18

กลุ่มเป็ดควบคุม (เดือน)	NI ของ Normal Serum	% Protection
1	0.67	0
2	0.47	0
3	0.1	0
4	1.0	0
5	0.65	0
6	1.02	0
7	1.13	0
8	0.75	0
9	0.84	0
10	0.84	0
11	0.5	0
12	0.84	0
13	0.7	0
14	1.17	0
15	1.37	0
16	0.84	0
17	1.2	0
18	0.2	0

เอกสารอ้างอิง

Dardiri, A. H., and W.R. Hess. The incidence of neutralizing antibodies to duck plaque virus in serums from domestic ducks and wild water fowl in the United States of America Proc. 71 st Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Assoc. pp. 225-237. 1967.

R.E. Gough. 1984. Laboratory confimed outbreaks of duck virus enteritis (duck plaque) in the United Kingdom from 1977. to 1982. Vet. Reccord. 114:262-265.

การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสูตรแบบซัสเป็นชั่นเซลล์คัลเจอร์

THE EXPERIMENTS ON TYPE O-PIG FMD VACCINE PRODUCTION BY SUSPENSION CELLS CULTURE METHOD

พยนต์ สินสวงศ์วัฒน์[1] เชิงชาย จันทรัศมี[1] วัชรี สินสวงศ์วัฒน์[1]

PAYONT SINSUWONKWAT CHERNGCHAI CHUNTHARUSMI WACHAREE SINSUWONKWAT

ABSTRACT

The O-pig FMD vaccine production,at Foot and Mouth Disease Center Pakchong Nakornratchasima, Thailand, produces by Rolling bottle cell culture method (monolayer cell culture method), which can produces small amount of vaccine. So, to get the large amount of vaccine and the vaccine can be used both pig and cattle (by same vaccine), the O-Pig FMD vaccine production must be produced by suspension cells culture method.

The experiment started on cultured of O-Pig FMD Seed Virus ($OPN8T_9$) in the 30 litre fermentor on $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells, M.O.I. = 0.5, the virus were harvested at 24 hours, CPE = 80-100%. The harvested virus were clarified and kept as master seed stock at -80°C.

The master seed stock must be returned to subculture in the monolayer cell culture 1 passage (Rolling bottle) to keep as the production seed stock. The production seed stock must be again subcultured on the $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells culture in the fermentor as the seed virus for production.

The seed virus for production were inocculated on $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells in the fermentor by 2% of the total volume of the cells (the cell number = 2.0×10^6 cells/ml), culture at 37°C., pH 7.4. The virus were harvested at 24 hours, CPE 80-100% and clarified by by Filter and Centrifuge, and 10 times concentrated by ultrafiltration system. The O-Pig FMD suspension vaccine were prepared form these Concentrated virus.

From the experiments the O-Pig FMD vaccine could protect well in both pig and cattle and didn't have the allergic reaction in the experimental animals after vaccinations.

บทคัดย่อ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สำหรับสูตรที่ผลิตที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา นั้น ผลิตโดยวิธีขวดหมุน (Rolling bottle cell culture method) ซึ่งเป็นการผลิตโดยใช้

---

1 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer จึงทำให้ได้ปริมาณวัคซีนน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการ

ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดเวลา, ประหยัดเงินตรา และประหยัดแรงงาน จึงได้ทดลองทำการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร แบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์ โดยใช้เซลล์$BHK_{21}C_{13}$ suspension ทั้งนี้เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพดี ใช้ได้ทั้งในโค และ สกร ตลอดจนได้วัคซีนจำนวนมากเพียงพอต่อความ ต้องการของเกษตรกร และไม่เกิดการแพ้ในสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว

การทดลองโดยการผลิตไวรัส โรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สกร (master seed stock) แบบซัสเปนชั่น 1 passage แล้ว เก็บเป็นสต็อกไว้ที่ -80°C. ต่อมากำหนด master seed stock นั้นมาเพาะแบบ monolayer cell culture ในขวด Roller 1 passage แล้วเก็บเป็น production seed stock ที่ -80°C. จากนั้นกำหนด production seed stock ไปเพาะแบบซัสเปนชั่นอีก 1 passage เพื่อใช้เป็น seed virus for production โดยเก็บไว้ที่ 4°C. ไม่เกิน 7 วัน

การผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร เพื่อผลิตเป็นวัคซีนนั้นผลิตโดยนำseed virus for productionมา innoculate ลงในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$suspension โดยใช้ seed virus 2% ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด (V/V) (เซลล์ขณะ innoculate seed virus ประมาณ $2.0x10^6$ เซลล์/ซีซี)แล้วเพาะที่ 37°C.pH 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง CPE 80-100% จึง Harvestจึงนำ virus fluidที่ได้มาทำการ clarify โดยการกรองและปั่นแยกกากเซลล์และ Concentrate 10 เท่าด้วย ultrafiltration system หลังจากนั้นจึงเตรียมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สกร จาก Concentrated virus นั้น

ผลของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สกร ที่ผลิตได้โดยวิธี suspension cells culture สามารถให้ความคุ้มโรคได้ดีทั้งในโคและสุกร และนอกจากนี้ยังไม่เกิดการแพ้ในสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนด้วย

อย่างไรก็ดีการทดลองในครั้งนี้ ควรจะทำซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แน่นอน

คำนำ

เนื่องจากโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร ได้เกิดการระบาดขึ้นในประเทศไทยอย่างแพร่หลาย และรวดเร็ว แต่การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร ที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ เพราะผลิตโดยวิธีขวดหมุนจึงทำให้โรคเกิดการระบาดกว้างขวางขึ้น

Makarasen et al (1982, 1986) ได้รายงานเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสกรด้วยวิธี Rolling bottle cell culture method และการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับ โค-กระบือด้วยวิธี suspension cell culture methodโดยเปรียบเทียบปริมาณไวรัสและวัคซีนที่ผลิตได้จากทั้งสองวิธีนั้น ปรากฏว่าการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับ โค-กระบือ โดยวิธี suspension cell culture method ผลิตได้ปริมาณมากกว่าวัคซีนสำหรับสุกร ซึ่งผลิตโดยวิธี Rolling bottle cell culture method

ดังนั้น เพื่อเป็นการที่จะหยุดการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร ในท้องที่ จึงจำเป็นต้องทำการผลิตวัคซีนให้ได้จำนวนมาก และเพียงพอต่อความต้องการ และการผลิตโดยวิธี Suspension cell culture จะเป็นวิธีเดียวที่จะทำให้ผลิตวัคซีนได้มาก จึงได้ทำการทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สกร โดยวิธีนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ ประกอบด้วย

1. ถังเพาะเซลล์ 30 ลิตร
2. ถังเพาะเซลล์ 300 ลิตร 3 ถัง
3. ถังเพาะเซลล์ 2000 ลิตร 1 ถัง และ 2500 ลิตร 1 ถัง
4. เครื่องกรองไวรัส(Funda Filter) 1 ชุด
5. ถังอินแอคติเวทไวรัส 1 ถัง
6. ถังปั่นอะลิเนียมเซล 1 ถัง

TABLE 1 The results of virus yield(O-Pig FMD virus) which produced by suspension cells culture method, and the results of the O-Pig FMD virus after concentration

Exp.No.	original virus fluid			concentrated virus fluid		
	pfu/ml(log)	cfu/ml	140S(u/ml)	pfu/ml(log)	cfu/ml	140S(u/ml)
1	7.21	18.08	1.45	-	158.68	6.35
2	7.16	22.28	1.34	-	189.35	7.57

Chloroform treatment tank 1 ถัง

8. เครื่อง Continuous centrifuge 4 เครื่อง

9. ถังเก็บวัคซีนพร้อมเครื่องทำความเย็น 1 ชุด

10. Modified Eagle's medium +5% PEG treated serum

11. Modified Eagle's medium +1% PEG treated serum

12. Hank's medium สำหรับเพาะเซลล์ mo - nolayer

13. เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension

14. เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer

15. ยาคโรลเลอร์

16. ไวรัส OPNBT$_9$ (O-Nakornpathom)

17. โคและสกร ใช้ในการทดสอบวัคซีน

วิธีการทดลอง

ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.เตรียม Master seed stock ในถังเพาะเซลล์ 30 ลิตร โดยใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension และ innoculate ไวรัส OPNBT$_9$ โดยใช้ MOI = 0.5, เพาะที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง CPE 80-100% จึง Harvest และทำการ clarify แล้วเก็บไว้ที่ -80°C.

2. เตรียม production seed stock โดยการนำไวรัส Master seed stock มาเพาะในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer (Rolling bottle cell culture method) โดยใช้ seed virus 1% ของ maintenance medium ที่ใช้ในการเพาะไวรัส เพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึง Harvest และทำการ clarify และเก็บไว้ที่ -80°C.

3. เตรียม seed virus for production โดยการนำproduction seed stock มาเพาะในถังเพาะเซลล์ 30 ลิตร โดยใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension เพาะที่ pH 7.4 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง CPE 80-100% จึง Harvest แล้วเก็บไว้ที่ 4°C. เพื่อใช้ผลิตไวรัสเพื่อการผลิตเป็นวัคซีนต่อไป แต่เก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน

4. เตรียมเซลล์ในถังเพาะเซลล์ 2000 ลิตร หรือ 2500 ลิตรโดยรับเซลล์มาจากถังเพาะเซลล์ 300 ลิตร 3 ถัง แล้วเพาะต่อ 1 วัน (ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5%) จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์ที่ 4°C. เป็นเวลา 2 วัน

5. Discard น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าในถังเพาะเซลล์ 2000 ลิตร หรือ 2500 ลิตร หลังจากตกตะกอนเซลล์แล้ว 2 วัน จากนั้นเติมน้ำยาเพาะเลี้ยงไวรัสที่มีน้ำยาเพาะเลี้ยงไวรัสที่มีน้ำเลือด 1% ลงไป จนได้ปริมาตรเท่าเดิม (ก่อน discard) แล้วจึงนำ seed virus for production มา innoculate ลงไปในถังเพาะเซลล์ 2000 ลิตร หรือ 2500 ลิตร โดยใช้ seed virus 2% (V/V) ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด ทำการเพาะที่ 37°C.

pH 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ CPE 80-100% จึง Harvest

6. ทำการ clarify ไวรัสที่ได้ด้วยเครื่องกรองผนัง

7. ทำการ inactivate ไวรัสด้วย BEI ที่ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Makarasen, et al 1985)

8. ทำการ clarify ไวรัสอีกครั้งด้วยเครื่อง Continuous Centrifuge

9. ทำการ Concentrate ไวรัสจากข้อ 8 ด้วยเครื่อง ultrafiltration system (Concentrate 10 เท่า)

10. treat ไวรัสที่ทำเข้มข้นแล้วด้วย 0.5 % chloroform ในถัง chloroform treatment tank

11. ทำการ clarify ไวรัสที่ treat ด้วยโคลโรฟอร์มแล้วด้วย continuous centrifuge อีกครั้ง

12. นำ Concentrated ไวรัสจากข้อ 11 ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (Table 2)

13. ไวรัสหลังขั้นตอนการผลิตจะทำการทดสอบโดยวิธี plaque assays method, Complement Fixation test และSingle Radial Immunodiffusion (SRID)

14. ปริมาณ Foreign protein ในวัคซีนหาโดยวิธี Follin test

15. วัคซีนที่ได้ในข้อ 12 จะนำไปทำการทดสอบ safety test,potency test และ purity test ต่อ

ผล

จากการทดลองผลิตไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไหป์โอ สกร (O Nakornpathom) โดยวิธีชีสเปนชั่นปรากฏว่าได้ผลดี กล่าวคือจากทดลอง 2 ครั้ง จะได้ virus titer สูงทั้งสองครั้ง (Table 1) ส่วนการทดลองวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไหป์โอ สกร ที่ผลิตโดยวิธีชีสเปนชั่นทั้งสองครั้ง ปรากฏว่าในโคฉีดโดสขนาด 2 ซีซี. เข้าใต้ผิวหนัง จะให้ความคุ้มโรค 100 % และ 95 % ตามลำดับ ส่วนในสุกรฉีดขนาด 2 ซีซี. เข้าใต้ผิวหนังและ Booster อีก 2 ซีซี. เข้าใต้ผิวหนัง หลังจากฉีดครั้งแรก 7 วัน ปรากฏว่าให้ความคุ้มโรค 60% และ 73.00% ตามลำดับ (Table 3)

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไหป์โอ สกร แบบชีสเปนชั่นครั้งนี้ ปรากฏว่าให้

TABLE 2 The concentrated O-Pig FMD vaccine formula.

components	amount (%)
1. inactivated virus (concentrated)	25.22
2. glycocal buffer	1.45
3. 2% aluminium gel	66.67
4. 10% saponin soluution	3.33
5. glycerine	3.33
Total volume of vaccine	100.00

TABLE 3 The results of potency test of O-Pig FMD concentrated vaccine in pigs and cattle,show the good protection in both pigs an cattles and didn't have the allergic reaction in the experimental animals.

EXP. No.	dose	antigen/dose 140S (u/ml)	seed challanges	% protection	allergic reaction
1	2 CC and booster 2 CC in pig	3.20	cattle:OC/BTm$_1$/P$_3$ pig:OPN-P$_{14}$	cattle:100.0% pig:66.67%	NON
2	2 CC and booster 2 CC in pig	3.82	cattle:OC/BTm$_1$/P$_3$ pig:OPN-P$_{14}$	cattle:95.0% ig: 73.3%	NON

virus yield สูงคลอดจนเมื่อผลิตเป็นวัคซีนแล้วก็จะให้ความคุ้มโรคได้ดี ทั้งในโคและสุกร และไม่เกิดอาการแพ้ในสัตว์ทดลองหลังจากฉีดวัคซีนแล้วด้วย นอกจากนั้นก็เป็นการลดโด๊สของวัคซีนด้วย ซึ่งปกติใช้ 5 ซีซี.ต่อโด๊ส แต่การทดลองครั้งนี้ใช้เพียง 2 ซีซี. เท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นแนวทางที่น่าจะทำการทดลองต่อไป คือ

1. ใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สุกร แบบซัสเปนชั่น มาผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สุกร แบบ oil adjuvants vaccine ซึ่งจะช่วยให้วัคซีนมีความคุ้มโรคได้ดีขึ้น และอาจจะฉีดเพียงครั้งเดียว โดยไม่ต้อง Booster

2. ใช้ไวรัสโอโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สุกร แบบซัสเปนชั่นมาผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ โค-กระบือ

3. นำวัคซีนที่ผลิตได้ ไปทำการทดลองฉีดในท้องที่เพื่อดูผลของความคุ้มโรคและการแพ้วัคซีน

อย่างไรก็ดีการทดลองครั้งนี้ทดลองผลิต โดยใช้ถังเพาะเชลล์และเครื่องมือในการผลิตขนาดใหญ่ ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน โค-กระบือ ทั้งนี้เพื่อต้องการให้ได้ประสบการณ์ในการใช้เครื่องมือ ซึ่งจะต้องใช้ในการผลิตต่อไป หากการทดลองครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ จึงทำให้การทดลองทำได้น้อยครั้งจึงทำให้ข้อมูลยังไม่มากพอ ดังนั้นเพื่อจะให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ จึงควรที่จะทำการทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Makarasen,P.and Sinsuwonkwat,P.1986.Vaccine and vaccine production. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control,Bangkok.259 p.

Makarasen,P.,Sinsuwonkwat,P., Chinsawadpun, W.,Tokui,T.,Motohashi,T.1982.Large Scale production of FMD vaccine using BHKcells in Thailand.XVIth Conference of the foot and mouth disease commission,Paris.175P.

Makarasen,P., Sinsuwonkwat,P., Tanachareon-watch, P. Binary Ethyleneimine and Foot and Mouth Disease vaccine production in Thailand, PP.308-309. In Anthony J.Delta-porta (eds.).Veterinary Viral Diseases, Their Significance in South-East Asia and the Western Pacific, Academic Press, Australia.

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ด เมื่อใช้สเทบิไลเซอร์ในอัตราส่วนต่างๆ

A Study on the quality of Duck Plaque vaccine with different kinds of stabilizer

สุวรรณ ทวมแสง[1] ฉาย จอมเกาะ[1]

Suwonne Tuamsang Chai Chomkoa

ABSTRACT

Casitone, polyvinyl pyrolidone (PVP) and minxture of casitone/PVP at various proportion were tested as stabilizers for Duck Plaque virus vaccine. 1.5% Polyvinyl pyrolidone was to be the most appropriate stabilizer when mixed with Duck Plaque virus vaccine at concentration 0.15%. The final product which gave 100% protection rate in ducks showed good cake and had moisture content 1.27%

บทคัดย่อ

จากการใช้สเทบิไลเซอร์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ casitione,polyvinyl pyrolidone (PVP) และ casitone รวมกับ polyvinyl pyrolidone ตามอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าสาร PVP ความเข้มข้น 1.5% อย่างเดียว เมื่อผสมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ดโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเป็น 0.15% จะให้ลักษณะของวัคซีนหลังทำแห้งมีคุณลักษณะที่ดีที่สุด คือ ลงรูปเป็นเค็ก ไม่ฝ่อ, ค่า virus titer ไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$-$TCID_{50}$ ต่อตัว เมื่อนำไปฉีดในเป็ด, เปอร์เซนต์ความชื้นในวัคซีน 1.27% และอัตราการให้ความคุ้มโรคเป็น 100%

คำนำ

ปัจจุบันวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดทำแห้งใช้casitone ความเข้มข้น 20% เป็นสเทบิไลเซอร์ โดยเมื่อผสมลงในเนื้อวัคซีนทำให้ความเข้มข้นของสารสุดท้ายเป็น 2% จะได้ลักษณะของเนื้อวัคซีนหลังทำแห้งสภาพลงรูปไม่ดีนัก บางครั้งมีการฝ่อของวัคซีนเกิดขึ้น อาจจะมีสาเหตุมาจากการใช้ส่วนผสมของสารละลายต่างๆ (สเทบิไลเซอร์)ที่ไม่เหมาะสม (2530, ฉาย จอมเกาะ) เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณลักษณะและมีประสิทธิภาพดีที่สุดหลังการทำแห้ง ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนี้ขึ้นมา เพื่อศึกษาส่วนผสมของสเทบิไลเซอร์ชนิดใหม่เมื่อนำไปผสมลงในวัคซีนจะให้วัคซีนหลังทำแห้งมีสภาพลงรูปดีที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัคซีนกาฬโรคเป็ดที่เตรียมจากการเพาะไวรัสลงในตัวอ่อนไข่ไก่ จำนวน 1000 มิลลิลิตร

2. สเทบิไลเซอร์ที่ใช้ทดลอง มีดังนี้

2.1 polyvinyl pyrolidon ความเข้มข้น 0.3%จำนวน 100 มิลลิลิตรเตรียมโดยชั่ง polyvinyl pyrolidone 0.3 กรัม ผสม lactose 10 กรัม เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

---

1 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา กรมปศุสัตว์ 30130

2.2 polyvinyl pyrolidone ความเข้มข้น 1.5% จำนวน 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง polyvinyl pyrolidone 1.5 กรัม ผสม lactose 50 กรัมเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3 casitone ความเข้มข้น 20% จำนวน 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง casitone 20 กรัมเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. เป็ดลูกผสมกากิแคมเบล กับพันธุ์พื้นเมือง อายุ 1 เดือน และยังไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็นมาก่อน จำนวน 65 ตัว

4. เซลล์ตัวอ่อนลูกไก่ อายุ 11 วัน (chick embryo fibroblast)

5. สาร Karl Fischer เพื่อใช้ตรวจหาเปอร์เซนต์ความชื้นของวัคซีน

วิธีการศึกษา

1. เตรียมวัคซีนกาฬโรคเป็ด โดยบรรจุขวดละ 2 มิลลิลิตร (ฉีดเป็ดได้ 200 ตัว) โดยผสมสเทบิไลเซอร์ตามอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้

วัคซีนชุดที่ 1 วัคซีน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5% polyvinyl pyrolidone 0.2 มิลลิลิตร อย่างเดียว

วัคซีนชุดที่ 2 วัคซีน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5% polyvinyl pyrolidone 0.15 มิลลิลิตร รวมกับ 20% casitone 0.05 มิลลิลิตร (สเทบิไลเซอร์ที่ใช้ 1.5% PVP: 20% casitone=3:1)

วัคซีนชุดที่ 3 วัคซีน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5% polyvinyl pyrolidone 0.1 มิลลิลิตร รวมกับ 20% casitone 0.1 มิลลิลิตร (สเทบิไลเซอร์ที่ใช้ 1.5% PVP : 20% casitone=1:1)

วัคซีนชุดที่ 4 วัคซีน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5% polyvinyl pyrolidone 0.05 มิลลิลิตร รวมกับ 20% casitone 0.15 มิลลิลิตร (สเทบิไลเซอร์ที่ใช้ 1.5% PVP: 20% casitone=1:3)

วัคซีนชุดที่ 5 เป็นวัคซีนชุดปกติที่ผลิตออกใช้ในห้องที่ ส่วนผสมดังนี้

วัคซีน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 20% casitone 0.2 มิลลิลิตร อย่างเดียว

วัคซีนชุดที่ 6 วัคซีน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.3% polyvinyl pyrolidone 1 มิลลิลิตร

วัคซีนชุดที่ 7 วัคซีน 1.8 มิลลิลิตรผสมกับ 0.3% polyvinyl pyrolidone 0.2 มิลลิลิตร

นำวัคซีนเหล่านี้เข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้โปรแกรมการทำแห้งสำหรับวัคซีนกาฬโรคเป็ดซึ่งใช้ระยะเวลาในการทำแห้งประมาณ 40 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดการทำแห้งแล้ว นำวัคซีนมาบดผ่านตะกอนลูมิเน่ียม และนำไปตรวจเช็คสภาพสุญญากาศและนำเก็บไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 2-5°C.

2. นำวัคซีนหลังทำแห้งจากข้อ 2.1 ชุดละ 10 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาจำนวนไวรัส ต่อมิลลิลิตร (virus titer) โดยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 เพาะเซลล์ตัวอ่อนลูกไก่ (chick embryo fibroblast CEF)อายุ 11 วัน ลงในหลอดทดลองขนาด 13x100โดยใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์(growth medium) ซึ่งมี M199 with Earles saltเป็นองค์ประกอบที่อุณหภูมิ 39°C. เป็นเวลา 1-2 วัน เซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่

2.2 วัคซีนที่จะนำมาตรวจหาจำนวนไวรัสทำการละลายครั้งแรก 10^{-1}- 10^{-6}(ten fold dilution) แล้วนำไวรัสในแต่ละ dilution นำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ตัวอ่อนลูกไก่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ (ตามข้อ 2.2.1 ใช้ dilutionละ 10 หลอดทดลอง โดยเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น maintenance media

2.3 หลังจากนั้น 5 วัน อ่านผล โดยดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เมื่อถูกไวรัส infect (cytopathic effect)

2.4 นำมาคำนวณหาค่า virus titerโดยวิธี Reed and Muence method

3. หลังการทำแห้งในวัคซีนชุดที่ไม่ผ่าน และหาค่าไวรัสแล้วไม่ต่ำกว่า $10^{3.5}TCID_{50}$ ต่อโด๊สต่อ 0.1 มิลลิลิตร (ในข้อ 2.1 และ 2.2) จะนำวัคซีนเหล่านี้ชุดละ 2 ตัวอย่าง ไปหาประสิทธิภาพของวัคซีน โดยนำไปฉีดในเป็ดทดลองด้วยขนาดโด๊สในห้องที่ชุดละ 12 ตัวเมื่อครบ 14 วัน นำเป็ดเหล่านี้ไปฉีดด้วยเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดหับ ด้วยขนาด

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของเนื้อวัคซีน, virus titer และเปอร์เซนต์ความชื้นของวัคซีนแห้ง หาแห้ง ชุดที่ 1-7

วัคซีนชุดที่	อัตราส่วนของวัคซีนต่อสเทบิไลเซอร์ ใน 1 ขวด (มิลลิลิตร)	ลักษณะของเนื้อวัคซีนหลังหาแห้ง (เป็นเค้ก +1- +3 ตามลำดับ)	virus titer หลังหาแห้ง ($TCID_{50}$/มิลลิลิตร) $\bar{X}$	% ความชื้น %/$\bar{X}$
1	วัคซีน: 1.5% PVP= 1.8: 0.2	+3	$10^{6.5}$	1.27
2	วัคซีน: 1.5% PVP: casitone 1.8: 0.15 : 0.05	+2	$10^{6.67}$	1.31
3	วัคซีน: 1.5% PVP: casitone 1.8: 0.1 : 0.1	+2	$10^{6.5}$	2.77
4	วัคซีน: 1.5% PVP: casitone 1.8: 0.05 : 0.15	+2	$10^{6.5}$	3.4
5	วัคซีน:20%casitone=1.8:0.2	+1	$10^{6.67}$	4.27
6	วัคซีน: 0.3% PVP= 1.1	+3	$10^{5.0}$	2.23
7	วัคซีน: 0.3% PVP= 1.8: 0.2	ฝ่อ, ไม่เป็นเค้ก		-

10^4-10^5 ELD_{50} ต่อตัว โดยมีกลุ่มเป็ดควบคุมจำนวน 5 ตัว ดูอัตราการรอดและตายของกลุ่มเป็ดเหล่านี้

4. เจาะเลือดเป็ดก่อนฉีดวัคซีน และหลังฉีดวัคซีน เพื่อนำไปหาค่าระดับของแอนติบอดี้ที่เกิดขึ้นโดยวิธี neutralization test มีวิธีการดังนี้

4.1 เพาะเชลล์ตัวอ่อนลูกไก่ เหมือน 2.2.1

4.2 ซีรั่มเป็ดที่ต้องการทดสอบนำมา inactivate ที่ 56°C. นาน 30 นาที

4.3 standard เป็นไวรัสที่ได้จาก seed Jensen strain ซึ่งเป็น attenuated Duck Plaque vaccine ต้องมี titer สูง ๆ

การหาค่า Neutralizing index

- ซีรั่มที่ต้องการทดสอบ นำมาใส่หลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด (constant serum)

- virus control ใช้ TPB เป็น diluent นำมาใส่หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด

- standard virus นำมาทำ 10-fold dilution จาก 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นใส่ไวรัสลงในหลอดที่มีซีรั่มทดสอบ และ virus control จาก 10^{-6}-10^{-1} ตามลำดับ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

- เขย่าให้ผสมกันดีแล้ว นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39°C. ใน water bath นาน 30 นาที

เมื่อครบ 30 นาทีนำ serum-virus mixture แต่ละ dilution ใส่ลงใน CEF ที่เพาะเลี้ยงในหลอดแก้วทดลอง โดยใส่หลอดละ 0.2 มิลลิลิตรนำไป incubate ที่ 39°C. เป็นเวลา 5 วัน หาค่า virus titer ของ virus-serum mixture และ virus control ผลต่างของค่า virus titer ที่ได้คือค่า NI

5. นำวัคซีนหลังหาแห้งในข้อ 2.1 ที่ไม่ฝ่อ ชุดละ 5 ตัวอย่าง ไปทดสอบหาปริมาณความชื้นในวัคซีน โดยวิธีการ iodometric titration ด้วยสาร Karl-Fischer

6. วิเคราะห์ข้อมูล

ผล

วัคซีนชุดที่ 1 และชุดที่ 6 ใช้ polyvinyl pyrolidone เป็นส่วนผสม แต่ต่างกันความเข้มข้น เมื่อผสมแล้วได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน คือ 0.15% จะได้ลักษณะ

ตารางที่ 2 แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนและค่า neutralizing index ก่อนและหลังการฉีดวัคซีน ของกลุ่มเป็ดที่ฉีดวัคซีนชุดที่ 1-5

