วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 กันยายน 2534

The Journal of Veterinary Biologics *Vol.2 No.2 Sept. 199*[redacted]

* การศึกษาสเตบิไลเซอร์ เพื่อปรับปรุงคุณภาพวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่................1
* การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไวรัสอินเฟคชั่น แอสโซซิเอตเต็ด (วี ไอ เอ) แอนติเจน ในซีรั่มของสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย....................................9
* ความปลอดภัยและความคุ้มโรค ของสุกรก่อนหย่านม เมื่อได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน...20
* การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกร และ โรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไทป์ ไอ เมื่อให้วัคซีนทั้งสองชนิดพร้อมกัน..25
* การศึกษาวัคซีนรวมหลอดลมอักเสบไก่ และ นิวคาสเซิล........................34
* คุณภาพการเก็บรักษาของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน...........42

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
บรรณาธิการผู้ช่วย	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	เชิงชาย จันทรัศมี
	บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์
	โสภณ ท้วมแสง
	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	เติมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ
วัตถุประสงค์	1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์
	2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับใช้วัคซีนป้องกันโรคสัตว์
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน มีนาคม และ เดือน กันยายน

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS

Editor in chif	Ab Kongthon
Assistance Editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial Board	Cherngchai Chuntarasmi
	Banchon Likitdecharoj
	Sophon Tuamsang
	Daranai Aroonprasert
	Dermpol Ratanawonk
Business Office	Division of Veterinary Biologics Phyathai Bangkok Thailand

The Journal of Veterinary Biologics is a publication of the Division of Veterinary Biologics, Department of Livestock Developement intended to make available the results of technical work in the veterinary biological science. The Journal of Veterinary Biologics edition is issued 2 times per year in March and September

พิมพ์ที่ : โรงพิมพ์ศิริพร้อม อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับคือ เดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่นๆที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง
2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสพการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

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

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของตัวเรื่อง ควรเขียนทั้งภาษาไทยและอังกฤษ

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 แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 *ผล (Results)* เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็น ถ้ามีตาราง กราฟหรือรูปภาพ ก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 *วิจารณ์ (Discussion)* เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อยตามถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 *เอกสารอ้างอิง (Literature cited)*

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a,b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อตัวนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินโดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน 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) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิตให้ใช้ตัว*เอน* หรือ<u>ขีดเส้นใต้</u>

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว*เอน* หรือ<u>ขีดเส้นใต้</u>

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

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกทอดหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือตำรา ให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. **ภาพประกอบ (Illustration)**

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจึงใช้และผู้เขียนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 x 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อหาความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การศึกษาสเทบิไลเซอร์เพื่อปรับปรุงคุณภาพวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่

STUDY ON STABILIZERS USED FOR INFECTIOUS BRONCHITIS VACCINE IMPROVEMENT

นันทนา โปษณเจริญ[1] กรรณิภา จิรจุมพล[1]

Nantana Posanachareon Kannipa Chirachumpol

ABSTRACT

Three kinds of substance were compounded in using as stabilizer of Infectious Bronchitis freeze-dried vaccine. They were polyvinyl pyrrolidone (PVP 700,000 MW) skim milk, and casitone.The results showed that 0.3-0.5% PVP was the most suitable agent which could be mixed with allantoic fluid in various proportions. However 5% skim milk and 2% casitone could be added to allantoic fluid only in 1:1 proportion in order to receive the same quality of vaccine. The freeze-dried vaccines were tested for virus titer, potency, moisture and other properties.

บทคัดย่อ

ในการใช้สารคงสภาพ (Stabilizer) 3 ชนิด สำหรับผลิตวัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบไก่ ได้แก่ Polyvinyl Pyrrolidone (PVP 700,000 MW) Skim milk (หางนม) และ casitone (เคซิโตน) พบว่า 0.3-0.5% PVP ใช้เป็นสารคงสภาพได้ดีที่สุด โดยสามารถผสมกับน้ำไข่ (allantoic fluid)ซึ่งมีไวรัสมีชีวิตหลอดลมอักเสบไก่ ในอัตราส่วนต่าง ๆได้ ส่วน 5% skim milk และ 2% casitoneจะสามารถให้ผลใกล้เคียงกันเมื่อผสมในอัตราส่วนน้ำไข่ต่อสารคงสภาพเท่ากับ 1 ต่อ 1 เท่านั้น วัคซีนแห้งนี้ได้ผ่านการทดสอบตามมาตรฐานแล้ว

คำนำ

การนำน้ำไข่ซึ่งเป็น amino-allantoic fluid เข้าขบวนการทำแห้ง (Freeze-drying) ต้องเติมสารประกอบบางอย่าง (Rowe; 1971) สารประกอบนี้ต้องมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ (colloids) แข็งตัวได้, โอบอุ้มวัคซีนในขบวนการจนกว่าความชื้นจะออกมาจากผิว และป้องกันการแห้งเกินไป และทำให้ free carbonyl group เป็นกลาง (Graves;

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

1962) สารประกอบดังกล่าวเรียกว่า สารคงสภาพ (Stabilizer or Additives) ซึ่งมีหลายชนิดและอยู่ในรูปโปรตีน เช่น หางนม, ซีรั่ม อัลบูมิน (Albumin) เป็นต้น (Alboiu- et al ; 1969, Todorova ; 1972. ; Nedelciu et al ; 1973)

การนำน้ำไข่ที่มีไวรัสหลอดลมอักเสบรวมกับสารคงสภาพ เพื่อเข้าขบวนการทำแห้ง ถ้าส่วนประกอบหรืออัตราส่วนผสมไม่พอเหมาะจะได้วัคซีนแห้งที่มีคุณสมบัติไม่ดี ฝ่อ หรือแห้งเป็นผงหรือเกาะกันเป็นก้อนใสคล้ายผลึกน้ำตาล หรือเกาะกันเป็นก้อนแข็ง จนละลายยาก ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนเสื่อมไปด้วย จัดว่าสารคงสภาพเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของคุณสมบัติวัคซีนแห้ง วัคซีนแห้งที่ดีสามารถคงประสิทธิภาพของไวรัสและทำให้เก็บได้นานในสภาพแช่แข็งภายใต้สุญญากาศ (Buthala ; 1965)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วัคซีนหลอดลมอักเสบไก่สดหรือน้ำไข่ (allantoic fluid) ได้จากการผ่าน Seed virus attenuated local strain เข้า allantoic sac ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันส่องคัดไข่ตายใน 24 ชั่วโมงทิ้ง เก็บ (Harvest) น้ำไข่ทั้งไข่เป็นและไข่ตายในชั่วโมงที่ 36 แช่เย็นไว้ปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนสดประมาณ 10^6 EID_{50}/ml.

สารคงสภาพ (Stabilizer) เป็นสารเคมีที่ขายทั่วไป 4 ชนิด คือ

1. Bacto skim milk dehydrated ชนิด Lab grade
2. Carnation skim milk ประกอบด้วยนมผงขาดมันเนย 71.7%, ไขมันเนย28%, เรซิริน 1.2% และวิตามิน 0.007%
3. Bacto casitone
4. Polyvinyl pyrrolidone (PVP), molcular weight 700,000

การเตรียมสารคงสภาพเป็นอัตราส่วนต่าง ๆ

1. Bacto skim milk และ Carnation skim milk เตรียมเป็น 1%,3%,5% และ 10% ถ้าเตรียมเป็น 1% = ใช้ skim milk 1 กรัม ผสมน้ำเดือด 100 ซีซี. เป็นต้น
2. Bacto casitone เตรียมเป็น 1%,2%,3% เช่น ถ้าเตรียม casitone 1 กรัม ผสมน้ำกลั่น 100 ซีซี. เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ 1% casitone แล้วนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน ถ้าทำเป็น 2% และ 3% จะใช้ casitone 2 กรัม และ 3 กรัม ตามลำดับ
3. PVP เตรียมเป็น 0.3% และ 0.5% ถ้าเตรียม 0.3% PVP ใช้สาร PVP 0.3 กรัม ผสมน้ำตาล Lactose (dehydrated) 10 กรัม ละลายน้ำเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมน้ำจนครบ 100 ml. แล้วนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน การเตรียม 0.5% PVP ใช้วิธีการเดียวกัน

เครื่องดูดแห้ง(Freeze-drying machine)ยี่ห้อLey boldผลิตจากประเทศเยอรมัน มีระบบการทำแห้งโดยอัตโนมัติตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ใช้ระยะเวลาทำแห้งนาน 27 ชั่วโมง

การตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้ง นำตัวอย่างวัคซีนแห้งซึ่งผสมกับสารคงสภาพชนิดต่าง ๆ มาหาปริมาณไวรัสมีชีวิตโดยการทำ ten fold dilution จาก 10^{-1} ถึง 10^{-7} ฉีดไวรัสแต่ละความเจือจางเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันนำเข้าตู้ฟักและบันทึกอัตราการตายทุกวัน นาน 7 วัน แล้วคำนวณหาค่า EID_{50}/ml. ตามวิธี Reed and Meunch

การตรวจหาประสิทธิภาพของวัคซีนแห้ง ใช้ไก่เล็กฮอร์นขาวอายุ 1 เดือน ไม่เคยทำวัคซีนหลอดลมอักเสบมาก่อน จำนวน 10 ตัวต่อการทดลอง 1 ตัวอย่าง เก็บซีรั่มไก่ก่อนการทำวัคซีน ละลายวัคซีน 1 ขวดด้วยน้ำยาละลาย (น้ำเกลือมาตรฐาน) 5 ซีซี.นำไปหยอดจมูกหรือหยอดตาไก่ตัวละ 2 หยด เก็บซีรั่มไก่หลังการทำวัคซีนแล้ว 21 วัน ใช้ซีรั่มไก่ก่อนและหลังการทำวัคซีนมาหาค่า Neutralizing index (NI) ด้วยวิธีการทำ Neutralization test

การตรวจหาความชื้นวัคซีนแห้ง ใช้วิธีการของ Karl-Fischer

การตรวจสภาพสุญญากาศวัคซีนแห้ง ใช้เครื่องมือตรวจสุญญากาศยี่ห้อ Edward โดยผ่านประจไฟฟ้าเข้าบริเวณสุญญากาศ จะเกิดสีฟ้า จนถึงสีฟ้าเขียว

วิธีการ

ผสมวัคซีนสดหลอดลมอักเสบไก่หรือน้ำไข่ กับสารคงสภาพ ปริมาตรต่อปริมาตร คิดเป็นเปอร์เซนต์เช่น 75% Stabilizer หมายความว่าในส่วนผสมน้ำไข่กับสารคงสภาพ 100 ส่วน เป็นปริมาณสารคงสภาพ 75 ส่วน และเป็นน้ำไข่ 25 ส่วน เป็นต้น

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ลักษณะวัคซีนแห้งได้จากน้ำไข่ที่มีไวรัสมีชีวิตกับสารคงสภาพชนิดต่างๆ วัคซีนแห้งที่มีหางนมผงเป็นส่วนผสมจะมีสีขาวขุ่น,ละลายยาก และมีผิวหน้าแตกเล็กน้อยถ้ามีปริมาณน้ำไข่มากกว่าสารคงสภาพ แต่วัคซีนแห้งมีลักษณะสมบรณ์เมื่อปริมาณน้ำไข่กับสารคงสภาพเท่ากันหรือปริมาณสารคงสภาพมากกว่า สำหรับวัคซีนแห้งที่มีเคซิโตนเป็นส่วนผสมจะมีสีน้ำตาลอ่อน ละลายดี วัคซีนแห้งมีลักษณะสมบรณ์เมื่อปริมาณน้ำไข่เท่ากับสารคงสภาพ หรือปริมาณสารคงสภาพมากกว่า และวัคซีนจะฝ่อ (ไม่เป็นก้อน) ถ้ามีปริมาณน้ำไข่มากกว่าสารคงสภาพ ส่วนวัคซีนแห้งที่ใช้ PVP เป็นส่วนผสมจะได้วัคซีนแห้งสมบูรณ์ไม่ว่าจะมีปริมาณน้ำไข่มากหรือน้อย

ตารางที่ 2 วัคซีนแห้งได้จากน้ำไข่ที่มีไวรัสมีชีวิตกับสารคงสภาพในอัตราส่วนผสมต่างๆ นำมาหาปริมาณไวรัสมีชีวิต โดยวิธีทำ ten fold dilution พบว่าวัคซีนแห้งที่มีส่วนประกอบของสารคงสภาพปริมาณมากกว่าน้ำไข่จะให้ค่า Virus titer น้อย ได้แก่ส่วนผสม 50%-70% ของสารคงสภาพ และวัคซีนที่มีปริมาณน้ำไข่มากกว่าสารคงสภาพ จะให้ค่า virus titer สูง ได้แก่ส่วนผสม 30%-40% ของสารคงสภาพการหาค่า NI ของวัคซีนแห้งทุกชนิดพบว่าเมื่อวัคซีนแห้งมีปริมาณไวรัสมีชีวิตอย่างน้อย $10^{3.5}$ EID_{50}/ml. จะมีค่า NI $\gg$ 2

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้งในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ นาน 12 เดือนที่อุณหภูมิต้อบ (37°C.) ปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลงเร็วในวันที่ 3 ต่ำกว่า $10^{3.5}$ EID_{50}/ml.ที่อุณหภูมิตู้เย็น(5°C.) ถึงตู้แช่แข็ง (-20°C.) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสมีชีวิตเป็นไปอย่างช้า ๆ และที่อุณหภูมิแช่แข็งพิเศษ (-40°C.) ปริมาณไวรัสมีชีวิตในวัคซีนแห้งเกือบไม่เปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 4 จากการหาเปอร์เซนต์ความชื้นของวัคซีนแห้ง ที่มีสารคงสภาพชนิดต่าง ๆ ประกอบอยู่ วัคซีนแห้งทุกชนิดที่มีส่วนผสมของสารคงสภาพกับน้ำไข่ปริมาณเท่ากันจะมีค่าความชื้นไม่เกิน 4% ถ้าเพิ่มปริมาณน้ำไข่มากกว่าสารคงสภาพจะได้วัคซีนแห้งที่มีความชื้นสูงเกิน 4% ยก

เว้นสารคงสภาพ PVP จะให้ค่าความชื้นของวัคซีนแห้งไม่เกิน 4% เสมอ ไม่ว่าจะเพิ่มปริมาณน้ำไข่หรือเพิ่มปริมาณสารคงสภาพในส่วนผสมวัคซีนแห้ง

Table 1 Show the Characteristic of Lyophilized vaccine. By mixing 50%,75% and 25% of the stabilizer with the allantoic fluid (Vol by vol)

Stabilizers	Colors of dried vaccine	Characteristic of dried-vaccine					
		50%STA	Soluble	75%STA	Soluble	25%STA	Soluble
1% Skim	ขาวขุ่น	O	ละลายยาก	O	ละลายยาก	O	-
3%	ขาวขุ่น	++	ละลายยาก	+++	ละลายยาก	+	ละลายยาก
5%	ขาวขุ่น	+++	ละลายยาก	+++	ละลายยาก	++	ละลายยาก
10%	ขาวขุ่นเข้ม	+	ละลายยาก	O	ละลายยาก	+++	ละลายยาก
1% Carnat	ขาวขุ่น	++	ละลายยาก	++	ละลายยาก	O	-
3%	ขาวขุ่น	++	ละลายยาก	++	ละลายยาก	+	-
5%	ขาวขุ่น	+	ละลายยาก	++	ละลายยาก	+	ละลายยาก
10%	ขาวขุ่นเข้ม	+	ละลายยาก	O	-	+++	ละลายยาก
1% casitone	น้ำตาลอ่อน	+	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก	O	-
2%	น้ำตาลอ่อน	+++	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก	O	-
3%	น้ำตาลอ่อน	++	ละลายยาก	+++	ละลายดีมาก	O	-
0.3% PVP	ขาวใส	+++	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก
0.5% PVP	ขาวใส	+++	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก	+++	ละลายดีมาก

STA = Stabilizer

+++ = ก้อนดีไม่แตก (cake)

++ = ก้อนแตกเล็กน้อย

\+ = ก้อนแตกมากและยุบตัว

O = ร่วน **ละลายดีมาก** หมายความว่า เมื่อเติมน้ำยาละลายวัคซีน เขย่าจะได้สารละลายเนื้อเดียวกันทันที

ละลายยาก หมายความว่า ภายหลังการเติมน้ำยาละลายบนวัคซีน ต้องเขย่าสักครู่ จึงจะได้สารละลายเนื้อเดียวกัน

Table 2 Show the characteristic of lyophilized vaccine by mixing the stabilizers and allantoic fluid, show the virus titer and NI.

