วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 6 เล่มที่ 1 มีนาคม 2539

The Journal of Veterinary Biologics *Vol. 6 No.1 March 1996*

* การใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพ.....1

* การเตรียมวัคซีนฝีดาษไก่จากเซลล์ไข่ไก่ฟัก.....9

* การศึกษาวัคซีนรวมหลอดลมอักเสบไก่และนิวคาสเซิล.....20

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับคือเดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ๆที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

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

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ให้เขียนนำหน้าต้นเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของต้นเรื่อง 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 กราฟหรือรูปภาพก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 *วิจารณ์ (Discussion)* เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านหลักฐานที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง คลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 เอกสารอ้างอิง (Literature cited)

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

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อต้วนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล 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* หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

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

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกหอดหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือควรให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. **ภาพประกอบ (Illustration)**

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

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในการที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับคืน หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อหาความตกลงกันเจ้าของเรื่องก่อน

การใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพ

รัชนี อัตถิ[1] อนุทิน หาญวีระพล[1]

บทคัดย่อ

เอกสารนี้เป็นบทความทั่วไปเชิงปริทัศน์ เกี่ยวกับวัคซีนและการใช้วัคซีนในสัตว์อย่างมีประสิทธิ-ภาพ ประกอบด้วยคำอธิบาย ชนิดของวัคซีนได้แก่ วัคซีนเชื้อเป็น และวัคซีนเชื้อตาย ข้อดีข้อเสีย ของวัคซีนแต่ละประเภท วัตถุประสงค์ของการใช้วัคซีน วิธีใช้ที่ถูกต้อง ผลแทรกซ้อนจากการใช้วัคซีน ข้อควรระวัง และปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีน

วัตถุประสงค์ของบทความนี้เพื่อเป็นประโยชน์แก่ผู้เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนในสัตว์ หรือแม้แต่ผู้ผลิตวัคซีนเองไว้เป็นเอกสารอ้างอิง หรือคู่มือปฏิบัติงาน หากมีข้อสงสัย เกี่ยวกับวัคซีนทั่วไป

คำนำ

การควบคุมและป้องกันโรคเป็นวิธีที่จะนำไปสู่การกำจัดโรคระบาดต่างๆ ในสัตว์ เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการป้องกันโรคก็คือ "วัคซีน" ซึ่งการนำวัคซีนไปใช้มีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ผู้ใช้จะต้องทำความเข้าใจกับวัคซีนเสียก่อน ไม่ว่าจะเป็นชนิด รูปแบบ การเก็บรักษา วิธีนำไปใช้ และการติดตามคุณภาพหลังการฉีดวัคซีน เพื่อการใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพ

วัคซีน

วัคซีน หมายถึง ชีวภัณฑ์ซึ่งเตรียมจากจุลชีพ หรือ ส่วนประกอบของจุลชีพ ที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ เมื่อนำเข้าสู่ร่างกายจะโดยการฉีดหรือการกินจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะกระตุ้นให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันสัตว์จากการป่วยเป็นโรคนั้น ๆ

ชนิดของวัคซีน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. **วัคซีนเชื้อเป็น** (Live vaccine) หมายถึง วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อหรือจุลชีพที่ยังมีชีวิตอยู่ เมื่อถูกนำเข้าร่างกายเชื้อจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยไม่ทำให้เกิดโรคแต่จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันวัคซีนเชื้อเป็นแบ่งตามลักษณะของเชื้อออกเป็น

1.1 ชนิดใช้เชื้อพิษ (Live virulent organisms)

เชื้อโรคบางอย่างเมื่อนำไปฉีดสัตว์บริเวณส่วนอื่นของร่างกาย (abnormal route) ที่ไม่ได้เป็นทางติดเชื้อตามธรรมชาติ (natural route) จะไม่ทำให้สัตว์นั้นเป็นโรค แต่กลับมีภูมิคุ้มกันโรคต่อการติดเชื้อตามธรรมชาติได้ เช่น โรค Infectious laryngotracheitis ในไก่ซึ่งปกติจะติดโรคนี้ทางระบบหายใจ แต่เมื่อให้เชื้อทาง cloaca ไก่จะไม่เป็นโรค

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทร.311476

ปัจจุบันการใช้วัคซีนชนิดนี้มีน้อย เพราะเป็นการเสี่ยงที่จะแพร่เชื้อพิษไปติดสัตว์ที่ไม่มีภูมิคุ้ม
โดยทาง natural route ได้

1.2 ชนิดใช้เชื้อพิษซึ่งทำให้พิษอ่อนลงแล้ว (Live attenuated organisms)

วัคซีนไวรัสส่วนใหญ่จะเป็นวัคซีนชนิดนี้เพราะมีข้อดีเหนือวัคซีนอื่นๆ หลายประการ การทำ
เชื้อพิษอ่อนลง ทำได้โดยนำไปผ่านสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ได้เป็น natural host เช่น กระต่ายไข่ไก่
หรือ เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เป็นต้น