กลุ่มเป็ดที่ฉีดวัคซีนชุดที่	ค่า NI ก่อนการฉีดวัคซีน $\bar{X}$	ค่า NI หลังการฉีดวัคซีน 14 วัน $\bar{X}$	protection rate (%)
1	0.5	2.48	100
2	0.5	2.7	100
3	1	3.68	100
4	0	2.7	100
5	0.5	3.26	100

วัคซีนหลังหาแห้งคงรูปมากที่สุด คือเป็นเค้กมากที่สุด +3 (ตามตารางที่ 1), เปอร์เซนต์ความชื้นใกล้เคียงกัน ซึ่งไม่เกิน 4% ตามที่มาตรฐานกำหนด แต่ค่า virus titer ในวัคซีนชุดที่ 1 จะสูงกว่าวัคซีนในชุดที่ 6

วัคซีนที่มีสเทบิไลเซอร์ 2 ชนิดผสมกันคือ วัคซีนชุดที่ 2, 3 และ 4 จะได้ลักษณะของเนื้อวัคซีนเป็นเค้ก +2 ไม่ดีเท่าชุดที่ 1 ค่า virus titer ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญและปริมาณความชื้นไม่เกิน 4%

วัคซีนชุดที่ 5 ซึ่งเป็นวัคซีนปกติที่ผลิตใช้ในห้องทดลอง ลักษณะของเนื้อวัคซีนไม่คงรูปสภาพเป็นเค้ก +1 ค่า virus titer ใกล้เคียงกับชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 และเปอร์เซนต์ความชื้นสูงถึง 4.27% ซึ่งเกินมาตรฐานกำหนด

วัคซีนชุดที่ 7 ใช้ polyvinyl pyrolidone 0.3% ผสมโดยได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03% พบว่าวัคซีนอ่อนไม่เป็นเค้ก

วัคซีนทุกชุด (ชุดที่ 1-5) มีประสิทธิภาพเป็น 100 เปอร์เซนต์เมื่อนำไปฉีดในเป็ด และค่าเฉลี่ยของ neutralizing index(NI) ในเป็ดหลังฉีดวัคซีนทุกกลุ่มเกิน 1.75 ซึ่งถือว่าคุ้มโรคได้

สรุปและวิจารณ์

วัคซีนชุดที่ 1 มีประสิทธิภาพและลักษณะคงรูปของวัคซีนดีที่สุด และวัคซีนที่มีการคงรูปใกล้เคียงกับวัคซีนชุดนี้ คือ วัคซีนชุดที่ 6 ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผสมด้วยสารเทบิไลเซอร์ชนิดเดียวกัน คือ polyvinyl pyrolidone แต่เวียนผสมคนละความเข้มข้น (1.5% และ 0.3% ในวัคซีนชุดที่ 1 และ 6 ตามลำดับ) วัคซีนทั้ง 2 ชุดนี้ นำสเทบิไลเซอร์ดังกล่าวผสมลงไปแล้ว จะได้ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายเป็น 0.15% เหมือนกัน ผลหลังหาแห้งของวัคซีนทั้ง 2 ชุด พบว่าเป็นเค้กดีทั้ง 2 ชุด, เปอร์เซนต์ความชื้นใกล้เคียงกัน ไม่เกิน 4% ของมาตรฐานกำหนด แต่แตกต่างกันที่ virus titer (จำนวนไวรัส/มิลลิลิตร) เนื่องจากวัคซีนชุดที่ 6 มีปริมาณเนื้อวัคซีนน้อยกว่าในชุดที่ 1 เกือบเท่าตัว คือในชุดที่ 6 มีปริมาณวัคซีน 1 มิลลิลิตร ในจำนวน 2 มิลลิลิตร แต่วัคซีนในชุดที่ 1 มีปริมาณเนื้อวัคซีนถึง 1.8 มิลลิลิตร ในจำนวน 2 มิลลิลิตร ดังนั้นวัคซีนในชุดที่ 1 จึงมีจำนวนไวรัสต่อมิลลิลิตรมากกว่าในชุดที่ 6

วัคซีนชุดที่ 7 ใช้สเทบิไลเซอร์ 0.3% polyvinyl pyrolidone เหมือนกับชุดที่ 6 แต่เมื่อผสมแล้วได้ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายเป็น 0.03% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้วัคซีนหลังหาแห้ง มีสภาพคงรูปไม่ดี คือ ฝ่อ, ไม่เป็นเค้ก

ปัจจุบัน วัคซีนที่ผลิตออกใช้ในห้องทดลอง ใช้สูตรตามวัคซีนชุดที่ 5 (ใช้ casitone เป็นสเทบิไลเซอร์) มีข้อเสียอยู่ 2 ประการ คือ ลักษณะของเนื้อวัคซีนหลังหาแห้งสภาพคงรูปไม่ดีและเปอร์เซนต์ความชื้นสูงเกินกว่ามาตรฐาน

กำหนด (4%) จากการทดลองครั้งนี้ทำให้สามารถหาชนิดของสเทบิไลเซอร์ที่ดีที่สุดได้ คือ polyvinyl pyrolidone โดยผสมในวัคซีนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15% ความสูตรวัคซีนชุดที่ 1 จะได้วัคซีนที่มีคุณภาพดีที่สุด และเป็นการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากสาร polyvinyl pyrolidone มีราคาถูกกว่า casitone

เอกสารอ้างอิง

ฉาย จอมเกาะ, 2529. "การทำแห้งและการเก็บของวัคซีนทำแห้ง" รวมงานวิชาการ 2526-2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์. น.310-331.

Dardiri, A.H., and W.R. Hess. The incidenc of neutralizing antibodies to duc plaque virus in serums from domes tic ducks and wild water fowl i the United States of America. Proc 71 st. Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Assoc. pp. 225-237. 1067.

การเสริมระดับภูมิคุ้มและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ เอ ในโค ซึ่งเคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ

Enhancement of immune response to type A FMD vaccine in cattle previously infected with type O virus

นพพร พัฒนประสิทธิ์[1] สุนีจิต คงทน[2]

Nopporn Pattanaprasit Suneechit Kongthon

ABSTRACT

The result of potency test of FMD vaccine monovalent type A between 2 groups of cattle, first group, the cattle are previously infected with type O virus, second group, the cattle have never been infected with any types of virus. PD_{50} value of the first group in higher than the another group.

บทคัดย่อ

ผลทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย monovalent type A (frenkel vaccine)ในโค 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ และกลุ่มซึ่งไม่เคยเป็นโรค หรือฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 3ไทป์ ปรากฏว่าค่า fifty percent protective dose(PD_{50}) ของกลุ่มซึ่งเคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ สูงกว่าอีกกลุ่มที่ซึ่งไม่เคยเป็นโรค

คำนำ

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ในสัตว์ทดลอง <target species> เป็นขั้นตอนซึ่งสำคัญยิ่งในการประเมินคุณภาพของวัคซีน การพิจารณาเลือกสัตว์ทดลอง ได้แก่โคหรือสุกร มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จากการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มโรค <antibody titer> โดยสัตว์ทดลองนั้น ต้องไม่เคยถูกฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน และไม่มีภูมิคุ้มโรค <neutralizing antibody> ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ต่างๆ <1> ในประเทศไทยโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งระบาดโดยทั่วไปมี 3 ไทป์ คือ โอ,เอ และเอเชีย1 ดังนั้นหากสัตว์ไม่มีภูมิคุ้มโรคทั้ง 3 ไทป์นี้ ย่อมสามารถใช้ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนได้ในทางตรงข้ามหากสัตว์นั้นมีภูมิคุ้มโรคต่อไทป์หนึ่งไทป์ใด สูงอันเนื่องมาจากเคยถูกฉีดวัคซีนหรือเคยเป็นโรคไทป์นั้นมาก่อน ย่อมไม่สมควรนำมาใช้ในการทดสอบวัคซีน ถึงแม้โรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ต่าง ๆ จะไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามไทป์กัน (2) แต่เป็นไปได้ที่อาจมีการเสริมความคุ้มโรคของไทป์หนึ่ง โดยไวรัสอีกไทป์หนึ่งได้ การทดลองนี้จึงมีขึ้นเพื่อยืนยันความเชื่อดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

โค ใช้โคลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเชี่ยนกับพันธุ์พื้นเมือง จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูกลางและทับกวาง ของกรมปศุสัตว์ แบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 จำนวน 14 ตัว เป็นโคซึ่งเคยใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพ ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ผ่านการฉีดวัคซีนไทป์โอ การฉีดพิษทับด้วยไวรัสไทป์โอ หายจากโรคแล้วและไม่เคยเป็นโรคหรือถูกฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ และเอเชีย1

กลุ่มที่ 2 จำนวน 14 ตัว เป็นโคซึ่งไม่เคยเป็นโรคหรือถูกฉีดด้วยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ

1 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

2 ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 1 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทปเอ ในโคซึ่งเคยเป็นโรคไทปโอ

No.	Cattle No.	Pravaccination log SN_{50} O,A,AS1	Vaccine	dose	date of vaccination	Postvaccination log SN_{50} A	Challenge		1st observation		2nd observation		remark
							date	with	date	result	date	result	
1	618	0.9031,0,0	A Frenkel vaccine	5ml S/C	6/8/81	0.301	27/8/81	AC-P_{26}	1/9/81	+ooo	3/9/81	+ooo	
2	1217	>2.7093,0,0	3+4+5/81	- " -	- " -	0.301	- " -	27/7/81	- " -	+ooo	- " -	+ooo	
3	1223	>2.7093,0,0		- " -	- " -	1.2041	- " -	1:3,500	- " -	oooo	- " -	oooo	
4	1224	2.4082,0,0	1:1	- " -	- " -	1.0536	- " -	2จุดๆละ	- " -	++oo	- " -	++oo	
5	1221	2.7093,0,0		- " -	- " -	0.6021	- " -	0.05ml	- " -	+ooo	- " -	+ooo	
6	1296	>2.7093,0,0.752		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+ooo	- " -	+ooo	
7	1205	>2.7093,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	6.24PD_{50}
8	1215	2.5588,0,0	1:3	- " -	- " -	0.4515	- " -		- " -	oooo	- " -	oooo	คอโด๊ส
9	1201	>2.7093,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+ooo	- " -	++oo	
10	1219	>2.7093,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+ooo	- " -	++oo	
11	1339	>3.0103,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	
12	103	>3.0103,0,0	1:9	- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++o+(xxxx)	- " -	++o+(xxxx)	
13	1318	>3.0103,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++++(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
14	1345	>3.0103,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+oo+(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
15	1340	0, 0, 0	control	-	-	-	- " -		- " -	++++(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
16	1303	0, 0, 0,	control	-	-	-	- " -		- " -	++++(xxxx)	- " -	++o+(xxxx)	

ตารางที่ 2 แสดงการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ ในโคซึ่งไม่เคยเป็นโรคหรือถูกฉีดด้วยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 3 ไทป์

No.	Cattle No.	Pravaccin tion log SN_{50} O,A,AS1	Vaccine	dose	date of vaccination	Postvaccination log SN_{50} A	Challenge		1st observation		2nd observation		remark
							date	with	date	result	date	result	
1	636	0.1505,0,0	A Frenkel vaccine	5ml S/C	6/8/81	1.0536	27/8/81	AC-P_{26}	1/9/81	oooo	3/9/81	oooo	
2	582	0.1505,0,0	3+4+5/81	- " -	- " -	0.301	- " -	27/7/81	- " -	++++(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
3	620	0.1505,0,0		- " -	- " -	0.301	- " -	1:3,500	- " -	++oo	- " -	++oo	
4	601	0.1505,0,0	1:1	- " -	- " -	0.301	- " -	2วัคซีน	- " -	oooo	- " -	oooo	
5	70	0, 0, 0		- " -	- " -	0.6021	- " -	0.05ml	- " -	+ooo	- " -	+ooo	
6	198	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	oooo	- " -	oooo	
7	1305	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+++(oxox)	- " -	++++(xxxx)	4.61 LD_{50}
8	1311	0, 0, 0	1:3	- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	ต่อโค๊ส
9	1302	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	-
10	1310	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	
11	923	0.4515,0.0		- " -	- " -	1.8062	- " -		- " -	+++(ooxo)	- " -	++++(oxxx)	
12	924	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	+oo+(xxxx)	- " -	+oo+(xxxx)	
13	1308	0, 0, 0	1:9	- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++oo	- " -	++oo	
14	1327	0, 0, 0		- " -	- " -	0.301	- " -		- " -	++++(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
15	1340	0, 0, 0	control	-	-	-	- " -		- " -	++++(xxxx)	- " -	++++(xxxx)	
16	1303	0, 0, 0	control	-	-	-	- " -		- " -	++o+(xxxx)	- " -	++o+(xxxx)	

หมายเหตุ สัญลักษณ์ + + + + (x x x x) หมายถึง (1) วัคซีนที่ฉีดบนสัน (2) วัคซีนบริเวณข้อนบนสัน (3) วัคซีนที่เหนือก (4) วัคซีนที่เท้า (5) วัคซีนที่เท้าหน้าซ้าย (6) วัคซีนที่เท้าหน้าขวา
(1)(2)(3)(4) (5)(6)(7)(8) (7) วัคซีนที่เท้าหลังซ้าย (8) วัคซีนที่ เล้งขวา

และเอดีเชียวัน

วัคซีน เป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอผลิตโดยวิธี Frenkel โดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปาก - ช่อง จ.นครราชสีมา

ก่อนฉีดวัคซีน เจาะเลือดโคทั้ง 2 กลุ่ม นำมาแยกซีรั่มและตรวจระดับความคุ้มต่อโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3ไทป์ โดยวิธีไมโครเพลทเทคนิค(3) diluteวัคซีนด้วยcarbonate bufferเป็น 3 dilutionคือ 1:1,1:3 และ 1:9 ฉีดวัคซีนโดยแต่ละกลุ่มด้วยวัคซีนนี้ dilution ละ 4-5 ตัว วันที่21หลังจากฉีดวัคซีน เจาะเลือดโคทุกตัวเพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มโรคและฉีดพิษทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอในโคทั้ง2กลุ่ม พร้อมด้วยโค controlจำนวน 2 ตัว จำนวนไวรัส 10,000 CID_{50} อ่านผลหลังจากฉีดพิษทับวันที่ 5 และ 7

ผลการทดลอง

ประสิทธิภาพของวัคซีนซึ่งทดสอบในโค 2 กลุ่ม คำนวนหาค่า fifty percent protective dose (PD_{50}) โดยวิธี Arithmatic ผลที่ได้ค่า PD_{50}/dose ในกลุ่มที่ 1คือโคซึ่งเคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ=6.24PD_{50}/dose ส่วนกลุ่มที่ 2 คือโคซึ่งไม่เคยเป็นโรคทั้ง 3 ไทป์ = 4.61

ส่วนค่าภูมิคุ้มโรคก่อนฉีดพิษทับ (Prechallenge Seroneutralisation titer) ต่อไทป์ A ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$)ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

สรุปและวิจารณ์

การทดลองครั้งนี้ ถือเป็นการทดลองเบื้องต้น เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยต่างไทป์ในแง่การเสริมความคุ้มโรคซึ่งกันและกัน จากผลการทดลองแสดงว่า ภูมิคุ้มโรคต่อไทป์หนึ่งในระดับที่สูงมาก ๆ เนื่องจากสัตว์เคยผ่านการเป็นโรคไทป์นั้นมาแล้ว สามารถเสริมความคุ้มโรคจากการหาวัคซีนอีกไทป์หนึ่งได้ ถึงแม้ว่าจะไม่เสริมระดับภูมิคุ้มโรค (Antiobody titer) ขึ้นก็ตาม เนื่องจากความความคุ้มโรคและระดับภูมิคุ้มโรค อาจไม่มีความสัมพันธ์กันโดยตรง ซึ่งจะต้องหาการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเ
เปื่อยในสัตว์ทดลอง จึงควรเลือกใช้สัตว์ซึ่งไม่มีภูมิคุ้มโรค
หกไทป์ ไม่ใช่ไม่มีภูมิคุ้มโรคเจาะไทป์ที่ต้องการทดสอบอย่
ไรก็ตามการทดลองเพียงครั้งเดียว ย่อมยืนยันผลทางสถิติ
ยาก จึงควรมีการทดลองแนวนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ผลที่
ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ แอบ คงหน นายสัตว
แพทย์ 8 ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัย (โรคปากและเท้าเปื่อย)
หน้าศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสั
ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำอันมีประโยชน์ต่อการท
ลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Foot-and-Mouth Disease (Ruminants)Inact
vated Vaccine. European Pha
macopoeia,1980.Second editio
PartII,European Treaty Serie
No. 50 - 198P page 63 - 64.
2. เชื้อ ว่องส่งสาร, สมบูรณ์ สุธีรัตน์ 2526. โรคปากแ
เท้าเปื่อย ใน ประมวลวิชาการสัตวแพ
พิมพ์ครั้งที่ 3 โรงพิมพ์มิตรการพิ
หน้า 150 - 154
3. วิไล ลินจงสบงกช, สมใจ ภมลศิริพัชยพร 252
การตรวจหาระดับแอนไทบอดี้ โดเค
ในซีรั่ม ที่มีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่
โดยวิธี ไมโครเพลต เทคนิค รายง
ทางวิชาการ 2526 - 2529 กอ
ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรว
เกษตรและสหกรณ์ หน้า 198 - 205

การศึกษาการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ Escherichia coli

Study on Escherichia coli and their prevention

แก้วมณี กองสมัคร[1] ชะเล็ก เสรีพันธ์พานิช[2]

Kaomanee Kongs mak Chalek Sereephanpanich

บทคัดย่อ

นำเชื้อที่เก็บได้จากไก่ที่เกิดโรคระบาด นำไปตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ และตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมี แล้วนำไปหา dose challenge ในไก่ (ID_{50})เพื่อที่จะใช้ challenge ในไก่ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนี้จากต่างประเทศซึ่งเป็นวัคซีนที่ประกอบเชื้อ E. coli strain 01, 02 และ 078 เป็นวัคซีนชนิด inactivated ด้วย formalin เป็นวัคซีนชนิด oil emulsion ซึ่งใน 1 ml ประกอบด้วยเชื้อ 1 x 10^9 cfu/ml

คำนำ

ในอดีตสาหกรรม การเลี้ยงไก่ที่จะจัดการให้ได้รับผลกำไรให้มากที่สุดนั้น จะต้องมีวิธีที่จะป้องกันและกำจัดโรคที่จะพึงบังเกิดขึ้นในฟาร์มนั้น ๆ ในบรรดาโรคที่เกิดขึ้นกับฝูงไก่ก็มีโรคที่เกิดขึ้นจากเชื้อ Escherichia coli รวมอยู่ด้วย ซึ่งหากให้การรักษาก็เปลืองทั้งเวลาและเสาะรูกิจ ดังนั้นจึงต้องหาวิธีป้องกันโรคโดยใช้วัคซีนที่ผลิตขึ้นมาป้องกันโรคนี้ ซึ่งแท้ที่จริงแล้ว ปัญหาของโรคนี้ก็คือเป็นทั้ง primary และ secondary infection ก็ได้ ซึ่งอาจจะเป็น predisposing cause ที่ทำให้เกิดโรค Glanuloma peritonitis, Salphingitis, Synovitis,Omphalitis, airsaculitis (1, 4, 5)

มีสาเหตุหลายประการ ที่ทำให้ไก่เกิดโรคพร้อมกับการที่ไก่มีอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ E.coli เชื้อนี้ก็มีหลาย Serotypes (8,9) และได้พบว่าเชื้อนี้มีถึง 72 Serotypes พบมี 4 Serotypes เท่านั้นที่ทำให้ไก่เป็นโรคตั้งแต่chicken embryo จนกระทั่งอายุได้ 3 สัปดาห์ และพบว่า Serotypes ที่ 01,02 และ 078 ที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบหายใจ และ Septicemic diseases(5,6,7) ในไก่ปกติอาจจะพบเชื้อ E. coli ได้

การเกิดสภาพทางพยาธิวิทยาของ E. coli ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดนักในการศึกษา Serotype O1a:K1 พบว่า Mortality rate 100% ในลูกไก่อายุ 1 วันเมื่อฉีดเชื้อนี้เข้าทาง yolk sac บางครั้งเกิด Omphalitis ไก่จะเกิด pericarditis เมื่อฉีดเชื้อเข้าทาง yolk sac (2) และในการฉีดไข่ทดลองจะพบเชื้อนี้แผงอยู่ในไข่ 26.5% (3) เชื้อนี้จะเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคทางระบบหายใจและเป็นโรคที่เป็นร่วมกับโรคที่เกิดจากเชื้อ Mycoplasma, Newcastle disease virus และ Bronchitis virus (ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคหรือเป็นเชื้อที่เป็นVaccine strains และเป็นร่วมกับสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดโรค

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเชื้อที่เก็บได้ในห้องที่มีโรคระบาด นำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ และตรวจสอบทางชีวเคมีพร้อมกับทดสอบความรุนแรงของเชื้อฉีดchallenge ในไก่ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจากต่างประเทศ ว่าวัคซีนที่นำเข้ามาจะให้ความคุ้มโรคกับเชื้อในห้องที่หรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางหาสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคนี้ในประเทศไทยต่อไป

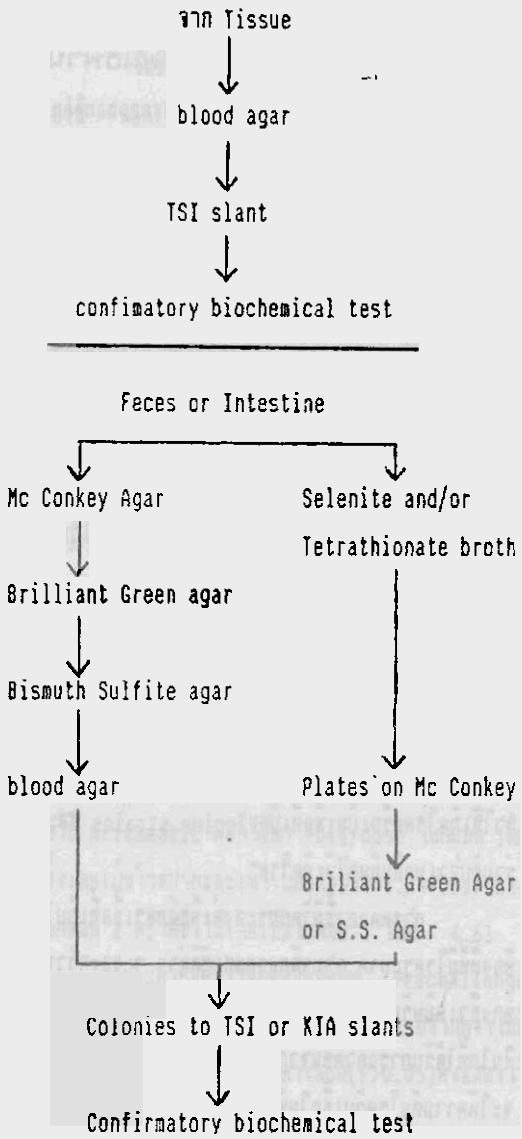
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อ Escherichia coli serotype 078 local strain

2. ไก่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์

1 สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ 2 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา



ภาพที่ 1 แสดงวิธีการแยกเชื้อ E. coli

3. วัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ E. coli

วิธีการ นำไก่ที่ป่วยและตายในห้องที่ ฯ เกิดโรคระบาดนำมาแยกเชื้อ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 1

ผล

นำเชื้อที่ได้มาศึกษาคุณลักษณะ จะมีลักษณะเป็น bacilli, gram-negative rods convex colonies ใน agar และเป็น mucoid colonies ส่วนผลการทดสอบทางชีวเคมีแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบความรุนแรงในไก่ โดยการฉีดด้วย infective dose

การหา infective dose ของเชื้อ E. co โดยเพาะเชื้อใน Tryptose agar plate 18 ชั่วโมง แ นำ 1 colony มาเพาะใน 10 ml Tryptose broth เพ ค่อที่ 37°C. นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ 10 fold dil tion แล้วนำไปฉีด I/V ในไก่อายุ 4 สัปดาห์ และขณะเดี กันก็ทำ Viable count ด้วย

ปรากฏว่าในเชื้อที่เพาะใน Tryptose broth เพาะใน 37°C. นาน 6 ชั่วโมง มีมีประมาณ 5.32 x 10 cfu/ml ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

นำอัตราการตาย และการเป็นโรคต่ออัตราส่วนที่ มาคำนวณโดยวิธีของ Reed และ Munch

ดังนั้น Infective dose of E. coli 078 0.6 x 10^{11} cfu/ml และได้นำเชื้อนี้ทดสอบทาง Serol gical examination จากสถาบัน ฯ NIAH ประเทศญี่ปุ่ ปรากฏว่า คือ Serotype 078

นำวัคซีนป้องกันโรคนี้ซึ่งผลิตโดย Vineland La boratory ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งประกอบด้วยเชื้อstrai 01,02 และ 078 inactivated ด้วยฟอร์มาลินเป็นชนิดอ emulsion ซึ่งใน 1cc ของวัคซีนประกอบด้วยเชื้อ 1 x 1 cfu/ml มาฉีดในกลุ่มไก่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์ เพื่อหาคว ปลอดภัย ดังตารางที่ 3

การทดสอบหาความปลอดภัย

นำวัคซีนที่จะทดสอบคุณภาพ มาฉีด 2 เท่าของขน ปกติ ดูอาการของไก่ใน 3 สัปดาห์ว่ามีอาการปกติหรือไม่

จากผลของการหาความปลอดภัยจากการฉีดวัคซีน ไก่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์ และในขนาดที่ต่างกันประมาณ2เ ทั้ง Single dose และ Revaccinate dose ปรากฏว่า ซีนนี้ให้ความปลอดภัยได้ดี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

การทดสอบหาประสิทธิภาพ (Potency test)

นำไก่อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว มาฉีดวัค field dose 0.2 mlI/M และมีตัว control 10 ตัว จ นั้นเลี้ยงไว้ 3 สัปดาห์ นำมา challenge ด้วย 10 เท่า 0.6 x 10^{11} cfu/ml I/V และจากการทดสอบอีก 1 ค

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมี A = acid, G = gas, MR = methyl red test, VP = Vogue-Proskauer Veactiun, + = Produce pigment.

เชื้อ	Motility	Fermentation of				H_2S	Urease	Indole produced	MR	VP	Citrate utilization
		Glucose	Sucrose	Lactose	Manose						
E. coli	-(+)	AG	AG	AG	AG	-	-	+	+	-	

ตารางที่ 2 ผลของ chicken inoculation/0.2ml/I/V

Dilution	No. of E. coli (cfu)	No. of death	No. of lame	Total infected
10^0	$5.32 \times 10^{11} \times 0.2$	1	4	5/5
10^1	$5.32 \times 10^{10} \times 0.2$	2	2	4/5
10^2	$5.32 \times 10^{9} \times 0.2$	0	1	1/4
10^3	$5.32 \times 10^{8} \times 0.2$	1	0	1/5
10^4	$5.32 \times 10^{7} \times 0.2$	1	2	3/5
10^5	$5.32 \times 10^{6} \times 0.2$	1	0	1/5

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบหาความปลอดภัยในไก่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์

Dose of vaccinate	Age of chicken weel	No. of vaccinated chicken	No. of chicken after vaccinate
0.2ml (Single)	4	5	5
0.2ml (Revac.)	4	5	5
0.6ml (Single)	4	5	5
0.6ml (Revac.)	4	5	5
0.2ml (Single)	8	5	5
0.2ml (Revac.)	8	5	5
0.6ml (Single)	8	5	5
0.6ml (Revac.)	8	5	5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาประสิทธิภาพของวัคซีน

Group	Servive/total
accinated group	1/10
Control group	1/10

ผลก็ยังคงเหมือนเดิม (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4)

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดสอบคุณภาพ ของวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ E. coli โดย Challenge ด้วยเชื้อนี้ Serotype 078 ไม่สามารถที่กล่าวได้ว่าวัคซีนนี้ให้ความคุ้มโรคได้ดีหรือไม่เพราะผลของvaccinated และ control chicken ไม่สามารถที่จะประเมินค่าได้

และอีกประการหนึ่งนั้น วัคซีนชนิดนี้ประกอบด้วยเชื้อ 3 Serotypes คือ 01, 02, 078 แต่เชื้อที่ใช้ challenge มีเพียง Serotype เดียวเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. Arp. L.H., and A.E. Jensen 1979. Avia Dis. 24:pp.153-161.
2. Christie, G. and W.G. Holliday 1979 Avian Path. 8:pp.45-55.
3. Curtis, M.J., B.W. Scott and E.J.Butler 1980. Res. Vet. Sci. 29:pp.133-134
4. Glantz. P.J., S. Narotsky and G. Bubasn 1962. Avian Dis. 6:pp.322-328.
5. Harry, E.G. 1964. Vet. Record. 76:pp.44 -449.
6. Harry, E.G. 1979. Res. Vet. Sci. 27:pp. 175-179.
7. Hemsley. L.A. and E.G. Harry 1965. Vet Rec. 77:pp.103-107.
8. Kulshreshta S.B. and S. Kumar 1976. Ind J. Anim. Sc. 4:pp.377-380.
9. Magaraja. K.V., D.A. Emery, J.A. Newma and B.S. Pomeroy 1983. Amer. Jou Vet. Res. 44:pp.284-287.