Stabilizer	Ratio of mixer (%Vol)	Charagteristic of dried-vaccine	Virus titer		Potency mean NI
			Before freeze-drying	After freeze-drying	
3% & 5% Skim milk (Lab grade)	30% STA	ก้อนผิวหน้าแตกละลายยาก	5.49	5.30	2.40 ± 1.46
	40% STA	ก้อนแตก ละลายยาก	5.31	4.50	2.30 ± 1.46
	50% STA	ก้อนดี ละลายยาก	5.0	4.81	2.15 ± 1.46
	70% STA	ก้อนดี ละลายยาก	4.31	3.49	1.8 ± 1.46
1% & 3% Canation Skim milk	30% STA	ก้อนผิวหน้าแตกละลายยาก	5.49	5.15	2.0 ± 1.19
	40% STA	ก้อนผิวหน้าแตกละลายยาก	5.31	4.50	2.05 ± 1.19
	50% STA	ก้อนผิวหน้าแตกละลายยาก	5.0	4.37	2.0 ± 1.19
	70% STA	ก้อนดี ละลายยาก	4.31	3.15	1.16 ± 1.19
2% & 3% Casitone	30% STA	ฝ่อ	-	-	-
	40% STA	ฝ่อ	-	-	-
	50% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	5.15	4.75	2.50 ± 1.30
	70% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	4.31	3.10	1.40 ± 1.30
0.3% & 0.5% PVP	30% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	5.49	5.15	2.75 ± 1.47
	40% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	5.31	5.0	2.34 ± 1.47
	50% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	5.0	4.37	2.18 ± 1.47
	70% STA	ก้อนดี ละลายง่าย	4.49	3.49	1.8 ± 1.47

STA = Stabilizer
ก้อนดี = เป็นก้อนผิวหน้าเป็นมันไม่แตก
ฝ่อ = ไม่เป็นก้อน เนื้อวัคซีนแห้งติดขวดเป็นผรุน
ละลายยาก = เมื่อใส่น้ำยาละลายบนวัคซีนต้องเขย่าสักครู่จึงจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
ละลายง่าย = เมื่อใส่น้ำยาละลายบนวัคซีน จะละลายทันทีเป็นเนื้อเดียวกัน

Table 3 Show virus titer of dried-vaccine with 50% stabilizer when keeping in different temperatures for 12 months (Log 10 EID_{50}/ml.)

Stabilizer	Incubator 37°C.		Room temp. 28°-30°C.		Refrigerator 5°C.			Freezer -10°C.			Biofreezer -40°C		
	3D	7D	3D	7D	3m	6m	12m	3m	6m	12m	3m	6m	12m
3% Skim	3.66	2.29	4.31	3.15	4.49	4.40	4.35	4.52	4.50	4.37	4.65	4.60	4.56
5% Skim	3.66	2.29	4.15	3.49	4.62	4.60	4.31	4.70	4.52	4.49	4.62	4.60	4.56
1% Carnat.	3.62	2.30	4.15	3.31	4.31	4.25	4.05	4.37	4.31	4.15	4.37	4.35	4.35
3% Carnat.	3.50	2.30	4.15	3.37	4.17	4.15	4.00	4.20	4.18	4.15	4.21	4.20	4.18
2% Casitone	3.62	2.31	4.37	3.62	4.49	4.37	4.15	4.51	4.49	4.40	4.62	4.52	4.50
3% Casitone	3.50	2.31	4.49	3.66	4.66	4.49	4.15	4.69	4.66	4.62	4.70	4.69	4.66
0.3% PVP	4.0	2.39	4.31	3.49	4.70	4.57	4.37	4.81	4.75	4.70	4.85	4.80	4.76
0.5% PVP	4.0	2.39	3.37	3.49	4.69	4.51	4.20	4.80	4.72	4.68	4.82	4.78	4.78

หมายเหตุ - วัคซีนแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน และอุณหภูมิ 5°C. ให้ความคุ้มโรค NI ≥2
- วัคซีนแห้งเก็บที่ตู้อบนาน5-7วัน และอุณหภูมิห้องนาน7วันไม่ให้ความคุ้มโรคNI ≤ 2

Table 4 The moisture test of dried vaccine (ความชื้นมาตรฐานของวัคซีนแห้งไม่เกิน 4 %)

Stabilizer	Moisture of vaccine (%)		
	50 % STA	40% STA	30% STA
3% Skim milk	2.67%	5.10	[illegible]
5% Skim milk	2.45%	5.60	6.46
1% Carnation	2.20%	5.41	5.14
3% Carnation	2.52%	5.57	5.50
2% Casitone	1.15%	[illegible]	[illegible]
3% Casitone	1.43%	[illegible]	[illegible]
0.3% PVP	0.85%	1.65	1.73
0.5% PVP	0.72%	1.76	1.95

สรุปและวิจารณ์

การใช้สารคงสภาพได้แก่ 3% & 5% หางนมผง,2% เคซีโตน และ 0.3%-0.5% PVP รวมกับน้ำไข่ (allantoic fluid) ที่ประกอบด้วยไวรัสมีชีวิตในปริมาณที่เท่ากัน แล้วนำส่วนผสมเข้าขบวนการทำแห้ง(Freeze drying process) จะได้วัคซีนแห้งมีลักษณะปกติเป็นก้อน (cake) มีผิวหน้าเรียบเป็นมันและละลายง่ายเมื่อผสมน้ำยาละลายวัคซีน (normal saline) แต่ถ้านำสารคงสภาพ ได้แก่ หางนมผง และเคซีโตน ยกเว้น PVP รวมกับน้ำไข่ในปริมาณมากกว่าน้ำไขหรือปริมาณน้ำไข่มากกว่าสารคงสภาพแล้วเข้าขบวนการทำแห้ง จะได้วัคซีนแห้งมีคุณสมบัติไม่ดีมีผิวหน้าแห้งเป็นรอยร้าวหรือผิวหน้ายุบตัวร่วนทั้งนี้เนื่องจากวัคซีนแห้งเกินไป (over drying) Graves;1962 ได้กล่าวไว้ว่าวัคซีนที่แห้งเกินไป เพราะสารคงสภาพที่นำมารวมกับวัคซีนเป็นของเหลวก่อนเข้าทำแห้งมี eutectic point ของจุดเยือกแข็งสูงหรือต่ำกว่าระดับที่ขบวนการทำแห้งจะเกิดได้ (ปกติจุดเยือกแข็งในขบวนการทำแห้งประมาณ -40°C.)

ในการใช้สารคงสภาพ 0.3%-0.5% PVP ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล (Lactose 10%) ให้วัคซีนแห้งมีคุณสมบัติสมบูรณ์ที่สุด ไม่ว่าจะรวมกับปริมาณน้ำไข่เท่าใดก็ตาม ตรงกับ Graves; 1962 กล่าวว่า วัคซีนที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบมีคุณสมบัติดี เพราะน้ำตาลช่วยควบคุมการแห้งของผลิตภัณฑ์ และป้องกันไม่ให้เกิดการแห้งเกินไป แต่ถ้าน้ำตาลมากเกินไปทำให้ผิวหน้าวัคซีนแห้งมีลักษณะใสคล้ายแก้ว และป้องกันการระเหยของน้ำขณะอยู่ในขบวนการทำแห้ง

การหาปริมาณไวรัสมีชีวิต ในวัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบสัมพันธ์กับค่า NI (neutralizing index) ถ้ามีปริมาณไวรัสมีชีวิตอย่างน้อย $10^{3.5}EID_{50}/ml.$ จนหมดอายุจะหาค่า NI ได้อย่างน้อย 2 จากการทดลอง ซึ่งหมายความว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (7)

ตามกรรมวิธีการผลิตวัคซีน ต้องให้มีปริมาณไวรัสมีชีวิตในวัคซีนมากกว่ามาตรฐานที่กำหนด (7) ($10^{3.0}EID_{50}/ml.$) เพราะจะมีการสูญเสียระหว่างการเก็บ และการขนส่ง (วิทยาภูมิคุ้มโรค : ดร.บุญเยี่ยมและคณะ) จากการใช้ปริมาณน้ำไข่ซึ่งประกอบด้วยไวรัสมีชีวิตเท่ากับหรือมากกว่าสารคงสภาพ (ส่วนประกอบวัคซีนแห้งมีสารคงสภาพ 30% หรือ 40%) ทำให้ได้วัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบมีคุณสมบัติสมบูรณ์ และมีปริมาณไวรัสมีชีวิตมากกว่ามาตรฐานกำหนดได้แก่การใช้สารคงสภาพ PVP ที่ประกอบอยู่ด้วย 10% ดลูโคส สอดคล้องกับ Buthala ; 1956 ที่พบว่า 10% ดลูโคส ให้ความคงสภาพต่อไวรัสหลอดลมอักเสบในสภาพแช่แข็ง และทำแห้ง (lyophilized) สำหรับสารคงสภาพชนิดอื่นที่นำมาร่วมกับน้ำไข่ได้ดี คือ 3% หรือ 5% หางนมผง และ 2% เคซีโตน ในปริมาณที่เท่ากัน

เมื่อนำวัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบ ที่ประกอบด้วยสารคงสภาพชนิดต่าง ๆ เก็บในสภาวะแวดล้อมอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ นาน 12 เดือน วัคซีนที่เก็บในอุณหภูมิต่ำ (-40°C.) ภายใต้สูญญากาศมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไวรัสน้อยมาก (Hofstad, 1960) และเก็บได้นานหลายปี ซึ่ง Cunningham และ Stuart (1947b) พบว่าไวรัสหลอดลมอักเสบจะยังคงมีชีวิตทำงานได้อย่างน้อย 19 ปี ในสภาวะคุดแห้ง (lyophilized state) ที่ 3°C.ส่วนความคงสภาพของวัคซีนแห้ง (Stability) ที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ อุณหภมิห้อง (28°-30°C.) และตู้อบ (37°C.) ปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลงและมีน้อยกว่ามาตรฐานที่กำหนด เมื่อเก็บไว้นานเกิน 5 วัน ตามวิธีการหาความคงสภาพของวัคซีนแห้งของ National Academy of Sciences ของวัค

ชีนหลอดลมอักเสบไก่ ใช้วิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนไวรัสที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน กับที่อุณหภูมิ 2°-7°C. นาน 6 เดือน ให้การสูญเสียของไวรัสประมาณ 1 log. และจากการทดลองวัคซีนแห้งที่ส่วนประกอบของสารคงสภาพชนิดต่าง ๆ พบการสูญเสียของไวรัสประมาณ 1 log. เช่นกัน นั่นคือวัคซีนแห้งที่ประกอบด้วยสารคงสภาพมีความคงสภาพ (Stable) และมีความชื้นไม่เกินมาตรฐานเมื่อรวมกับน้ำไข่ (50% V/V)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวชะเล็ก เสรีพันธ์พานิช ช่วยตรวจหาปริมาณความชื้นของวัคซีนแห้ง

เอกสารอ้างอิง

1. ALBOIU. et al, M., POPA, E. M.S., 1969. Factors influencing the freezedrying of Newcastle disease strain B1 virus on a commercial scale.Lucr.Inst.Cerc.Vet.Bioprep.Pasteur,6:445-454.
2. Buthala, D.A., 1956. Some properties of the avian bronchitis virus. PhD. thesis. Iowa State College. Diseases of Poultry 5th edition by Biester and Schwarte 1975 : 604-606.
3. BIESTER and SCHWARTE. 1975. Avian Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry 5th edition : 601-606.
4. CUNNING-HAM;C.H.: and Stuart,H.O.;1947 b.Cultivation of the virus of infectious bronchitis of chikens. Cornell Vet.37:99.
5. Greaves, R.I. 1962. Recent Advances in freeze-drying. J. Pharm. Pharmacal., 14 : 621-640.
6. NEDELCIU, D., ALBOIU, M. TIGAIERU, N & POPA, E. Factors affecting the freezed-drying Newcastle disease virus strains to form a collection. Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur,1:81-92.
7. National A cademy of Sciences Washington D.C. 197. Infectious Bronchitis vaccine. Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and huantifying Avian Pathogens : 42-107.
8. TODOROVA, R. Freeze-drying of Komarov strain of Newcastle disease virus Vet. Med. Nauke. Sof., 9:61-67.
9. ROWE, T.W.G. 1971. Machinery and Methods in freeze-drying. Cryabiology, 8 : 153-172.
10. Reed, L.J., and H. Muench. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg. 27 : 493-497.
11. ดร.บุญเยี่ยม และคณะ 1960. ตอบคำถามเรื่องวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ และนิวคาสเซิล : วิทยาภูมิคุ้มโรค : 80-82.

การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไวรัส อินเฟคชั่น แอสโซซิเอดเต็ด (วี ไอ เอ) แอนติเจน ในซีรั่มของสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย

THE DETECTION OF ANTIBODY TO VIRUS INFECTION ASSOCIATED (VIA) ANTIGEN IN ANIMAL INFECTED WITH FOOT AND MOUTH DISEASE

วิไล ลินจงสุบงกช[1] อดิลักษ์ เล็บนาค[1] แอบ คงทน[1]

Wilai Linchongsubongkoch Adilak Lebnak Ab Kongthon

ABSTRACT

The Virus Infection Associated (VIA) Antigen was isolated from Foot and Mouth Disease Virus type O and AsiaI by Ion Exchange Chromatography Method.

Antibodies to VIA antigen were detected from infected sera by Double Gel Immunodiffusion (DGID) Test. The positive results were obtained from the sera of animals affected by any types of FMD virus.But neither normal nor immunized sera showed positive reaction

The comparison between the results of VIA Test and serum Neutralizing (S.N.) titer of FMD infected sera provided that the positive VIA Test sera also got higher S.N. titer to the specific type that caused infection than other types of virus.

The duration of VIA antibody in infected sera were found that 28.57% gave positive VIA Test in 1 week post infection and prolong VIA antibody untill 13 weeks post infection which showed 14.28% to positive VIA Test.

บทคัดย่อ

การเตรียม Virus Infection Associated (VIA Antigen)จากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ และไทป์เอเซียวัน โดยวิธี Ion Exchange Chromatography และทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว

การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA Antigen ในซีรั่มของสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้า-เปื่อยโดยวิธี Double Gel Immuno diffusion (DGID) Test พบว่าให้ผลบวกในซีรั่มของสัตว์ที่ติดเชื้อด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ทั้ง 3 ไทป์ และให้ผลลบในซีรั่มของสัตว์ปกติ หรือในซีรั่มของสัตว์ที่มีแอนติบอดี้ไตเตอร์เนื่องจากการฉีดวัคซีน

การเปรียบเทียบ VIA Test กับค่าของ Serum Neutralization (S.N.) Test ในซีรั่มสัตว์ป่วยพบว่าในรายที่ให้ผลบวกใน VIA Test จะให้ค่า S.N. Titer ต่อไวรัสไทป์

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

เดียวกันกับที่ทำให้สัตว์เป็นโรคค่อนข้างสูงกว่าไทป์อื่น

ระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบ และระยะเวลายาวนานของ VIA antibody (Durationof VIA antibody) ในซีรั่มสัตว์ป่วยพบว่าเริ่มให้ผลบวกต่อVIA Test จำนวน 28.57% ในระยะสัปดาห์ที่ 1 หลังการติดเชื้อ จนถึงระยะ 13 สัปดาห์หลังการติดเชื้อยังพบให้ผลบวกต่อ VIA Test 14.28% หลังจากสัปดาห์ที่ 14 หลังการติดเชื้อไปแล้วจะไม่สามารถตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มสัตว์ป่วย

คำนำ

ปัจจุบันโรคปากและเท้าเปื่อยยังคงมีระบาดอยู่ ส่งผลทำให้เกิดเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก สัตว์ป่วยและสัตว์ที่อยู่ในเขตโรคระบาด สามารถเป็นพาหะแพร่เชื้อไปสู่เขตอื่นได้โดยการเคลื่อนย้ายสัตว์ ซึ่งยากต่อการควบคุมโรคได้ ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen โดยวิธี DGID Test จึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยได้ว่าสัตว์เหล่านั้นปลอดจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างแท้จริง

VIA antigen เป็น component หนึ่งในไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งอยู่ในรูป Inactive form ของ Ribonucleic acid (RNA) viral polymerase ซึ่งจะเกิดขึ้นในขณะที่มีขบวนการติดเชื้อไวรัส (viral infection) เข้าสู่เซลหรือเข้าสู่ร่างกายสัตว์ ดังนั้นร่างกายสัตว์มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen ทำให้สามารถตรวจพบแอนติบอดี้ได้ในซีรั่มสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคโดยวิธีดังกล่าว

ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง VIA antigen กับ antibody สามารถเกิดได้ทุกไทป์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMD-specific) โดยไม่จำเพาะต่อไทป์ใดไทป์หนึ่ง

ประโยชน์และจุดประสงค์ ของการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen ในซีรั่มของสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่สงสัย มีดังนี้

1. เพื่อศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Epidermiological surveys) ในกรณีการเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างท้องที่ หรือระหว่างประเทศ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจสอบดูว่าสัตว์เหล่านั้น ปลอดจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างแท้จริงโดยการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen โดยวิธี DGID Test ควบคู่กับการหาแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ คือ โอ, เอ และเอเชียวัน โดยวิธี Serum Neutralization test ซึ่งสามารถแยกและบ่งบอกได้ว่าสัตว์มีไตเตอร์ เนื่องจากได้รับการฉีดวัคซีน หรือมีไตเตอร์เนื่องจากได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย

2. ศึกษาระยะเวลา VIA antibody ในซีรั่มสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อและช่วงระยะเวลาที่เริ่มตรวจสอบให้ผลบวกต่อ VIA Test จนถึงช่วงระยะเวลาที่ให้ผลลบต่อ VIA Test

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมและการวิจัยดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม VIA antigen ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูง

Viral fluid (2.5 L.)

Precipitated by 7% PEG (6,000)

Stiring at 4oC. for 2.5 hrs.

Centrifugue 4,000 rpm, 30 min

Sediment part for 140S preperation

Supernatant part

Mix with DEAE sephadex A-50

Gently shaking in 4oC. O/N

Let Sephadex sediment by gravity

Discard supernate by vacuum

Pack sephadex into column

Washed by 0.02 M Tris- HCl PH 7.6+ 0.15N NaCl

OD 254 nm.

eluted by 0.02 M Tris- HCl Ph 7.6+ 1.0 N NaCl

Collect peak (VIA peak)

Precipitated by sat. $(NH_4)_2SO_4$(50% final)

Agitate for 1 hr., in 4oC.