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคอายุต่างวันกัน

นพพร พัฒนประสิทธิ์[1] สุนีจิต คงทน[2]

Nopporn Pattanaprasit Suneechit Kongthon

ABSTRACT

Potency test of FMD vaccine type O was done in different age of cattle 20, 16, 8, 6 months. The results of potency test done in the group of cattle aged from 8-20 months were satisfying and not so different. The result of potency test done in the group of cattle aged 6 months was very low.

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบผลของการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน โดยใช้โคทดลองอายุต่าง ๆ กัน คือ 20,16, 8,6 เดือน พบว่าโคอายุตั้งแต่ 8 เดือน ถึง 20 เดือน ให้ประสิทธิภาพของวัคซีนเป็นที่น่าพอใจไม่แตกต่างกันมาก ส่วนโคอายุ 6 เดือน มีผลประสิทธิภาพของวัคซีนต่ำมากที่สุด

คำนำ

การทดสอบประสิทธิภาพ ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ตามปกติใช้โคอายุ ตั้งแต่ 8 เดือนขึ้นไป ส่วนคำแนะนำของ European Pharmacopoeia ให้ใช้อายุ 18-30 เดือน (1) เนื่องจากโคอายุน้อย ๆ จะมีปัญหาเกี่ยวกับ maternal immunity ซึ่งยังคงเหลืออยู่ และการพัฒนาของ immune system ซึ่งยังไม่เจริญเต็มที่ โดยเฉพาะ bone marrow ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้าง antibody ในรูปของ immunoglobulin. Benner.R (1984) ชี้ให้เห็นว่าจำนวน Ig-secreting cells ขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ จากการทดลองใน SPF BALB/C mice พบว่าจำนวน Ig-secreting cells เพิ่มขึ้น 20 เท่า จากอายุ 8 ถึง 100 อาทิตย์ (2)

นอกจากนั้น มีรายงานจำนวนมากยืนยันว่าความสามารถ ในการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโค จะเพิ่มขึ้นตามอายุ (Mackowiak et al., 1962; Priskoka et al., 1976; Solyom et al., (1979) (3,4,5)

การทดลองนี้ เพื่อต้องการทราบว่าช่วงอายุใดที่เหมาะสม และสัตว์มีพัฒนาการของ immune system ดีพอ เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน

อุปกรณ์และวิธีการ

โคทดลอง ใช้โคลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเชียน และพันธุ์พื้นเมือง จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ ลำพญากลาง และทับกวาง แบ่งเป็น 4 กลุ่มตามอายุดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 โคอายุ 6 เดือน จำนวน 8 ตัว
กลุ่มที่ 2 โคอายุ 8 เดือน จำนวน 6 ตัว
กลุ่มที่ 3 โคอายุ 16 เดือน จำนวน 8 ตัว
กลุ่มที่ 4 โคอายุ 20 เดือน จำนวน 6 ตัว

วัคซีน เป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ผลิตโดยวิธี suspension ชุดบรรจุ 1721 ทดสอบประสิทธิภาพครั้งแรกในโคอายุ 10-11 เดือน เมื่อ 8 เดือน ก่อน

1 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ 2 ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ในโคกลุ่มที่ 1 อายุ 20 เดือน

NO	เบอร์โค	Prevacc.logSN50 A,O,As	วันฉีดวัคซีน	Prechallenge log SN50,O	วันฉีดพิษทับ	อ่านผลครั้งแรก วันที่	อ่านผลครั้งแรก วิการ	อ่านผลครั้งหลัง วันที่	อ่านผลครั้งหลัง วิการ	ผลการทดสอบ
1	10/23	0,0,0	29/10/24	0.7526	19/11/24	24/11/24	++00	26/11/24	++00	
2	11/23	0,0,0	"	0.9031	"	"	+++0	"	+++0	
3	12/23	0,0,0	"	0.1505	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
4	16/23	0,0,0	"	1.0536	"	"	++00	"	++00	66.7
5	18/23	0,0,0	"	0.1505	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
6	19/23	0,0,0	"	0.6021	"	"	+++0	"	+++0	
7	249/23	0,0,0	-	-	"	"	++0+(xxxx)	"	++0+(xxxx)	
8	281/23	0,0,0	-	-	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบ วัคซีนในโคกลุ่มที่ 2 อายุ 16 เดือน

NO	เบอร์โค	Prevacc.logSN50 O,A,As	วันฉีดวัคซีน	Prechallenge log SN50,O	วันฉีดพิษทับ	อ่านผลครั้งแรก วันที่	อ่านผลครั้งแรก วิการ	อ่านผลครั้งหลัง วันที่	อ่านผลครั้งหลัง วิการ	ผลการทดสอบ
1	207/23	0,0,0	2 10/24	0.6021	19/11/24	24/11/24	++00	26/11/24	+000	
2	208/23	0,0,0	"	0.1505	"	"	0000	"	0000	
3	210/23	0,0,0	"	0.9031	"	"	0000	"	0000	
4	211/23	0,0,0	"	0.6021	"	"	0000	"	0000	
5	213/23	0,0,0	"	0.4515	"	"	++00	"	++00	78 1
6	214/23	0,0,0	"	0.9031	"	"	+++0	"	+++0	
7	230/23	0,0,0	"	0.1505	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
8	231/23	0,0,0	"	0.1505	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
9	249/23	0,0,0	-	-	"	"	++0+(xxxx)	"	++0+(xxxx)	
10	281/23	0,0,0	-	-	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ในโคกลุ่มที่ 3 อายุ 8 เดือน

NO	เบอร์โค	Prevacc.logSN$_{50}$ A,0,As	วันฉีดวัคซีน	Prechallenge log SN$_{50}$,0	วันฉีดพิษทับ	อ่านผลครั้งแรก		อ่านผลครั้งหลัง		ผลการทดสอบ
						วันที่	วิการ	วันที่	วิการ	
1	45/24	0,0,0.301	29/10/24	0.4515	19/11/24	24/11/24	++++(xxxx)	26/11/24	++++(xxxx)	
2	46/24	0,0,0.4515		1.0536		"	0000	"	0000	
3	10124	0,0,0		0.1505		"	0000	"	0000	
4	11/24	0,0,0		0.1505		"	++00		++00	70.8%
5	19/24	0,0,0		0.3010		"	++++(xxxx)"		++++(xxxx)	
6	22/24	0,0,0.301		0.1505		"	000+(xxxx)"		000+(xxxx)	
7	249/23	0,0,0	-	-	"	"	++0+(xxxx)"		++0+(xxxx)	
8	281/23	0,0,0	-	-	"	"	++++(xxxx)"		++++(xxxx)	

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในโคกลุ่มที่ 4 อายุ 6 เดือน

NO	เบอร์โค	Prevacc.logSN$_{50}$ 0,A,As	วันฉีดวัคซีน	Prechallenge log SN$_{50}$,0	วันฉีดพิษทับ	อ่านผลครั้งแรก		อ่านผลครั้งหลัง		ผลการทดสอบ
						วันที่	วิการ	วันที่	วิการ	
1	58/24	0,0,0	29/10/24	0.4515	19/11/24	24/11/24	++00	26/11/24	++00	
2	62/24	0,0,0		0.1505		"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
3	63/24	0,0,0		0.1505		"	++0+(xxxx)	"	++0+(xxxx)	
4	74/24	0,0,0	"	0.1505		"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	
5	75/24	0,0,0	"	0.3010		"	++00	"	++00	53.1%
6	77/24	0,0,0		0.3010		"	++00	"	++0+(x000)	
7	79/24	0,0,0		0.4515		"	++00	"	++0+(x000)	
8	84/24	0,0,0	"	0.1505		"	++++(00xx)	"	++00	
9	249/23	0,0,0				"	++0+(xxxx)	"	++0+(xxxx)	
10	281/23	0,0,0	-	-	"	"	++++(xxxx)	"	++++(xxxx)	

หมายเหตุ สัญลักษณ์ + + + + (x x x x) หมายถึง (1) วิการที่จดฉีดบนลิ้น (2) วิการบริเวณอื่นบนลิ้น (3) วิการที่เหงือก
1 2 3 4 5 6 7 8
(4) วิการที่เท้า (5) วิการที่เท้าหน้าซ้าย (6) วิการที่เท้าหน้าขวา
(7) วิการที่เท้าหลังซ้าย (8) วิการที่เท้าหลังขวา

การทดลองครั้งนี้ได้ความคุ้มโรค 100%

เจาะเลือดโคทดลองทุกกลุ่ม เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกไทป์โดยวิธีไมโครเพลตเทคนิค (2) ฉีดวัคซีนโคทุกกลุ่มด้วยวัคซีนโดสปกติ (normal dose) จำนวน 5 ซี.ซี. ต่อตัวเข้าใต้ผิวหนัง หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 3 อาทิตย์เจาะเลือดโคทุกตัว เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มโรคอีกครั้งหนึ่งและฉีดพิษทับโคทุกตัวพร้อมกับโค control 2 ตัว ซึ่งไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อนด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่ลิ้น (intradermolingual route) จำนวน 10,000 CID_{50} อ่านผลการทดลองวันที่ 5 และวันที่ 7 ประสิทธิภาพของวัคซีนรายงานเป็น percent of foot protection rate

ประสิทธิภาพของวัคซีนทดสอบในกลุ่มที่ 1,2,3, และ 4 คือ 66.7, 78.1, 70.8 และ 53.1 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ serum neutralization titer (log SN_{50}) ของกลุ่มที่ 1,2,3 และ 4 คือ 0.60,0.49, 0.38 และ 0.26 ตามลำดับค่าของ serum neutralization titer ของแต่ละกลุ่ม เพื่อนำมาเปรียบเทียบหาความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี test พบว่ากลุ่มที่ 1,2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะเดียวกันกลุ่มที่ 1 และ 4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และกลุ่มที่ 2 และ 4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1,2,3 และ 4

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า การใช้โคอายุตั้งแต่ 8 เดือน จนถึง 20 เดือน ประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ให้ผลการทดลองที่ดีและใกล้เคียงกัน ส่วนโคอายุต่ำกว่า 8 เดือนลงมา ให้ผลต่ำมากทั้งในแง่ภูมิคุ้มโรค (antibody titer) และความคุ้มโรค (protection rate) อาจเนื่องมาจากการคอยสนอง ของระบบการสร้างภูมิคุ้มโรค (immune system) ต่อวัคซีนหรือแอนติเจนที่ได้รับยังไม่พัฒนาเต็มที่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ แอบ ดงหม นายสัตวแพทย์ 8 ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัย (โรคปากและเท้าเปื่อย) หัวหน้าศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำอันมีประโยชน์ต่อการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Foot-and-Mouth Disease (Ruminants) Inactivated Vaccine. European Pharmacopoeia,1980. Second edition,Part II European Treaty Series, No-50-198P, 63.
2. Benner, R 1981. The Bone Marrow: a Major Site of Antibody Production. The Immine System, vol 1, 362. (Karger Basel).
3. Mackowiak, C., Fontaine, J., Lang, R., Camand, R. & Petermann, H.G. 1962 Bulletin. Office international des ipizooties 57, 937.
4. Priskoka,V.A., Sobko,A.I.,Murav'ev,V.K. Mikhailyuk,A.P.& Belokon',I.K.1976 Veterinariya, Moscow No.5,45.
5. Solyom, F., Roith, J., Maker, A. Fazekas, A. & Czelleng, F. 1978 Magyar allatorvosok lapja 34, 23.
6. วิไล ลินจงสุขกิจ, สมใจ กมลศิรพิชัยพร 2529 การตรวจหาระดับแอนไทบอดี้ ไตเตอร์ ในซีรัม ที่ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีไมโครแพลต เทคนิค รายงานทางวิชาการ 252 - 2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 198-205

การใช้เครื่องกรองฟุนด้า* ในการ Clarify ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน

The clarification of FMD virus by funda filter for vaccine production

เชิงชาย จันทรัศมี[1] พยนต์ สินสวงศ์วัฒน์[1]

Cherngchai Chuntarasai Payont Sinsuwonkwat

ABSTRACT

Moslet and Lei(1972) reported that the filtration of FMD antigen when performed with diatomaceous earth (DE) as filter aids is susperior to centrifugation in clarifying the fresh virus harvest, as it yielded a clearer filtrate in a shorter time with no measurable loss of infectivity or immunogenic properties.

To prevent the allergic action in the cattle after vaccination which causes from cell debries in the vaccine, the Funda Filter is introduced into the process of the vaccine production at Foot and Mouth Disease Center Pakchong, Nakornratchasima, Thailand.

The Funda Filter,which uses the DE as the filter aids,can clarifying the fresh virus harvest in a shorter time with no measurable loss of in fectivity or immunogenic properties. The vaccines which prepared from those clarified virus are good quantity and no allergic action after vaccination.

บทคัดย่อ

จากรายงานของ Moslet และ Lei(1972) ได้รายงานว่าสามารถใช้ Diatomaceous Earth(DE) กรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างรวดเร็ว และไม่ทำให้ไวรัสสูญหายไปในระหว่างการกรอง

ดังนั้นศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา โดยความร่วมมือจากรัฐบาลญี่ปุ่นจึงได้ใช้วิธีการของ Moslet และ Lei นี้มาทำการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้เครื่องกรองฟุนด้า (ซึ่งเป็นเครื่องกรองที่ต้องใช้ DE เป็นตัวกรอง)

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Suspension cell culture method (2) แล้วนำ virus fluid ที่ได้มาผลิตเป็นวัคซีน แต่วัคซีนที่ผลิตได้นั้นมีการเซลล์ปะปนอยู่มาก ซึ่งการเซลล์นั้นจะเป็นตัวทำให้เกิดการแพ้วัคซีนในสัตว์ได้

ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการแพ้วัคซีนในสัตว์ จึงจำเป็นต้องขจัดการเซลล์ออกจาก virus fluid ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน รัฐบาลญี่ปุ่นจึงได้บริจาคเครื่องกรองฟุนด้า ให้แก่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา เพื่อนำมาใช้ในการ clarify virus fluid ก่อนจะนำไปผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

---

* เป็นเครื่องกรองที่สามารถกรองได้โดยใช้ Diatomaceous Earth(DE) เป็นตัวทำแผ่นกรอง(Cake) บนตะแกรงถี่ (Mesh) แล้วกรอง FMD virus fluid ผ่านแผ่น cake นั้น

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

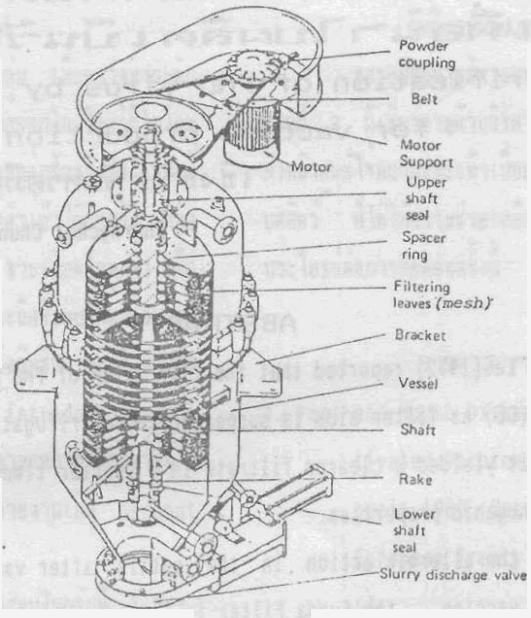


Figure 1 The Funda Filter CFR type.

คำนำ

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา นั้น ผลิตโดยวิธี Suspension cel culture method(2) แล้วนำ virus fluid ที่ได้มาผลิตเป็นวัคซีน แต่วัคซีนที่ผลิตได้นั้นจะมีกากเซลล์ปะปนอยู่มาก และกากเซลล์นั้นจะเป็นตัวทำให้เกิดการแพ้ในสัตว์หลังจากการฉีดวัคซีนแล้ว (3) ต่อมาศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมาได้ทำการขจัดกากเซลล์ออกจาก virus fluid ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนโดยวิธีตกตะกอนกากเซลล์ที่ 4°C.(2)แต่ก็ยังไม่สามารถขจัดกากเซลล์ออกได้หมด จึงได้ทำการทดลองนำ Diatomaceous Earth (DE)มาเป็น filter aids ในการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน

จากรายงานของ Moslet และ Lei (1972) ได้ทดลองนำเอา DE มาใช้ในการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนปรากฏว่าการกรองได้ราดเร็วและไม่ทำให้ไวรัสเกิดการสูญหายในระหว่างการกรอง (no measurable loss of infectivity or immunogenic properties)(1) ดังนั้นศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา โดยความร่วมมือจากรัฐบาลญี่ปุ่นจึงได้นำวิธีการของ Moslet และ Lei มาใช้ในการขจัดก
เซลล์ออกจาก virus fluid ก่อนที่จะนำไปผลิตเป็นว
โดยรัฐบาลญี่ปุ่นได้บริจาคเครื่องกรองพ่นด้ามาให้ ซึ่งเ
กรองนี้เป็นเครื่องกรองที่ต้องใช้ DE เป็นตัวทำแผ่น
(cake) บนตะแกรงกั้ (mesh) แล้วกรองไวรัสโรคปาก
เท้าเปื่อยผ่าน cake นั้น (Fig 1)

Virus fluid ที่ clarified แล้วจากเ
กรองพ่นด้าจะถูกนำไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้า
แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์ประกอบด้วย

1.1 เครื่องกรองพ่นด้า และ diatomaceo
earth

1.2 ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โค - กระ
ไทป์ O, A และ Asia 1

1.3 เครื่องแก้ว เช่น plates, tubes, p
pettes และอื่น ๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบไวรัสโค
complement fixation,plaque assays และSing
Radial Immunodiffusion (SRID)

1.4 โครุ่นอายุ 1 ปี ใช้ในการทดสอบวัคซีน

นำไวรัสที่กรองได้จากเครื่องกรองฟนค้าไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนปรากฏว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคได้สูงและไม่เกิดอาการแพ้ในสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว (Table 1)

สรุปและวิจารณ์

การใช้เครื่องกรองฟนค้าซึ่งเป็นเครื่องกรองที่ต้องใช้ DE เป็นตัวกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น สามารถกรองได้รวดเร็ว โดยไม่ทำให้ไวรัสสูญหายไปในระหว่างการกรอง (no measurable loss of infertivity or immunogenic properties)(1) นอกจากนั้นเมื่อนำไวรัสที่กรองได้ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนก็ปรากฏว่ามีผลคุ้มโรคได้สูงและไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ในสัตว์หลังจากการฉีดวัคซีนแล้ว

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ DE กรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนนำไปเตรียมเป็นวัคซีนตามวิธีของ Moslet และ Lei (1972) สามารถจะนำมาประยุกต์ใช้กับเครื่องกรองฟนค้าที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ได้เป็นอย่างดี

เพื่อป้องกันการแพ้วัคซีนในสัตว์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมาโดยความร่วมมือจากรัฐบาลญี่ปุ่น จะได้ทำการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเครื่องกรองฟนค้า เพื่อแยกกากเซลล์ออกจาก virus fluid ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Moslet, U., Lei, J.C., 1972. Chloroform treatment and clarification by filtration of Foot and Moulth Disease virus suspensions, A survey of preliminary experiences. Bul. off. int. Epiz. 77 (7-8). pp 1303-1314.
2. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. 259 p.
3. Wiblin, C.N., 1985.Pyrogenicity and Carcinogenicity Tests, pp.321-354. In R.E. Spier and J.B.Griffiths (eds.) Animal cell Biotechnology, Vol.2. Academic Press, United Kingdom.

TABLE 1 The antigen titers of type O, A and Asia 1 FMD virus before and after filtrated by FUNDA FILTER, the table shown that the virus were not lost by the filtration and the vaccines prepared from filtrated virus fluid were good vaccines with high potency and did not cause the allergy after vaccination.

	Before filtration			After filtration		
	type O	type A	type Asia 1	type O	type A	type Asia 1
cfu/ml	54.75	47.67	51.02	53.29	47.65	51.01
pfu/ml (log)	7.66	7.49	7.25	7.62	7.50	7.62
140S (u/ml)	2.19	1.91	2.00	2.13	1.87	2.04
vaccine preparatⁿ	-	-		x	x	x
Allergic action	-	-		NON	NON	NON
Protectⁿ rate (%)	-	-		100.0	100.0	100.0

2. วิธีทดลอง

2.1 ทำการ precoat แผ่นกรอง (Mesh) ในเครื่องกรองฟูนด้าด้วย DE ขนาด 5 ก.ก./น้ำ 900 ลิตร circulate จนกว่าน้ำจะใส แล้วทำการ drain น้ำทิ้งทั้งหมด DE ก็จะ form เป็น cake บนแผ่นกรองหนาประมาณ 1 ซ.ม.

2.2 นึ่งเครื่องกรองฟูนด้าและ DE คลอดจนห่อประกอบต่าง ๆ ด้วยไอน้ำด้วยความดัน 1.5 ก.ก./ซ.ม.^{3}, 121°C., 1.30 ชั่วโมง เสร็จแล้วทิ้งให้เครื่องกรองเย็นโดยอัดความดันด้วยอากาศปริสุทธิ์ 1.5 ก.ก./ซ.ม.^{3}

2.3 ก่อนใช้เครื่องกรองฟูนด้ากรองไวรัสต้องลดความดันที่อัดไว้จนเหลือความดันประมาณ 0.1 ก.ก./ซ.ม.^{3} จึงปล่อยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O โด-กระบือ ซึ่งเพาะได้จากถังเพาะเชลล์ขนาด 2500 ลิตร มาทำการกรองด้วยเครื่องกรองฟูนด้านี้

2.4 เก็บตัวอย่างไวรัสก่อน และหลังการกรองด้วยเครื่องฟูนด้า เพื่อทดสอบหาปริมาณไวรัส

2.5 นำไวรัสที่ clarified ด้วยเครื่องกรองฟูนด้าแล้วไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O โด-กระบือ แล้วทำการทดสอบคุณภาพวัคซีนต่อไป

2.6 ทำซ้ำข้อ 2.1-2.5 อีกแต่ใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A โด-กระบือ และไทป์ Asia 1 โด-กระบือ ตามลำดับ

2.7 ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 2.1-2.6 อีก 2 ครั้ง แล้วนำตัวเลขต่าง ๆ ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย เพื่อทำการสรุปผลต่อไป

ผล

จากการทดลองกรอง virus fluid โดยใช้เครื่องกรองฟูนด้าปรากฏว่า การกรองสามารถกรองได้ราวเร็ว (ไวรัส 1500 ลิตร ใช้ผ้าลากรองประมาณ 45 นาที และ virus fluid ที่กรองได้จะใสสะอาดปราศจากกากเซลล์ เมื่อนำไปทำการทดสอบหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Complement fixation test, plaque assay method และ Single Radial Immunodiffusion(SRID) แล้วปรากฏว่าไวรัสก่อนการกรอง และไวรัสหลังการกรองด้วยเครื่องกรองฟูนด้านั้นจะให้ค่าไม่แตกต่างกัน นั่นคือไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จะไม่สูญหายไปในระหว่างการกรองด้วยเครื่องกรองฟูนด้า (Table 1)

การประเมินผลความคุ้มโรคของวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ Haemophilus paragallinarum (Infectious coryza) ในไก่ไข่

The Value of oil adjuvant and Alhydrogel vaccine in the control of Haemophilus paragallinarum infection (Infectious coryza) in eggs production birds

แก้วมณี กองสมัคร[1] ชะเล็ก เสรีพันธ์พนิช[2]

Kaomanee Kongs mak Chalek Sereephanpanich

บทคัดย่อ

การฉีดวัคซีนป้องกันโรคหวัดคัดค่อในไก่ไข่โดยใช้ oil adjuvant bacterin (รหัส I-III) และ alhydrogel bacterin (รหัส IV) นั้นเป็นการประเมินผลในไก่ที่จัดเป็นกลุ่ม ๆ ทั้งหมด 3 กลุ่ม จำนวน 250 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 แบ่งเป็น 4 กรง ๆ ละ 25 ตัว กลุ่มที่ 2 ก็แบ่งเช่นเดียวกัน ส่วนกลุ่มที่ 3 มี 1 กรง 50 ตัว ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนรหัส I, II, III และ IV 2 ครั้งๆ ละ 0.5 มล. ครั้งแรกเมื่ออายุ 9 สัปดาห์ ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 13 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง 1 มล. เมื่ออายุ 13 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม (control) ไม่ฉีดอะไรเลย ไก่ทั้งหมดจะถูก challenge ด้วยเชื้อ H. Paragallinarum serotype A 2 ครั้ง ๆ แรกก่อนออกไข่เมื่ออายุ 20 สัปดาห์ ครั้งที่สองเมื่ออายุ 33 สัปดาห์

คำนำ

การเกิดโรคหวัดคัดค่อ(Infectious Coryza) ในฝูงไก่ไข่เป็นสาเหตุให้ไข่ลดลงเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เกิดจากเชื้อที่มีความรุนแรง และชนิดย่อยที่ทำ ๆ ไป คือ Haemophilus paragallinarum Serotype A

ได้มีการพัฒนาการผลิตแบคทีรีน (bacterin) เพื่อป้องกันโรคนี้เช่น egged propagated bacterin(8) แต่ให้ความคุ้มโรคได้ไม่ดีนัก ต่อมาได้มีการปรับปรุง broth propagated bacterin (2,3,4,5,6,9) ซึ่งคุ้มโรคได้ดีพอสมควร

รายงานส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการใช้broth Propagatated bacterin (7) เพื่อป้องกันโรคนี้ แต่ก็มีรายงานผลการใช้แบคทีรินชนิด Oil adjuvant bacterin ฉีดป้องกันโรค ซึ่งให้ความคุ้มโรคที่ดีกว่าแบคทีรินชนิดอื่น(8,10, 11)

การฉีด alhydrogel bacterin นั้น โดยปกติจะให้ความคุ้มโรคได้ระยะสั้นประมาณ 3-4 เดือน แต่เมื่อมีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคนี้เป็นชนิดผสมน้ำมัน(oil adjuvant bacterin) ปรากฏว่าให้ความคุ้มโรคได้นานกว่า 2-3 เท่า (11)

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อให้ทราบผลของการให้วัคซีน 2 ชนิดในไก่ไข่ คือ ชนิด oil adjuvant และชนิด Alhydorgel bacterin ซึ่งการประเมินผลของการทดลองนี้ทำในไก่ตั้งแต่เริ่มฉีดวัคซีนเมื่ออายุ 9 สัปดาห์ จนกระทั่งอายุ 39 สัปดาห์ซึ่งในการศึกษาทดลองครั้งนี้มุ่งไปในด้าน

1. การฉีดวัคซีนด้วยขนาดและเวลาที่ต่างกันจะมีผลต่อความคุ้มโรคต่างกันหรือไม่

2. ผลของการฉีดวัคซีน และการฉีดเชื้อพันธุ์ที่มีต่อน้ำหนักของไก่ขณะออกไข่

3. ผลต่อการพัฒนาด้าน Sexual maturity ของฝูงไก่ที่ได้รับการฉีดวัคซีน และ challenge ด้วย

---

1 สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ 2 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา

นำไวรัสที่กรองได้จากเครื่องกรองฟูนด้าไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนปรากฏว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคได้สูงและไม่เกิดอาการแพ้ในสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว (Table 1)

สรุปและวิจารณ์

การใช้เครื่องกรองฟูนด้าซึ่งเป็นเครื่องกรองที่ต้องใช้ DE เป็นตัวกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น สามารถกรองได้รวดเร็ว โดยไม่ทำให้ไวรัสสูญหายไปในระหว่างการกรอง (no measurable loss of infertivity or immunogenic properties)(1) นอกจากนั้นเมื่อนำไวรัสที่กรองได้ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนก็ปรากฏว่ามีผลคุ้มโรคได้สูงและไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ในสัตว์หลังจากการฉีดวัคซีนแล้ว

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ DE กรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ก่อนนำไปเตรียมเป็นวัคซีนตามวิธีของ Moslet และ Lei (1972) สามารถจะนำมาประยุกต์ใช้กับเครื่องกรองฟูนด้าที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ได้เป็นอย่างดี

เพื่อป้องกันการแพ้วัคซีนในสัตว์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมาโดยความร่วมมือจากรัฐบาลญี่ปุ่น จะได้ทำการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการกรองไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเครื่องกรองฟูนด้า เพื่อแยกกากเซลล์ออกจาก virus fluid ก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Moslet, U., Lei, J.C., 1972. Chloroform treatment and clarification by filtration of Foot and Moulth Disease virus suspensions, A survey of preliminary experiences. Bul. off. int. Epiz. 77 (7-8). pp 1303-1314.
2. Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. 259 p.
3. Wiblin, C.N., 1985.Pyrogenicity and Carcinogenicity Tests, pp.321-354. In R.E. Spier and J.B.Griffiths (eds.). Animal cell Biotechnology, Vol.2., Academic Press, United Kingdom.

การประเมินผลความคุ้มโรคของวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ Haemophilus paragallinarum (Infectious coryza) ในไก่ไข่

The Value of oil adjuvant and Alhydrogel vaccine in the control of Haemophilus paragallinarum infection (Infectious coryza) in eggs production birds

แก้วมณี กองสมัคร[1] ชะเล็ก เสรีพันธ์พนิช[2]

Kaomanee Kongs nak Chalek Sereephanpanich

บทคัดย่อ

การฉีดวัคซีนป้องกันโรคหวัดคัดค่อในไก่ไข่โดยใช้ oil adjuvant bacterin (รหัส I-III) และ alhydrogel bacterin (รหัส IV) นั้นเป็นการประเมินผลในไก่ที่จัดเป็นกลุ่ม ๆ ทั้งหมด 3 กลุ่ม จำนวน 250 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 แบ่งเป็น 4 กรง ๆ ละ 25 ตัว กลุ่มที่ 2 ก็แบ่งเช่นเดียวกัน ส่วนกลุ่มที่ 3 มี 1 กรง 50 ตัว ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนรหัส I, II, III และ IV 2 ครั้งๆ ละ 0.5 มล. ครั้งแรกเมื่ออายุ 9 สัปดาห์ ครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 13 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง 1 มล. เมื่ออายุ 13 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม (control) ไม่ฉีดอะไรเลย ไก่ทั้งหมดจะถูก challenge ด้วยเชื้อ H. Paragallinarum serotype A 2 ครั้ง ๆ แรกก่อนออกไข่เมื่ออายุ 20 สัปดาห์ ครั้งที่สองเมื่ออายุ 33 สัปดาห์

คำนำ

การเกิดโรคหวัดคัดค่อ(Infectious Coryza) ในฝูงไก่ไข่เป็นสาเหตุให้ไข่ลดลงเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เกิดจากเชื้อที่มีความรุนแรง และระบาดอยู่ทั่ว ๆ ไป คือ Haemophilus paragallinarum Serotype A

ได้มีการพัฒนาการผลิตแบคทีรีน (bacterin) เพื่อป้องกันโรคนี้เช่น egged propagated bacterin(8) แต่ให้ความคุ้มโรคได้ไม่ดีนัก ต่อมาได้มีการปรับปรุง broth propagated bacterin (2,3,4,5,6,9) ซึ่งคุ้มโรคได้ดีพอสมควร

รายงานส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการใช้broth Propagatated bacterin (7) เพื่อป้องกันโรคนี้ แต่ก็มีรายงานผลการใช้แบคทีรินชนิด Oil adjuvant bacterin ฉีดป้องกันโรค ซึ่งให้ความคุ้มโรคที่ดีกว่าแบคทีรินชนิดอื่น(8,10, 11)

การฉีด alhydrogel bacterin นั้น โดยปกติจะให้ความคุ้มโรคได้ระยะสั้นประมาณ 3-4 เดือน แต่เมื่อมีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคนี้เป็นชนิดผสมน้ำมัน(oil adjuvant bacterrin) ปรากฏว่าให้ความคุ้มโรคได้นานกว่า 2-3 เท่า (11)

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อให้ทราบผลของการให้วัคซีน 2 ชนิดในไก่ไข่ คือ ชนิด oil adjuvant และชนิด Alhydorgel bacterin ซึ่งการประเมินผลของการทดลองนี้ทำในไก่ตั้งแต่เริ่มฉีดวัคซีนเมื่ออายุ 9 สัปดาห์ จนกระทั่งอายุ 39 สัปดาห์ซึ่งในการศึกษาทดลองครั้งนี้มุ่งไปในด้าน

1. การฉีดวัคซีนด้วยขนาดและเวลาที่ต่างกันจะมีผลต่อความคุ้มโรคต่างกันหรือไม่

2. ผลของการฉีดวัคซีน และการฉีดเชื้อพิษที่มีต่อน้ำหนักของไก่ขณะออกไข่

3. ผลต่อการพัฒนาด้าน Sexual maturity ของฝูงไก่ที่ได้รับการฉีดวัคซีน และ challenge ด้วย

1 สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ 2 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา

ดังนี้ ผลการหา packed cell volume ต้องไม่น้อยกว่า 0.2%.pH ของมีเดียในขณะเพาะเชื้อระยะเวลา 18 ชั่วโมง ประมาณ 6.5

การเตรียมและการตรวจสอบมาตรฐานของ oil adjuvant และ alhydrogel H. paragallinarum วัคซีน

1. ชนิด oil adjuvant

โดยใช้แบคทีเรียที่เตรียมดังกล่าวข้างต้น ที่มีเชื้ออย่างน้อยที่สุด 10^9 cfu/ml inactivated ด้วย 0.25% formalin นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วผสมกับ Montanide เมื่อได้ emulsion ที่เหมาะสมและทดสอบคุณสมบัติของ emulsion ตามมาตรฐานของกองผลิตชีวภัณฑ์

2. ชนิด $Al(OH)_3$ gel 10% ใน Broth bacterin ที่inactivated ด้วย 0.25% formalin นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมนั้น ไปทดสอบความปลอดภัยในไก่อายุ 13 สัปดาห์ โดยฉีด 1ml S/c อย่างละ 25 ตัว บันทึกอาการของไก่ใน 2 สัปดาห์ แล้วนำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเก็บไว้ที่ 4°C.

วิธีการฉีดวัคซีน

แบ่งการฉีดเป็น 2 วิธี คือ

1. ฉีดครั้งละ 0.5 ml 2 ครั้ง ห่างกัน 4 สัปดาห์ S/C เมื่อไก่อายุ 9 และ 13 สัปดาห์

2. ฉีด 1 ครั้ง 1 ml S/C เมื่อไก่อายุ 13 สัปดาห์

ก. ไก่

ใช้ไก่ 250 ตัว จากการพักครั้งเดียวของฝูงที่ไม่เคยเป็นโรคหวัดติดต่อนี้ และตรวจไม่พบเชื้อ Mycoplasma gallisepticum ในฝูง

จัดให้ไก่อยู่ในกรงที่ได้รับการดูแลเป็นอย่างดี ตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งออกไข่

ข. การจัดกลุ่ม

แบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1, 4 กรง ๆ ละ 25 ตัว, กลุ่มที่ 2, 4 กรง ๆ ละ 25 ตัว, กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม 50 ตัว

ค. การฉีดพิษหนัง

ก่อนออกไข่ครั้งแรกเมื่ออายุ 20 สัปดาห์และเมื่ออายุ 33 สัปดาห์ โดยฉีดเชื้อพิษ H. paragallinarum 10^6 cfu/ml ขนาด 0.5 ml ในแต่ละตัว

ง. การวิเคราะห์ผล

1. ตรวจดูสุขภาพโดยทั่วไปของไก่ จะไม่มีโรคนี้เกิดขึ้นกับฝูงไก่ทดลองทุก ๆ กรงก่อนการฉีดวัคซีน

2. ผลการฉีดวัคซีนในไก่ หลังการฉีดวัคซีนชนิด oil adjuvant ไก่ประมาณ 20% จะนอนชมประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ไก่ที่ฉีดด้วยวัคซีน Alhydrogel จะยังปกติ

3. ชั่งน้ำหนักไก่หลังฉีดวัคซีนทุกสัปดาห์ น้ำหนักไก่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจะไม่มีผลแตกต่างกัน

4. อาการของไก่หลังจากได้รับเชื้อพิษ สังเกตอาการ น้ำหนัก การออกไข่ และอัตราการตายของไก่ โดย

- สังเกตอาการของไก่ทั้งฝูงทุก ๆ วันโดยสม่ำเสมอ

- ชั่งน้ำหนักของไก่ตั้งแต่อายุ 9 สัปดาห์ จนกระทั่ง 39 สัปดาห์ เป็นระยะ ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจาก challenge แล้วถ้าไก่มีอาการน้ำมูกไหลและหน้าบวม บันทึกอาการ จนกระทั่งไก่หายจากการเป็นโรค หรือผลการออกไข่ทุกวัน

- สังเกตุการออกไข่ทั้งสัปดาห์ หลังจากการฉีดพิษหนังเมื่ออายุ 20 และ 33 สัปดาห์โดยเริ่มบันทึกตั้งแต่อายุ 22 สัปดาห์ จนถึง 39 สัปดาห์

ตารางที่ 4 แสดงความแตกต่างของการออกไข่ 43% ระหว่างวัคซีนชุดที่ 1 (% การออกไข่ได้มากที่สุด) กับกลุ่ม Control 27%

วิธีฉีดวัคซีน	ค่าเฉลี่ยการออกไข่/วัน (%)
Ix1	70
Ix2	72
IIx1	68
IIx2	70
IIIx1	71
IIIx2	68
IVx1	69
IVx2	67
Control	27

ตารางที่ 5 จากการหายจากการแสดงอาการของโรคหลังจากได้รับการchallenge แล้วเมื่ออายุ 33 สัปดาห์

วัคซีนวัคซีน	ค่าเฉลี่ยของการหายจากการแสดงอาการของโรค (วัน)
Ix1	120
Ix2	122
IIx1	126
IIx2	121
IIIx1	127
IIIx2	123
IVx1	215
IVx2	220
Control	351

ผล

ผลการฉีดพิษทับครั้งแรก เมื่อไก่อายุ 20 สัปดาห์ หลังจากการฉีดวัคซีนครั้งแรกเมื่ออายุ 9 สัปดาห์และฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 13 สัปดาห์ ไก่ทุกกลุ่มจะแสดงอาการของโรค ดังตารางที่ 1

ผลการฉีดพิษทับครั้งที่ 2 เมื่อไก่อายุ 33 สัปดาห์ จะแสดงอาการของโรคหวัดใน 6 วัน ดังตารางที่ 2

การวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ จากข้อมูลการออกไข่ก่อนและหลัง challenge ใน 14 วัน

ก่อนที่ challenge ด้วยเชื้อพิษ ค่าเฉลี่ยในการออกไข่ประมาณ 76% หลังการ challenge แล้วไข่จะลดลงในทุก ๆ กลุ่มและไม่มีความแตกต่างของการออกไข่ต่อผลจากการฉีดวัคซีนครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ในกลุ่มที่ 1 ไข่จะลดลงจากเดิม 7%,10% กลุ่มที่ 2 ไข่จะลดลงจากเดิม 6%, 7% กลุ่มที่ 3 จะลดลง 10%,12% กลุ่มที่ 4 ไข่จะลดลง 25%, 29% ซึ่งไก่ทั้ง 4 กลุ่มนี้จะมีไข่ลดลงในอัตราที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในกลุ่ม Control นั้น ไข่จะลดลงจากเดิม 49% ดังตารางที่ 3 และจากตารางที่ 3 นี้ แสดงให้เห็นว่าวัคซีนแต่ละชุดป้องกันการลดของไข่ได้

จากสถิติการออกไข่ หลังจากได้บันทึกข้อมูลหลัง 6 สัปดาห์ เมื่อไก่ได้รับเชื้อแล้วพบว่าไก่ออกไข่เป็นจำนวนเกือบเท่าเดิม ตอนที่ได้รับการฉีดวัคซีน ดังตารางที่ 4 และจากตารางที่ 4 นี้ จะมีความแตกต่างของการออกไข่ 43% ระหว่างวัคซีนชุดที่ 1 (เปอร์เซนต์การออกไข่ได้มากที่สุด) กับกลุ่ม Control 27%

ความเร็วจากการหายจากการแสดงอาการของโรคหลังจากไก่ได้รับเชื้อโดยการchallenge แล้วเมื่ออายุ 33 สัปดาห์

โดยการบันทึกการแสดงอาการของไก่ หลังจาก challenged ในไก่ทุก ๆ กลุ่มที่มีเปอร์เซนต์การแสดงอาการของโรค ปรากฏว่าเวลาที่สั้นที่สุดที่ไก่หายจากโรคนั้นคือ 120 วัน ส่วนกลุ่ม Control จะหายจากโรคนี้ใน 351 วัน เป็นเวลาที่นานที่สุด แต่ในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน oil adjuvant จะหายเร็วกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิด alhydrogel ดังตารางที่ 5

การวิเคราะห์ข้อมูลของน้ำหนักไก่

จะไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักไก่ทุกกลุ่มเมื่อชั่งตอนอายุได้ 39 สัปดาห์ยกเว้นในกลุ่มควบคุม(Control) ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วจะมีน้ำหนัก 30%

วิจารณ์

การทดลองนี้หาให้ทราบถึงผล ของความต้านโรคของวัคซีนป้องกันโรคหวัดคัดค่อ (Infectious coryza) โดยจุดประสงค์หลักที่จะเน้นการป้องกันโรคนี้ในไก่ไข่ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมากของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ แม้จะป้องกันโรคนี้โดยใช้ยาปฏิชีวนะก็ไม่ได้ผลดีนัก (จากข้อมูลของฟาร์มเอกชน) และผลจากการใช้วัคซีนป้องกันโรคนี้ในไก่ทดลองจำนวนน้อยก็ได้ผลดีพอสมควรและผลที่สำคัญคือ แม้วัคซีนนี้จะป้องกันโรคไม่ได้ 100% แต่เมื่อไก่หายจากการเป็นโรคแล้วก็ยังออกไข่ได้ในอัตราที่ไม่แตกต่างจากเดิมมากนัก

สรุป

การใช้วัคซีนชนิด oil adjuvant ในการป้องกันโรคในไก่จะเป็นวิธีการที่ใช้ได้ผลดีกว่าวัคซีนชนิดอื่น ซึ่งการทดสอบครั้งนี้จะเป็นข้อมูลหลาย ๆ ประการ ในการใช้วัคซีน

ตารางที่ 1 ผลการฉีดพิษพับไก่ทุกกลุ่มจะแสดงอาการของโรคหวัด

วัคซีน	วิธีการฉีด	ค่าเฉลี่ยของการแสดงอาการของโรค (%)
I	1 ml.	6
I	0.5x0.5 ml.	6
II	1 ml.	5
II	0.5x0.5 ml.	6
III	1 ml.	5
III	0.5x0.5 ml	4
IV	1 ml	[illegible]
IV	0.5x0.5 ml	17
v	control	93

ตารางที่ 2 ผลการฉีดพิษพับครั้งที่ 2 เมื่อไก่อายุ 33 สัปดาห์ ไก่ทุกกลุ่มจะแสดงอาการของโรคหวัด

วัคซีน	วิธีการฉีด	ค่าเฉลี่ยของการแสดงอาการของโรค (%)
I	1 ml.	21
I	0.5x0.5 ml.	23
II	1 ml.	27
II	0.5x0.5 ml.	26
III	1 ml.	26
III	0.5x0.5 ml.	28
IV	1 ml.	80
IV	[illegible]x0.5 ml.	75
V	not vaccinate	91

Virulence strain ในไก่อายุ 20 สัปดาห์ก่อนการออกไข่ 4. ผลต่อการออกไข่เมื่อไก่ได้รับวัคซีนแล้ว และ challenge ด้วยvirulence strainเมื่ออายุ 33 สัปดาห์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

oil adjuvant propagated vaccine รหัส I, II, III และAluminium hydroxide broth propagated vaccine รหัส IV วัคซีนทั้ง 4 ชนิด เป็นวัคซีนที่เตรียมจาก H. paragallinarum Serotype A (จากสถาบันสุขภาพสัตว์ ประเทศญี่ปุ่น)

การเพาะเชื้อ H. paragallinarum

เชื้อจากสถาบัน NIAH แห่งประเทศญี่ปุ่น Serotype A นำมาเพาะใน yo lk sac ของไข่อายุ 6-7 วัน ไข่ตายใน 24 ชั่วโมงเก็บyolk sac ทำfreeze drying เก็บไว้ที่ -40°C. แล้วนำไป streak บน Tryptose blood agar แล้ว Cross streak ด้วย Feeder culture ซึ่งให้ V-factor (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) แต่โดยทั่ว ๆ ไปใช้ Staphylococcus epidimidis แล้วนำเชื้อไปเพาะใน chicken meat infusion broth เติม 5% heat inactivated chicken serum เพาะที่ 37°C. นาน 24 ชั่วโมง แล้วใช้ 10% ของ inoculum นี้นำไปเพาะใน Brain heart infusion broth ที่มี (1)

ผลของการเพาะเชื้อ H. paragallinarum

จะต้องได้จำนวนเชื้อไม่น้อยกว่า 10^8cfu/ml

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของไข่ลดลงหลัง challenge ด้วยเชื้อ H. Paragallinarum

วิธีการจัดวัคซีน	Ix1	Ix2	IIx1	IIx2	IIIx1	IIIx2	IVx1	IVx2	Control
ค่าเฉลี่ยของไข่ลด (%)	7	10	6	7	10	12	25	29	49

ป้องกันโรคหวัดคัดคล่อในไก่ที่เกิดจากเชื้อ H.paragallinarum

การทดลองเบื้องต้นในการเตรียมวัคซีนชนิด oil adjuvant และชนิด alhydrogel เพื่อใช้ป้องกันโรคหวัดคัดคล่อ ปรากฏว่า

1. วิธีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคจะเพียงครั้งเดียว หรือ 2 ครั้ง ก็ไม่มีผลแตกต่างกันมากนัก

2. การฉีดวัคซีนจะไม่ทำให้ไก่มีน้ำหนักลดลง ยกเว้นในกลุ่มควบคุมซึ่งมีน้ำหนักลดลง 30%

3. การฉีดวัคซีนชนิดoil adjuvant vaccine แล้วchallengeด้วยเชื้อพิษผลการออกไข่ลดลงจากปกติ(น้อยที่สุด 6%) ส่วนการฉีดวัคซีนชนิด Alhydrogel หลัง challenge แล้วไข่ลงลงถึง 25% ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนเลยแต่ฉีดเชื้อพิษ (กลุ่มควบคุม) ไข่ลดถึง 49%

เอกสารอ้างอิง

1. Rimler, R.B., Shotts, E.B.and Davis, R.B. (1975). A growth medium for the production of a bacterin for immunisation against infectious coryza. Avian Dis. 19:318-323.
2. Pase,L.A., Rosenwald,A.S. and Price, F.C. (1963). Haemophilus infections in chickens IV.Results of Laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by Haemophilus gallinarum Avian Dis.7:239-256.
3. Pase, L.A.(1962).Haemophilus in chickens. Characteristics of 12 Haemophilus Isolates recoverd from diseased chickens. A.J. Vet. Res. 23:85-95.
4. Matsumoto,M.and Yamamoto,R.(1975).Protective quality of an Aluminium hydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coryza.Am.J.Vet.Res.36:579-582.
5. Matsumoto,M.and Yamamoto,R.(1970).A broth bacterin against infectious coryza:Immunogenicity of various preparations.Avian Dis. 14:109-117.
6. Kume,K.,Sawate,A.andNakase,Y.(1980).Relationship between protective activity and antigen structure of Haemophilus paragal linarum serotypes 1 and Am.J.Vet.Res.41: 97-100.
7. Kato,K.(1967).Infectious coryza of chickens.IX.Protective effect of merthiolate killed vaccine prepared from the chicken meat infusion broth culture.Japan J.Vet. Sci. 29 (suppl.):263.
8. Davis, R.B.,Rimler, R.B. and Shotts, E.B. (1976). Efficacy studies on Haemophilus gallinarum bacterin preparations. Am. J. Vet. Res. 37:219-222.
9. Dark,D.S.and Godrey,J.F.(1961).Studies of inactivated Haemophilus gallinarum vaccine for immunization of chickens against infectious coryza.Avian Dis.5:37-47.
10. Sato,S.,and M.Shifrine.Serologic response of chickens experimental infection with Haemophilus gallinarum and their immunity to challenge.Poultry Sci.43:1199-1204.
11. Cessi, D. 1983. Application of oil emulsion vaccine Veterinary Medicine. In A seminar in the commission of the European Communities Programe of Coordina- of Reserch on Animal Pathology. APril, 27 and 28, Venice.

ความสัมพันธ์ด้านทางชีววิทยา และกายภาพกับจำนวนลูกต่อแม่ (ขนาดครอก) ของหนูตะเภาพันธุ์ Thai-local black ear Harley

Correlation between some biological and physiological data on litter size of Thai-local black ear Hartley guinea-pig

ทาริกา ประมูลสินทรัพย์[1]

Tarika Pramoolsinzap

ABATRACT

The present study was to determine the optimum biological and physiological condition on growth and survival rates of Thai-local black ear Hartley guinea-pig. Total 413 mature guinea-pig (59 males, 354 females; male:female = 1:6) were used as breeding parents and were kept under strict hygine conditions at the foot and mouth disease vaccine production center.

The growth rate and mortality percentage of a guinea-pig depended partly upon the number of young in the litter. The highest growth rate with lowest mortality of youngster was seen when the number of young per litter was 3.0 and there was no adverse effect on maternal health. This study indicated that, the litter size for Thai-local black ear Hartley guinea-pig should be optimalize to 3 in numbers.

บทคัดย่อ

การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางชีววิทยาและกายภาพกับจำนวน ลูก/แม่ ของหนูตะเภาพันธุ์ Thai-local black ear Hartley ที่สถานผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีววัตถุ กรมปศุสัตว์ จากหนูตะเภาพันธุ์ 59 ตัว ผสมกับแม่พันธุ์ 354 ตัว (เพศผู้ : เพศเมีย = 1:6) พบว่าจำนวนลูก/แม่(litter size) มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของลูกหนูตะเภานั้น หนูตะเภาแม่พันธุ์ที่ให้ลูกครอกละ 3.0 ตัว/แม่นั้นนับเป็นจำนวนที่พอเหมาะที่สุดที่จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของลูกหนูตะเภาสูงที่สุด โดยมีผลกระทบกระเทือนต่อสุขภาพร่างกายของแม่หนูตะเภาน้อยที่สุดด้วย

คำนำ

หนูตะเภา(Carvia porcellus)พันธุ์ Dunkin-Hartley มีลักษณะรูปร่างที่ได้มาจากประเทศอังกฤษเมื่อปลายปี ค.ศ.1920 (2,4) นิยมใช้เป็นสัตว์ทดลอง(1) ขั้นพื้นฐาน ในงานวิจัยกันอย่างกว้างขวางและแพร่หลายมาก เนื่องจากหนูตะเภามีลักษณะทางชีววิทยา (3) และความไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้เอง ในขนาดพอเหมาะกับความต้องการ (9) ที่คล้ายคลึงกับพวกสัตว์ชั้นสูงที่เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป จึงมักใช้เป็นตัวอ้างอิงเปรียบเทียบในงานวิจัยทดสอบต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้แล้วหนูตะเภามีคุณลักษณะพิเศษคือเป็นสัตว์ที่เลี้ยงดูและควบคุมปรับสภาพได้ง่ายอย่างไม่มีปัญหาในห้องปฏิบัติการ มีความไวต่อการติดเชื้อที่ติดคนและสัตว์อื่น ๆ โดยทำให้ความรุนแรงของเชื้อโรคแรงขึ้น จากคุณสมบัตินี้จึงใช้หนูตะเภาในงานตรวจสอบวินิจฉัยโรค ทางด้านจุลชีววิทยา อิมมูนวิทยา ตลอดจนแบบอย่างของสัตว์ที่ใช้ในงานวิจัยทางโภชนาการ และวิชาสาขาอื่น ๆ อีกมากมาย (9)

การเพาะเลี้ยงดูแลหนูตะเภาเป็นแบบ Conventional colony ที่ถูกหลักสุขาภิบาล โดยมีการควบคุม

---

1 สถานโรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

สภาวะแวดล้อมของโรงเรือนให้มีอุณหภูมิห้อง 18 - 20°C. ความชื้นสัมพัทธ์ 50% แสงให้ 12-16 ชั่วโมงต่อวัน อากาศหมุนเวียน 10-15 ครั้งต่อชั่วโมง (1,10) ภายในกรงแบบพื้นทึบ (solid floor) (9) ซึ่งเหมาะกับการผสมพันธุ์แบบ Polygamous group (9, 12) พื้นกรงปูด้วยหญ้าแห้งอบฆ่าเชื้อโรคด้วยไอน้ำที่มีความดัน 15/lb/in.^{2} อุณหภูมิ 120°C. นาน 1/2 ชั่วโมง(7) เลี้ยงด้วยอาหารอัดเม็ดที่มีเปอร์เซนต์โปรตีน = 20-22%, เยื่อใย = 11-16%, ไขมัน = 4.0 % คาร์โบไฮเดรต = 44% และให้อาหารเสริมด้วยไวตามินซีละลายน้ำในขนาดประมาณ 200มิลลิกรัม/กิโลกรัม (1,5,6,7)

การผสมพันธุ์หนูตะเภาเป็นแบบFull-sib mating system โดยคัดเลือกหนูตะเภาที่มีลักษณะระบบสืบพันธุ์คลอดจนสุขภาพแข็งแรกดี (12) เป็นพ่อพันธุ์ 1 ตัว ให้อยู่ในกรงผสมพันธุ์เดียวกับแม่พันธุ์ 4-20 ตัว (10) แม่พันธุ์จะตั้งท้องนาน 59-72 วัน เฉลี่ย 63 วัน (8) คลอดลูกแล้วจะเลี้ยงลูกนาน 15-28 วัน จนลูกมีน้ำหนัก 180 กรัม หรือ 21 วัน ลูกมีน้ำหนัก 165-240 กรัม (10) จึงจะแยกลูกออกจากกรงผสมพันธุ์ (9, 12)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. หนูตะเภา

พันธุ์ Thai-local black ear hartley หรือพันธุ์เพศผู้ที่โตเต็มที่อายุ 75-80 วันน้ำหนักตัวไม่ต่ำกว่า 500 กรัม (9,12) จำนวน 59 ตัว และแม่พันธุ์เพศเมียที่โตเต็มที่อายุ 75-80 วัน น้ำหนักตัวไม่ต่ำกว่า 450 กรัม (9, 12) จำนวน 354 ตัว