Centrifuge 4000 rpm, 20'

Sediment part

Discard supernatant part

Disolved by washing buffer

Dialyse against washing buffer for 2-3 days

Check VIA sensitivity by DGID Test

2. การตรวจหา Sensitivity and working dilution of VIA antigen by DGID test

2.1 เตรียม 1.2% Noble agar ซึ่งละลายใน 0.02 M Tris Hcl PH 7.6+ 0.15 N NaCl จากนั้นหยอดวุ้นลงบนแผ่นกระจก (10 x 9 MM.) ความหนาของวุ้น 2 มม. เจาะรูวุ้นที่แข็งแล้วด้วยเครื่องเจาะ (Gel puncher)ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแต่ละหลุม4 มม. ปริมาตร 40 ไมโครลิตรต่อหลุม

2.2 รูกลางหยอด VIA antigen

2.3 รูรอบนอกหยอด negative control serum เช่น normal serum หรือ immunized serum

2.4 รูรอบนอกหยอด positive control serum หรือ convalescent serum ในการทดลองนี้ใช้ post challenge serum type O, A_{15}, Asia I

2.5 เก็บใน Moisture chamber ในอุณหภูมิห้อง อ่านผล precipitation line ภายใน 1-5 วัน

2.5 การหา Working dilution ของ VIA antigen โดยวิธี titration ของ VIA antigen กับ positive control serumโดยการ dilute ทั้งVIA antigen และ positive serum 1:1,1:2,1:4 (ดังแสดงในรูป 1-2)

3. การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen

โดยใช้ซีรั่มจากห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับซีรั่มห้องที่จากเขตต่าง ๆ เพื่อเก็บข้อมูลและดูผลแตกต่างระหว่างซีรั่มในห้องปฏิบัติการกับซีรั่มจากห้องที่ เพื่อเป็นแนวทางศึกษาและวินิจฉัยผลของ VIA antigen ต่อไป

กรณีซีรั่มจากห้องปฏิบัติการ จะใช้ซีรั่มหลังจากได้รับการฉีดพิษทับแล้ว (post challenge serum) ทำการเจาะเลือดทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน นำซีรั่มมาตรวจสอบ VIA Test โดยวิธี DGID Test เพื่อดูการเกิด precipitation line ระหว่าง VIA antigen กับซีรั่ม

กรณีซีรั่มห้องที่ต่าง ๆ ที่เจาะจากสัตว์ป่วยและที่สงสัยว่าป่วย ประวัติของสัตว์ป่วยอาจไม่แน่นอน และส่วนมากจะเป็นซีรั่มที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน จึงไม่สามารถทำการเจาะเลือดทุก ๆ สัปดาห์

ในขณะเดียวกับซีรั่มต่าง ๆ ที่นำมาทดลองนี้ได้ทำการตรวจ S.N. titer ต่อ FMD Virus ทั้ง 3 ไทป์ด้วย เพื่อเปรียบเทียบกับผลของ VIA Test และซีรั่มทุกตัวอย่างจะต้องนำมา inactivate ก่อน โดยอุ่นใน water bath 56°C. เป็นเวลา 30 นาที

4. การตรวจหา Duration of VIA antibody

โดยทำการเจาะเลือดจากสัตว์ป่วยแต่ละกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน เจาะเลือดจากสัตว์แต่ละกลุ่มทุก ๆ สัปดาห์ นำไปตรวจ VIA Test และ S.N. titer ดังนี้

4.1 โคกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์โอ เจาะเลือดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 16ภายหลังได้รับการฉีดพิษทับ

4.2 โคกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์เอ เจาะเลือดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 15ภาย

หลังได้รับการฉีดพิษหับ

4.3. โคกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์เอเชียวัน เจาะเลือดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังได้รับการฉีดพิษหับ สัตว์กลุ่มนี้ได้ฆ่าและทำลายซากก่อนสิ้นสุดการทดลอง

4.4. สุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์โอสุกร เจาะเลือดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1ถึงสัปดาห์ที่ 10ภายหลังได้รับการฉีดพิษหับ

ผลการทดลอง

1. ผลของการหา Sensitivity และ working dilution ของ VIA Test

จากรูป 1 แสดงถึง reaction ของ VIA antigen กับ positive serum ที่ยังสามารถเกิด precipitation line ได้อย่างชัดเจนที่ dilution 1:8,1:2 ตามลำดับ แสดงว่าในการทดลองนี้สามารถ dilute VIA antigen ได้ถึง 1:1-1:8 และ positive serum ได้ถึง 1:1-1:2

2. ผลการเปรียบเทียบ VIA Test กับ S.N. Titer

Positive serum ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ และจากห้องที่จะให้ผลบวกต่อ VIA Test พบว่าซีรั่มที่ได้จากการติดเชื้อ ด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน สามารถเกิด precipitation line กับ VIA antigen ได้อย่างชัดเจนโดยไม่จำเพาะไทป์ของไวรัส ส่วนกรณี Negative serum หรือ Immunized serum จะไม่เกิด precipitation line กับ VIA antigen จากรูป 2 และรูป 3

ผลของการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี Neutralization Test กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน จะให้ค่า S.N. Titer สูงมากในแต่ละไทป์ของการติดเชื้อ ซึ่งได้ทำการตรวจเชื้อจากวิการ โดยวิธี Complement fixation (CF) Test แล้วให้ผลสอดคล้องกับค่า S.N. Titer

ส่วนกรณี Negative serum พบว่าค่า S.N. Titer ที่มีต่อไวรัสแต่ละไทป์นั้นต่ำกว่า positive serum มาก และตรวจสอบวิการโดย C.F. Test ให้ผล Negative แสดงว่าสัตว์ไม่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จากตารางที่ 1 และตารางที่ 2

3. ผลของการตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มของสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัส และระยะเวลายาวนานของ VIA antibody (Duration of VIA antibody) ที่ยังคงตรวจพบในซีรั่มของสัตว์ป่วย

จากตารางที่ 3 พบว่าเริ่มตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มสัตว์ป่วยพบ 28.57% ที่ให้ผลบวกต่อ VIA Test ในระยะสัปดาห์ที่ 1 ภายหลังการติดเชื้อ และยังคงให้ผลบวกต่อ VIA Test สูงขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 9 พบ 92.86% ถึง 100% ตามลำดับ และยังคงตรวจพบ VIA antibody จนถึงสัปดาห์ที่ 13 ภายหลังการติดเชื้อ พบ 14.28% ที่ให้ผลบวกต่อ VIA Test หลังจากสัปดาห์ที่ 14 ภายหลังการติดเชื้อไปแล้วจะไม่สามารถตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มของสัตว์ป่วย

ผลของค่า S.N.titer ในระยะเวลาต่างๆของการติดเชื้อ พบว่าสัตว์แต่ละกลุ่มที่ได้รับการฉีดพิษหับไทป์โอ, เอ และเอเชียวัน ยังคงให้ค่า S.N.titer สูงในสัปดาห์ที่ 1 และสูงขึ้น

เรื่อยๆ ในระยะสัปดาห์ที่ 2,3 และ 4 ภายหลังการฉีดพิษทับ ตามลำดับ หลังจากนั้นค่า S.N. titer จะค่อยๆลดลง แต่ยังคงให้ค่า S.N.titer ค่อนข้างสูงตลอดระยะเวลาของการทดลอง ดังตารางที่ 4,5 และ 6

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบ VIA Test และ S.N. Titer โดยใช้ซีรัมจากห้องทดลอง

Animal No.		S.N. Titer			VIA Test	CF Test
		OC	A15	Asia 1		
Positive serum	1	156	11	23	+	0
- " -	2	256	8	11	+	0
- " -	3	256	1.4	0	+	0
- " -	4	8	1024	3	+	A15
- " -	5	6	1024	4	+	A15
- " -	6	0	45	180	+	Asia 1
- " -	7	0	32	90	+	Asia 1
NEG. serum	8	0	0	0	-	N.D.
- " -	9	0	1.4	0	-	N.D.
Immunized serum	10	6	0	0	-	N.D.
- " -		11	0	2	-	N.D.

S.N.Titer= Serum neutralization test, CF.Test= Complement fixation test,VIA test= Double gel immunodiffusion test

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบ VIA test และ S.N. titer โดยใช้ซีรัมท้องที่

Animal No.	S.N. Titer			VIA Test	CF Test
	OC	A15	Asia 1		
1	23	90	1024	+	Asia 1
2	3	90	1024	+	- " -
3	16	23	362	+	- "
4	6	4	256	+	" -
5	>128	6	128	+	OC
6	>128	6	4	+	OC
7	>128	2	32	+	OC
8	>128	1.4	32	+	OC
9	3	2	6	-	NEG
10	0	1.4	11	-	NEG

S.N.Titer= Serum neutralization test, CF.Test= Complement fixation test,VIA test= Double gel immunodiffusion test

ตารางที่ 3 ระยะเวลาที่ตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มของสัตว์ป่วย (Duration of VIA antibody)

Virus type	Weeks after challenged													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	16
OC (Positive) total	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/2
A15 - " -	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	1/4	0/4	
Asia1- " -	2/5	5/5	4/5	2/5										
OP - " -	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1				
% VIA postive	28.57	92.86	92.86	78.57	100	100	100	100	87.5	75.0	71.40	14.28	0	0

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่า S.N. titer และผล VIA test ของโคกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์โอ

Cattle No.	Weeks after challenged													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	16
130	128	362	724	450	362	108	362	362	256	128	180	512	ND	362
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
150	180	180	180	64	128	512	1024	362	512	256	512	180	ND	180
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
151	180	512	1024	724	724	1447	724	1024	Dead					
	-	+	+	+	+	+	+	+						
194	362	362	362	180	362	724	362	724	362	362	724	512	ND	ND
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
VIA Positive total	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/2

- = Nagative VIA Test, + = Positive VIA Test, ND = Not Done

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบค่า S.N. titer และผล VIA Test ของโคกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์เอ

Cattle No.	Weeks after challenged												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
4	180	2048	2048	2048	>2048	2048	1024	1024	256	512	90	ND	ND
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
178	1024	>2048	>2048	2048	2048	2048	2894	1447	724	362	724	ND	ND
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
179	2048	>2048	724	362	724	>2048	724	1447	512	256	362	ND	ND
	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
187	512	362	512	724	512	1447	256	512	362	128	256	ND	ND
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
VIA Positive total	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	1/4	0/4

- = Nagative VIA Test, + = Positive VIS Test, ND = Not Done

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบค่า S.N. titer และผล VIA test ของกลุ่มโคที่ฉีดเชื้อไวรัสไทป์เอเชียวัน

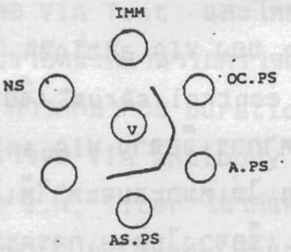
Cattle No.	Weeks after challegnged			
	1	2	3	4
90	2048	>2048	2048	362
	-	+	-	-
166	2048	>2048	2048	742
	+	+	+	-
167	724	2048	1447	ND
		+	+	-
169	1024	ND	2048	2048
	+	+	+	+
170	724	724	724	2048
	-	+	+	+
VIA Positive total	2/5	5/5	4/5	2/5

- = Negative VIA Test, + = Positive VIA Test, ND = Not Done

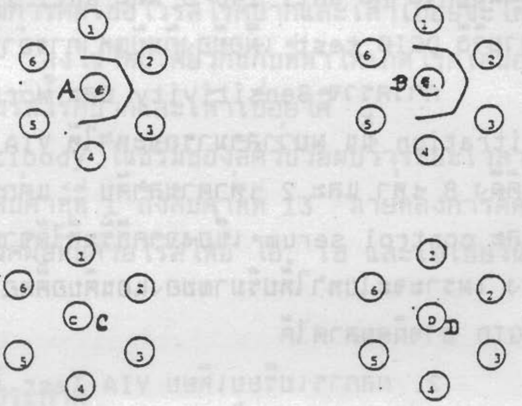
โคกลุ่มนี้ได้ฆ่าก่อนเสร็จสิ้นการทดลองทำให้ไม่สามารถเจาะเลือดในสัปดาห์ต่อไปได้

รูปที่ 1 ผลการทดลอง sensitivity และ working dilution ของ VIA antigen

1) Detection of VIA antigen by DGID test

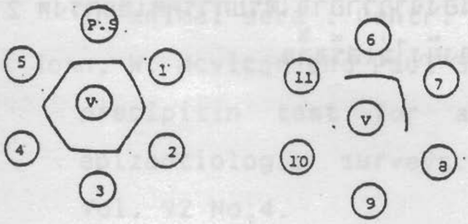


2) Titration of VIA antigen and control serum



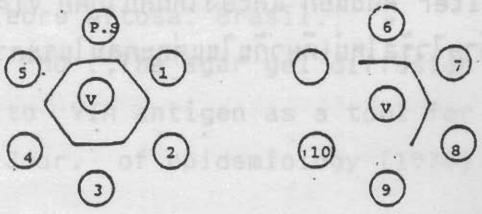
V = VIA antigen
NS = normal serum
IMM = Immunized serum
OC.PS = anti O-C positive serum
A.PS = anti A positive serum
As.PS = anti As positive serum

A,B,C & D = serum dilution 1:1, 1:2,1:4,1:8 respectively
1,2,3,4,5,6 = antigen dilution1:1, 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32 respectively



รูปที่ 2 ผลของ VIA test โดยใช้ซีรัมจากห้องปฏิบัติการโดยวิธี DGID test

V = VIA antigen
P.S = positive control serum
1-10 = tested serum



รูปที่ 3 ผลของVIA test โดยใช้ซีรัมจากท้องที่ โดยวิธี DGID test

V = VIA antigen
P.S = positive control serum
1-11 = tested serum

วิจารณ์

1. การแยก VIA antigen จาก FMD virus ไทป์ใดไทป์หนึ่ง โดยวิธีการของ Plum Island Animal Disease Center และ Centro Panamicano de fiebre Aftosa (3) ซึ่งสามารถแยก VIA antigen ได้ปริมาณความเข้มข้นสูงและความไวสูง และไม่มีปฏิกิริยาต่อ anti 140 S และ anti 12 S component จากซีรั่มเมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี DGID test เพื่อป้องกันปัญหาการอ่านผลผิดพลาด

การตรวจ Sensitivity และ Working dilution ของ VIA antigen โดยวิธี Titration นั้น พบว่าสามารถจะทำให้ VIA antigen และ control serum เจือจางลงได้ถึง 8 เท่า และ 2 เท่าตามลำดับ แต่การทดลองนี้ไม่ได้ทำการเจือจาง VIA antigen และ control serum เนื่องจากซีรั่มที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน ไม่เหมาะสมจะทำให้เจือจางลง เพราะจะไปทำให้ปริมาณของแอนติบอดีต่อ VIA antigen เจือจางไปด้วย การตรวจสอบ DGID อาจผิดพลาดได้

2. ผลการเปรียบเทียบ VIA Test กับค่า S.N. Titer ให้ผลสอดคล้องกัน (1,2) คือ สัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายจะให้ผลบวกต่อ VIA Test และให้ค่า S.N. Titer ค่อนข้างสูงกว่าไทป์อื่น เมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 ไทป์ ส่วนสัตว์ที่ให้ S.N. Titer สูง แต่ให้ผลลบต่อ VIA Test แสดงว่าสัตว์ไม่ได้รับการติดเชื้อไวรัส แต่มีไตเตอร์เนื่องมาจากการฉีดวัคซีน

3. กรณีการหา duration ของ VIA antibody ในซีรั่มสัตว์ป่วยนั้น ระยะเวลาในการเก็บซีรั่มของสัตว์แต่ละกลุ่มยาวนานไม่เท่ากัน เนื่องจากเกิดอุปสรรคและปัญหาขึ้นในโคทดลองชุดที่ฉีดพิษทับด้วยไวรัสไทป์เอเชียวัน สามารถเก็บซีรั่มได้แค่ระยะ 4 สัปดาห์หลังได้รับการฉีดพิษทับ ได้ทำการฆ่าและทำลายซากก่อนการทดลองจะเสร็จสิ้น ดังนั้นจะเหลือสัตว์ทดลองชุดที่ฉีดพิษทับด้วยไวรัสโอและไวรัสเอ จากการตรวจ VIA Test และ S.N. Titer พบว่าระยะสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ภายหลังจากติดเชื้อจะเริ่มตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มของสัตว์ป่วยได้ และยังสามารถตรวจพบจนถึงสัปดาห์ที่ 13 ภายหลังฉีดพิษทับ ผลการตรวจ S.N. Titer ของโคกลุ่มที่ฉีดพิษทับไทป์ โอ และเอ พบว่าระยะ 4 สัปดาห์ไปแล้ว โคบางตัวจะให้ค่า S.N. Titer สูงขึ้นอีก และยังให้ผลบวกต่อ VIA Test เนื่องจากว่าอาจได้รับการติดเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยไวรัสไทป์เดียวกันในแต่ละกลุ่มในระหว่างการทดลองยังไม่เสร็จสิ้น

สรุป

การเตรียมและแยก VIA antigen สามารถเตรียมได้จาก FMD virus ได้ทุกไทป์ โดยวิธี Ion Exchange Chromatography และสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อ VIA antigen ในซีรั่มของสัตว์ป่วยหรือได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ทุกไทป์ โดยการตรวจ VIA Test ด้วยวิธี Double Gel Immunodiffusion Test ซึ่งวิธีนี้ สามารถที่จะตรวจสอบและบ่งบอกได้ว่าสัตว์ที่มีแอนติบอดีไตเตอร์นั้น เกิดจากการได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายหรือมีแอนติบอดีไตเตอร์เนื่องมาจากการได้รับการฉีดวัคซีน

VIA antigen เป็น RNA polymerase ซึ่งจะเกิดขึ้นในขณะมีขบวนการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายเท่านั้น เพราะฉะนั้นจะทำให้เกิดเส้นตะกอนวุ้นได้กับซีรั่มของสัตว์ป่วยที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ทุกไทป์ (FMD-Specific) โดยไม่จำเพาะต่อไทป์ใดไทป์หนึ่งเมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธี DGID Test

การเปรียบเทียบต่อ S.N. Titer และ VIA antigen ในซีรั่มของสัตว์ป่วยได้จากห้องปฏิบัติการและซีรั่มจากท้องที่ พบว่าในรายที่มีการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะให้ผลบวกต่อ VIA Test และให้ค่า S.N. Titer สูงในไทป์เดียวกันกับที่ทำให้เกิดโรคเสมอ ซึ่งวิธีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบและวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้

การศึกษาด้วย Duration of VIA antibody ในซีรั่มของสัตว์ป่วยพบว่าระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบ VIA antibody ในซีรั่มพบตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 13 ภายหลังการติดเชื้อ ค่า S.N. Titer ในโคแต่ละกลุ่มที่ทำการฉีดพิษทับด้วยไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเชียวันพบว่าให้ค่า S.N. Titer ในแต่ละไทป์สูงมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.สุนีจิต คงทน และ น.สพ.นพพร ผดุงประสิทธิ์ ที่เอื้อเฟื้อโคในการทดลองและช่วยเหลือในการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม สำหรับใช้ตรวจสอบตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. A.A. Pinto and R.S. Hedger : The detection of antibody to VIA antibody in various of African wildlife following natural and experiment infection with FMD virus. Archiver of virol (1978) 57, 307-314.
2. Alonso Fernandez, A., Sondahl, M.S., Giacometti, H.and Ferreira, M.E.V.:Identification of Foot and Mouth Disease VIA antibodies in animal sera . Centr. Panam. Fiebre Aftosa. Brasil.
3. John, W. Mcvicar and Paul Sutmoller, FMD : The agar gel diffusion precipitin test for antibody to VIA antigen as a tool for epizootiologic surveys. Amer. Jour. of epidemiology (1970) Vol. 92 No.4.
4. K.M. Cowan and J.H. Graves : A Third antigenic component associated with FMD infection. Virol, 1966, 30, 528-540.

ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของลูกสุกรก่อนหย่านม เมื่อได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน

A study on the safety and efficacy of lapinized Chaina strain swine fever vaccine used in preweaning pigs

กัญญา สุวินทรากร[1]

Kunya Suvintarakorn

Abstract

The efficiency of lapinized swine fever vaccine,China strain was studied in swine which were 1,7,14,21 and 28 days old. They were off springs from non-vaccinated swine parrents. Two weeks after injection, all animals were observed for any symtoms.1,2,3,4 and 5 months after vaccination, blood was taken for testing antibodies against swine fever by neutralization test.

The results showed that after vaccination, all animals were normal. Everyone produced antibodies against swine fever. One month after injection, the one day old swine produced high titer (mean = 2048) antibodies whereas other groups produced antibodies with mean titer in the range of 58.6 - 213.3.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความปลอดภัยและความคุ้มโรคของลูกสุกร อายุ 1,7,14,21 และ 28 วัน เมื่อฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่าสเตรน ในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในห้องที่ ลูกสุกรเหล่านี้เป็นลูกสุกรจากแม่ซึ่งไม่เคยฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร หลังจากนั้นสังเกตอาการของลูกสุกรภายหลังรับวัคซีนนาน 2 สัปดาห์ และเจาะเลือดเพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้ออหิวาต์สุกร โดยวิธี virus neutralization test ภายหลังรับวัคซีนแล้ว 1,2,3,4 และ 5 เดือน

ผลจากการศึกษาพบว่า ลูกสุกรทุกกลุ่มอายุ 1,7,14,21 และ 28 วัน แสดงอาการปกติภายหลังรับวัคซีน และการสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรทุกกลุ่มอายุสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้ดี และกลุ่มอายุ 1 วัน มีค่าไตเตอร์สูงมากในเดือนแรกหลังรับวัคซีน คือเฉลี่ย 2048 ขณะที่กลุ่มอื่นๆ มีค่าไตเตอร์เฉลี่ย 58.6 - 213.3

คำนำ

สุกรทุกขนาดอายุ ที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรจะมีอัตราการตายสูง 95-100 % การรักษาสุกรที่ป่วยด้วยโรคนี้ไม่ได้ผล (Stewart,1981) ดังนั้นการป้องกันโรคที่สำคัญ คือการฉีดวัคซีน

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา

เนื่องจากเป็นโรคระบาดที่ร้ายแรง การฉีดวัคซีนให้แก่ลูกสุกรอายุน้อยที่สุด ในกรณีที่ไม่ได้รับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ (maternal immunity) ก็จะทำให้ช่องว่างของการติดเชื้อน้อยลงด้วย

ในการทดลองครั้งนี้ จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาว่า ในลูกสุกรก่อนหย่านมที่ไม่มี maternal immunity เมื่อได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน ซึ่งผลิตโดยศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่แล้ว ลูกสุกรนั้นจะแสดงอาการป่วย หรือตายเนื่องจากได้รับวัคซีนหรือไม่ และจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรได้เพียงใด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สัตว์ทดลอง ลูกสุกรจำนวน 30 ตัว แบ่งตามอายุเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว คือ อายุ 1,7,14,21 และ 28 วัน ทุกกลุ่มมาจากแม่สุกรที่ไม่เคยฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร จำนวน 5 แม่ ๆ ละกลุ่ม

วัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน ชุดที่ 3/27 ผลิตโดยงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ผลิตเมื่อ 21 ตุลาคม 2526 มี virus titer(antigen) $10^{3.5}$ PPD_{50}/dose

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ALD strain ของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล Miyadera strain ของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

วิธีการ

เจาะเลือดลูกสุกรทุกตัวก่อนฉีดวัคซีน เพื่อเก็บซีรั่มนำมาหา serum neutralizing titer (SN - titer)

การฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร ขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ คือ ละลายวัคซีน ด้วยน้ำเกลือ 0.85 % หนึ่งขวดต่อ 10 ซีซี ใช้จำนวน 1 ซีซี ฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของลูกสุกรแต่ละกลุ่มอายุคือ 1,7,14,21 และ 28 วัน ทุกตัว จากนั้นสังเกตุอาการของลูกสุกรภายหลังจากรับวัคซีน และวัดอุณหภูมิวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น นาน 14 วัน

เจาะเลือดและแยกเก็บซีรั่มจากสุกรแต่ละตัวภายหลังฉีดวัคซีนนาน 1,2,3,4 และ5 เดือน เก็บซีรั่มไว้ที่ -20°ซ. เพื่อตรวจหาระดับของ neutralizing antibody

การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกร โดยวิธี virus neutralization test การตรวจหา antibody titer กระทำโดยวิธี virus neutralization test ใน primary swine testicle cell ตามวิธี END method ของ Kumagai(Kumagai *et al*, 1961) นำซีรั่มจากสุกรมาอุ่นที่อุณหภูมิ 56°ซ. นาน 30 นาที แล้วเจือจางซีรั่ม โดยทำ two fold dilution และใช้ standard virus ขนาด 100 $TCID_{50}$/0.1 ซีซี

ผลการทดลอง

ความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน เมื่อใช้ในลูกสุกรอายุ 1,7,14,21 และ 28 วัน โดยดูจาก clinical sign และอุณหภูมิของร่างกายนาน 14 วัน ภายหลังจากรับวัคซีน พบว่า วัคซีนอหิวาต์สุกรที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ให้ความปลอดภัยในลูกสุกร

ทุกอายุ คือทุกตัวจะมีสุขภาพแข็งแรงเป็นปกติภายหลังรับวัคซีน ดังตารางที่ 1

สำหรับการสร้างแอนติบอดี้ต่อวัคซีนอหิวาต์สุกร จากการทดสอบโดยวิธี virus neutralization test พบว่าสุกรทุกกลุ่มอายุสามารถสร้างแอนติบอดี้ต่อวัคซีนอหิวาต์สุกรได้ ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1

วิจารณ์

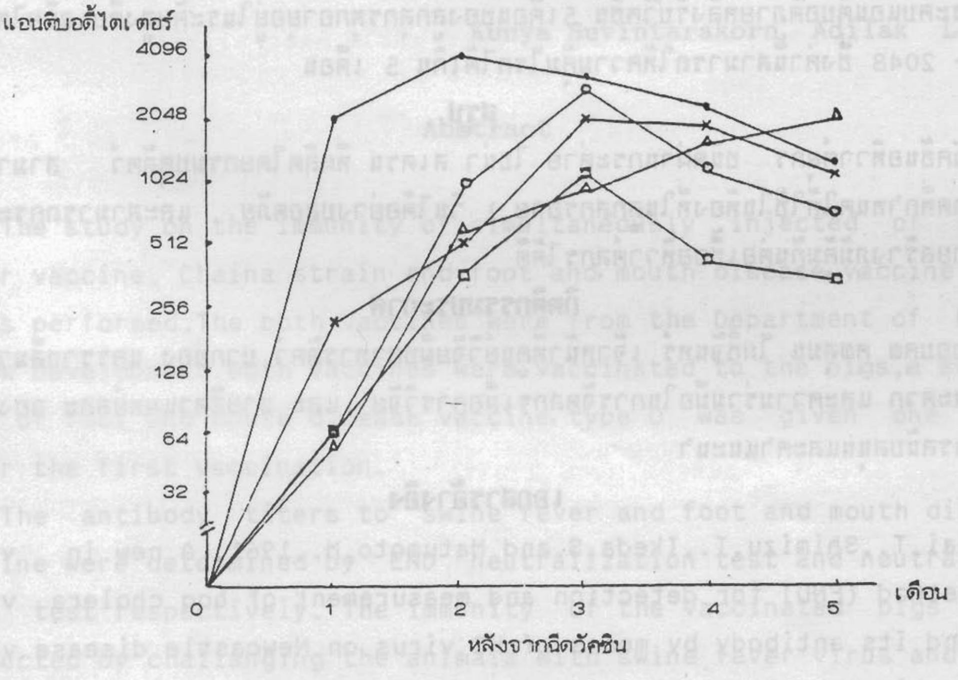
ความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน ที่ฉีดในลูกสุกรก่อนหย่านมอายุ 1,7,14,21 และ 28 วัน อยู่ในระดับสูงถึง 100% ลูกสุกรภายหลังรับวัคซีนแล้วไม่แสดงอาการป่วย หรือเจริญเติบโตช้า การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดี้ต่อวัคซีนอหิวาต์สุกรอยู่ในระดับสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ma *et al*(1971)และ Lee *et al*(1980) แต่รายงานของ Ma *et al* และLee *et al* ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิด LPC strain ภายใน 24 ชั่วโมงหลังคลอดก่อนลูกสุกรกินนมน้ำเหลือง ซึ่งรายงานว่าสามารถกระตุ้นให้ลูกสุกรสร้างภูมิคุ้มกันได้ในระดับสูง และไม่แสดงอาการป่วยภายหลังรับวัคซีน

ตารางที่ 1 ความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์สุกร ภายหลังฉีดให้สุกรอายุ 1,7,14,21และ28วัน

อายุขณะฉีดวัคซีน (วัน)	จำนวนสุกร ที่แสดงอาการป่วย / ทั้งหมด	% ความปลอดภัย
1	0 / 6	100 %
7	0 / 6	100 %
14	0 / 6	100 %
21	0 / 6	100 %
28	0 / 6	100 %

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยแอนติบอดี้ ไตเตอร์ ของซีรั่มสุกร

อายุขณะฉีดวัคซีน (วัน)	ระยะเวลาเป็นเดือนภายหลังฉีดวัคซีน					
	0	1	2	3	4	5
1	0	2048.0	4096.0	3686.4	2252.4	1126.4
7	0	213.3	512.0	2048.0	1962.6	960.0
14	0	58.6	597.3	938.6	1536.0	2048.0
21	0	66.6	1024.0	3072.0	1194.6	853.3
28	0	66.6	307.3	1048.0	469.3	405.0



รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของแอนติบอดี้ไตเตอร์ของซีรั่มสุกร หลังจากรับวัคซีนอหิวาต์สุกร เมื่ออายุ 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน

(●) กลุ่มอายุ 1 วัน

(✖) กลุ่มอายุ 7 วัน

(Δ) กลุ่มอายุ 14 วัน

(O) กลุ่มอายุ 21 วัน

(◻) กลุ่มอายุ 28 วัน

ค่าไตเตอร์ภายหลังรับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรนนาน 1 เดือนของกลุ่มอายุ 1 วันอยู่ในระดับที่สูง คือเฉลี่ยไตเตอร์ 2048 ขณะที่กลุ่มอื่นๆเฉลี่ย 58.6 - 213.3 เนื่องจากปริมาณไวรัสในวัคซีน (antigen) ที่ฉีดตามขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ คือ $10^{3.5}$ PPD_{50} เมื่อฉีดให้กับสุกรอายุ 1 วันซึ่งตัวเล็กมากปริมาณไวรัสต่อน้ำหนักร่างกายจึงสูงมาก การสร้างแอนติบอดี้จึงสูงขึ้นด้วย ซึ่งควรเป็นเรื่องที่จะศึกษาต่อไปว่าการสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรนั้นมีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสในวัคซีน(antigen)และน้ำหนักของสุกรเพียงใด

ระดับแอนติบอดี้ภายหลังรับวัคซีน 5 เดือนของลูกสุกรทุกอายุอยู่ในระดับสูงคือเฉลี่ยไตเตอร์ 405 - 2048 ซึ่งค่านี้สามารถให้ความคุ้มโรคได้เกิน 5 เดือน

สรุป

วัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ สามารถใช้ในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ในลูกสุกรอายุ 1 วันได้อย่างปลอดภัย และสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรได้ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ คุณสุมน ไผอิ้จันทร์ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยพืชอาหารสัตว์ ปากช่อง นครราชสีมา ที่ให้ความสะดวก และความร่วมมือในการจัดสุกรเพื่อการวิจัย และ นายสัตวแพทย์สละ กองสมัคร ที่ให้การสนับสนุนและคำแนะนำ

เอกสารอ้างอิง

Kumagai,T.,Shimizu,T.,Ikeda,S.and Matumoto,M.,1961, A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of HC virus on Newcastle disease virus in tissue culture. 1. Establishment of standard procedure. J. Immunol.,87 : 245 - 256.

LEE,Robert,C.T.,Wang,J.T.,Lai,S.S.,Wu,F.M.and Tracy T.C., LIN. Study on precolostral vaccination against hog cholera using an attenuated virus. LPC. China strain.(To be presented at the 1980 I.P.V.S.Congress)

MA,C.H.,Liu,F.Y.,Wang,C.F. and Hong,T.H.,1971. Immunologic response of colostrum-deprived and suckling pigs at various days of age to Lapinized swine fever virus strain (LPC). Ann. Res. Re., 59160:161 - 172 .

Shimitsu,T.,Kumagai,T.,Ikeda,S. and Matumoto,M.,1964. A new in vitro methods (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. III. END neutralization test. Arch.Ges.Virusforsch., 14:215-226.

Stewart,W.C.,1981. In Disease of swine, 5th Ed,. Leman, A.D. (eds.) Iowa State Ames, U.S.A.,832 p.

การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกรและโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด ไทป์ โอ เมื่อให้วัคซีนทั้งสองชนิดพร้อมกัน

A study on immune response of pigs simultaneously vaccinated with swine fever vaccine and foot and mouth disease vaccine type O

กัญญา สุวินทรากร[1] อดิลักษ์ เล็บนาค[2]

Kunya Suvintarakorn Adilak Lebnak

Abstract

The study on the immunity of simultaneously injected of swine fever vaccine, Chaina strain and foot and mouth disease vaccine type O was performed. The both vaccines were from the Department of Livestock Development. Both vaccines were vaccinated to the pigs, a second dose of foot and mouth disease vaccine type O was given one week after the first vaccination.

The antibody titers to swine fever and foot and mouth disease vaccine were determined by END neutralization test and neutralization test respectively. The immunity of the vaccinated pigs were conducted by challanging the animals with swine fever virus and foot and mouth disease virus at the first and sixth month after the first vaccination.

The highest antibody titers to swine fever vaccine was obtained three months after the first vaccination of single vaccine and simultaneously injected vaccines. The immune response to simultaneously injected vaccines, at the first and sixth months after the first vaccination, was not different from the single vaccine

The antibody against foot and mouth disease vaccine reached the highest level in the first month following the first vaccination. The neutralization titer to single vaccine was related to the simultaneously injected vaccines.

The immunity against swine fever and foot and mouth disease vaccine were 100 % protection in simultaneously injected vaccines at the sixth month following.