2. โรงเรือน

ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้ถูกหลักสุขาภิบาล โดยปรับให้อุณหภูมิห้อง 18-22°C. ความชื้นสัมพัทธ์ 50% สัตว์ได้รับแสงสว่าง 12-16 ชั่วโมง/วัน อากาศหมุนเวียน 10-15 ครั้ง/ชั่วโมง (1,10) โดยผ่านเครื่องกรองอากาศให้บริสุทธิ์

3. กรง

ใช้กรงแบบพื้นทึบ (solid floor) ขนาด 70x100x80 มิลลิลิตร พื้นกรงปูด้วยสิ่งรองนอน เป็นกรงผสมพันธุ์ (9)

4. สิ่งปูรองนอน

หญ้าขนอัดฆ่อนอบฆ่าเชื้อโรค ด้วยความดันไอน้ำ 15/lb/in.^{2} อุณหภูมิ 120°C. นาน 1/2 ชั่วโมง (7) โดยเปลี่ยนสิ่งปูรองนอนอาทิตย์ละครั้ง

5. อาหาร

เลี้ยงด้วยอาหารอัดเม็ดที่ผลิตขึ้นเองจากศูนย์ผลิตวัตถุดิบโรคปากและเท้าเปื่อย โดยมีเปอร์เซนต์ความชื้น = 9.19%, ไขมัน = 3.50%, โปรตีน = 23.23%, เยื่อใย = 10.19% คาร์โบไฮเดรต = 45.45%, เถ้า = 8.45%

อาหารเสริม เป็นหญ้าบนสดที่แช่ 1% ด่างทับทิม 15-30 นาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้งในที่ละอาดก่อนจะใช้เลี้ยงสัตว์

6. น้ำ

เป็นน้ำกรองที่มีสมไวตามินซีขนาด 200 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร (1,9,12)

7. สี picric acid

ใช้เป็นสัญญลักษณ์บอกถึงลูกแม่พันธุ์แต่ละตัวดังเช่นในหนึ่งกรงผสมพันธุ์กันจะมีแม่พันธุ์ 6 ตัว ก็ทำสีแม่พันธุ์ตัวที่ 1 ที่หัว ตัวที่ 2 ที่กลางหลัง ตัวที่ 3 ที่สัก ตัวที่ 4 ที่ขาหน้าขวา ตัวที่ 5 ที่ขาหลังซ้าย ตัวที่ 6 ที่ขาหลังขวา

8. วิธีการผสมพันธุ์

8.1 คัดเลือกหนูตะเภาที่มีลักษณะดี ทั้งทางระบบสืบพันธุ์และสุขภาพแข็งแรงเป็นพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ (9)

8.2 ผสมพันธุ์แบบPolygamous group(9,12)

9. บันทึกผล

หลังจากผสมพันธุ์นาน 2 1/2 เดือน หนูตะเภาแม่พันธุ์จะเริ่มคลอดลูก จดบันทึกผลจำนวนลูกที่ได้ต่อแม่ เพศ น้ำหนักลูกแรกเกิดแต่ละตัว น้ำหนักแม่พันธุ์ทั้งก่อนคลอดและหลังคลอด ระยะห่างของการคลอดลูกอีกครั้ง น้ำหนักลูกหนูตะเภาเมื่ออายุ 1 และ 2 สัปดาห์จนกระทั่งแยกลูกออกจากแม่พันธุ์ และจำนวนลูกที่ตายต่อแม่

ผลการทดลอง

อัตราการเจริญเติบโตของลูกหนูตะเภา ที่คลอดจากแม่พันธุ์ที่ให้ลูกดีราวละ 1-2 ตัว/แม่ จะมีขนาดน้ำหนัก

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต, เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอด กับจำนวนลูก/แม่

Age	No. of youngster (head)																								
B.W.	Birth/ B.W (grams)					1 wk/B.W. (grams)					2 wk/B.W. (grams)					Total							No.of dead		Morta-lity
Lit. size	51-100	101-150	151-200	201-250	251-300	51-100	101-150	151-200	201-250	251-300	51-100	101-150	151-200	201-250	251-300	No. of litter T.	M	F	M+F	No. of baby T.	M	F	birth 1 wk.	2 wks.	(%)
1	5	14*	-	-	-	1	4	10*	4	-	-	1	4	19*	5	9	12	7	-	19	12	7	-	-	0.00
2	27	76*	1	-	-	1	26	56*	11	-	-	-	24	53*	18	52	11	11	30	104	52	52	4	-	3.85
3	165*	150	-	-	-	11	137*	143*	15	-	7	15	108*	139*	23	105	10	16	79	315	146	169	9	3	3.81
4	365*	102	1	-	-	50	285*	102	-	-	5	55	245*	107	13	117	9	5	103	468	238	234	31	17	10.26
5	219*	16	-	-	-	50	164*	14	-	-	6	80	122*	18	1	47	0	0	47	235	99	136	8	-	3.4
6	77*	1	-	-	-	15	43*	5	5	-	3	14	40*	5	-	13	0	0	13	78	34	44	15	1	20.51
7	5	2	-	-	-	4*	3	-	-	-	-	3	3	-	-	1	0	0	1	7	2	5	-	1	14.29
T.	863	361	2			132	662	330	35		21	168	547	341	60	354	42	39	273	1226	579	647	67	22	
	=1226					1159(+67+22) =1226					1137(+67+22) =1226												5.46	1.79%	
																							7.25%		

T. = Total, B.W. = body weight, M = Male, F = Female, lit. = litter

ตารางที่ 2 น้ำหนักตัวของหนูตะเภาแม่พันธุ์หลังคลอดลูกแต่ละครั้ง

จำนวนลูก/แม่ คลอดครั้งที่ 1- คลอดครั้งที่ 2	น้ำหนักตัวแม่พันธุ์ % เพิ่มขึ้น	% ลดลง
จำนวนน้อย - จำนวนมาก	27.17	18.48
จำนวนมาก - จำนวนน้อย	23.91	13.04
จำนวนเท่ากัน	11.96	5.43
Total	63.04	36.95

ตัวแรกเกิด (101-150 กรัม/ตัว) มากกว่าลูกหนูตะเภาที่คลอดจากแม่พันธุ์ที่ให้ลูกดกราวละ 3-7 ตัว/แม่ (51-100 กรัม/ตัว) แต่แม่พันธุ์ที่ให้ลูกดกราวละ 3 ตัว/แม่นั้น แม้ว่าน้ำหนักตัวของลูกแรกเกิดจะต่างกันแต่เมื่อถึงเวลาแยกลูกหย่านมออกจากแม่พันธุ์นั้น ก็ปรากฏว่าน้ำหนักตัวก็จะเท่ากับลูกที่เกิดจากแม่พันธุ์ที่มีจำนวน 1-2 ตัว/แม่ (201-250 กรัม/ตัว) (9,12) ส่วนแม่พันธุ์ที่ให้ลูกดกราวละ4-7 ตัว/แม่ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตช้า และอัตราการตายสูง (3.4-20.51%) (12) ดังตารางที่ 1 และ figure 1

ระยะห่างของการคลอดลูกครั้ง นาน 48-88 วัน (เฉลี่ย 68.09 วัน) (8)

หนูตะเภาแม่พันธุ์ที่ให้ลูกหลายครั้งมีโอกาสน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น(63.04%) มากกว่าที่น้ำหนักตัวจะลดลง(36.05%) ดังตารางที่ 2

สรุปและวิจารณ์

ในการศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางชีววิทยาและกายภาพกับจำนวนลูก/แม่ของหนูตะเภาโดยใช้พันธุ์ Thai-local black ear hartley ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความไวต่อโรคปากและเท้าเปื่อย (9,11) โดยใช้เป็นสัตว์ทดลองแทนโค และสกร ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีราคาแพง และหาได้ยาก (1,9,13)

ระดับคุณค่าทางโภชนาการที่สัตว์ได้รับ และจำนวนลูกสัตว์/แม่ มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญเติบโต และเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของลูกสัตว์ (12)หนูตะเภาแม่พันธุ์ที่ได้รับการผสมแบบ Polygamous group (9,12) และให้ลูกดราวละ 3.0-4.0 ตัว/แม่(9) เป็นจำนวนพอเหมาะที่สุดสำหรับหนูตะเภาที่เลี้ยงอยู่ที่ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จากผลการทดลองนับว่า

ก. ควรจะทำการคัดเลือกเก็บเลี้ยงเฉพาะหนูตะเภาที่มีลักษณะสุขภาพแข็งแรงดีไม่เกิน 4 ตัว/แม่ และควรทำลายจำนวนที่เกินตั้งแต่แรกเกิดเพื่อไม่เป็นการรบกวนหรือขัดขวางการเจริญเติบโต ของสัตว์ที่คัดเลือกเก็บเลี้ยงไว้ตลอดจนสุขภาพของแม่สัตว์เองด้วย (12)

ข. งานเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองหนูตะเภา ควรดำเนินการอย่างถูกหลักสุขาภิบาล ดังที่ได้แสดงให้เห็นจากผลการทดลอง และผลิตที่ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา เพื่อให้ได้หนูตะเภาที่มีคุณภาพดีปลอดเชื้อโรค ซึ่งเป็นผลให้การวิจัยทดลองถูกต้องแม่นยำ

กิตติกรรมประกาศ

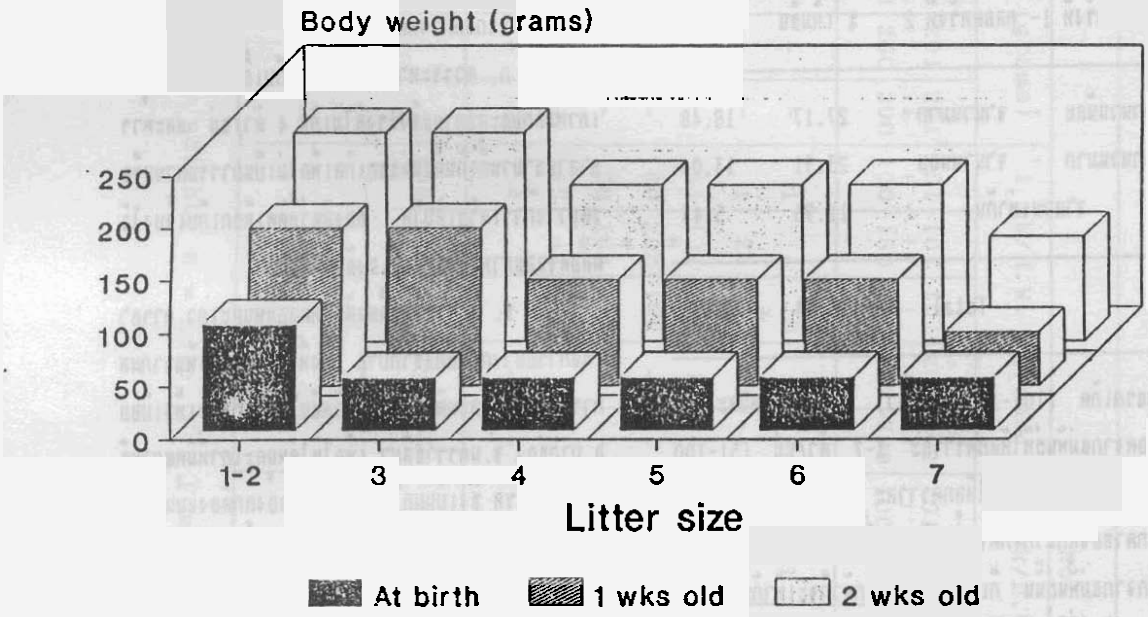
ขอขอบคุณ ร.ต.สุธรรม มุขยอุปพัทธ์ ผู้อำนวยการกองผลิตชีวภัณฑ์, น.สพ.ทินกร จันดาแก้ว หัวหน้าศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้การสนับสนุนงานทดลอง และ น.ส.เพ็ชรี ศรประสิทธิ์ สถานีทดอาหารสัตว์ อ.ปากช่อง ที่ได้วิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ให้

เอกสารอ้างอิง

1. Arrington, L.R.1972 Introductory laboratory animal science. The breeding care and management of experimental animals. The interstate publish, Danville, Illinois U.S.A. pp.1-2,82 121.

2. Wagner, J>E. 1976 Introduction and Taxonomy. In: The Biologyy of the Guinea-pig (J.E. Wagner, P>J> Manning, eds.). Academic Press, New York,NY. PP. 1-4.

Fig.1 Litter size & Body weight of youngster before weanling



3. Wagner, J.E., Manning, P.J. (eds.). 1976. The Biology of the Guinea pig. Academic Press, New Yourk, NY.

4. National Research Council (U.S.) 1979. Animals for Research : A directory of Sources (10th ed.), Nationa Academy of Science,Washington,DC.

5. Ediger. R.D. 1976. Care and Management. In: The Biology of the Guinea-pig (J.E. Wagner, P.J. Manning, eds.). Academic Press, New York,NY.pp.5-12

6. ASH, G.W. 1975.When is a husbandry method proven after 10 years ? Guinea pig News Letter 9,27.

7. Laboratory Animals Center Diiets Advisory Committee,1977.Guinea-pigs.In:Dietary Standards for Laboratory Animal, Medical Research Council, Cdarshalton, UK. pp 16-17.

8. Festing, M.F.W.1976.The Guinea pig. In: The UFAW. Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. churchill Livingstone,London, UK.pp. 229-247.

9. Canadian Council on Animal Care. 1984. Guide to the care and use of experimental animals. Vol.2., Ottawa, Ontario pp. 103-112.

10. Fox, J.G., Cohen, B.J., Loew, F.M., 1984. Biology and diseases of Guinea pigs. In: Laboratory animal Medicine. Academic press, UK, pp. 149-182.

11. Kongthon, S.,1981.Foot and Mouth disease virus adapted in Guinea-pig.Department of Livestock Development Ministry of Agriculture and

Cooperatives., pp. 150-154.

12. Worden, A.N., Peter, W.L.1957.The Guinea pig. In: The UFAW Handbook on the care and management of Laboratory Animals. (2nd ed.), The Courier printed, Tunbridge Wells, Kent, England. pp. 203-343.

13. สุนจล คงทน และคณะ 2529. ความสัมพันธ์ประสิทธิภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโค สุกร และหนะเภา ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการปศุสัตว์ครั้งที่ 5 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ น. 366-382.

ความคงรอดของสารแขวนลอยสปอร์แอนแทรกซ์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°-8°C. และที่อุณหภูมิห้อง

Viability of antrax spore suspension at 4°-8°C and at room temperture.

แก้วมณี กองสมัคร[1] รัชนี อัตถิ[2]

Kaomanee Kongs aak Ratchanee Utthi

บทคัดย่อ

การทดลองหา viability ของสปอร์แอนแทรกซ์ ที่มีความเข้มข้นต่างกันในสารละลาย 50% Glycocal saline หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°-8°C และอุณภูมิห้อง เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าปริมาณ viable spore จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บ และในอัตราการตายของสปอร์ดังที่ ส่วนอิทธิพลของความเข้มข้นสปอร์ต่อviability พบว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°-8°C สารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นสปอร์ตั้งแต่ 6.0 x 10^4 ถึง 4.8 x 10^8cfu/ml จะยังคงมีอัตราการตายเท่ากัน แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง หากที่มีความเข้มข้นสปอร์ต่ำกว่า 4.2 x 10^7cfu/ml จะมีอัตราการตายสูงขึ้นและไม่สามารถเก็บได้นานถึง 12 เดือน สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสปอร์ 6.0 x 10^4 และ 5.7 x 10^5cfu/ml ดังนั้นการเก็บในอุณหภูมิ 4°- 8°C นอกจากนี้สามารถคาดคะเนระยะเวลาที่เก็บได้ และปริมาณความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นได้โดยการคำนวนจาก survival curve ที่ได้ ซึ่งเป็นเส้นตรง

คำนำ

ค่า viability ของเชื้อแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อหลายๆด้านอาทิเช่น การเก็บสต๊อคเชื้อที่ต้องการในห้องปฏิบัติการทางแพทย์หรือในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มซึ่งต้องใช้เชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์ในการหมัก สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีนก็มีความเกี่ยวข้องโดยเป็นค่าที่ใช้ในการกำหนดอายุการเก็บของวัคซีนชนิดเชื้อเป็นตลอดจนการทดสอบคุณภาพปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อค่า Viability ของเชื้อแบคทีเรียได้แก่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรด ด่างและอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมซึ่งเชื้อแบคทีเรียอยู่ โดยอาจอยู่ในสภาพแขวนลอย หรือสภาพแห้งก็ได้ (Mead,1959)

การทดลองครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความคงรอด (Viability) ของสปอร์ของเชื้อ Bacillus anthracis ในสารละลาย 50% glycerol saline ซึ่งมีคุณสมบัติในการเก็บรักษาสปอร์และทำลายVegetative form ของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเก็บที่อุณหภูมิระหว่าง 4°-8°C. และที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ทราบถึง Viability, Death rate และรูปแบบของ Survival curve เมื่อเก็บในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตลอดจนผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของสปอร์ต่อความคงรอดด้วย ทั้งนี้ผลการทดลองสามารถนำไปเป็นแนวทางในการยืดอายุการเก็บวัคซีนแอนแทรกซ์ ซึ่งผลิตโดยกรมปศุสัตว์และประมาณค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสปอร์ที่เหมาะสม ปัจจุบันวัคซีนแอนแทรกซ์ถูกกำหนดอายุการเก็บเพียง 8 เดือน ที่อุณหภูมิ 4°-8°C. ซึ่งเป็นปัญหาต่อการผลิต เนื่องจากความต้องการวัคซีนก็ต่อเมื่อเกิดโรคการเก็บสต๊อควัคซีนไว้ไม่ได้นานทำให้ต้องมีการทำลายทิ้ง

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

bacillus anthracis สเตรน 34 F2 ซึ่ง

---

1 สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

2 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

เป็นสเตรนที่ไม่สร้างแคปซูลไม่มีความรุนแรงแยกโดยSterne (1937) และเป็นสเตรนที่ใช้ผลิตวัคซีนสปอร์แอนแทรกซ์ในปัจจุบัน

วัคซีนสปอร์แอนแทรกซ์

ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนสปอร์จากเชื้อ Bacillus anthracis สเตรน 34 F2โดยวิธีของ Sterne (1939) มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสปอร์เท่ากับ 1.5 x 10^7 cfu/ml. บรรจุในปริมาตร 10 ml.ในขวดวัคซีน ขนาด 12 ml.

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

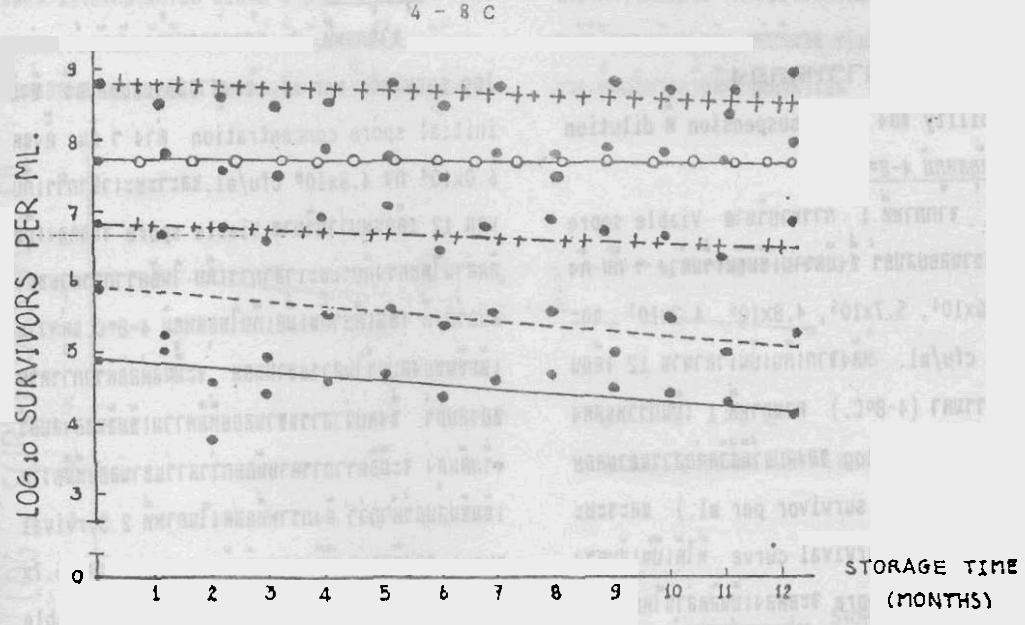
เตรียมโดยวิธีการ เช่นเดียวกับการผลิตวัคซีนสปอร์แอนแทรกซ์ ด้วยการเพาะเชื้อบน Tryptose agar (Difco) ปริมาตร 250 ml.ที่บรรจุใน Roux flask ขนาด 1 ลิตร นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 37°C. 3 วัน แล้วนำมาเก็บต่อในที่มืดในอุณหภูมิห้องอีก 3-4 วัน ตรวจสอบการเกิดสปอร์ด้วยการย้อมด้วยสี Malachite greenความมีการสร้างสปอร์ 80-90% จึงล้างเชื้อออกด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 30 ml. พร้อมกับลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มม. เพื่อช่วยการล้างเชื้อ แล้วจึงเติม Pure Glycerol ลงไปในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายเชื้อที่ได้ ทำให้มีปริมาณ Glycerol ในสารละลายนั้น = 50% เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ในอุณหภูมิห้อง 2 สัปดาห์ จึงนำ spore suspension นั้นมาหาค่า Viable spore แล้ว dilute ด้วยสารละลาย 50% Glycerolในnormal saline ให้มีความเข้มข้นของ Viable spore ในขนาดต่าง ๆ กัน แบ่งใส่ขวด ขนาด 12 ml. ในปริมาณขวดละ 5 ml. หาค่า Viable spore ในแต่ละขวด เพื่อเป็นค่า Initial spore concentration แล้วนำเก็บที่อุณหภูมิ 4°-8°C.ในตู้เย็นธรรมดาส่วนหนึ่งและในอุณหภูมิห้องอีกส่วนหนึ่ง

การเลือกตัวอย่าง (Sampling)

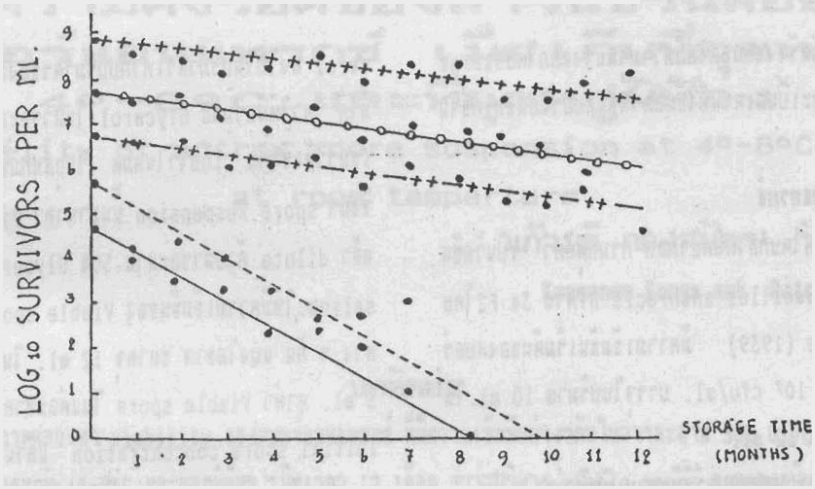
ตัวอย่างจากวัคซีนแอนแทรกซและ spore suspension ที่ dilution ต่าง ๆ และที่อุณหภูมิต่างกันอย่างละ 2 ขวด จะถูกนำมาตรวจหาจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน โดยตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน

การหาปริมาณสปอร์ที่มีชีวิต (Viable spore count)

หาค่า Viable spore ด้วยวิธี Pour plate



ภาพที่ 1 แสดงปริมาณของ Viable spore จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บและในอัตราการตายของ spore คงที่



ภาพที่ 2 แสดงปริมาณของความเข้มข้นของ spore เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง

(Baker, 1980) มีวิธีทำดังนี้ ดูดตัวอย่างมาอย่างละ 1 ml. นำมาเจือจางโดยเริ่มต้นที่ dilution 1:10 สำหรับ dilution แรกใส่ลูกแก้วลงไปช่วยเขย่า พร้อมกับใช้ Tube mixer ประมาณ 5 นาที เพื่อช่วยให้สปอร์หมักจับตัวกันแยกออกจากกัน แล้วจึงเจือจางต่อไปแบบ 10-fold dilution โดยใช้สารละลาย Ringer (Baker,1980) เป็นตัวละลาย แล้วเพาะลง Tryptose agar plate จำนวน 3 plate นับจำนวนโคโลนีหลังจากบ่มที่ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

1. viability ของ spore suspension ที่ dilution ต่าง ๆ *ที่อุณหภูมิ 4-8°C.*

จากภาพที่ 1 การหาปริมาณ Viable sopre ของสารแขวนลอยสปอร์ ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต่าง ๆ กัน คือ 6.0×10^4, 5.7×10^5, 4.8×10^6, 4.2×10^7 และ 4.8×10^8 cfu/ml. หลังจากเก็บเป็นเวลานาน 12 เดือน ในตู้เย็นอุณหภูมิ (4-8°C.) ตามภาพที่ 1 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าlog ของสปอร์ที่มีชีวิตต่อสารแขวนลอยปริมาตร 1 ml. (log survivor per ml.) และระยะเวลาการเก็บพบว่า survival curve ที่ได้เป็นเส้นตรง โดยปริมาณ Viable spore จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บ และในอัตราการตายของสปอร์ที่คงที่

อิทธิพลของปริมาณความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้นในแต่ละตัวอย่าง จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นสปอร์ที่แตกต่างกันระหว่าง 6.0×10^4 ถึง 4.8×10^8 cfu/ml.นั้น ไม่มีผลต่ออัตราการตายของสปอร์ซึ่งจะเห็นได้ว่า curve ที่ได้ตามภาพที่ 1 เป็นเส้นขนานกัน เนื่องจากมี Slope เท่ากัน แสดงว่าในแต่ละความเข้มข้นจะมีอัตราการตายของสปอร์เท่ากัน

2.Viability ของ spore suspension ที่ dilution ต่าง ๆ *ที่อุณหภูมิห้อง*

จากภาพที่ 2 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log survivor per ml. ของสารแขวนลอยสปอร์ ซึ่งมี initial spore concentration ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 6.0×10^4 ถึง 4.8×10^8 cfu/ml.และระยะเวลาการเก็บนาน 12 เดือนพบว่าปริมาณ Viable spore จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บ ในอัตราการตายของสปอร์คงที่ เช่นเดียวกันเมื่อเก็บในอุณหภูมิ 4-8°C.แต่ความเข้มข้นของสปอร์ในสารแขวนลอย จะมีผลต่ออัตราการตายของสปอร์ ซึ่งพบว่าสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นสูง จะมีอัตราการตายน้อยกว่าสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นสปอร์ต่ำกว่า ดังกราฟที่แสดงในภาพที่ 2 Survival curve ของตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 6.0×10^4 และ 5.7×10^5 มีค่า slope มากกว่าตัวอย่างอื่นและจำนวน Viable spore จะลดลงจนหมดไม่เหลืออยู่เลยในเวลา 8 และ 10 เดือนตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงกว่า

ยังคงมี Viable spore อยู่

3. Viability ของวัคซีนแอนแทรกซ์

วัคซีนสปอร์แอนแทรกซ์มีความเข้มสปอร์ เริ่มต้น $1.5x10^7$ cfu/ml. หลังจากเก็บในอุณหภูมิ 4-8°C. และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าวัคซีนซึ่งเก็บในที่เย็นมีอัตราการตายของสปอร์น้อยกว่าวัคซีน ที่เก็บในอุณหภูมิห้องธรรมดา ดังแสดงในภาพที่ 3 เส้นกราฟของวัคซีนที่เก็บ 4-8°C. มี slope น้อยกว่าเส้นกราฟของวัคซีนที่เก็บในอุณหภูมิห้อง และปริมาณสปอร์ที่เหลืออยู่เท่ากับ $1.4x10^7$ และ $1.3x10^6$ cfu/ml. สำหรับวัคซีนที่เก็บใน 4-8°C. และอุณหภูมิห้องตามลำดับ

วิจารณ์

Viability ที่ได้จากการทดลองนี้สำหรับ Anthrax spore suspension ที่ dilution ต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4-8°C. และที่อุณหภูมิห้องแล้วควรจะเก็บในตู้เย็น 4-8°C. ดีกว่าทั้งนี้เพราะมีอัตราการตายของสปอร์ที่ต่ำกว่า ดังนั้นจึงแนะนำสำหรับการเก็บวัคซีนสปอร์แอนแทรกซ์ซึ่งเป็น Anthrax Spore suspension เช่นกัน จึงให้เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-8°C.

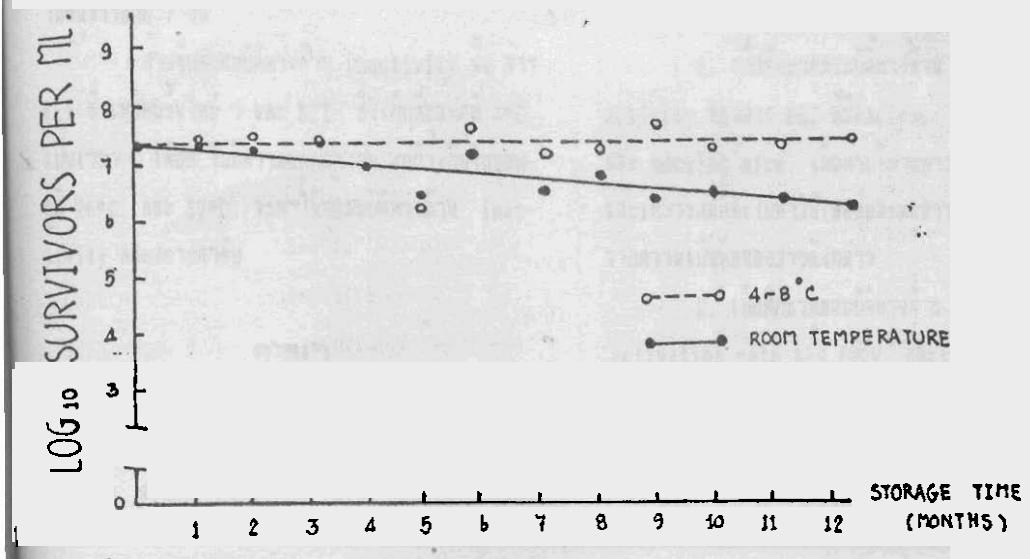
ความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นยิ่งสูงก็ยิ่งทำให้สารแขวนลอยมีความ stable สูง ถึงแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิห้องก็ตาม จะพบว่า Initial spore concentration ที่สูงที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือ $4.8x10^8$ cfu/ml. จะมีความคงอยู่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องดีเท่ากับเมื่อเก็บที่ 4°C. เป็นเวลา 12 เดือน แต่เมื่อลดความเข้มข้นเริ่มต้นลงเป็น $4.2x10^7$ ลงไป จะเริ่มมีอัตราการตายสูงขึ้นและเมื่อลงลงจนถึง $5.7x10^5$ cfu/ml. จะไม่สามารถเก็บได้นานถึง 12 เดือน ในอุณหภูมิห้อง

ในการคาดการณ์ระยะเวลาการเก็บ หรือปริมาณความเข้มข้นสปอร์ในAnthrax spore suspension หรือ Anthrax spore vaccine ก็อาจใช้ประโยชน์จาก Survival curve ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ โดยการคำนวณจากสัดหลักของกราฟเส้นตรงได้ คือ $Y=a+bx$

โดยการแทนค่า Y หมายถึง log ของจำนวนสปอร์มีชีวิตหลังเก็บเป็นเวลา..., a หมายถึงค่า log ของ Initial spore concentration, b หมายถึง slope ของกราฟ และ x หมายถึงระยะเวลาเป็นเดือน

ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการ กำหนดปริมาณสปอร์เริ่มต้น และกำหนดระยะเวลาเก็บที่อุณหภูมิห้องได้

ค่าความคลาดเคลื่อนของ Viable spore ที่หาได้จากการทดลองนี้ เกิดเนื่องจากสปอร์ของแอนแทรกซ์มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มกัน แต่ปริมาณ Viable spore จะไม่มีการเพิ่มปริมาณหรือมีการแบ่งตัวเป็น Vegetative form



ภาพที่ 3

ของแบคทีเรียดังกล่าวแล้ว

สรุป

อุณหภูมิของการเก็บ มีผลต่อความคงรอดของสาร แขวนลอยสปอร์แอนแทรกซ์ โดยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4-8°C.จะมีอัตราการคงรอดสูงและคาดว่าจะเก็บได้นานกว่า ที่อุณหภูมิห้อง

อิทธิพลของปริมาณความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ต่างกัน จะมีผลต่ออัตราการคงรอดของสารแขวนลอยสปอร์ โดยเฉพาะเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงจะมีอัตราการตายน้อยกว่าที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

Survival curve ที่ได้เป็นเส้นตรงโดยปริมาณ Viable spore ลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บ

เอกสารอ้างอิง

Baker, F.J. and Breach, M.R. 1980. Medical Microbiology Techniques,Butterworth & Co. (Publishers) Ltd, London.

Mead, D.D., Wessman, G.E. Higuchi, K. and Surgalla, M.J. 1960. Stability of of cell suspensions of Pasteurella pestisat 5°C.and at -23°C.and Appl. Microbiol. 8, 55-60.

Sterne, M. 1937. Variation in Bacillus anthracisII.Some correlations Between colony variation and pathogenicity strains of Bacillus anthracis Onderstepoort J.Vet.Sci.Anim. Indust. 8:279-349.

Sterne, M. 1939. The use of anthrax vaccines prepared avirulent (uncapsulated) variants of Bacillus anthracis Onderstepoort J.Vet. Sci.Anim. Indust. 13:307-312.

อิทธิพลของการเก็บและการเตรียมสาร Binary Ethylene Imine (BEI) ต่อการเป็นพิษและคุณสมบัติในการ Inactivation ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

Influence of storage and treatment of binary ethylene imine (BEI) on Toxicity and inactivating activity to foot and mouth disease virus

สมใจ กมลศิริพิชัยพร[1] นงลักษณ์ ชลสินธ์[2] วิไล ลินจงสบงกช[1]

Somjai Kamolsiripichaiporn Nonglak Cholsindhu Milai Linchongsubongkoch

ABSTRACT

The binary ethylene imine (BEI) that use for inactivating foot and mouth disease virus has some properties in toxicity and inactivating activity when kept in different temperature.

Toxicity of BEI to tissue culture cell was higher than in mice. Toxicity increased after keeping at 37°C.

The BEI kept one month at 4°C. has the inactivating activity as same as the freshly prepared. However,this activity was reduced if the BEI was kept at 26°C. or 37°C.

บทคัดย่อ

สาร binary ethylene imine (BEI) ซึ่งใช้เป็นตัว inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในการผลิตวัคซีนนั้น มีคุณสมบัติทั้งทางด้าน inactivity และ toxicity โดยหากให้เกิด toxicity ต่อ tissue culture cell (BHK-cell) ได้สูงกว่าการเกิด toxicity ในหนูขาวอายุ 7 วัน

สำหรับคุณสมบัติทางด้าน inactivity นั้น สาร BEI ซึ่งเตรียมขึ้นใหม่ ๆ และ BEI ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ถ้าเก็บในอุณหภูมิ 26°C. และ 37°C. จะทำให้คุณสมบัติทางด้าน inactivity ลดลงตามลำดับ

คำนำ

ในการ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น แต่เดิมได้ใช้ฟอร์มาลินเป็นตัว inactivant ต่อมาพบว่าสาร Binary ethylene imine (BEI) เป็นตัว inactivant ได้ดีกว่า แต่อาจจะมีการเป็นพิษต่อเซลล์คัลเจอร์ ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร BEI เมื่อใช้เป็นตัวinactivant โดยหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม, การเก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน, วิธีการเตรียมหรือการเตรียมในปริมาณมาก ๆ เพื่อเก็บไว้ใช้นาน ๆ ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้อาจทำให้คุณสมบัติในด้านการ inactivate ไวรัสของสาร BEI เปลี่ยนไปและอาจเกิดการเป็นพิษขึ้นได้

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้าน toxicity และ activity ของสาร BEI ที่มีต่อtissue culture cell และ sucking mice เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นมากที่สุดและเหมาะสมที่จะไม่ทำให้เซลล์และหนูขาวเกิดตาย เนื่องจากความเป็นพิษของสารดังกล่าว

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้าน kinetic inactivation rate ของ FMDV และเปรียบเทียบสารละลาย BEI ซึ่งเตรียมขึ้นใหม่ ๆ กับสารละลาย BEI ซึ่งเก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อจะศึกษาว่า BEI ยังคงมีคุณสมบัติทางด้าน inactivated FMDV

1 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 2 ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

ได้ดีหรือไม่ เพื่อประโยชน์ในการเตรียมปริมาณมาก ๆ เพื่องานผลิตวัคซีนต่อไป โดยสามารถประหยัดเวลาและสะดวกในการนำออกใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาด้าน toxicity ของสาร BEI และสาร sodium thiosufate ที่มีต่อ BHK-Cell และหนูขาวอายุ 7 วัน

เตรียม2% BEI จากtable 1 ทำการsterile โดยวิธีต่าง ๆ คือ กรองผ่าน membrane filter และวิธีนำเข้า autoclave เพื่อเปรียบเทียบ BEI ที่เตรียมใหม่ในขณะใช้โดยไม่ต้อง sterile ส่วน sodium thiosulfate ใช้ความเข้มข้น 0.5% นำสารเหล่านี้มาทำให้เป็นสารละลายเจือจาง 1:1, 1:2, 1:4, 1:8.....1:256 นำไปฉีดในหนูขาวอายุ 7 วัน และ BHK-cell จากนั้นดูความเปลี่ยนแปลงของหนูขาวและเซลล์

2. ทดลองเกี่ยวกับ toxicity ของ BEI ที่มีต่อเซลล์และหนูขาวโดยเตรียม BEI เก็บในสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บต่างกัน คือ เก็บที่ 4°C., 26°C. และ 37°C.และ fresh BEI เป็นกลุ่มชันชัน นำ BEI เก็บในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ กันเป็นเวลา 1,2,3 และ 4 สัปดาห์ นำไป inoculate ใน BHK-Cell หก ๆ สัปดาห์โดยมีกลุ่มชันชันเป็น fresh BEI ที่เตรียมได้ใหม่ ๆ

3. ทดลองคุณสมบัติของ BEI ในการ inactivate virus โดยเตรียม BEI และเก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับ fresh BEI เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของ BEI ในการ inactivate virus วิธีการโดยใช้ BEI ที่เก็บที่ 4°C., 26°C., และ 37°C. เป็นเวลา 1 เดือน และ fresh BEI เป็นกลุ่มชันชัน นำ BEI ทั้ง 4 ชนิดผสมกับ FMD O/Bangkok/60 โดยคำนวณความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0117% บ่มในอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ในระหว่างนั้นทำการเก็บไวรัสทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยเติม sodium thiosulfate (0.5% final) เป็นตัวหยุดปฏิกิริยาของ BEI จากนั้นนำตัวอย่างไวรัสไปทำ virus titration เพื่อหา kinetic inactivation activity ของ BEI ในแต่ละกลุ่ม

4. ทดลองคุณสมบัติของ BEI ในการ inactivate virus โดยใช้ BEI ที่เตรียมใหม่ๆ กับ BEI ที่เก็บที่ 4°C.เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (influent of storange period on inactivating activity of BEI to FMD virus) วิธีการใช้ BEI ที่เก็บใน 4°C.เป็นระยะเวลาต่างกัน คือ 10,20,30 และ 60 วัน เปรียบเทียบกับ fresh BEI โดยนำไปผสมกับ FMD O/Bangkok/60 โดย final concentration = 0.0117%

5. ทดลองคุณสมบัติของ BEI ในการ inactivate virus ซึ่งเตรียมมาจากแหล่งกำเนิดต่างกัน(inactivate curves of FMD O/Bangkok/60 produce from different cell source)

วิธีการใช้ BEI นำมาผสมกับ FMD type O ซึ่งเตรียมจาก monolayer cell และ suspension cell ไวรัสที่ใช้มีดังนี้

$T\text{-}TM_{10}$: FMDV เตรียมจาก monolayer cell ผ่าน BHK-Cell ได้ 10 passage

$S\text{-}TS_{10}$: FMDV เตรียมจาก suspension cell ผ่าน BHK-L ได้ 10 passage

$T\text{-}TS_{10}$: FMDV ได้จาก monolayer cell ผ่านลงใน suspension cell ได้ 10 passage

$S\text{-}TM_{10}$: FMDV จาก suspension cell ผ่านลงใน monolayer ได้ 10 passage

วิธีการดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.

ผล

1. ผลการเปรียบเทียบ BEI ซึ่งฆ่าเชื้อโดยวิธีต่างๆ จะมีคุณสมบัติด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ได้สูงกว่าความเป็นพิษในหนูขาวคือ ทำให้เซลล์เปลี่ยนลักษณะรูปร่างไปจากเดิม และมีเซลล์ตายเกิดขึ้น ส่วนในหนูขาวจะทำให้หนูขาวตายพบว่าความเข้มข้นของ BEI เมื่อทำให้จางเป็น 1:128 ของ 2% BEI หรือ 0.014% ยังสามารถทำให้เซลล์ตายได้ ส่วนในหนูขาวความเข้มข้น 1:4 ของ BEI หรือ 0.5% จะทำให้หนูตาย แสดงว่า BEI ให้ความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า

Fig. 1. Influence of BEI Treatment on Toxicity to Cell and Suckling Mice

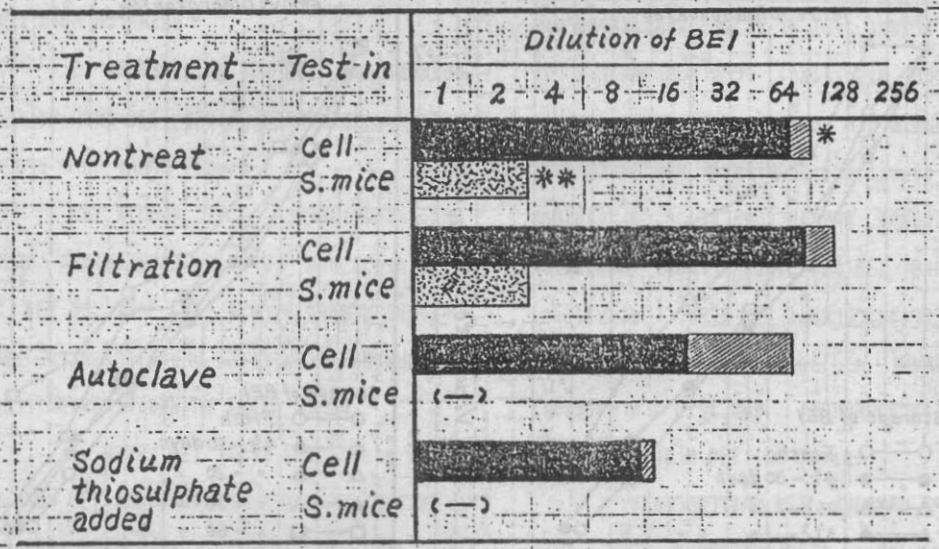


Fig. 2. Influence of BEI Storage on Toxicity to Cell.

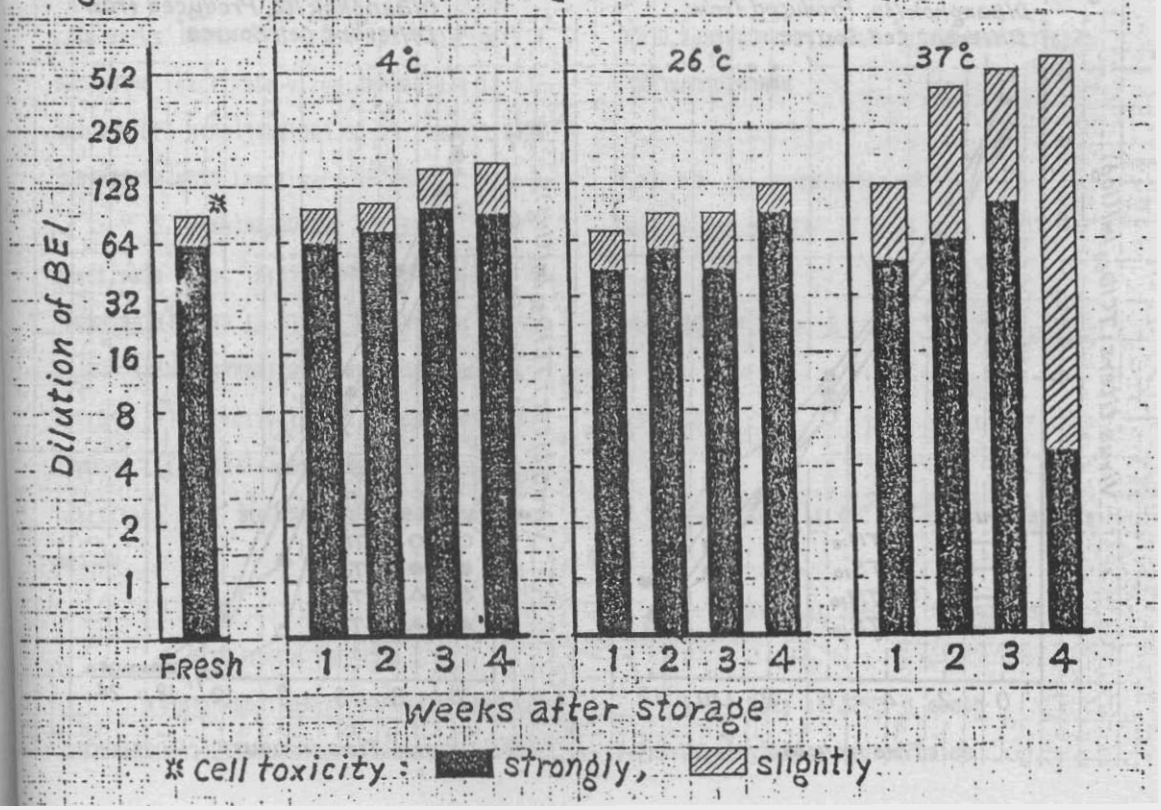


Fig. 3. Influence of Storage Temperatures on Inactivating Activity of BEI to FMD Virus

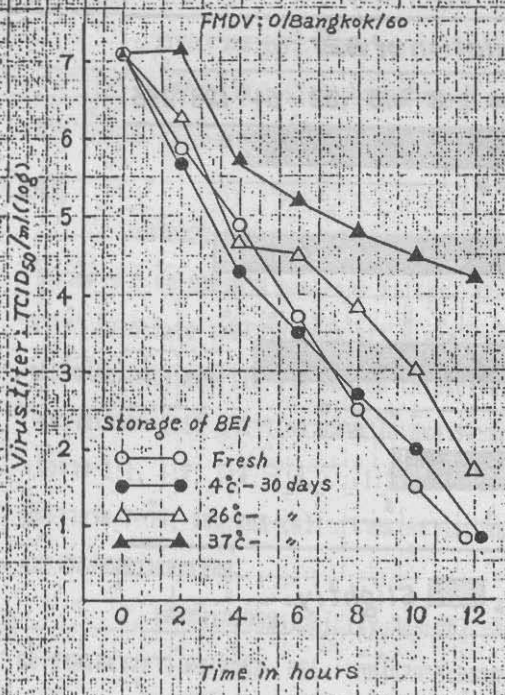


Fig. 4. Influence of Storage Period on Inactivating Activity of BEI to FMD Virus

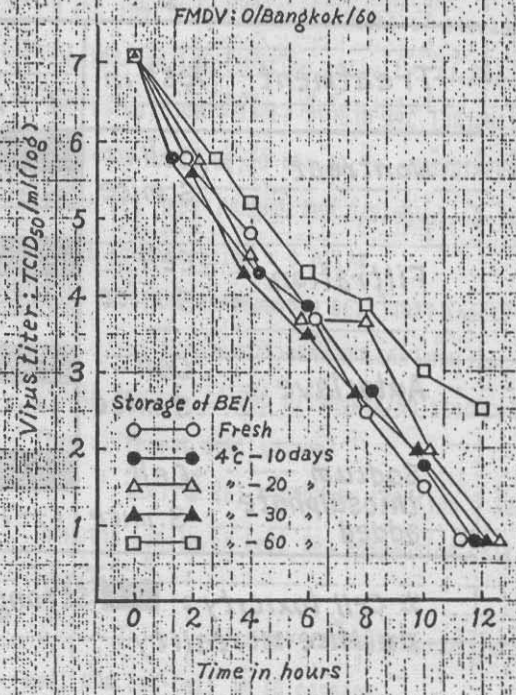


Fig. 5-1. Inactivation Curves of FMDV O/Bangkok/60, Produced from Different Cell Source

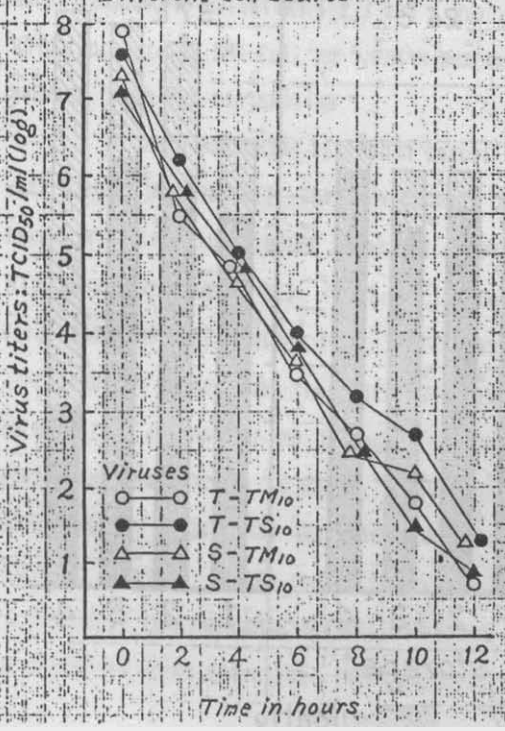
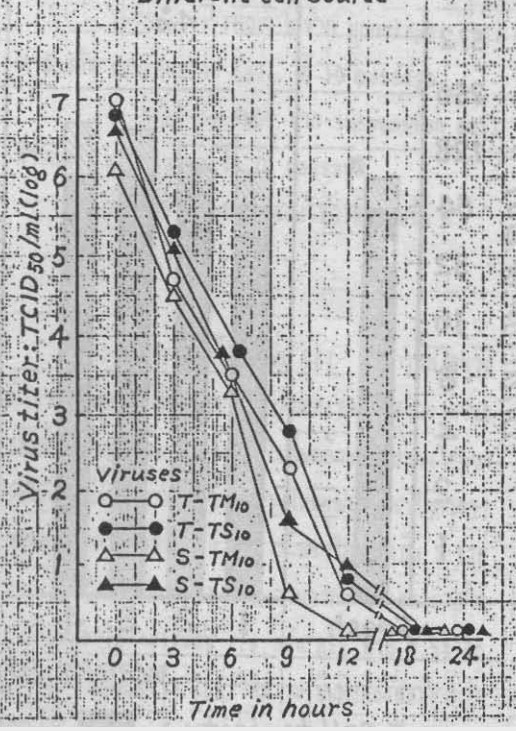


Fig. 5-2. Inactivation Curves of FMDV O/Bangkok/60, Produced from Different Cell Source



ในหนูขาว ดังแสดงใน Figure 1

การใช้ sodium thiosulfate ความเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตายต้องใช้ความเข้มข้นสูงสุด 1:16 ส่วนในหนูขาวไม่ได้ทำการทดลอง

2. ผล Toxicity ของ BEI ที่มีต่อเซลล์และหนูขาวโดยเตรียม BEI และเก็บในสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน จากรูป Figure 2

BEI ที่เก็บใน 37°C. ให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด และสูญเสียคุณสมบัติเดิมไป ส่วน fresh BEI, 4°C. BEI และ 26°C. BEI จะทำให้เซลล์ตาย เนื่องจาก Toxic ในระดับใกล้เคียงกัน แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงบางประการเกิดขึ้นทำให้เซลล์เกิด Toxic มากขึ้น

3. ผลของ BEI ในการ inactivate virus โดยเตรียม BEI และเก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือน ยังคงมีคุณสมบัติในการ inactivate virus ได้ดี ส่วน BEI ที่เก็บใน 37°C. เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเริ่มมีการสูญเสียคุณสมบัติทางด้าน inactivate virus

4. แสดงผลคุณสมบัติของ BEI ที่เก็บใน 4°C. เป็นเวลา 10-30 วัน ยังคงให้คุณสมบัติในการ inactivate virus ได้ดีพอ ๆ กับ fresh BEI จาก Figure 4 และสามารถ inactivate virus ได้หมดภายใน 12 ชั่วโมง ส่วน BEI ที่เก็บไว้เป็นเวลา 60 วัน เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการ inactivate ได้ไม่หมด

5. ผลของคุณสมบัติของ fresh BEI ในการ inactivate virus ที่เตรียมจากแหล่งกำเนิดต่าง ๆ กัน ได้สมบูรณ์ภายในเวลา 12 ชั่วโมง แม้ว่าจะปล่อยไว้จน 24 ชั่วโมง จะไม่มีไวรัสหลงเหลืออยู่เลย จาก Figure 5-1 และ 5-2 ค่า infectivity titre ของไวรัสแต่ละชนิดไม่พบว่ามี titre หลงเหลืออยู่ แสดงว่า BEI มีคุณสมบัติ inactivate FMDV ได้หกชนิด แม้ว่าจะเตรียมมาจากเซลล์ที่ต่างกัน

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของ BEI ในด้านคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์และต่อหนูขาวนั้น แสดงว่า BEI ให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ได้สูงกว่าหนูขาว ปริมาณความเข้มข้น 0.014% ในกรณีใช้ fresh BEI ถ้าใช้ BEI ในแง่ของการ inactivate ไวรัส ปกติแล้วแนะนำให้ใช้ปริมาณความเข้มข้น 0.012% ใน 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการ inactivate ไวรัสได้หมดและไม่ทำให้เซลล์เกิด Toxic ด้วย ถ้าการใช้เพิ่มความเข้มข้นมากกว่าที่กำหนด จะทำให้การ inactivate ไวรัสได้ได้หมดและใช้ระยะเวลาสั้นกว่าที่กำหนด แต่มีข้อเสียคือทำให้เซลล์ตาย เนื่องจาก Toxic ของ BEI ดังนั้นในการ inactivate ไวรัสด้วย BEI เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจำเป็นต้องเติม sodium thiosulfate ในปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย = 0.5% ทันที เพื่อหยุดปฏิกริยาของ BEI เป็นการป้องกันไม่ให้ BEI เกิด Toxic

เนื่องจากการเก็บ BEI ในอุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 1 เดือน ยังมีคุณสมบัติในการ inactivate ไวรัสได้ดีพอ ๆ กับ fresh BEI เพราะฉะนั้นจึงเป็นการสะดวกในงานผลิตวัคซีน คือสามารถเตรียม BEI ครั้งละมาก ๆ และเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C. ได้ภายใน 1 เดือน โดยยังมีคุณสมบัติคงเดิม ซึ่งจะสามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้มาก ซึ่งคุณสมบัตินี้นับว่าเป็นประโยชน์ต่องานด้านวิจัยและงานด้านการผลิตวัคซีน

Table 1 Preparation of BEI

Two percent of BEA* in 0.2N NaOH

↓

React at 37°C. for 1 hrs.