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

[2] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนฉีดพร้อมกัน ของวัคซีนอหิวาต์สกรชนิดเชื้อเป็น ผ่านกระต่าย ไชน่า สเตรน และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายทั้งสองชนิด ของกรมปศุสัตว์ โดยฉีดวัคซีนให้สุกรพร้อมกัน และฉีดซ้ำวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในอีกหนึ่งสัปดาห์ต่อมา ตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ต่อโรคอหิวาต์สุกร และโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ โดยวิธี END neutralization test และวิธี neutralization test ตามลำดับ ทุกเดือน นาน 6 เดือน

ผลจากการทดลองพบว่าสุกรสร้างแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์สุกรสูงสุดในเดือนที่ 3หลังจากได้รับวัคซีน ทั้งวัคซีนเดี่ยวและวัคซีนที่ฉีดพร้อมกัน และค่าไตเตอร์อยู่ในระดับใกล้เคียงกันตลอด 6 เดือนต่อมา

ส่วนการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อโรคปากและเท้า เปื่อย ไทป์ โอ สูงสุดในเดือนแรกหลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรก ทั้งวัคซีน เดี่ยวและวัคซีนที่ฉีดพร้อมกัน และค่าไตเตอร์อยู่ในระดับใกล้เคียงกันตลอด 6 เดือนเช่นเดียวกัน

ภูมิคุ้มโรคต่อเชื้ออหิวาต์สุกรและโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ภายหลังรับวัคซีนแล้ว 1 เดือน และ 6 เดือน วัคซีนที่ฉีดพร้อมกัน สามารถป้องกันได้ 100 %

คำนำ

สุกรตัวหนึ่ง ๆ ต้องได้รับการฉีดวัคซีนหลายชนิด โดยจัดโปรแกรมการใช้วัคซีนให้ช่วงระยะเวลาห่างกัน ทำให้ต้องจับสัตว์หลายครั้ง เพื่อฉีดวัคซีนแต่ละชนิด

ปัจจุบันวัคซีนสำหรับสุกรที่ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ มี 2 ชนิด คือ วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเชื้อเป็นผ่านกระต่าย ไชน่า เสตรน และวัคซีนเชื้อตายโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ เอ และ ไทป์โอ แต่ที่เกษตรกรนำไปใช้กันมากคือ ไทป์โอ ถ้าวัคซีนอหิวาต์สุกรและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ สามารถฉีดเข้าสุกรพร้อมกันได้โดยไม่ทำให้การสร้างภูมิคุ้มโรคของแต่ละอย่างลดลง ก็จะทำให้ผู้ใช้ได้รับความสะดวก เมื่อจับสัตว์ครั้งเดียวสามารถฉีดวัคซีนให้ทั้งสองชนิด เพราะการฉีดวัคซีนแต่ละครั้งสิ้นเปลืองเวลา และแรงงาน นอกจากนั้นทำให้สัตว์มีอาการตกใจและเครียดมาก

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงเพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันเชื้ออหิวาต์สุกร และ เชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย ชนิดไทป์โอ ซึ่งเป็นผลจากการฉีดวัคซีนทั้งสองพร้อมกันในสุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. *สัตว์ทดลอง* สุกรอายุ 2 เดือนพันธุ์ผสมลาร์จไวท์ และแลนด์เรซจากแม่สุกรที่ไม่เคยฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 24 ตัวน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ11ก.ก.

2. *วัคซีน*

2.1 วัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย ไชน่า เสตรน ซึ่งผลิตโดยงานผลิตวัคซีน

อหิวาต์สุกร กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ชุด 30/31 ผลิตเมื่อ 20 พฤษภาคม 2531 หมดอายุ 23 พฤศจิกายน 2532

2.2 วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไทป์ โอซึ่งผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ ชุด 25-28/88

3. *เชื้อไวรัส*

3.1 เชื้อพิษไวรัสอหิวาต์สุกร ชุด HCV'30

3.2 เชื้อพิษไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ชุด OPN- P_{14}

3.3 เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ALD strain

3.4 เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล Miyadera strain

3.5 Standard virus โรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ

วิธีการ

1. *เจาะเลือดสุกรทั้ง 24 ตัว เพื่อเก็บซีรั่ม* และแบ่งซีรั่มสำหรับตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกรและโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ก่อนนำมาทำการทดลอง

2. *การฉีดวัคซีนแก่สุกรทดลอง* แบ่งสุกรเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มฉีดวัคซีนเดี่ยวกลุ่มละ 2 ตัว คือ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร,กลุ่มที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ,กลุ่มที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมกับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ จำนวน 12 ตัว และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม (Control) จำนวน 8 ตัว

2.1 ฉีดวัคซีนเดี่ยวอหิวาต์สุกรเพียงครั้งเดียว ในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ เข้ากล้ามเนื้อที่แผงคอ

2.2 ฉีดวัคซีนเดี่ยวโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ 2 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ เข้าใต้ผิวหนังที่แผงคอในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่

2.3 ฉีดวัคซีนพร้อมกัน แต่ละชนิดฉีดแยกกันสองข้างแผงคอ ตามขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ และอีก 1 สัปดาห์ต่อมาฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ซ้ำ (booster)

เจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่มสุกรทุกเดือนหลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรก นาน 6 เดือน

3. *การทดสอบภูมิคุ้มโรคของวัคซีน* วัคซีนอหิวาต์สุกรกระทำโดยฉีดเชื้อพิษทับ ด้วยเชื้อพิษไวรัสอหิวาต์สุกร HCV'30 ขนาด 10^5 minimum lethal dose (MLD) ส่วนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ทดสอบโดยฉีดเชื้อพิษไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ชุด OPN-P_{14} ขนาด 300 PID_{50} (Pig infective dose) โดยฉีดเชื้อพิษสำหรับทดสอบทั้ง 2 ชนิดในเดือนที่ 1 และเดือนที่ 6 โดยแยกสุกรจากกลุ่มฉีดวัคซีนพร้อมกัน ครั้งละ 4 ตัว แบ่งไปตอกเชื้อพิษละ 2 ตัว พร้อมกับสุกรกลุ่มควบคุม(control) 2 ตัวต่อครั้ง ดูอาการสุกรหลังฉีดพิษทับ 3 สัปดาห์

4. *การหาแอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับวัคซีน*

END neutralization test (สำหรับการหาแอนติบอดี้ไตเตอร์ ของวัคซีนอหิวาต์สุกร)

การเตรียมเซลล์ primary swine testicle cell (ST- cell) ตามวิธี Exaltation of Newcastle disease virus (END method) ของ Kumagai และคณะ คือ เตรียมเซลล์จากลูกอัณฑะสุกรอายุ 1 เดือน เลี้ยง ST-cell ใน Growth medium (G.M) คือ LH_{20} ประกอบด้วย lactalbumin,Hank,penicillin-streptomycin 500

unit/cc และ goat serum (GS) 20% และ maintenance medium (MM) คือ LH_{10} ใช้เหมือน GM ยกเว้นใช้ GS 10%

นำซีรั่มสุกรมา inactivated ที่ 56°ซ นาน 30 นาทีเจือจางซีรั่มโดยวิธี two fold dilutionใน LH_{20}และใช้standard virus,ALD strain ขนาด 100 $TCID_{50}$/0.1 cc ในปริมาตรเท่ากัน นำไป neutralized ที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ในหลอดเลี้ยงเซลล์ หลอดละ 0.1 ซีซี เติม ST-cell suspension ใน GM หลอดละ 0.5 ซีซี นำไปเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 37°ซ นาน 4 วัน แล้วจึงเอา culture fluid ในแต่ละหลอดออกใส่ 0.5 ซีซี ของ 1 HAU/cc ของ Miyadera strain ใน LH_{10} หลังจากนั้น นำไปอบที่ 37°ซ ต่ออีก 3 วัน แล้วดู CPE (Cytopathic Effect)

Neutralization test (สำหรับการหาแอนติบอดีไตเตอร์ ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย)

การเตรียมเซลล์ใช้ BHK cell line อาหารที่ใช้คือ MEMเติมpenicillin-streptomycin 500 unit/cc และ calf serum 5%

นำซีรั่มจากสุกรมา inactivated ที่อุณหภูมิ 56°ซ นาน 30 นาที เจือจางซีรั่ม โดย two fold dilutionใน lactalbumin hydrolysate HLY และใส่ standard virus ขนาด 100 $TCID_{50}$/0.1 cc โดยให้ปริมาตรเท่ากัน อบใน 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาใส่ไมโครเพลท ช่องละ 0.05 ซีซี ต่อ dilution แล้วเติมเซลล์ suspension ลงช่องละ 0.1 ซีซี นำไมโครเพลทไปอบที่ 37°ซ นาน 2-3 วันแล้วดู CPE อ่านค่าจาก serum dilution สูงสุดที่ไม่เกิด CPE

ผลการทดลอง

สุกรทดลองทุกตัวจำนวน 24 ตัว ก่อนทำการฉีดวัคซีน พบว่ามีค่าซีรั่มไตเตอร์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรและเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เป็นศูนย์

สุกรทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมกับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV), กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรเดี่ยว, กลุ่มฉีดวัคซีน FMDV เดี่ยว พบว่าค่าไตเตอร์ต่อเชื้ออหิวาต์สกรและเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ภายหลังรับวัคซีนครั้งแรก นาน 1 เดือนถึง 6 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงตามตารางที่ 1

การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของวัคซีนอหิวาต์สุกรภายหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมกับ FMDV โดยดูจากค่าไตเตอร์ที่ทดสอบโดยวิธี END neutralization test พบว่าค่าไตเตอร์สูงสุดเกิดขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรก 3 เดือน หลังจากนั้นไตเตอร์จะลดลงเพียงเล็กน้อยจนถึงเดือนที่ 6 ซึ่งค่าไตเตอร์มีใกล้เคียงกับค่าไตเตอร์ที่ได้จากการฉีดวัคซีนอหิวาต์สกรเพียงอย่างเดียว ตามรูปที่ 1

การสร้างแอนติบอดีต่อวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ภายหลังฉีดวัคซีน FMDV และวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมกัน จากการทดลองโดยวิธี Neutralization test พบว่าสุกรสร้างแอนติบอดีสูงสุดในเดือนแรกหลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรก หลังจากนั้นไตเตอร์จะลดต่ำลงในค่าที่ใกล้เคียงกับวัคซีนเดี่ยว แต่ค่าเฉลี่ยของวัคซีนเดี่ยวต่ำกว่า ตามรูปที่ 2

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน โดยดูจากภูมิคุ้มโรค ในสุกรที่ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร และ FMDV พร้อมกัน

วัคซีนอหิวาต์สุกร ฉีดเชื้อพิษไวรัสอหิวาต์สุกร ปรากฏว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนพร้อมกันนาน 1 เดือน และ 6 เดือนสามารถป้องกันโรคหรือมีความคุ้มโรคถึง100 %ไม่มีสุกรตาย ในขณะที่กลุ่มควบคุมตายหมดภายใน 2 สัปดาห์ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่าไตเตอร์ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรและเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ภายหลังได้รับวัคซีนพร้อมกัน และ วัคซีนเดี่ยว (* = ฉีดด้วยเชื้อพิษไวรัสอหิวาต์สุกร,** = ฉีดด้วยเชื้อพิษไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ)

กลุ่มทดลอง	เบอร์สุกร	ระดับภูมิคุ้มกัน													
		0 เดือน		1 เดือน		2 เดือน		3 เดือน		4 เดือน		5 เดือน		6 เดือน	
		S	FMDV	S	FMDV	S	FMDV	S	FMDV	S	FMDV	S	FMDV	S	FMDV
	1	0	0	32	128*										
	2	0	0	64	64*										
	3	0	0	128	128**										
ฉีดวัคซีน	4	0	0	64	64**										
อหิวาต์	5	0	0	16	32	128	128	256	90	256	64	512	23	256	16*
สุกร	6	0	0	16	64	256	64	1024	32	512	16	1024	23	1024	11*
พร้อมกัน	7	0	0	32	45	512	11	1024	16	1024	11	1024	23	512	45**
วัคซีน	8	0	0	16	64	256	45	256	11	512	32	512	32	256	23**
FMDV	9	0	0	64	180	512	32	1024	45	512	64	1024	45	1024	45
	10	0	0	128	64	512	23	1024	23	512	45	512	32	1024	45
	11	0	0	32	128	256	64	2048	128	512	64	256	64	256	45
	12	0	0	32	180	256	90	512	11	512	45	512	23	256	32
ค่าเฉลี่ยไตเตอร์		0	0	52	95.1	336	57.1	896	44.5	544	42.6	672	33.1	576	32.7
ฉีดอหิวาต์	13	0	0	64	0	1024	0	1024	0	1024	0	1024	0	512	0
สุกรเดี่ยว	14	0	0	32	0	256	0	1024	0	512	0	512	0	512	0
ค่าเฉลี่ยไตเตอร์		0	0	48	0	640	0	1024	0	768	0	768	0	512	0
ฉีด FMDV	15	0	0	0	64	0	32	0	16	0	16	0	11	0	8
เดี่ยว	16	0	0	0	128	0	32	0	16	0	45	0	64	0	32
ค่าเฉลี่ยไตเตอร์		0	0	0	96	0	32	0	16	0	30.5	0	37.5	0	20

ตารางที่ 2 ภูมิคุ้มโรคต่อเชื้ออหิวาต์สุกรภายหลังฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมกับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ นาน 1 เดือนและ 6 เดือน

ระยะเวลาหลังจากรับวัคซีนแล้วฉีดพิษทับ	จำนวนสุกร (รอดตาย / ทั้งหมด)	% รอดตาย
1 เดือน	2 / 2	100
กลุ่มควบคุม	0 / 2	0
6 เดือน	2 / 2	100
กลุ่มควบคุม	0 / 2	0

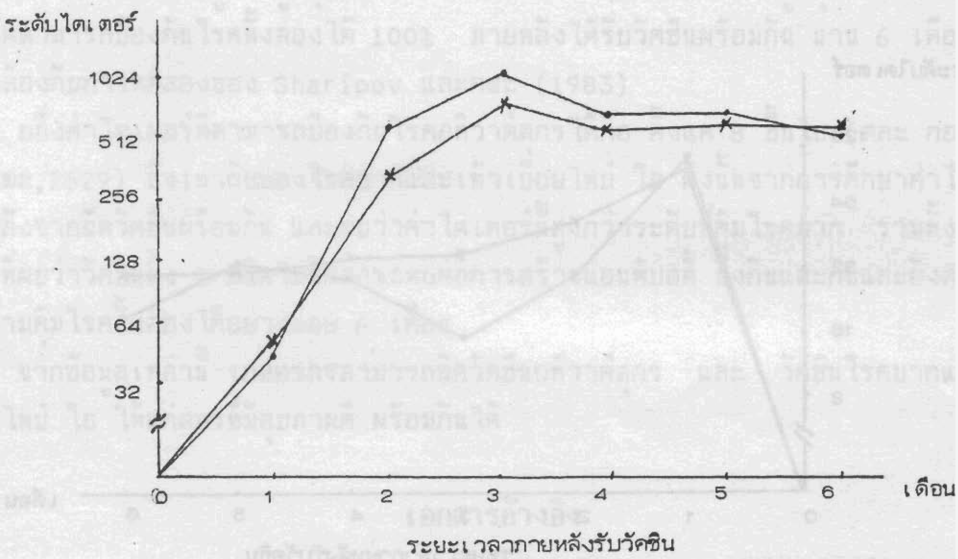
ตารางที่ 3 ภูมิคุ้มโรคต่อเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ภายหลังฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ พร้อมกับวัคซีนอหิวาต์สุกรนาน 1 เดือนและ 6 เดือน

ระยะเวลาหลังจากรับวัคซีนแล้วฉีดพิษทับ	จำนวนสุกร (ไม่ป่วย / ทั้งหมด)	% ไม่ป่วย
1 เดือน	2 / 2	100
กลุ่มควบคุม	0 / 2	0
6 เดือน	2 / 2	100
กลุ่มควบคุม	0 / 2	0

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ฉีดเชื้อพิษไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ พบว่า กลุ่มที่ได้รับวัคซีนพร้อมกันนาน 1 เดือนและ 6 เดือน สามารถป้องกันโรคหรือมีความคุ้มโรคถึง 100 % เช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 3

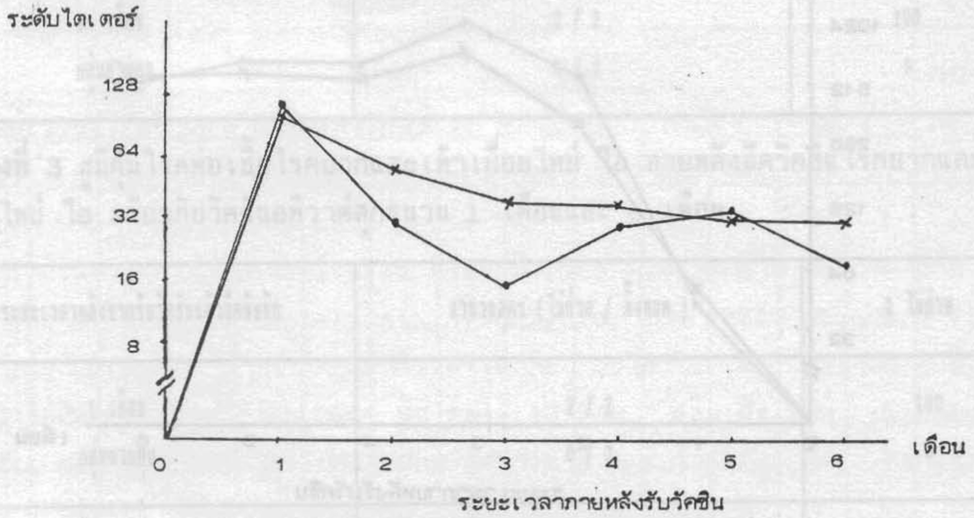
สรุปและวิจารณ์

การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดี้ต่อวัคซีนอหิวาต์สุกรและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ภายหลังจากฉีดวัคซีนทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่าวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ฉีดพร้อมกัน ไม่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของสุกรต่อวัคซีนอหิวาต์สุกร โดยศึกษาจากค่าไตเตอร์ตลอดระยะเวลา 6 เดือนหลังจากฉีดวัคซีนพบว่าค่าไตเตอร์ไม่ต่างจากกลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรเพียงอย่างเดียว และจากการทดลองพบว่าวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ฉีดพร้อมกันก็ไม่ได้มีผลลดการสร้างภูมิคุ้มกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ซึ่งเมื่อศึกษาค่าไตเตอร์จากสุกรที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เดี่ยว และที่ฉีดพร้อมกัน พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย คือค่าไตเตอร์ของวัคซีนเดี่ยวต่ำกว่าค่าไตเตอร์ของกลุ่มที่ฉีดพร้อมกันซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง



รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของ neutralizing antibody titer ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรในสุกร ภายหลังรับวัคซีนอหิวาต์สุกร พร้อมกับวัคซีนปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ

- ● กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรเดียว
- X กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมวัคซีนปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ



รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของ neutralizing antibody titer ต่อเชื้อปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ในสุกรภายหลังรับวัคซีนปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ พร้อมกับวัคซีนอหิวาต์สุกร

• กลุ่มฉีดวัคซีนปากและเท้าเปื่อยไทป์โอเดี่ยว

x กลุ่มฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรพร้อมวัคซีนปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ

ของ Sharipov และ Nuriev (1983) ซึ่งพบว่า immune response ของวัคซีนที่ฉีดพร้อมกัน 3 ชนิด คือ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าเทียม และ วัคซีนอหิวาต์สุกร ดีกว่าฉีดแต่ละชนิด แต่ต่างกับการทดลองของ Olah และ Panjevic (1984)ซึ่งพบว่าเมื่อฉีดวัคซีนทั้งสองพร้อมกัน ค่าไตเตอร์ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ จะลดลง 44% โดยศึกษาจากสุกรจำนวน 28 ตัว

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่ฉีดพร้อมกัน คือวัคซีนอหิวาต์สุกรและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ โดยดูจากภูมิคุ้มกันโรคที่เกิดขึ้นหลังจากฉีดเชื้อพิษทับ ภูมิคุ้มโรคของวัคซีนทั้ง 2 ชนิดสามารถป้องกันโรคทั้งสองได้ 100% ภายหลังได้รับวัคซีนพร้อมกัน นาน 6 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sharipov และคณะ (1983)

อนึ่งค่าไตเตอร์ที่สามารถป้องกันโรคอหิวาต์สุกรได้คือ ตั้งแต่ 8 ขึ้นไป (สละ กองสมัคร และคณะ,2529) ซึ่งเท่ากับของโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ดังนั้นจากการศึกษาค่าไตเตอร์ภายหลังจากฉีดวัคซีนพร้อมกัน และพบว่าค่าไตเตอร์นี้สูงกว่าระดับที่คุ้มโรคมาก รวมทั้งผลการศึกษาที่พบว่าวัคซีนทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลกระทบต่อการสร้างแอนติบอดี้ ซึ่งกันและกันและยังสามารถให้ความคุ้มโรคทั้งสองได้อย่างน้อย 6 เดือน

จากข้อมูลเหล่านี้ เกษตรกรสามารถฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร และ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ ให้แก่สุกรที่มีสุขภาพดี พร้อมกันได้

เอกสารอ้างอิง

สละ กองสมัคร,2529. วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย.64 น.

Olah,M.,Panjevic,D.,1984.Immune response of swine after simultaneous vaccination against swine fever and foot and mouth disease., Naucni Inst. Za Veterinarstvo,Novi Sad, Yugoslavia. 32 (1/3): 121 -128.

Sharipov,Sh.N.,Gorskii,B.V.,Pronin,I.A.,Yusupov,R.Kh.,Dudnikov,A.I., Onufriev, V.P., 1983. Results of research on simultaneous immunization of pigs against foot and mouth disease,swine fever and Aujeszky's disease. Vet.Inst.,Kazan. USSR. 43 - 48.

Sharipov,Sh.N.,Nuriev,G.G.,1983. Non specific immune factors in pigs immunized simultaneously against certain viral disease (Foot and Mouth disease,Aujesky's disease andswine fever). Vet.inst., Kazan. USSR. 37 - 41.

การศึกษาวัคซีนรวมหลอดลมอักเสบไก่และนิวคาสเซิล

นันทนา โปษณเจริญ[1] วิมล ปริยกนก[1] กมลทิพย์ อนุสกุลเจริญพร[1]

Nantana Posanachareon, Vimol Pariyakanok

Kamonthip Anusakunchareonporn

ABSTRACT

The protective effect of Infectious bronchitis (IB) and Newcastle disease(ND) lived virus dried vaccine were examined in 3-4 weeks old healthy chicken. When chicks were vaccinated with mixed IB (10^4 EID_{50} per chick) and ND ($10^{6.5}$ EID_{50} per chick) intranasally the immunity against both viruses was effective. The results show the significant effectiveness only when the virus titer of ND higher than IB.

บทคัดย่อ

วัคซีนรวมเชื้อเป็นชนิดแห้ง (Lyophilized vaccine) ระหว่างหลอดลมอักเสบติดต่อไก่ (IB) และนิวคาสเซิล (ND) นำมาใช้กับลูกไก่สุขภาพแข็งแรงไม่เคยได้รับวัคซีนอื่นมาก่อน อายุ 3-4 สัปดาห์ โดยการหยอดจมูกวัคซีนผสม IB (10^4 EID ต่อตัว) และ ND ($10^{6.5}$ EID ต่อตัว) พบว่าวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิดและวัคซีนรวมนี้ต้องมีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลมากกว่าไวรัสหลอดลมอักเสบ ถ้าปริมาณไวรัสระหว่าง IB และ ND ของวัคซีนรวมใกล้เคียงกันมากแล้ว ประสิทธิภาพความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิดจะลดลง

คำนำ

โรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบไก่เป็นโรคระบาดที่ร้ายแรงของไก่ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เนื่องจากวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรนเอฟและวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่สเตรนพื้นบ้านมีวิธีการผลิตและวิธีการใช้คล้ายคลึงกัน การใช้วัคซีนรวมย่อมก่อให้เกิดความสะดวกต่อผู้ใช้ (เศรษฐวิกุล,2524) กล่าวว่าการใช้วัคซีนรวมให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้วัคซีนแต่ละชนิดแยกกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของผู้ใช้ ในต่างประเทศได้ผลิตวัคซีนรวมระหว่างนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อไก่มานานแล้วและยังนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่ง Bengelsdorff (1972) ได้รายงานว่าการให้วัคซีนนิวคาสเซิลก่อนแล้วให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อตามหลัง 10-14 วัน จะทำให้ความคุ้มโรคนิวคาสเซิลลดลงอย่างเห็นได้ชัด ด้วยเหตุนี้ควรให้

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

วัคซีนนิวคาสเซิลพร้อมวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ สำหรับการทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตวัคซีนรวม ทำให้เกษตรกรได้รับความสะดวกสองประการคือ ได้รับวัคซีนทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกัน และไม่ต้องเสียเวลาในการทำวัคซีนสองครั้ง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. SEED ไวรัสนิวคาสเซิลสเตรนเอฟ และ SEED ไวรัสหลอดลมอักเสบไก่สเตรนพื้นบ้าน

โดยการผ่าน SEED attenuated virus แต่ละชนิดเข้า Chorioallantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ส่องคัดไข่ตายภายใน 24 ชั่วโมงเก็บน้ำไข่ (allantoic fluid) ของไข่เป็น สำหรับวัคซีนนิวคาสเซิลเก็บน้ำไข่ในวันที่ 4 ส่วนวัคซีนหลอดลมอักเสบให้เก็บน้ำไข่ในชั่วโมงที่ 48

นำตัวอย่างน้ำไข่ไปหาปริมาณไวรัสโดยเจือจางเป็น 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-10} แล้วฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวันนาน 7 วัน คำนวนหาค่า EID_{50}-/CC. ตามวิธี Reech and Muench วัคซีนสดนิวคาสเซิลมีปริมาณไวรัสประมาณ $10^{9.5}$ EID_{50}/CC. และวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่มีปริมาณไวรัส $10^{8}EID_{50}$/CC. เก็บน้ำไข่หรือวัคซีนสดไว้ในตู้แช่แข็ง (-20°C.) ก่อนนำมารวมกัน

2. ลูกไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาวอายุประมาณ 10 วัน จำนวน 400 ตัว จากงานเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง

3. ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน จำนวน 500 ฟอง จากงานเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง

4. เชื้อพิษไวรัสนิวคาสเซิล (Hot Virus) เป็นเชื้อพิษชนิดรุนแรงที่แยกได้ในท้องที่อำเภอปากช่อง มีปริมาณไวรัส $10^{10.1}$ EID_{50}/CC. ใช้ฉีดเข้ากล้ามลูกไก่ขนาด $10^{6}EID_{50}$ ต่อตัว แล้วดูผลในวันที่ 21 ภายหลังการฉีกพิษทับ

5. สารคงสภาพ (STABILIZER) ประกอบด้วย 0.3% Polyvinyl pyrrolidone และ 10% Lactose ทำเป็นสารละลายแล้วนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันใช้เป็นส่วนผสมของการทำวัคซีนแห้ง

6. เครื่องดูดแห้ง (Freeze-drying machine) ใช้โปรแกรมการทำแห้งอัตโนมัติมีระยะเวลาการทำแห้งวัคซีนแต่ละครั้งนาน 27 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การรวมน้ำวัคซีนสด (allantoic fluid) ระหว่างวัคซีนนิวคาส ล (ND) กับวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ (IB) ในปริมาณ 1 ซีซี. เท่ากันโดยให้มีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลขนาด $10^{8.5}$ ถึง $10^{5.5}$ รวมกับหลอดลมอักเสบไก่ขนาด 10^{7} ถึง 10^{4} EID_{50}/CC. หยอดจมูกหรือตาลูกไก่อายุ 10 วัน ซึ่งแบ่งเป็น 8 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว และกลุ่มควบคุม 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ซึ่งจัดเป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้ทำวัคซีน, ทำวัคซีน ND ชนิดเดียว และทำวัคซีน IB ชนิดเดียว

ชนิดและปริมาณไวรัสที่ใช้หยอด	กลุ่มได้รับวัคซีน								กลุ่มควบคุม*		
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3
ND EID50/ML	$10^{8\ 5}$	$10^{8\ 5}$	$10^{8\ 5}$	$10^{7\ 5}$	$10^{6.5}$	$10^{6\ 5}$	$10^{6\ 5}$	$10^{5.5}$	-	$10^{8.5}$	-
IB EID50/ML	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{5}	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{4}	-	-	$10^{6\ 0}$
ND+IB EID50/ตัว	$10^{6\ 5}+10^{5}$	$10^{6\ 5}+10^{4}$	$10^{6\ 5}+10^{3}$	$10^{5\ 5}+10^{3}$	$10^{4\ 5}+10^{5}$	$10^{4\ 5}+10^{4}$	$10^{4\ 5}+10^{3}$	$10^{3\ 5}+10^{2}$	-	$10^{6\ 5}$	10^{4}

กลุ่มควบคุม คือ (1) กลุ่มไม่ได้ทำวัคซีน (2) กลุ่มทำวัคซีน ND ชนิดเดียว (3) กลุ่มทำวัคซีน IB ชนิดเดียว

ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการทำวัคซีนรวมเก็บซีรั่มไก่ทุกกลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวยกเว้นกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1 และกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 3 นำซีรั่มมาหาค่า HI ไตเตอร์ดำเนินการโดยวิธีการตามหนังสือ Isolation and Identification of Avian Pathogens ซึ่งจัดพิมพ์โดย American Association of Avian Pathologists (AAAP) 2nd Edition 1980 โดยเริ่มเจือจางจาก 1:2 และอ่านค่า Titer เป็น log 2 จากนั้นนำไก่ที่เก็บซีรั่มแล้วไปฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิล พร้อมไก่กลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1 เป็นไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนเลยและกลุ่มควบคุมที่ 2 เป็นไก่ที่ได้รับวัคซีน ND ชนิดเดียวฉีดเชื้อพิษขนาด $10^6 EID_{50}$ ต่อตัวเข้ากล้าม สังเกตอาการภายใน 14 วัน

ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการให้วัคซีนรวม เก็บซีรั่มไก่ที่เหลือทุกกลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว และกลุ่มได้รับวัคซีน IB ชนิดเดียว แล้วนำมาหาค่า Neutralizing Index (NI) โดยวิธีอัลฟ่า (Alpha method) คือใช้ปริมาณซีรั่มคงที่แต่แปรค่าไวรัสจาก 10^{-1} ถึง 10^{-7} ฉีดส่วนผสมไวรัสกับซีรั่มเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน นำเข้าตู้ฟัก 37°C. นาน 7 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวันแล้วนำมาคำนวนตามวิธี Reech and Muench ค่าของ Virus control ลบค่าของไวรัสผสมซีรั่มจะได้ค่า NI

2. ***การทำวัคซีนรวมชนิดแห้งเชื้อเป็น*** (Lyophilized Vaccine) นำวัคซีนสดที่ได้จากการผ่าน Seed ของไวรัสทั้งสองชนิดซึ่งรู้ปริมาณไวรัส ND = $10^{9.5}$ and IB = 10^7 EID_{50}/ml มาผสมกันด้วยสัดส่วนต่าง ๆ 3 ชนิด โดยมีวัคซีนแต่ละชนิดเป็นตัวควบคุม (control) คำนวนปริมาณไวรัสแต่ละชนิดต่อโด๊สก่อนผสมวัคซีน แล้วเติมสารคงสภาพ (Stabilizer) ปริมาณเท่ากับวัคซีน แบ่งส่วนผสมเก็บไว้เป็นตัวอย่างเพื่อหาปริมาณไวรัสก่อนเข้าทำแห้ง จากนั้นแจกวัคซีนผสมใส่ขวด ๆ ละ 1 ซีซี. แล้วนำเข้าเครื่องดูดแห้ง (Freeze - drying machine) นาน 27 ชั่วโมง

กลุ่มที่	ปริมาณไวรัส EID_{50} ต่อตัว	
	วัคซีนผสมก่อนเข้าทำแห้ง	วัคซีนผสมหลังทำแห้ง
1	ND $10^{7.0}$+IB$10^{4.30}$/ตัว	ND $10^{6.8}$+IB$10^{4.0}$/ตัว
2	ND $10^{7.5}$+IB$10^{3.0}$/ตัว	ND $10^{7.2}$+IB$10^{2.4}$/ตัว
3	ND $10^{6.8}$+IB$10^{4.6}$/ตัว	ND $10^{6.6}$+IB$10^{4.3}$/ตัว
4	ND $10^{7.0}$/ตัว	ND $10^{6.5}$/ตัว
5	IB $10^{4.3}$/ตัว	IB 10^4/ตัว

* วัคซีน 1 ขวด มี 100 โด๊ส

3. ***การทดสอบวัคซีนแห้งเชื้อเป็น*** (quality Control)

3.1 ทดสอบความบริสุทธิ์ (Sterility test) โดยเพาะวัคซีนแห้งที่ละลายด้วยน้ำยาละลายบน Tryptose agar plate และ Thioglycollate broth เพื่อตรวจนับจำแนกแบคทีเรีย ปกติไม่ควรมีแบคทีเรียเกิน 10 โคโลนีต่อโด๊ส

3.2 ทดสอบความปลอดภัย (Safety test) ใช้ไก่ทดลองกลุ่มละ 10 ตัว จำนวน

6 กลุ่ม แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้ทำวัคซีน 1 กลุ่ม กลุ่มให้วัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเดียว 1 กลุ่ม กลุ่มให้วัคซีนหลอดลมอักเสบชนิดเดียว 1 กลุ่ม และกลุ่มวัคซีนรวมอีก 3 กลุ่ม ละลายวัคซีนแห้งด้วยน้ำยาละลาย (nomal saline) ให้เข้มข้นเป็น 10 เท่าของขนาดที่ใช้ในท้องที่ (field dose)นำไปหยอดจมูกหรือตาตัวละ 2 หยด เลี้ยงไว้ดูอาการ 3 สัปดาห์ ไก่ทุกตัวที่ได้รับวัคซีนไม่ควรแสดงอาการใด ๆเกี่ยวกับระบบหายใจหรืออื่น ๆ

3.3 การหาปริมาณไวรัสแต่ละชนิดในวัคซีนรวม นำวัคซีนรวมชนิดแห้งมาละลายด้วยน้ำยาละลาย 1 ซีซี.ต่อขวด เติม Hyperimmune serum ชนิดตรงข้ามกับไวรัสที่ต้องการหาปริมาณเพื่อทำให้ไวรัสชนิดเดียวกับซีรั่มที่ใส่เป็นกลาง (neutralized) เช่นใช้ hyperimmune serum ของไวรัสนิวคาสเซิลรวมกับวัคซีนผสม ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อหาปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบ เช่นเดียวกันเมื่อใช้ hyperimmune serum ของไวรัสหลอดลมอักเสบรวมกับวัคซีนผสมเพื่อหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล จากนั้นเอาวัคซีนผสมที่ถูกทำให้เป็นกลางแล้วมาหาปริมาณไวรัส โดยวิธีการทำให้เจือจาง 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-10} ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน นำเข้าตู้ฟัก 37°C. นาน 7 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวัน แล้วจึงคำนวณหาปริมาณไวรัสตามวิธี Reech and Muench

3.4 การหาปริมาณความคุ้มโรคของวัคซีนรวม

<u>การหาค่า HI ไตเตอร์</u> ละลายวัคซีนรวมชนิดแห้งด้วยน้ำยาละลาย (normal saline) อัตราส่วน 1 ต่อ 4 หยอดจมูกหรือตาไก่อายุ 1 เดือน จำนวน 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ส่วนไก่ควบคุมอีก 2 กลุ่มที่ไม่ให้วัคซีนเลย และกลุ่มให้วัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเดียวภายหลังการให้วัคซีน 14 วัน เจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่มไก่ทุกตัว ยกเว้นไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีนเลย นำไปหาค่า HI ไตเตอร์ ด้วยวิธี microtest (Beta method) หลังจากนั้นจึงนำไก่ทั้งหมดทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่มควบคุมไปฉีดพิษทับด้วยไวรัสนิวคาสเซิล สังเกตอาการใน 2 สัปดาห์