↓

Fresh BEI

- → Keep at 4°C. 10 days - 2 months
- → Keep at 26°C. 1 - 2 months
- → Keep at 37°C. 1 month

* 2-Bromoethylamine Hydrobromide

Table2 Inactivation of FMD virus by BEI

FMD virus
↓
Dilute 2-3 times by 0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.6)
↓
Mix with BEI (0.0117% final conc.)
↓
Keep at 37°C. for 12 - 24 hrs.
↓
Sampling
↓
Add sodium thiosulphate
↓
Titrate for infectivity in BHK-T monolayer cell

เอกสารอ้างอิง

1. Bahnemann, H.G.: Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and ets application for vaccine production.Arch. Virol. 47, 47-56 (1975).
2. Bahneman, G.G., Auge de Meloo, P.,Abaracon, D., and Gomes, I.: Immunogenicity in cattle of foot and mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine.Bull. off. int. Epiz,81, (11-12), 1335-1343 (1974).
3. Girard, H.C., Bayramoglu, O., Erol, N. and Burget, A. : Inactivation of O_1 FMD virus by the binary ethylene imine (BEI). Bull. off. int. Epiz. 87, (3-4), 201-217 (1977).

วัคซีน, แอนติเจน ป้องกันโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร

แก้วมณี กองสมัคร[1] ชะเล็ก เสรีพันธ์พานิช[1]

Kaomanee Kongs mak Chalek Sereephanpanich

1. วัคซีนป้องกันโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร

บทคัดย่อ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาทดลองคือเชื้อ Bordetella bronchiseptica local strain ซึ่งแยกได้จากสุกรที่แสดงอาการของโรคโพรงจมูกอักเสบ ซึ่งทำให้โครงกระดูกของโพรงจมูก (Turbinate bone) โค้งงอ ทำให้สัตว์หายใจไม่สะดวก สุขภาพอ่อนแอ ทำให้ร่างกายแคระแกรน นำเชื้อที่แยกได้โดยการ swabs จากโพรงจมูกของสุกรที่เป็นโรคมาเพาะในมีเดียที่เหมาะสมคือ Bordet-gengou blood agar แล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ครูปร่างลักษณะและย้อมเชื้อติดสีกรัม การตรวจสอบทางวิทยาเคมี และการตรวจทางพยาธิวิทยา โดยดูที่ necrotic toxin โดยการฉีดเชื้อนี้ 0.1 ml. เข้าใต้ผิวหนังขนาด $1x10^9$ cfu/ml. ทำให้ guinea pigs เกิด hemorrhagic necrosis ใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้แล้วยังตรวจสอบความรุนแรง (Virulence) โดยการฉีดเชื้อนี้ทาง intranasal,intracerebral และ intraperitoneal อาการของหนู mice จะตายด้วยโรค pneumonia, encephalitis และ septicemia การตรวจสอบคุณสมบัติทาง immunogenicity โดยฉีดแอนติเจนของเชื้อนี้ทาง intraperitoneal ซึ่งจะทำให้สร้างภูมิต้านทานต่อการ challenge โดยวิธี intranasal,intraperitoneal และ intracerebral injection

ได้นำวัคซีนจากต่างประเทศมาทดลองหาความคุ้มโรคในสุกร หนู mice แล้วนำเชื้อ Bordetella bronchisep - tica local strain, challenge ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่าให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อท้องที่ได้ดี

คำนำ

เนื่องจากในเขตที่มีการเลี้ยงสุกร แบบอุตสาหกรรมอย่างหนาแน่น เช่น ในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี จะเห็นว่า จะมีโรคนี้เกิดขึ้นอยู่บ่อย ๆ แต่เนื่องจากโรคนี้ไม่ได้ทำให้สัตว์ตายทันที แต่ทำให้เลี้ยงไม่โต แม้จะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลานานก็ตาม (7) เกิดการสูญเสียทั้งด้านเศรษฐกิจและแรงงาน จึงมีผู้นำวัคซีนป้องกันโรคนี้จากต่างประเทศ (ประเทศจีนได้หวัน) เข้ามาใช้ป้องกันโรคระบาดนี้ที่เกิดขึ้นในประเทศไทยเป็นชนิด Formalin killed vaccine

การศึกษาวิจัยโรคนี้ โดยทำการแยกเชื้อจากสุกรที่ป่วยแสดงอาการในเขตที่มีโรคระบาด โดยนำมาตรวจสอบทางพยาธิวิทยา (6) ตรวจทางชีวเคมี (2) และตรวจคุณสมบัติทาง immunogenicity โดยฉีด bacterin ในหนู mice แล้ว challenge ด้วยเชื้อพิษ (1,3,4)

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ Bordetella bronchiseptica ที่ระบาดในประเทศไทย หลังจากที่นำมาเพาะในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แล้ว จึงจะสามารถทำนายว่าสุกรเกิดโรคโพรงจมูกอักเสบทำให้จมูกโค้งงอเกิดจากเชื้อชนิดนี้อย่างแน่นอนและได้นำวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศมาทดลองฉีดหาความคุ้มในสัตว์แล้วใช้เชื้อท้องที่ที่แยกได้ challenge ดูว่า วัคซีน strain ที่ผลิตจากต่างประเทศให้ความคุ้มโรคระบาดที่เกิดขึ้นในประเทศหรือไม่ ซึ่งเมื่อทราบผลแล้วจะได้เป็นแนวทางสำหรับศึกษาการผลิตวัคซีน จากเชื้อท้องที่เพื่อป้องกันโรคในประเทศต่อไป

---

1 ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Bordetella bronchiseptica local strain (มหาปรุม)..
2. ลูกสุกรอายุ 1 เดือน
3. หนู mice
4. หนู gruinea pigs
5. Bordetella bronchiseptica bacterin Yuan - Lin strain

วิธีการ

การตรวจสอบคุณสมบัติของ local strain

- Morphology โดยการย้อมสีกรัมจะติดสีกรัมลบไม่มี flagella โดยเฉพาะเชื้อตรวจดูโดยใช้ Bordetgengou medium
- Culture ตรวจดด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมีรูปร่างกลมใสขนาดเล็ก
- Biochemical properties
  - ไม่เปลี่ยนแปลงใน carbohydrates
  - เป็นด่างใน litums milk
  - ไม่เกิด H_2S
  - positive ใน Catalase และ Urease
  - ไม่เกิดปฏิกริยา Nitrate
  - Agglutinate horse และ guinea pigs erythrocytes
- Pathogenicity โดยฉีดเชื้อ 0.1 ml. (ขนาด $1x10^9$ cfu/ml.) I/N ใน guinea pigs ดูผลใน 24 ชั่วโมงจะเกิด severe hemorrhagic necrosis
- Virulence และ Immunogenicity ฉีดแอนติเซนท์เตรียมจากเชื้อนี้ I/N ในหนู mice อายุ 3 สัปดาห์ แล้ว challenge ด้วยเชื้อนี้ในขนาด 0.1 ml. ($1x10^9$ cfu/ml.) I/N. I/N และ I/P ในชุดควบคุมหนูจะตายด้วยโรค pneumonia, encephalitis และ septicemia ส่วนหนูชุดที่ immunized ด้วย antigen จะยังคงปกติ

ผล

1. Test in mice โดยฉีด I/M 0.1 ml. ของวัคซีนที่จะทดสอบใน guinea pigs สังเกตดอาการใน 2 สัปดาห์ ดังตารางที่ 1

2. Test in swine โดยฉีดวัคซีนนี้ในขนาด 10 เท่าของขนาดปกติเข้าใต้ผิวหนังของสุกรอายุ 4 สัปดาห์ และฉีดขนาด 20 เท่าของขนาดปกติในสุกรท้องอายุ 70 วัน แล้วสังเกตดูความผิดปกติใน 14 วัน และ 30 วันตามลำดับ ปรากฏว่า สุกรไม่ได้แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด ตามตารางที่ 2

3. Potency test in mice นำเชื้อ local strain เพาะใน Bordet gengou blood agar 18 ชั่วโมง แล้ว suspened ด้วย PBS นำมาทำ dilution ตั้งแต่ $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ แล้วนำ dilution ต่าง ๆ เหล่านี้ไปทำ viable count ไว้ก่อนแล้วจึงนำไปฉีด intranasal route ในหนู mice อายุ 3 สัปดาห์ ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3

ดังนั้น Complete Killing dose ที่ทำให้หนู mice ตาย 100% คือ dilution 10^{-5} ซึ่งทำ viable count ได้ $2.5x10^7$ cfu/ml. แล้วจึงนำมาลนไปทำ potency test โดยวิธี challenge ด้วย intranasal route ในหนู mice เพื่อจะดูอัตราการรังมีชีวิตอยู่เปรียบกับชุดควบคุม และดูผลการ swab เชื้อจากโพรงจมูกของหนู mice หลังการ challenge เพื่อให้ทราบว่าจะคงมีเชื้อ Bordetella bronchiseptica shred ใน nasal cavity หลังจากการให้วัคซีนหรือไม่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 นี้ ในวิธีที่ 1 ปรากฏว่าเมื่อทำให้วัคซีนมีความเจือจาง 10 เท่าและ 100 เท่า ของขนาดปกติฉีดหนู mice I/M ในขนาด 0.5 ml.แล้ว หลังจากนั้นอีก 2 สัปดาห์จึงchallenge ด้วยขนาด $2.5x10^7$cfu/ml ซึ่งเป็น complete killing dose ที่น้อยที่สุดที่ทำให้หนู mice ตาย 100% ปรากฏว่าหนู mice สามารถรอดชีวิตทั้ง 2 group เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งหนูตาย 100%

ส่วนวิธีที่ 2 นั้นก็ทำเช่นเดียวกัน แต่ฉีดวัคซีนให้

ตารางที่ 1 แสดงผลของ safety test ใน mice อาย 3 สัปดาห์ และ guinea pig หนัก 350 กรัม

lot.No.	pH	Sterility test	Animal	No. of animal	Dose	Period of observation	Result
1	7.2	passed	mouse	10(I/M)	0.1ml	2 wks.	No abnormality
			guinea pigs	2(S/C)	"	3 days	
2	7.2	"	mouse	10(I/M)	"	2 wks.	
			guinea pigs	2(S/C)	"	3 days	
3	7.3	"	mouse	10(I/M)	"	3 wks.	
			guinea pigs	2(S/C)	"	3 days	

ตารางที่ 2 Safety test of the vaccine in swine

test date	Animal		Vaccination			Observation	Result	
	Age(wks)	No.of animal	lot.No.	dose	inject^n	period	symtom	local lesion
15/5/87	4	3	1	10ml.	S/C	30 days	No Abnormality	
5/8/87	4	3	1					
7/1/88	70days pregnent sow	2	1	20ml		14 days		

ตารางที่ 3 ผลของ mice inoculation 0.2 ml I/N

Viable count		Pathogencity	
dilution	No. of Bor.(cfu/ml)	No.of Death	Servivors/total
10^{0}	6.2×10^{12}	10	0/10
10^{-1}	5.7×10^{11}	10	0/10
10^{-2}	7.1×10^{10}	10	0/10
10^{-3}	3.2×10^{9}	10	0/10
10^{-4}	4.8×10^{8}	10	0/10
10^{-5}	2.5×10^{7}	10	0/10
10^{-6}	4.1×10^{6}	6	4/10
10^{-7}	3.8×10^{5}	3	7/10

ตารางที่ 4 Potency test of the vaccine intranasal challenge in mice

Method	Group vaccine	Immunization				Challenge		Judgement	
		Dilution	Dose	Frequency	Interval	Time	Dose	Method	Result survivors/total
วิธีที่ 2	Immunized Lot.1	x10	0.5 ml.	1	-	2wks.	$2.5x10^7$	No of Suckling mice 7 days after challenge	10/10
		x100	0.5 ml.	1	-	2wks.	$2.5x10^7$	- " -	10/10
	Control	-	-	-	-	-	$2.5x10^7$	- " -	0/10
	Immunized	x10	0.5 ml.	3	1wks.	2wks.	$2.5x10^2$	No of mice having Organism in the nasal cavity 7 day after challenge	0/10
		x100	0.5 ml.	3	1wks.	2wks.	$2.5x10^2$	- " -	6/10
	Control	-	-	-	-	-	$2.5x10^2$	- " -	10/10

หนู 3 ตัว ระยะเวลาห่างกัน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ก็ challenge ด้วย $2.5x10^2$ cfu/ml. อีก 1 สัปดาห์ต่อมาจึง swab nasal cavity เพื่อดูผลว่าจะมี bacterial shred อยู่ใน nasal cavity หรือไม่ แล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ปรากฏว่าชุดที่ให้วัคซีนที่เจือจาง 10 เท่า จะไม่มี bacterial shred ใน nasal cavity เลย ส่วนในหนูที่ให้วัคซีนที่เจือจางลง 100 เท่า จะพบว่ามี bacterial shred อยู่เกินครึ่งของจำนวนทั้งหมด ส่วนในชุดควบคุมนั้นจะมี bacterial shred อยู่ 100%

สรุป

จากผลการใช้เชื้อที่แยกได้จากสุกรป่วย ในประเทศไทยฉีด challenge ในหนู mice และสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ ปรากฏว่าสุกรที่ได้รับความคุ้มจากวัคซีนจะปลอดภัยจากโรคนี้ได้ ซึ่งเป็นแนวทางที่จะศึกษาการผลิตวัคซีนจากเชื้อที่แยกได้ในท้องที่ อันเป็นโครงงานเริ่มต้น เพื่อประหยัดเงินตราต่างประเทศในการจัดซื้อวัคซีนเพื่อป้องกันโรคนี้ต่อไป

2. แอนติเซน สำหรับทดสอบโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร

บทคัดย่อ

การเตรียม Atrophic rhinitis แอนติเซน (AR แอนติเซน) เพื่อการตรวจสอบโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร โดยการแยกเชื้อ Bordetella bronchiseptica จากสุกรที่แสดงอาการของโรคนี้จาก จังหวัดนครปฐม (NP strain หรือ local strain) แล้วนำมาเพาะและ subculture จนถึง 20 passage เพื่อให้ได้ Phase I organism ใน Bordet gengou blood agar แล้วนำไป inactivated ด้วยฟอร์มาลินและ Thimerosal ในอัตราส่วน 0.1 W/V และ 0.01 W/V ตามลำดับ ส่วนผสมนี้ทิ้งไว้ที่ 4°C. นาน 1 สัปดาห์ แล้วกรองและเจือจางส่วนใสด้วย PBS pH 7.8 แล้วนำไปทำเข้มข้น 50 เท่าแล้วเติม Thimerosal ให้ความข้นครั้งสุดท้ายให้ได้ 0.01 W/V แล้วนำมาทำ plate agglutinating test กับซีรัมสุกรที่ต้องการตรวจผล และเตรียมแอนติเซนที่ไม่ได้ inactivated ด้วยฟอร์มาลิน แล้วนำมาตรวจสอบผลกับชนิดแรกซึ่งจะให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก

คำนำ

เนื่องจากเชื้อ Bordetella bronchiseptica เป็นสาเหตุให้เกิดโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร สุกรในเขตหมั่นการเลี้ยงอย่างหนาแน่น คิดต่อโรคนี้ได้อย่างรวดเร็ว ถึงแม้โรคนี้จะไม่ทำให้สุกรบ่วยมีอัตราการตายสูง แต่จะทำให้สัตว์มีร่างกายอ่อนแอ เชื้อนี้จะเข้าไปทำลายโพรงจมูกทำให้กระดูกโพรงจมูกโค้งงอ สุกรหายใจไม่สะดวก ทำให้ร่างกายอ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตต่ำมาก สุกรส่วนใหญ่จะแสดงอาการเมื่ออายุได้ 4 เดือน น้ำหนักประมาณ 60 กิโลกรัม แม้จะเลี้ยงต่อไปถึง 7 เดือน น้ำหนักก็เพิ่มขึ้นน้อยมาก ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองอาหารและแรงงาน ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

การทดลองเตรียมแอนติเซนนี้ มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการเตรียมแอนติเซน ที่จะใช้ได้ผลดีในการตรวจสอบโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกร โดยวิธี plate agglutination test กับซีรัมสุกรที่ต้องการตรวจผล (5, 6) อันเป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคเพื่อประโยชน์ในการหาวิธีป้องกันและกำจัดโรคนี้ให้น้อยลงหรือให้หมดไป จากฝูงสุกรที่ได้รับเชื้อในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อ Bordetella bronchiseptica NP strain Phase I organism

2. Bordet-gengou blood agar plate เตรียมได้ดังนี้คือ

Potato extract	250 gm.
Tab water	500 gm.
NaCl	9 gm.

นำมาต้มแล้วกรองให้เหลือส่วนใส 500 ml. pH 7.0 แล้วนำ Potato extract 500 ml. ผสม

Agar	100 gm.
Proteose peptone	20 gm.
Glycerol	20 cc.
Tab water (cold)	1500 cc.

นำส่วนนี้ไปต้มแล้วแยกลงหลอดละ 50 cc. นำไปนึ่งภายในความดันที่ 15°C. นาน 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50-60°C. เติม blood (horse) 5% แล้วลง plate เก็บไว้ใช้เป็น blood agar gengou plate

3. Culture

3.1 Preliminary culture เพาะเชื้อ NP strain นี้ใน Bordet-gengou blood agar plate ที่ 37°C. นาน 2 วัน เลือกเชื้อหลาย ๆ colony ที่มีลักษณะเป็น phase I organism (Capsule เรียบหนาสม่ำเสมอ) ไปเพาะใน Bordet-gengou agar slant เพาะต่อที่ 37°C. นาน 2 วัน และตรวจสอบเชื้อนี้ให้มีลักษณะของ Phase I organism โดยมีคุณสมบัติที่จะสามารถ agglutinate เม็ดเลือดแดงไก่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ลักษณะจะ

กลมและไม่มี flagella

3.2 Seed culture นำเชื้อที่เพาะในตอนแรกนี้มาเพาะต่อใน Bordet-gengou's blood agar ที่ 37°C. นาน 2 วัน

3.3 Main culture สะลาย seed culture ที่เพาะได้ด้วย normal saline แล้วเพาะเชื้อนี้ใน Semisynthetic agar containing charcoal ซึ่งประกอบด้วย

Casamino acid	100.0 gm.
NaCl	2.5 gm.
KH_2PO_4	0.5 gm.
$MgCl_2$	0.4 gm.
Soluble starch	1.5 gm.
Poly peptone	5.0 gm.
Yeast extract	2.0 gm.
1% $CaCl_2$	1.0 gm.
1% Cystine solution	2.5 gm.
0.5% $CuSO_4$ solution	1.0 ml.
Agar	15.0 gm.
Purifies water	1000.0 ml.
Charcoal	5.0 gm.
pH	7.2

นึ่งภายใต้ความดัน 120°C.นาน15 นาทีแล้วนำ plate ที่ streak เชื้อไว้นำไปเพาะที่ 37°C.นาน 2 วัน

3.4 Harvesting เก็บเชื้อที่เพาะได้ในข้อ 3.3 โดยให้ suspened ใน PBS ปรับ pH ให้ได้ 7.0

3.5 Purity test นำเชื้อไปย้อมสีดู gram- และดูว่าไม่มีเชื้ออื่นปลอมปน และเพาะใน Bordet gengou blood agar ตรวจสอบดูอีกครั้ง

3.6 การเติมสารเคมี และการทำให้เข้มข้น นำเชื้อที่ Harvested ได้ผสมกับ Thimerosal และ Formalin ในอัตราส่วน 0.01 W/V% และ 1.1 W/V% แล้วทิ้งไว้ที่ 4°C. นาน 1 สัปดาห์เพื่อ inactivate แล้วกรองด้วยสำลีบน gauze 3 ครั้ง เก็บส่วนใสมาเจือจางด้วย PBS ปรับ pH ให้ได้ 7.0 จนกระทั่งได้เชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ $1x10^{10}$ cfu/ml. โดยใช้ standard Tubidity tube แล้วเติม Thimerosal ให้ได้ final contration เป็น 0.01 W/V% แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 2-5°C.เพื่อใช้เป็นแอนติเซนต่อไป

3.7 แบ่งแอนติเซนที่เตรียมได้ โดยไม่ได้ inactivated ด้วยฟอร์มาลิน เก็บไว้ทดสอบคุณภาพเปรียบเทียบกับวิธีที่เตรียมได้ครั้งแรก

4. Usage of antigen

4.1 Test tube agglutination test เจือจางแอนติเซนที่เตรียมได้ด้วย PBS 50 เท่าแล้วนำมาผสมด้วยซีรั่มตัวอย่างที่ห้องตรวจ 0.5 ml.ผสมกับ 0.5 ml.ของแอนติเซนเจือจางให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ 37°C.นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ใน 2-5°C.นาน 12 ชั่วโมงแล้วนำมาอ่านผล

4.2 Rapid agglutination test นำแอนติเซนที่ยังไม่ได้เจือจาง 0.03 ml. และหยดซีรั่มขนาดเท่ากันบนสไลด์คนให้เข้ากัน เอียงสไลด์ไปมาตรวจดู granules ที่เกิดขึ้นใน 1 นาทีถือว่าเป็นผลบวก ถ้าเกิดหลัง 1 นาทีถือว่าผลเป็นลบและที่ทดลองต้องอยู่ในอุณหภูมิ20-25°C.

ผล

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ Bordetella strain phase ของเชื้อนั้นอยู่กับรูปร่าง และลักษณะโคโลนี การ agglutinate anti K และ anti O serum

* Bor.H16-2 เป็นเชื้อมาตรฐานจากสถาบัน NIAH ญี่ปุ่น
**Bor.NP1เป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกรป่วยที่นครปฐมกลุ่มที่ 1
***Bor.NP2 - " - กลุ่มที่ 2

Strain from pig	Composition of colony		Apperance of Transitional
	Phase I	Phase III	PhaseIII after subculture in blood agar
*	+++	++	+
**	+++	++	+
***	++	+	+

ตารางที่ 2 การทดสอบ Tube agglutination test เปรียบเทียบกับ Rapid agglutination test

Pig serum	Titer in Tube agglutination test							Result of Rapid agglutination test	
No.	10	20	40	160	320	640	1280	1-30 Sec.	30-60 Sec.
1	-	-	-	-	-			-	-
2	-	-	-	-	-				-
3		-	-		-			-	- +
4	+	+	-		-			+	++
	+	+-	-		-			+	++
	++	+-	-		-			+	+++
	++	++	+-						++
	++	+	+-					+	+++
9	++	++	+-					+++	+++
10	++	++	+	+-				+++	+++
11	+	-						-	-
12	++	+	-	-	-	-		++	++
13	+++	++	+	+-	-	-		+++	+++
14	++	+	-	-	-	-		++	++
15	+++	++	++	+	+-	-		+++	+++
16	+++	++	++	+	-	-		+++	+++
17	-	-	-	-	-	-		-	
18	+++	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++
19	+++	+++	+++	++	++	+	-	+++	+++
20	++	++	++	++	+-	+	+	++	++

สรุป

แอนติเซรุมที่ผลิตโดยใช้เชื้อBordetella bronchiseptica NP. strain ที่แยกได้จากสุกรป่วยจากนครปฐมนั้น สามารถที่จะเตรียมเป็นแอนติเซรุมที่ใช้ทดสอบหาแอนติบอดี้ในซีรัมของสุกรได้เป็นอย่างดี ไม่ว่าจะตรวจสอบโดยวิธี Tube agglutination testหรือRapid plate agglutination test ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันในฝูงของสุกรที่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรม

อนึ่ง ในการเตรียมแอนติเซรุมเชื้อเป็นและแอนติเซรุมเชื้อตายนั้น ผลการทดสอบกับซีรัมจะคล้าย ๆ กันถ้าใช้แอนติเซรุมที่เตรียมขึ้นใหม่ ๆ แต่เหตุที่ต้องฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินก็เนื่องจากต้องเก็บแอนติเซรุมไว้นานๆ สำหรับการทดสอบแอนติเซรุมที่ฆ่าเชื้อแล้วจะไม่เปลี่ยนแปลงสภาวะของเชื้อเป็นตลอดเวลา ซึ่งถ้านำแอนติเซรุมเชื้อเป็นใช้แล้วผลการทดสอบย่อมไม่แน่นอน

ตารางที่ 3 ระดับแอนติบอดี้ในสุกรโดยใช้ Live และ Killed formalin Organisms as antigens ในสุกรที่คัดโรคนี้ 82 ตัว แสดงว่า Formalin Killed และ lived antigen ให้ระดับ antibody titer เหมือนกัน

		Titer by lived antigen									
		5	5	10	20	40	80	160	320	640	1280
Titer by formalin antigen	5	6									
	5	3	2								
	10		1	1							
	20			2	4	6					
	40				5	7					
	80				1	8					
	160					6	10	2			
	320						3	11			
	640							1	1		
	1280									1	

เอกสารอ้างอิง

1. Gwatkin, R. 1958. Infectious atrophic rhinitis of swine. Advan. Vet. Sci. 4:211.
2. Bjorklund, N. 1958. Atrophic rhinitis of pigs. A morphologic study including some etiologic aspects.Uppsala 1958 Appelbergs BohtryKeri Ab.
3. Baetz, A ; Kemeng, L.J.; and Graham,C.K. 1974. Blood chemistry change in swine from one to twelve weeks of age in fected with Bordetella bronchiseptica intransally.,Am. J. Vet. Res. 35. 451.
4. Bennett, P.C. 1951. Some angle on Atrorhinitis. Proc. U.S. Live Stock Sant. Assoc. P. 201.
5. Kou, et. at. : J. of Jap. Vet. Med.Soc., 32, 295, 1970. Shimizu, et. al. : Reports from Veterinary Center, Japan. 60, 22, 1970.
6. Eldering et. al. : J. Bact. 74, 133, 1957.
7. Daniel, G.M. (1986) : New concepts in the etiology of atrophic rhinitis and its prevention using a B.bronchiseptica P. multocida bacterin toxoid (Toximmune TM). Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract., Minneapolis, March 1986 : 77-95.

การเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบซัสเปนชั่นเซลล์คัลเจอร์ ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

The $BHK_{21}C_{13}$ Suspension cells culture in the medium contains 5% PEG treated serum* for MFD virus and vaccine production

พยนต์ สินสวงศ์วัฒน์[1] เชิงชาย จันทรัศมี[1]

Payont Sinsuwonkwat and Chernchai Chuntarasmi

ABSTRACT

The purposes of these experiments are to decrease the amount of serum in the medium (normally uses 10% PEG treated serum), by the cells don't change the charcater, and can produces high yield of FMD virus and good quantity of FMD vaccine from these cells.

The $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells culture in the medium contains 5% PEG treated serum, (started from the cells which culture in the medium contains 10%PEG treated serum and stocked in -80°C.),culture in the 30 litre fermentor 3 days forl passage,by controlled the pH 7.2 and temperature 37°C. The cells were subcultured in the medium contains 5% PEG treated serum step by step until the 7th passage, the cells were innoculated by type O cattle (O_{BKK}) FMD virus (by cell sedimentation method). Then the innoculated cells were cultured in the medium contains 1% PEG treated serum pH 7.4, temperature 37°C. When 18 hours, (CPE 80-100%), the virus was harvested and prepared FMD vaccine. These experiments were repeated 2 more times and conclussion.

The results shown that the $BHK_{21}C_{13}$suspension cells can grows in the medium contains 5% PEG treated serum, and can produces high yield of FMD virus and good quantity of FMD vaccine from these cells.