<u>การหาค่า NI</u> ละลายวัคซีนรวมชนิดแห้งด้วยน้ำยาละลายอัตราส่วน 1 ต่อ 4 หยอดจมกหรือตาไก่อาย 1 เดือน จำนวน 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ส่วนไก่ควบคุม 10 ตัวจะให้วัคซีนหลอดลมอักเสบชนิดเดียว ภายหลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์เก็บซีรั่มไก่ทุกกลุ่มเป็นซีรั่มรวม (pooled serum) นำมา inactivate ที่ 56°C.นานครึ่งชั่วโมงก่อนนำไปหาค่า neutralizing index (NI) โดยการทำ Virus neutralization (Alpha method)

ผลการทดลอง

1. ตารางที่ 1 แสดงผลความคุ้มโรคของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบไก่ชนิดสดที่มีปริมาณไวรัสแน่นอนในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์

2. ตารางที่ 2 แสดงผลการใช้วัคซีน 3 ชนิด และกลุ่มควบคุม ในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์ ไก่ทุกกลุ่มมีความปลอดภัย 100% ภายหลังการให้วัคซีนรวม

3. ผลการใช้วัคซีนรวมชนิดแห้ง ปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล $10^{6.8}$ กับหลอดลมอักเสบไก่ $10^{4.0}$ EID_{50} ต่อตัว ในลูกไก่อายุ 1 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว และกลุ่มควบคุมไม่ให้วัคซีนใด ๆ จำนวน 20 ตัว ปรากฏว่า

- วัคซีนมีความปลอดภัย 100% - ค่า HI ไตเตอร์เฉลี่ย $2^{5.59}$
- ความคุ้มโรคหลังฉีดพิษทับ 97% - ค่าเฉลี่ย NI = 2.6

ตารางที่ 1 แสดงผลความคุ้มโรคของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบไก่ชนิดสด ที่มีปริมาณไวรัสแน่นอน ในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์

กลุ่มที่	ปริมาณไวรัส ND+IB/ตัว (EID_{50}/ตัว)	* ค่าเฉลี่ย HI Titer (Log 2)	จำนวนไก่รอด/จำนวนไก่ฉีดพิษทับ	% ความคุ้มโรค	** ค่าเฉลี่ย Neutralizing Index
1	$10^{6.5}+10^{5}$	7	10/10	100%	2.81
2	$10^{6.5}+10^{4}$	6.11	10/10	100%	3.21
3	$10^{6.5}+10^{3}$	3.65	10/10	100%	2.64
4	$10^{5.5}+10^{3}$	3.14	10/10	100%	2.0
5	$10^{4.5}+10^{5}$	4.74	8/10	80%	2.42
6	$10^{4.5}+10^{4}$	2.87	8/10	80%	2.61
7	$40^{4.5}+10^{3}$	3.15	9/10	90%	2.78
8	$10^{3.5}+10^{2}$	1.4	3/10	30%	1.83
9	-	-	0/10	0%	กลุ่มควบคุมไม่ได้ทำวัคซีน
10	$10^{6.5}$ND ตัว	7	10/10	100%	กลุ่มควบคุมทำวัคซีน ND ชนิดเดียว
11	10^{4}IB	-	-	-	2.4 กลุ่มควบคุมทำวัคซีน IB ชนิดเดียวกัน

* มาตรฐาน HI titer = log 2^{3} ** มาตรฐาน NI = 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการใช้วัคซีน 3 ชนิด และกลุ่มควบคุมในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์

ชนิดที่	ปริมาณไวรัสของวัคซีนรวม + แยกชนิดแห้ง/โด๊ส (EID_{50}/Dose)	ค่าเฉลี่ย HI Titer (Log 2)	จำนวนไก่รอด/จำนวนไก่ฉีดพิษทับ	% ความคุ้มโรค	ค่าเฉลี่ย IN (Log 10)
1 -	ND+IB=$10^{6.8}+10^{4.0}$	4.5	10/10	100%	3
-	ND+IB=$10^{7.2}+10^{2.4}$	5.28	10/10	100%	1.85
-	ND+IB=$10^{6.6}+10^{4.3}$	4.11	4/10	40%	3
2	ND = $10^{6.5}$	5.7	10/10	100%	-
3	IB = 10^{4}	-	-	-	2.51

สรุปและวิจารณ์

บริมาณไวรัสนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบไก่ของวัคซีนรวมที่มีประสิทธิภาพคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิดดีที่สุดคือ $10^{6.5}+10^{4}EID_{50}$ ต่อตัว ซึ่งความคุ้มโรคที่ตรวจด้วยวิธี microtest ได้ค่าเฉลีย HI titer=6.11 และค่า NI=3.21 ผลการฉีดพิษทับสัมพันธ์กับค่า HI คือไก่ตายภายหลังการฉีดพิษทับเมื่อค่า HI ต่ำกว่า Log 2^{3} (FAO, 1978)

ในการรวมวัคซีนทั้งสองชนิดก่อนทำแห้ง (Freeze-drying) จำเป็นต้องเตรียมเชื้อไวรัสให้สูงเพียงพอที่จะกระตุ้นความคุ้มโรคและเผื่อการสูญเสียไวรัสระหว่างการทำแห้ง (FAO, 1978) ซึ่งบริมาณไวรัสทั้งสองชนิดของวัคซีนแห้งจะลดลงเล็กน้อย (Bengels dorft,1972) ดังนั้นจากตารางที่ 2 บริมาณไวรัสแต่ละชนิดของวัคซีนรวมชนิดที่ 1 เมื่อผสมสารคงสภาพแล้วก่อนเข้าทำแห้งมีบริมาณ $10^{7}+10^{4.30}$ EID_{50} ต่อตัว ต่อมาภายหลังการทำแห้งบริมาณไวรัสลดลงเป็น $10^{6.8}+10^{4.0}$ EID_{50} ต่อตัว จากตารางที่ 2 วัคซีนรวมที่ได้ (ชนิดที่ 1) มีประสิทธิภาพให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิด ถ้าเปรียบเทียบกับวัคซีนรวมชนิดที่ 2 และ 3 ซึ่งมีบริมาณไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่า พบว่าผลความคุ้มโรคต่อไวรัสชนิดหนึ่งสูงแต่อีกชนิดหนึ่งต่ำ สรุปว่าบริมาณไวรัสแต่ละชนิดของวัคซีนรวมในตารางที่ 1 และ 2 สอดคล้องกัน

ต่อมาได้นำวัคซีนรวมชนิดแห้งมีบริมาณไวรัสนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบไก่ $10^{6.8}$ + 10^{4} EID_{50} ต่อตัวมาหยอดจมูกหรือตาลูกไก่อายุ 1 สัปดาห์จำนวน 100 ตัวพบว่าไก่ทดลองทุกตัวมีความปลอดภัย 100% มีความคุ้มโรคภายหลังการฉีดพิษทับด้วยไวรัสนิวคาสเซิลและมีความคุ้มโรคต่อไวรัสหลอดลมอักเสบ

ดังนั้นการรวมวัคซีนระหว่างนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบไก่ต้องมีบริมาณไวรัสนิคาสเซิลสูงกว่าหลอดลมอักเสบอย่างน้อย 1 log จึงจะมีประสิทธิภาพให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิด ซึ่งตรงกับ L.B. HANSON และคณะ 1956 กล่าวว่า เมื่อไวรัสหลอดลมอักเสบรวมกับไวรัสนิวคาสเซิล ถ้ามีไวรัสหลอดลมอักเสบมากกว่านิวคาสเซิล จะมีผลยับยั้งต่อไวรัสนิวคาสเซิลและผลยับยั้งจะน้อยลงเมื่อมีไวรัสนิวคาสเซิลมากกว่า เช่นเดียวกับ Winterfreld และคณะ, 1957 กล่าวว่า ไวรัสนิวคาสเซิลควรจะมีค่ามากกว่าไวรัสหลอดลมอักเสบ 2 ถึง 3 log จึงจะให้ความคุ้มโรคได้ดี ถ้าใช้ในบริมาณเท่ากันจะให้ความคุ้มโรคได้ไม่ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงกรรณิภา จิรจุมผล และสัตวแพทย์หญิงวิรงรอง หุ่นสุวรรณ ที่ได้ช่วยประสานงานในการทดลองครั้งนี้ จนประสบผลสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เศรษฐากล, 2524; การใช้วัคซีนนิวคาสเซิล, 99-122; ในวิทยาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้ทางสัตวแพทย์ โดยบญเยียม เกียรติวุฒิ และคณะ; กรงเทพ ฯ, 170 น.

ALLAN, W.H., Lancaster, J.E., Tollit, B; 1978; Newcastle Disease vaccines, Their production and use. PP 57-69, 125-128, In the Report of FAO, Rome, 163 P.

Bangeldorff, H.J.; 1972; Protective effect of vaccination and the antibody production after combined administration of Newcastle Disease Infections Bronchitis vaccines., Blue book for the Vetrinary Profession; PP. 144-151.

Hanson, L.E., White, F.H., Albert, J.O.; Interference between Newcastle Disease and Infection bronchitis viruses. Am. J. 17; PP. 294-298.

Hanson, R.F.;1980; Newcastle Disease; PP. 63-66x; In Histohney,S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G., William, J.E.; Isolation and Identification of Avian Pathogens, 2nd Edition; American Association of Avian pathogists; USA.

National Acadamy of Sciences; 1971; Newcastle Disease, Infections Bronchitis; PP. 66-108; In Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Thornton, D.H.,Meskett, J.C.;1975; Effect of Infections bronchitis vaccination on the performance of Live Newcastle Disease vaccine; Vet.Rec.Vol. 96; PP.467-468.

Winterfield, R.W.; 1984; Vaccination of chickens with Newcastle Disease and Infections bronchitis vaccine administered singly and in combination; Poultry Sci. Vol. 63; PP. 182-184.

คุณภาพการเก็บรักษาของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย ไชน่าเสตรน

Keeping quality of lapinized swine fever vaccine, China strain

กัญญา สุวินทรากร[1] อนุทิน หาญวีระพล[1]

Kunya Suvintarakorn Anootin Hanveeraphon

ABSTRACT

The quality of Swine Fever vaccine was assayed for viruses by pig protective dose. This vaccine was lapinized swine fever vaccine, China strain which was produced by Department of Livestock Development. It was kept dry at various temparature such as 37°C., 4-8°C., -20°C. and room temperature (26-32°C.).

The amount of virus before dry keeping was $10^{3.5}$ PD_{50}/dose whereas the quality of vaccine after being kept at different condition were as follow :

The virus titer kept at 37°C. for seven and fourteen days were $10^{3.0}$ PD_{50}/dose and $10^{1.5}$ PD_{50}/dose respectively.

The virus titer kept in the refrigerator (4°-8°C.) for 3,6,12, 18 and 24 months were $10^{3.5}$, $10^{3.5}$, 10^{3}, 10^{3} and 10^{2} PD_{50}/dose respectively.

The virus titer kept in the freezer (-20°C.) for 1.5,2.5,3.5 and 4.5 years were $10^{3.5}$,$10^{3.5}$,$10^{3.0}$and $10^{2.5}$$PD_{50}$/dose respectively.

The field dose efficiency of vaccine were was kept at room temperature (26-32°C.) for 10, 14, 18, 22 and 26 days were studied. The result showed that 22 days old-dry vaccine still gave 100% efficiency where as 26 days old-dry vaccine induced high fever in the first week and returned to normal in the second week.

The vaccine was reconstituted with 0.85% normal saline and kept at room temperature for 3, 6, 12 and 18 hrs., or kept in the refrigerator (4-8°C.) for 3, 96 , 192 and 240 hrs. The field dose efficiency of reconstituted vaccine kept at room temperature for 18 hrs., or kept in the refrigerator for 10 days gave 100% protective immunity.

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

บทคัดย่อ

คุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไซน่าเสตรน ซึ่งผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ภายหลังการเก็บรักษาในสภาพทำแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C., 4-8°C., -20°C. และในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. หาปริมาณไวรัสโดยวิธี Pig protective dose ซึ่งปริมาณไวรัสก่อนทำการเก็บรักษาพบว่าเป็น $10^{3.5}$ PD_{50}/dose คุณภาพของวัคซีนภายหลังเก็บในสภาพต่าง ๆ เป็นดังนี้

เก็บในตู้อบ 37°C. นาน 7 วัน พบว่ามีปริมาณไวรัสเป็น 10^{3} PD_{50}/dose และนาน 14 วัน ปริมาณไวรัสจะเหลือเพียง $10^{1.5}$ PD_{50}/dose

เก็บในตู้เย็น 4-8°C. ระยะเวลา 3,6,12,18 และ 24 เดือน พบว่าปริมาณไวรัสเป็น $10^{3.5}$, $10^{3.5}$, 10^{3}, 10^{3} และ 10^{2} PD_{50}/dose ตามลำดับ

เก็บในตู้แช่แข็ง -20°C.ระยะเวลา 1 1/2 ปี,2 1/2 ปี,3 1/2 ปี และ 4 1/2 ปี พบว่ามีปริมาณไวรัสเป็น $10^{3.5}$, $10^{3.5}$ และ $10^{2.5}$ PD_{50}/dose ตามลำดับ

เก็บในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. ระยะเวลา 10,14,18,22 และ 26 วัน เมื่อนำมาหาความคุ้มโรคในขนาด field dose พบว่าวัคซีนทำแห้งเก็บไว้นาน 22 วันยังคุ้มโรคได้ 100% แต่นาน 26 วัน มีไข้สูงในสัปดาห์แรก และ recover ในสัปดาห์ที่ 2

วัคซีนอหิวาต์สุกร เมื่อเก็บในสภาพที่ถูกละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85%แล้ว ที่อุณหภูมิห้อง 26-32°C.และในตู้เย็น 4-8°C. เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 3,6,12 และ 18 ชั่วโมง และในตู้เย็นระยะเวลา 3, 96, 192 และ 240 ชั่วโมง เมื่อนำมาหาความคุ้มโรคในขนาด field dose พบว่าวัคซีนหลังจากละลายแล้ว และเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 10 วัน สามารถคุ้มโรคได้ 100%

คำนำ

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ได้ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดเชื้อเป็นผ่านกระต่าย ไซน่าเสตรน เพื่อใช้ป้องกันโรคแก่สุกรในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2519 ในปัจจุบันเกษตรกรได้ใช้วัคซีนนี้ประมาณปีละ 5.5 ล้านโด๊ส แต่ยังไม่มีรายงานถึงประสิทธิภาพความคงทนและความสามารถในการป้องกันโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรในสภาพทำแห้ง และที่ละลายด้วยน้ำยาละลายแล้ว เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิต่างกัน

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ จึงเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ โดยการศึกษาดังนี้

ในสภาพทำแห้ง เมื่อเก็บรักษาไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C. ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8°C. และในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C.

ในสภาพที่วัคซีนอหิวาต์สุกรถูกละลายด้วยน้ำยาละลาย คือ น้ำเกลือ 0/85% แล้ว เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 26-32°C. และในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8°C.

งานวิจัยนี้เพื่อเป็นประโยชน์ ในการเป็นข้อมูลของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไซน่าเสตรน และกำหนดอายุสภาพการเก็บรักษาวัคซีน เพื่อเป็นข้อแนะนำแก่เกษตรกรผู้ใช้วัคซีนนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเชื้อเป็นผ่านกระต่าย ไชน่าเสตรน ชุด 18/28 จำนวน 250 ขวด ผลิตเมื่อ 25 มีนาคม 2528 ผลิตจาก seed virus vaccine ซึ่งมีไตเตอร์ $10^{6.5}$ Protective $Dose_{50}$ (PD_{50})/มล.

วัคซีนชุด 18/28 ประกอบด้วยม้ามและต่อมน้ำเหลืองที่ลำไส้ของกระต่ายที่ฉีด seed ปริมาณ 0.0203 กรัม/มล. หรือ 2.03% วัคซีนชุดนี้ผ่านการทดสอบสุญญากาศด้วย Tessler coil มี Moisture content 2.33% และผ่านการตรวจสอบ Sterility test ด้วย Thioglycolate Broth ที่อุณหภูมิ 22°C. และ 37°C.

2. เชื้อพิษอหิวาต์สุกร มีไตเตอร์ 10^{6} PD_{50}/มล. ผลิตปี 2528 ของงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร

3. สัตว์ทดลอง ใช้สุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกรจำนวน 179 ตัว อายุประมาณ 2 เดือน พันธุ์ลาร์จไวท์ผสมแลนด์เรซ น้ำหนักเฉลี่ยก่อนทำการทดลองตัวละ 11 กิโลกรัม

วิธีการ

การเก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกร

1. เก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกรในสภาพทำแห้ง ใช้วัคซีนจำนวน 160 ขวด แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 40 ขวด ตามสภาพการเก็บรักษาคือ

1.1 ในตู้อบ 37°C. นำมาทดสอบเมื่อเก็บระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน

1.2 ในตู้เย็น 4-8°C. นำมาทดสอบเมื่อเก็บนาน 3,6,12,18 และ 24 เดือน

1.3 ในตู้แช่แข็ง -20°C. นำมาทดสอบเมื่อเก็บนาน 1 1/2, 2 1/2 และ 4 1/2 ปี

1.4 ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. นำมาทดสอบเมื่อเก็บนาน 10,14,18 และ 22 วัน

2. เก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกรในสภาพที่ละลายด้วยน้ำยาละลายแล้ว ใช้วัคซีนจำนวน 80 ขวด ก่อนนำมาละลายเก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°C. แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 40 ขวด คือ

2.1 ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C.นำมาทดสอบเมื่อเก็บนาน3,6,12และ 18 ชั่วโมง

2.2 ในตู้เย็น 4-8°C. นำมาทดสอบเมื่อเก็บนาน 3,96,192 และ 240 ชั่วโมง

การนำวัคซีนแต่ละสภาพการเก็บรักษามาทดสอบแต่ละช่วงระยะเวลาใช้วัคซีน ครั้งละ 5 ขวด

สุกรจำนวน 179 ตัว แบ่งเป็น 7 กลุ่มการทดลองดังนี้

1. ตรวจหา Virus content ของวัคซีน ก่อนทำการเก็บรักษา ทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-4} ของ field dose ใช้สุกร dilution ละ 4 ตัว พร้อมสุกรควบคุมฉีดเชื้อพิษ (challenge control) 1 ตัว รวมใช้สุกรทดลอง 17 ตัว

2. ตรวจหา Virus content ของวัคซีนทำแห้ง ภายหลังเก็บในตู้อบ 37°C. นาน 7 วัน และ 14 วัน รวมใช้สุกรทดลอง 20 ตัว คือ

เก็บระยะเวลา 7 วัน นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{0} ถึง 10^{-4}

เก็บระยะเวลา 14 วัน นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{0} ถึง 10^{-3}

ใช้สุกรทดลอง dilution ละ 2 ตัว พร้อม challenge control ระยะเวลาละ 1 ตัว

3. ตรวจหา Virus content ของวัคซีนทำแห้ง ภายหลังเก็บในตู้เย็น 4-8°C. นาน 3,6,12,18 และ 24 เดือน รวมใช้สุกรทดลอง 45 ตัว คือ

เก็บระยะเวลา 3 เดือน นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{0} ถึง 10^{-4}

เก็บระยะเวลา 6,12 และ 18 เดือน นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{0} ถึง 10^{-3}

เก็บระยะเวลา 24 เดือน นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{0} ถึง 10^{-2}

ใช้สุกร dilution ละ 2 ตัว พร้อม challenge control ระยะเวลาละ 1 ตัว

4. ตรวจหา Virus content ของวัคซีนทำแห้ง ภายหลังเก็บในตู้แช่แข็ง -20°C. นาน 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2 และ 4 1/2 ปี รวมใช้สุกรทดลอง 32 ตัว คือ

เก็บระยะเวลา 1 1/2 และ 2 1/2 ปี นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-4}

เก็บระยะเวลา 3 1/2 และ 4 1/2 ปี นำวัคซีนมาทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-3}

ใช้สุกร dilution ละ 2 ตัว พร้อม challenge control ระยะเวลาละ 1 ตัว

5. ตรวจหาความคุ้มโรคของวัคซีนทำแห้ง ภายหลังเก็บในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. นาน 10,14,18,22 และ 26 วัน ใช้สุกรทดลองรวม 25 ตัว

6. ตรวจหาความคุ้มโรคของวัคซีนภายหลังละลายแล้ว เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. นาน 3,6,12 และ 18 ชั่วโมง ใช้สุกรทดลองรวม 20 ตัว

7. ตรวจหาความคุ้มโรคของวัคซีนภายหลังละลายแล้ว เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°C. นาน 3,96,192 และ 240 ชั่วโมง ใช้สุกรทดลองรวม 20 ตัว

หาความคุ้มโรคของวัคซีน ข้อ 5,6 และ 7 ใช้ขนาด field dose ในสุกร โดยใช้สุกรทดลอง ช่วงระยะเวลา ละ 4 ตัว พร้อม challenge control อีก 1 ตัว

การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายไซน่า เสตรน

โดย Pig protective dose คือนำวัคซีนมาเจือจาง 10 fold dilution ของ field dose ละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ฉีดวัคซีนแต่ละความเจือจางแก่สุกรทดลอง 1 มล. ต่อตัว เข้ากล้ามเนื้อที่สะโพก จากนั้นวัดอุณหภูมิวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็นเป็นเวลา 14 วัน จึงฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษอหิวาต์สุกรขนาด 10^{5} MLD (Minimum lethal dose) พร้อมกับสุกรยืนยันเชื้อพิษอีก 1 ตัว วัดอุณหภูมิร่างกายและสังเกตดูอาการเป็นเวลา 21 วัน หลังจากฉีดพิษทับ ซึ่งสุกรยืนยันเชื้อพิษและสุกรทดลองที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์สุกรที่เจือจางมาก จะตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร ส่วนสุกรทดลองที่ได้รับปริมาณไวรัสวัคซีนขนาดที่สามารถเพิ่มจำนวน เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ จะไม่ตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรภายหลังฉีดพิษทับ

หาค่า Virus titer คิดคำนวณโดยวิธี Karber (Spear man Karber Method)

การหาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร

กระทำโดยฉีดวัคซีนให้สุกรในขนาดที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ (field dose) คือละลายวัคซีนด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปริมาณ 1 ขวด ต่อ 10 มล. แล้วใช้ขนาด 1 มล. ฉีดเข้ากล้ามเนื้ออีก 14 วัน ต่อมาฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษอหิวาต์สุกรขนาด 10^{5} MLD พร้อมสุกรควบคุมฉีดเชื้อพิษ 1 ตัว วัดอุณหภูมิร่างกายและสังเกตดูอาการเป็นเวลา 21 วัน ภายหลังฉีดพิษทับ

วัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคจะไม่ทำให้สุกรที่ได้รับวัคซีนแล้ว แสดงอาการป่วย หรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรภายหลังฉีดพิษทับ

ผลการทดลอง

1. การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกร ก่อนทำการเก็บรักษาโดยนำวัคซีนมา titration ให้เจือจาง 10 ถึง 10,000 เท่า (10^{-1} ถึง 10^{-4}) ของ field dose ดังตารางที่ 1 หาปริมาณไวรัสคำนวณตามวิธี Karber พบว่ามีค่า $10^{3.5}$ 50% Pig protective Dose/dose ($10^{3.5}$ PD_{50}/dose)

2. การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรภายหลังเก็บวัคซีนทำแห้งในตู้อบ 37°C. นาน 7 วัน และ 14 วัน ดังตารางที่ 2

เมื่อคำนวณหาปริมาณของไวรัสพบว่ามีค่า $10^{3.5}$ PD_{50}/dose และ $10^{1.5}$ PD_{50}/-dose ตามลำดับ

3. การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรภายหลังเก็บวัคซีนทำแห้งในตู้เย็น 4-8°C. นาน 3 เดือน, 6 เดือน, 12 เดือน, 18 เดือน และ 24 เดือน ดังตารางที่ 3

เมื่อคำนวณหาปริมาณไวรัสพบว่ามีค่า $10^{3.5}$ PD_{50}/dose, $10^{3.5}$ PD_{50}/dose, 10^{3} PD_{50}/dose, 10^{3} PD_{50}/dose และ 10^{2} PD_{50}/dose ตามลำดับ

4. การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรภายหลังเก็บวัคซีนทำแห้งในตู้แช่แข็ง -20°C. นาน 1 1/2 ปี, 2 1/2 ปี, 3 1/2 ปี และ 4 1/2 ปี ดังตารางที่ 4

คำนวณหาปริมาณไวรัส พบว่ามีค่า $10^{3.5}$ PD_{50}/dose, $10^{3.5}$ PD_{50}/dose, 10^{3} PD_{50}/dose และ $10^{2.5}$$PD_{50}$/dose ตามลำดับ

5. การหาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรภายหลังเก็บวัคซีนทำแห้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. นาน 10 วัน, 14 วัน, 18 วัน, 22 วัน และ 26 วัน โดยใช้ขนาด Field dose ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 1 การหา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรทำแห้งก่อนเก็บรักษา

ความเจือจางของวัคซีน	ขนาดที่ใช้	อัตราความคุ้มโรคในสุกร รอดชีวิต/ทั้งหมด
10^{-1}*	1 มล. I/M	4/4
10^{-2}	1 มล. I/M	4/4
10^{-3}	1 มล. I/M	3/4
10^{-4}	1 มล. I/M	1/4
สุกรควบคุม	-	0/1
Virus content	-	$10^{3.5}$ PD_{50}/dose

* ความเจือจางเป็นเท่าของ field dose

ตารางที่ 2 หา Virus content ภายหลังเก็บวัคซีนอหิวาต์สุกรทำแห้ง ในตู้อบ 37°C. นาน 7 วัน และ 14 วัน

ความเจือจางของวัคซีน (ใช้ 1 มล.)	เก็บวัคซีนที่ 37°C. นาน 7 วัน อัตราความคุ้มโรคในสุกร รอดชีวิต/ทั้งหมด	วัคซีนเก็บที่ 37°C. นาน 14 วัน อัตราความคุ้มโรคในสุกร รอดชีวิต/ทั้งหมด
10^{0}*	2/2	2/2
10^{-1}	2/2	2/2
10^{-2}	2/2	0/2
10^{-3}	2/2	0/2
10^{-4}	0/2	
สุกรควบคุม	0/1	0/1
Virus content	$10^{3.5}$ PD_{50}/dose	$10^{1.5}$ PD_{50}/dose

* ความเจือจางเป็นเท่าของ field dose

ตารางที่ 3 หา Virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรทำแห้งภายหลังเก็บในตู้เย็น 4-8°C. นาน 3 เดือน, 6 เดือน, 12 เดือน, 18 เดือน และ 24 เดือน

ความเจือจางของวัคซีน (ใช้ 1 มล.)	อัตราความคุ้มโรคในสุกร (รอดชีวิต/ทั้งหมด)				
	3 เดือน	6 เดือน	12 เดือน	18 เดือน	24 เดือน
10^{0}	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
10^{-1}	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
10^{-2}	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
10^{-3}	2/2	2/2	1/2	1/2	-
10^{-4}	0/2	-	-	-	-
สุกรควบคุม	0/1	0/2	0/1	0/1	0/2
Virus content (PD_{50}/dose)	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$

ตารางที่ 4 หา virus content ของวัคซีนอหิวาต์สุกรทำแห้ง ภายหลังเก็บในตู้แช่แข็ง -20°C. นาน 1 1/2 ปี, 2 1/2 ปี, 3 1/2 ปี และ 4 1/2 ปี

ความเจือจางของวัคซีน (ใช้ 1 มล.)	อัตราความคุ้มโรคในสุกร (รอดชีวิต/ทั้งหมด)			
	1 1/2 ปี	2 1/2 ปี	3 1/2 ปี	4 1/2 ปี
10^{-1}	2/2	2/2	2/2	2/2
10^{-2}	2/2	2/2	2/2	2/2
10^{-3}	2/2	2/2	1/2	0/2
10^{-4}	0/2	0/2	-	-
สุกรควบคุม	0/1	0/1	0/1	0/2
Virus content (PD_{50}/dose)	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	10^{3}	$10^{2.5}$

ตารางที่ 5 หาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรทำแห้งเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C.

ระยะเวลาเก็บรักษา	ขนาดที่ใช้	อัตราความคุ้มโรคในสุกร รอดชีวิต/ทั้งหมด	สุกรควบคุม รอดชีวิต/ทั้งหมด	% ความคุ้มโรค
10 วัน	1 field dose	4/4	0/1	100 %
14 วัน	1 field dose	4/4	0/1	100 %
18 วัน	1 field dose	4/4	0/1	100 %
22 วัน	1 field dose	4/4	0/1	100 %
26 วัน	1 field dose	4/4*	0/1	<100 %

* มีไข้สูงในสัปดาห์แรก 3 ตัว และ recover

ตารางที่ 6 หาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรหลังจากละลายแล้ว เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. นาน 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง

ระยะเวลาเก็บรักษา	ขนาดที่ใช้	อัตราความคุ้มโรคในสุกร รอดชีวิต/ทั้งหมด	สุกรควบคุม รอดชีวิต/ทั้งหมด	% ความคุ้มโรค
3 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
6 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
12 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
18 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %

ตารางที่ 7 หาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรหลังจากละลายแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4-8ºC. นาน 3 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมง, 192 ชั่วโมง และ 240 ชั่วโมง

ระยะเวลาเก็บรักษา	ขนาดที่ใช้	อัตราความคุ้มโรคในสุกรรอดชีวิต/ทั้งหมด	สุกรควบคุมรอดชีวิต/ทั้งหมด	% ความคุ้มโรค
3 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
96 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
192 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %
240 ชั่วโมง	1 field dose	4/4	0/1	100 %

พบว่าสุกรทดลองที่ฉีดด้วยวัคซีนอหิวาต์สุกรที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 10 วัน,14 วัน, 18 วัน และ 22 วัน ไม่แสดงอาการผิดปกติสามารถคุ้มโรคได้ 100% สุกรทดลองในกลุ่มระยะเวลา 26 วัน มีจำนวน 3 ตัว ไข้สูงในสัปดาห์แรก และไม่แสดงอาการผิดปกติอย่างอื่น ๆ ส่วนอีก 1 ตัว อาการเป็นปกติ

6. การหาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร เมื่อละลายตามกำหนด และเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง 26-32ºC. นาน 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง โดยใช้ขนาด field dose ดังตารางที่ 6

พบว่าสุกรทดลองที่ฉีดด้วยวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ละลายแล้วและเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง,6ชั่วโมง,12ชั่วโมง และ 18ชั่วโมง ไม่แสดงอาการผิดปกติ สามารถคุ้มโรคได้ 100%

7. การตรวจหาความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรเมื่อละลายตามกำหนดแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8ºC. นาน 3 ชั่วโมง, 96 ชั่วโมง, 192 ชั่วโมง และ 240 ชั่วโมง โดยใช้ขนาด field dose ดังตารางที่ 7

พบว่าสุกรทดลองที่ฉีดด้วยวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ละลายแล้ว และเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 3 ชั่วโมง,96ชั่วโมง,192ชั่วโมงและ 240ชั่วโมง ไม่แสดงอาการผิดปกติ สามารถคุ้มโรคได้ 100%

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกรสภาพทำแห้งในตู้อบ 37ºC. นาน 7 วัน ในตู้เย็น 4-8ºC. นาน 6 เดือน และในตู้แช่แข็ง -20ºC. นาน 2 1/2 ปี จะมีปริมาณไวรัสในวัคซีนเท่ากับก่อนเก็บรักษา โดยเฉพาะการเก็บในตู้เย็นสอดคล้องกับของ Lin and Lee (1981) ที่พบว่าวัคซีน แอลพีซี เสตรน ซึ่งเป็นเชื้อผ่านกระต่ายเช่นเดียวกับ ไชน่าเสตรน เก็บในตู้เย็นนาน 195 วัน จะมีไตเตอร์เท่าครั้งแรก

ผลของการเก็บในตู้อบ 37ºC. นาน 7 วัน มีปริมาณไวรัสเท่ากับเก็บในตู้เย็นนาน 6 เดือน ควรจะเป็นค่าประมาณที่นำมาใช้เพื่อประหยัดเวลาสำหรับหาค่าการเก็บรักษาในตู้เย็นได้

การเก็บในตู้เย็น 4-8ºC. สามารถรักษาไวรัสในวัคซีนตามมาตรฐานได้นาน 2 ปี คือตามมาตรฐานจะมีไวรัสไม่ต่ำกว่าโด๊สละ 100 PD_{50}ซึ่งสามารถนำผลการศึกษาครั้งนี้มากำหนดอายุของวัคซีนใหม่ โดยเปลี่ยนจาก 1 ปี เป็น 1 1/2 ปี หลังจากวันผลิต

การเก็บในตู้แช่แข็ง -20°C. จะรักษาคุณภาพไวรัสในวัคซีนได้ดีและนานที่สุด คือ นาน 4 1/2 ปี ปริมาณไวรัสยังสูงกว่ามาตรฐาน แต่การปฏิบัติในท้องที่ทำได้ยาก (สละ กองสมัคร, 2529)

เนื่องจากปัญหาสุกรทดลองไม่เพียงพอ การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาวัคซีนอหิวาต์สุกรสภาพทำแห้ง และวัคซีนที่ละลายแล้วในอุณหภูมิห้อง 26-32°C. และวัคซีนที่ละลายแล้วเก็บในตู้เย็น 4-8°C. จึงศึกษาเพียงขนาด field dose ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ เท่านั้น ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บในสภาพทำแห้งในอุณหภูมิห้องนาน 22 วัน สามารถให้ความคุ้มโรค 100% และวัคซีนที่ละลายแล้วเก็บในอุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็น 4-8°C. นาน 10 วัน (240 ชั่วโมง) ยังสามารถคุ้มโรคได้ 100%

ดังนั้นจากคำแนะนำการใช้วัคซีนของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ (2529) ที่กล่าวว่า วัคซีนอหิวาต์สุกรที่ละลายแล้วต้องใช้ภายใน 2 ชั่วโมง และควรแช่น้ำแข็งตลอดเวลา จึงเป็นคำแนะนำที่รักษาประสิทธิภาพและคุณภาพของวัคซีนไว้อย่างดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นสพ. ฉาย จอมเกาะ ที่ให้ความสนับสนุน และคำแนะนำ

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์,2529.คำแนะนำการใช้วัคซีน : 25 น.

สละ กองสมัคร,2529.วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย : 64 น.

Lin, T.C. and Lee, C.T., 1981. An overall Report on the Development of a Highly Safe and Potent Lapinized Hog Cholera Control in Taiwan : NSC Special Publication, No.5.: 15-23.