บทคัดย่อ

การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อลดปริมาณน้ำเลือดในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ลงจากปกติเคยใช้ 10% ทั้งนี้โดยเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะ และสามารถนำเซลล์นั้นมาเพาะเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดี และนำไวรัสที่ได้ไปผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้คุณภาพสูงอีกด้วย

การทดลองเริ่มต้นโดยการนำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension (ซึ่งปกติเคยเพาะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 10% และเก็บเป็นสต็อคไว้ที่ -80°C.) มาเพาะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5% ในถังเพาะเซลล์ขนาด 30 ลิตร ควบคุม pH ที่ 7.2 อุณหภูมิ 37°C. โดยเพาะ 3 วัน ต่อ 1 passage การเพาะจะทำการเพาะต่อกันไปเรื่อย ๆ (subculture) จนถึง passage ที่ 7

---

1 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

Foot and Mouth Disease Center Pakchong Nakornratchasima, Thailan

* Bovine serum collecting from slaughter house and treated with 8% PEG 6000

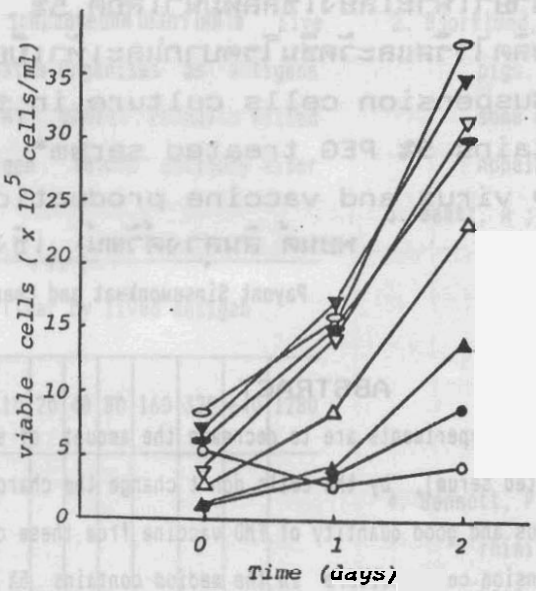


FIGURE 1 *Shown the growth of the $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells which cultured in the medium contained 5% PEG treated serum. O =1^{st}, ● =2^{nd}, ▲ =3^{rd}, Δ =4^{th}, ▽ =5^{th}, ▼ =6^{th}, ○ =7^{th} passages and ● =control.*

TABLE 1 *The amount of cells which cultured in the medium contains 5% PEG treated serum and the control cultured (medium contained 10% PEG treated serum), the table shown that the $BHK_{21}C_{13}$ suspension cells can grow in the medium contained 5% PEG treated serum after 3-4 passages adapted.*

passage no / Experiments	days	1	2	3	4	5	6	7	cont.
		Amount of cells (x 10^5cells/ml)							
1	0 day	5.30	1.50	1.55	3.10	4.20	5.30	4.90	5.10
	1 day	2.95	3.60	4.23	8.50	12.30	15.10	12.80	16.45
	2 day	4.15	10.20	16.01	25.20	36.00	32.40	33.70	31.80
2	0 day	5.00	1.29	1.42	4.10	5.01	5.92	5.90	5.70
	1 day	2.40	3.72	4.26	12.30	17.76	16.95	17.00	12.20
	2 day	5.30	10.81	17.04	24.60	43.01	37.25	41.20	30.25
3	0 day	5.15	1.27	1.01	3.26	4.15	5.11	5.90	5.40
	1 day	3.41	3.54	4.26	9.59	13.96	17.37	17.86	15.85
	2 day	4.32	7.23	12.15	18.76	27.25	32.95	31.74	29.45

จึงนำเซลล์ที่ได้มาเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โดกะบือ โดยวิธีการหลุดกะกอนเซลล์โดยเพาะไวรัสในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 1% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง CPE 80-100%, pH 7.4, อุณหภูมิ 37°C. จากนั้นนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป การทดลองในครั้งนี้จะทำการทดลองเป็น 3 ชุด แล้วจึงทำการสรุปผล

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ BHK_{21}-C_{13} suspension สามารถจะเจริญเติบโตได้ดี ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% โดยไม่เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะในการที่จะนำไปผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้คุณภาพดี

คำนำ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีเพาะเซลล์แบบเซลล์แขวนลอย (suspension cell culture) ที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา นั้น ต้องทำการผลิตเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ให้ได้จำนวนมากก่อนจึงทำการ innoculate seed virus แล้วจึงนำไวรัสที่ผลิตได้ไปทำการผลิตเป็นวัคซีนน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันต้องมีส่วนผสมของน้ำเลือด (PEG treated serum) 10% จึงจะเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ให้เจริญเติบโตและมีคุณภาพดีได้ และเมื่อนำเซลล์นั้นไปผลิต FMD virus และนำไวรัสไปผลิตเป็นวัคซีนก็จะได้คุณภาพดีเช่นกัน (Makarasen, et, al.1982., Makarasen and Sinsuwonkwat. 1986)

เนื่องจากวัคซีนที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา มีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณน้ำเลือดที่ได้รับจากโรงงานฆ่าสัตว์ 50-100 เท่า ทำให้ต้นทุนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูงขึ้น

จากการศึกษาจากรายงานการทดลอง จากต่างประเทศพบว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer สามารถเพาะบน DEAE Sephadex A 50 beads ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักส่วนผสมของน้ำเลือดจากลูกโค 5% ได้ (whiteside and Spier,1977; Meignier, Mougeot and Favre, 1980) ซึ่งการเพาะเซลล์แบบนี้เป็นการเพาะแบบกึ่งแขวนลอย (Semi-suspension) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จึงได้ทำการทดลองนำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension มาทำการทดลองเพาะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension จะสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% หรือไม่ โดยเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะในการที่จะนำมาผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย

1.1 น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักชื่อว่า Modified Eagle's medium (Merchant., et al, 1964) มีอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติมคือ 0.25% lactalbumin hydrolysate, 0.1% peptone (Makarasen., et al. 1982) และ 5% น้ำเลือด (PEG treated serum)

1.2 เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ซึ่งเพาะได้จากน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 10% แล้วเก็บเป็นสต๊อกไว้ที่อุณหภูมิ -80°C.

1.3 ถังเพาะเซลล์ (fermentor) ขนาด 30 ลิตร ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ, pH และออกซิเจนได้อัตโนมัติ และก่อนการใช้เพาะเซลล์ทุกครั้งจะทำการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C.นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที ความดัน 1.5 กก./ซม^2. (sterilization)

1.4 เครื่องกรอง membrane filter ขนาด 0.45 u และ 0.22 u ซึ่งใช้กรองน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ปราศจากเชื้อโรคก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเพาะเซลล์ โดยเก็บน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่กรองแล้วไว้ในขวดแก้วขนาด 20 ลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้ว ส่วนเครื่องกรองก่อนใช้กรองต้องนึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้วเช่นกัน

1.5 ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ โดกะบือ (O_{BKK}) ซึ่งนำมาทดลอง innoculate ลงในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ซึ่งเพาะได้จากการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5%

1.6 โคอายุ 1 ปี ที่ไม่มีภูมิคุ้มโรคปากและ-

TABLE 2 *Show the results of virus yield and the vaccine quantity which produced from the* $BHK_{21}C_{13}$ *suspension cells that cultured in the medium contains 5% PEG treated serum.*

NO.	viable cells ($X10^5$/ml)	seed virus	harvest (HRS)	CPE (%)	virus titer cfu/ml	virus titer pfu/ml	virus titer 140S u/ml	vaccine controls dose	vaccine controls allergy	safety test	protection rate (%)
1	21.75	OC/S_1	18	97.0	40.0	7.47	1.93	5cc	NON	OK	100.0
2	31.75	OC/S_1	18	95.0	50.5	7.50	2.38	5cc	NON	OK	100.0
3	22.33	OC/S_1	18	98.6	33.5	8.10	1.66	5cc	NON	OK	100.0
CONT	26.40	OC/S_1	18	98.0	36.7	7.79	1.84	5cc	NON	OK	100.0

เท้าเปื่อย ไข้โอ เพื่อใช้ในการทดสอบวัคซีน

2. วิธีการทดลอง

2.1 นำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ซึ่งปกติเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 10%มาทำการเพาะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% ในถังเพาะเซลล์ (fermentor)ขนาด 30 ลิตร อุณหภูมิ 37°C. p 7.2 และป้อนอากาศบริสุทธิ์เข้าได้ใบพัดของถังเพาะเซลล์(sparger) ขนาด 5 ลิตร/นาที หก ว 45 นาที นาน 5 วินาทีโดยเพาะ 3 วัน ต่อ 1 passage และเก็บตัวอย่างเซลล์จากถังเพาะเซลล์มาทำการนับ และดูการเจริญเติบโตด้วยกล้องจุลทัศน์ทุกวัน ว ละ 1 ครั้ง

ทำการ subculture เซลล์นี้ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึง passage ที่ 7

2.2 นำเซลล์ passage ที่ 7 ที่เพาะได้จากการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% มาทำการเพาะไวรัสโดยวิธี cell sedimentation method และใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 1% ในการเพาะไวรัส โดยเพาะในถังเพาะเซลล์ขนาด 30 ลิตรอุณหภูมิ 37°C.ph 7.4 และป้อนอากาศบริสุทธิ์เข้าไปในถังในขนาดเดียวกันกับการใช้เพาะเซลล์ หลังจากเพาะแล้ว 18 ชั่วโมง จะทำการ Harvest ไวรัสที่ได้ ซึ่งจะเกิด CPE 80-100% นำไวรัสที่ได้ไปทำการทดสอบหาปริมาณและคุณภาพโดยวิธี Complement fixation, plaque assay method และ Single radial immunodiffusion (SRID)

2.3 นำไวรัสที่เพาะได้จาก 2.2 ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพของวัคซีน โดยการทำ safety test และ potency test ในโค

2.4 ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 2.1-2.3 ใหม่อีก 2 ครั้ง แล้วจึงทำการสรุปผล

ผล

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ที่นำมาจาก -80°C. ซึ่งเป็นเซลล์ที่เตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5% ใน passage ต้น ๆ เซลล์จะเจริญเติบโตไม่ค่อยดีนักทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ปรับสภาพให้เข้ากับน้ำยาที่มีน้ำเลือดน้อยลงกว่าปกติยังไม่ได้ แต่เมื่อทำการ subculture ต่อไป จนถึง passage ที่ 3 เซลล์จะเริ่มปรับตัวได้และเจริญเติบโตดีขึ้นไปเรื่อย ๆ จนถึง passage ที่ 7ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control (คือเซลล์ที่เพาะด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 10%) แล้วจะเห็นว่าค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์หมักน้ำเลือด 5%ตั้งแต่ passage ที่ 4-7 จะใกล้เคียง

กับ control ซึ่งแสดงไว้ใน Table 1 และ Figure 1

เมื่อสามารถเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5% ได้แล้ว นำเซลล์ที่ได้ใน passage ที่ 7 ไปทำการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ โคกระบือ (O_{BKK}) โดยวิธี cell sedimetation ปรากฏว่า เมื่อ Harvest ไวรัสที่ 18 ชั่วโมง จะได้ CPE 80-100% และได้ virus titer สูง คล้ายคลึงกันกับ control (ไวรัสซึ่งเพาะจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 10%) และเมื่อนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย แล้วนำวัคซีนนั้นไปทำการทดสอบ safety test และ potency test ปรากฏว่าให้ผลคุ้มโรคได้ถึง 100% ดังแสดงไว้ใน Table 2

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$suspension สามารถเพาะด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5% (5% PEG treated serum) ซึ่งถ้าทำการ subculture ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึง passage สูง ๆ เซลล์ก็จะเจริญเติบโตได้ดีและคงที่เช่นเดียวกับการเพาะด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 10% (Makarasen, et al. 1982) และเมื่อนำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ที่มีน้ำเลือด 5% ไปทำการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอโค-กระบือ (O_{BKK}) แล้วนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมเป็นวัคซีน ก็ปรากฏว่าได้ virus yield สูง และวัคซีนก็ให้ความคุ้มโรคสูง เช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีนจากไวรัสที่ได้จากการเพาะเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ที่เพาะด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 10% (Makarasen and Sinsuwonkwat. 1986) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า $BHK_{21}C_{13}$ suspension สามารถเพาะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำเลือด 5% ได้โดยไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะ ในการที่จะนำไปผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จึงจะได้นำวิธีการนี้ไปใช้ในการผลิตเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension, ผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบอุตสาหกรรมต่อไป (large scale production)

เอกสารอ้างอิง

Makarasen,P.,Sinsuwonkwat,P.,Chinsawadpun,-W., Tokui, T., Motohashi, T. 1982. Large scale production of FMD vaccine using BHK cells in Thailand. XVIth Conference of the Foot and Disease commission, Paris. 175 P.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and Vaccine production. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. 259 P.

Merchant J., D., Kahn H.,R., Murphy H.,W. 1964. Hand book of cell and organ culture. Buurgess Publ. Co., United State of America. 163 P.

Meignier, B., Mougeot, H.and Favre, H.1980. Foot and Mouth Disease virus Production on Microcarrier-Grown cells. Biol, standard. 46. PP 249-256.

Whiteside, J.P. and Spier, R.E. 1977. The cultivation of BHK monolayer cell on DEAE Sephadex A 50 Beads Maintained in Suspension.Biol,Standard. 35. PP. 67-72.

การตรวจหาความคุ้มของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดโอในสุกร ซึ่งใช้ฟอร์มาลินและไบนารีเอททีลีนอิมีน (BEI) เป็นสาร inactivant เมื่อเก็บในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

Protection of FMD vaccine type O for swine inactivated with formalin and binary ethylene imine (BEI) in keeping Quality

นงลักษณ์ ชลสินธ์[1] วัชรี สินสวงศ์วัฒน์[2] นพพร พัฒนประสิทธิ์[2]

Monglak Cholsindhu Wacharee Sinsuwonkwat Nopporn Patanaprasit

ABSTRACT

FMD vaccines for swine were prepared from the virus of foot and mouth disease inactivated with formalin and binary ethylene imine (BEI), the virus was propagated in $BHK_{21}C_{13}$ cell line in roller bottle culture. The potency test was done when storage vaccines at 0, 1, 3, 6 and 12 months respectively. The pigs vaccinated with formalin inactivated vaccine have the antibody titer in serum not so different with the pigs vaccinated with BEI inactivated vaccine, the BEI inactivated vaccine gives higher percent protection even the vaccine was kept in refrigerator for 12months and the keeping period of BEI vaccine during one year still effective in pigs.

บทคัดย่อ

วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกรชนิดโอ ซึ่งผลิตโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK_{21} และ FMDV ในขวดหมุนนั้น แต่เดิมได้ทำให้ไวรัสหมดความรุนแรง โดยใช้ฟอร์มาลิน ต่อมาพบว่า BEI เป็นตัว inactivant ที่ดีกว่า และเมื่อทำการผลิตวัคซีนโอสำหรับสุกร โดยใช้ฟอร์มาลินและ BEI เป็น inactivants จากไวรัสชุดเดียวกัน และทำการทดลองหาเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค โดยการฉีดทับในสุกรก็พบว่าค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ ในซีรัมของสุกรที่ฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกันแต่เปอร์เซนต์ความคุ้มโรคในวัคซีน BEI จะสูงกว่าในฟอร์มาลินอย่างเห็นได้ชัดแม้เมื่อเก็บวัคซีนไว้นานๆ ก็ทำการฉีดให้สุกรเมื่อเก็บวัคซีนไว้ 0,1,3,6และ 12 เดือนตามลำดับ วัคซีน BEI ก็ยังให้เปอร์เซนต์ความคุ้มโรคที่สูงและไม่แตกต่างกันมากนักในขณะที่ฟอร์มาลินวัคซีนให้ความคุ้มในระดับที่ต่ำ แม้จะเก็บไว้ยังไม่เกินสามเดือน

คำนำ

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยในสุกรนั้นแต่เดิมศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้ใช้ฟอร์มาลินเป็นสารทำให้ไวรัสหมดความรุนแรง (inactivate) โดยมีอลูมินัมเซลและซาโปนินเป็นตัวช่วยสร้างภูมิคุ้มกัน(Adjuvant) ซึ่งบางครั้งพบว่ายังมีไวรัสบางส่วนไม่ถูก inactivate ต่อมาพบว่าสาร Binary ethylene imine (BEI) มีคุณสมบัติในการ inactivate ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดีกว่าฟอร์มาลิน และยังใช้เวลาในการ inactivated น้อยกว่าฟอร์มาลินอีกด้วย

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงได้ทำการผลิตวัคซีนสำหรับโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดโอสำหรับสุกรขึ้น โดยใช้ไวรัสชุดเดียวกัน แต่ใช้ inactivant ต่างกัน คือใช้

---

1 ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ 2 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย

ฟอร์มาลินและ BEI ทั้งนี้เพื่อจุดประสงค์คือ

1. เพื่อทดลองหาประสิทธิภาพของวัคซีน และความคุ้มในสุกรของวัคซีนที่เตรียม โดยใช้ฟอร์มาลินและ BEI เป็น inactivant

2. เพื่อศึกษาถึงระยะเวลา การเก็บวัคซีน ไว้นาน ๆ ก่อนนำมาใช้ว่ามีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกรหรือไม่

3. เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเปลี่ยน inactivant จากฟอร์มาลินเป็น BEI ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสและวัคซีน ไวรัสที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็น ไวรัสชนิดโอของสุกร (ONP-BTm93/11/81) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในขวดหมุน หลังจากนั้นจึงนำไวรัสที่ได้มาเตรียมเป็นวัคซีนสองชนิด โดยใช้ inactivant ต่างกันโดยชนิดแรกใช้ฟอร์มาลินเป็นinactivant เรียกว่า$OPV8_{21}$/82 Formalin 23/3/82 ชนิดหลังใช้ BEI เป็น inactivant เรียกว่า $OPV8_{21}$/82 BEI 23/3/82 วัคซีนทั้งสองชนิดมีไวรัสอยู่ 8.4 TCID ต่อโด๊ส โดยมีอลมินัมเฮลและซาโปนินเป็นตัวช่วยสร้างภูมิคุ้มกัน (Adjuvant)

สุกรทดลอง ใช้สุกรลูกผสมสามสายพันธุ์จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์หนองกวางน้ำหนักประมาณ 20 กิโลกรัม สุกรเหล่านี้ไม่เคยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน และในซีรัมไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดโอ,เอ และเอเชียวัน

การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test)

1. sterility test โดยทดสอบสิ่งบนเปื้อนในไวรัสและวัคซีน โดยทดสอบในมีเดียเลี้ยงเชื้อคือ Nutrient Agar, Thioglycolate broth และ Tryptose Soy Broth

2. Innocuity test โดยการฉีดเชื้อและวัคซีนในลูกหนูขาวดูดนม (suckling mice) และสุกร วิธีการทำเหมือนกันในวัคซีนทั้งสองชนิดคือในลูกหนูขาวดูดนมอายุ 1-3 วัน ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 ม.ล. จำนวน 24 ตัวต่อวัคซีน 1 ชนิด แล้วสังเกตอาการทุกวันนาน 10 วันถ้าลูกหนูขาวตาย เก็บเอาชากไปตรวจยืนยันโดยวิธีคอมพลิเมนต์ฟิคเซชั่นเทสต์ (Complement Fixation test) ส่วนในสุกรใช้สุกรน้ำหนักประมาณ 20 กิโลกรัมฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดแก่สุกรจำนวน 2 ตัวต่อวัคซีน 1 ชนิด โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูตัวละ 10 ม.ล. และเข้ากล้ามตัวละ 2 ม.ล.สังเกตดูอาการ 7-10 วัน

การทดสอบความคุ้มโรค(Potency test) โดยการฉีดทับทำการทดสอบแบบเดียวกัน ในวัคซีนทั้งสองชนิด คือ เก็บวัคซีนไว้นาน 12 เดือน โดย นำออกมาทดสอบในเดือนที่ 0, 1, 3, 6 และ 12 ตามลำดับ โดยนำวัคซีนมาทำไดลูชั่น 1:1,1:3,1:9 แล้วฉีดสุกร 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว โดยมีสุกรกลุ่มชันยัน 2 ตัว ทำการฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูสุกร ฉีดตัวละ 5 ม.ล. โดยฉีด 2 ครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ เมื่อฉีดวัคซีนสุกรครั้งที่ 2 ครบ 3 สัปดาห์แล้ว นำมาฉีดทับด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (OPN-P_{11}9/10/81) ในขนาด 300 PID_{50} (Pig Infective Dose) โดยฉีดเข้าในผิวหนังบริเวณฝ่าเท้า หรืออุ้งเท้า (Foot pad) ตัวละ 0.2 ม.ล. อ่านผลหลังจากฉีดทับ 7 วัน แล้วคำนวนหาเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค จากกลุ่มของสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนโดยไม่เจือจาง และ หาจำนวน Pb_{50}/dose จากสุกรทุกกลุ่มโดยวิธี Arithmetic การอ่านผลจะดูการที่เกิด generalization ไปยังเท้าที่ไม่ได้ฉีดเชื้อพิษเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค คือเปอร์เซนต์ของเท้าที่ไม่แสดง gencralization ในกลุ่มของสุกรที่ทำการทดลอง ทั้งนี้โดยไม่นับการขาข้างที่ฉีดเชื้อพิษ

การหาระดับแอนติบอดีในซีรัม เมื่อฉีดวัคซีนสุกรแล้ว 3 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือด เมื่อเลือดแข็งตัว แยกเอาซีรัมไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C. นาน 30 นาที นำซีรัมที่ได้มาหาระดับแอนติบอดี โดยวิธีซีรัมนิวทรอลไลเซชั่น (Serum Neutralization Test) ในไมโครเพลท ได้ไตเตอร์เป็น log_{10} ของส่วนกลับของซีรัมไดลูชั่น ที่เมื่อผสมกับไวรัส 100 $TCID_{50}$ ทำให้เกิด CPE ในเซลล์ BHK_{21} 50%

ผล

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน

ชนิดวัคซีน	ความปลอดภัย ในสุกร		ความปลอดภัย ในลูกหนูขาว	
	จำนวน	ตาย/รอด	จำนวน	ตาย/รอด
$OPVB_{21}/82$ Formalin	2	0/2	24	0/24
$OPVB_{21}/82$ BEI	2	0/2	24	1/24

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ความคุ้มโรค และค่า Pb_{50}/dose ในสุกร

ชนิดวัคซีน	%ความคุ้มโรค				Pb_{50}/dose			
	0ด.	1ด.	3ด.	6ด. 12ด.	0ด.	1ด.	3ด.	6ด. 12ด.
$OPVB_{21}/82$ Formalin	20	33.3	-	- -	<1.0	<1.0	-	- -
$OPVB_{21}/82$ BEI	93.3	80	-	100 100	1.4	<1.0	-	- -

ตารางที่ 3 ระดับแอนติบอดีและเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคเมื่อเก็บวัคซีนไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ

ชนิดวัคซีน	0 เดือน		1 เดือน		3 เดือน		6 เดือน		12 เดือน	
	log SN_{50}	% ความคุ้มโรค	log SN_{50}	% ความคุ้มโรค	log SN_{50}	% ความคุ้มโรค	log SN_{50}	% ความคุ้มโรค	log SN_{50}	% ความคุ้มโรค
$OPVB_{21}/82$ Formalin	0.75						-		-	
	0.301		0.45				-		-	
	0.301	20%	0.602	33.33%	-		-		-	-
	0.45		<0.301				-		-	
	<0.301		0.301						-	
ค่าเฉลี่ย	0.421		0.414							
$OPVB_{21}/82$ Fkormalin	<0.301		0.45		0.903		0.602		0.903	
	0.602		0.45		0.75		<0		0.75	
	0.301	93.33%	<0.301	80%	0.47	-*	0.75	100%	1.05	100%
	0.75		0.45		1.204		0.903		0.602	
	0.301		0.602		0.602		0.75		0.602	
ค่าเฉลี่ย	0.451		0.451		0.786		0.601		0.781	

* เกิดการปนเปื้อนของ type A ในคอกสุกรทดลอง

สรุปและวิจารณ์

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกรชนิดโอ โดยวิธีเพาะเลี้ยงในเซลล์ BHK_{21} ในขวดหมุนแล้วนำมาผลิตวัคซีนโดยใช้ฟอร์มาลินและ BEI เป็น inactivant แล้วนำมาทดสอบหาระดับความคุ้มโรค เมื่อใช้วัคซีนที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ภายใน 12 เดือน ผลการทดลองที่ได้ไม่ค่อยสม่ำเสมอนัก ดังผลจากตารางที่ 2 จะเห็นว่าวัคซีนซึ่งใช้ฟอร์มาลินเป็น inactivant ให้ความคุ้มต่ำกว่าวัคซีนซึ่งใช้ BEI เป็น inactivant ส่วนค่า Pb_{50}/dose ของวัคซีนทั้งสองชนิดมีค่าต่ำมาก ดังนั้นจึงหยุดการหาเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคในวัคซีนฟอร์มาลินหลังจากเก็บ 1 เดือน และหยุดการหาค่า Pb_{50}/dose ในวัคซีนทั้งสองชนิด ส่วนเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคของวัคซีน BEI นั้น ได้ทำการทดลองจนครบ 12 เดือน ของการเก็บวัคซีน ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า เมื่อเก็บวัคซีนไว้ไม่เกิน 1 เดือนนั้น ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ในซีรัมของวัคซีนทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าวัคซีนฟอร์มาลินจะให้ค่าเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคที่ต่ำกว่า 60% (ซึ่งถือเป็นเกณฑ์ขั้นต่ำสำหรับวัคซีนสุกร) แต่ในวัคซีน BEI นั้น พบว่าให้เปอร์เซนต์ความคุ้มค่อนข้างสูง คือเกิน 80% แม้จะเก็บวัคซีนไว้เป็นระยะเวลานานถึง 12 เดือน ระดับความคุ้มก็ยังไม่มีการลดลง

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ พอจะสรุปได้ว่าในการทำให้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยหมดความรุนแรง เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนสำหรับสุกรนั้นการใช้ BEI เป็น inactivant จะทำให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีกว่า การใช้ฟอร์มาลินอย่างเห็นได้ชัด ทั้งยังสะดวกและประหยัดเวลาในขั้นตอนการผลิตวัคซีนอีกด้วย เพราะ BEI ใช้เวลาในการ inactivate ที่ 37°C. เพียง 24 ชั่วโมง แต่ Formalin ต้องใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมงที่ 26°C. ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้จะได้ใช้เป็นข้อมูลอันหนึ่งที่สนับสนุนการใช้สาร BEI เป็น inactivant ในการผลิตวัคซีนสำหรับสุกรแทนฟอร์มาลิน เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพดี มีความปลอดภัยสูง ทั้งยังสามารถทำให้สุกรมีความคุ้มต่อโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดีอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ พิจิตา มกรเสน, Dr. T. Tokui, สัตวแพทย์หญิง สุนิจิต คงทน และเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนและทดสอบคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่าน ที่ให้ความสนับสนุนทำให้การทดลองครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และนายสัตวแพทย์ พยนต์ สินสวงศ์วัฒน์ ที่กรุณาช่วยตรวจแก้และจัดรวบรวมพิมพ์ลงในหนังสือวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

1. Girard H.C., Bayramoglu O., Erol N. and Burgut A. Inactivation of O_1 FMD virus by the Binary Ethylene Imine (BEI). *Bull. off. int. Epiz.*, 1977, 87 (3-4), 201-217.
2. Anderson E.C., Masters R.C. and Mowat-G.N. Immune Response of Pigs to inactivated Foot and Mouth Disease Vaccines. Response to DEAE-Dextran and Saponin Adjuvanted Vaccines. *Res. Vet. Sci.*, 1971, 12, 351-357.
3. Bahnemann H.G. Binary Ethylenimine as an Inactivant for Foot and Mouth Disease Virus and Its Application for Vaccine Production. *Arch.of Virol.*, 1975, 47, 47-56.
4. Graves J.H. Formaldehyde Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus as Applied to Vaccine Preparation. *Amer. J. Vet. Res.*,1963,24,103,1131-1135.
5. Mowat G.N. Potency of BHK-produced Foot and Mouth Disease Vaccine after storage.*Bull. off. int. Epiz.*,1974, 81 (11-12), 1151-1154.