1.3 ชนิดใช้เชื้ออ่อนตามธรรมชาติ (Live avirulent organisms)

เป็นเชื้อซึ่งไม่มีความรุนแรงตามธรรมชาติ เช่น วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลผลิตจากไว
นิวคาสเซิล เสตรน เอฟ, วัคซีนป้องกันโรคแท้งติดต่อในโคและกระบือ ผลิตจากเชื้อ *Brucel*
abortus strain 19, วัคซีนแอนแทรกซ์ ผลิตจากเชื้อ *Bacillus anthracis* strain 34
เป็นต้น

2. วัคซีนเชื้อตาย (Killed Vaccine หรือ inactivated vaccine)

หมายถึง วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ หรือจุลชีพที่ตายหรือทำให้หมดพิษด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น ทางฟิสิ
โดยใช้ความร้อน หรือ รังษีทางเคมี เช่น formalin หรือ Binary ethyleneimine (BEI)

ส่วนใหญ่วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียจะเป็นวัคซีนนี้ เช่น วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย และวัค
ซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เป็นต้น

วัคซีนเชื้อตายยังมีชนิดย่อยอีก ได้แก่ ชนิด Broth bacterin และชนิด Adjuvant

1. Broth bacterin เป็นวัคซีนที่ผลิตจากแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วผสมสาร
พิษ (inactivating agents) และผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูป โดยไม่ได้ผสมสารอื่น ๆ เป็นวัคซีน
ความคุ้มโรคค่อนข้างเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตายชนิด adjuvant แต่จะให้ความคุ้มโรค
ในระยะสั้น

2. Adjuvant vaccine วัคซีนเชื้อตายมักจะให้ความคุ้มโรคต่ำและระยะสั้นเพื่อเป็นการเ
ศักยภาพของวัคซีนให้มีความคุ้มโรคสูงขึ้น ต้องผสมสารบางอย่างนอกจาก inactivating agent
ไปด้วย สารที่ผสมลงไปนี้ เรียกว่า Adjuvant สารที่ใช้เป็น adjuvant สำหรับวัคซีน มีมากม
หลายชนิด เช่น Bacterial materials - mycobacterial cell walls, yeasts et
Chemicals - calciam phosphate, aluminium hydroxide (alhydrogel), sapon
และ mineral oils ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น วัคซีนบางอย่างก็ผสม adjuvants มากกว่า 1 ชนิด เ
aluminium hydroxide และ saponin แต่ที่ใช้กันมากก็คือ aluminium hydroxide gel เ
วัคซีนโรคแบลคเลก และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ของกรมปศุสัตว์ที่ใช้อยู่ในเวลานี้ Mineral o
ก็ใช้กันมากเช่นกัน เรียกว่า oil adjuvant vaccine วัคซีนเชื้อตายในท้องตลาดในปัจจุบันมักเ
ชนิดนี้

การที่ adjuvant vaccine ทำให้เกิดความคุ้มโรคได้ดีและมีความคุ้มโรคยาวนานขึ้น เนื่
จาก adjuvant จะทำให้การกระจายตัวของวัคซีน (vaccine diffusion) เป็นไปอย่างช้า
กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเป็นเวลานาน และเป็นการลดโอกาสที่จะเกิดปฏิกริยาหลังฉีดที่ไม่ต้องการ
น้อยลงด้วย

นอกจากแอดจูแวนท์ ที่กล่าวแล้ว ปัจจุบันยังสังเคราะห์แอดจูแวนท์ (Synthetic adjuvant) ขึ้นมาใช้ด้วย และพบว่ามีคุณภาพดีกว่า adjuvant จาก mycobacterial cell walls คือสารที่เรียกว่า muramyl dipeptide (MDP) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน mycobacterial cell walls

ข้อดีและข้อเสียของวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย

วัคซีนทั้งเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตายมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ผู้ใช้สมควรต้องทราบเพื่อความเหมาะสมในการเลือกใช้ หรือเพื่อประโยชน์ในการใช้วัคซีนนั้น ๆ

วัคซีนเชื้อเป็น

ข้อดี 1. เพิ่มจำนวนในตัวสัตว์ได้ ปริมาณของเชื้อแต่ละโดสจึงต่ำกว่าวัคซีนเชื้อตายมากทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ

2. วัคซีนเชื้อเป็นส่วนใหญ่ให้ความคุ้มโรคสูง และเป็นระยะเวลานานแม้จะฉีดเพียงครั้งเดียว ทำให้ต้นทุนในการควบคุมโรคของเกษตรกรต่ำลง

3. ให้ความคุ้มโรคได้เร็วกว่าวัคซีนเชื้อตาย บางชนิดให้ความคุ้มโรคภายใน 1 อาทิตย์หลังฉีด เช่น วัคซีนอหิวาต์สุกร Chinese strain บางชนิดป้องกันโรคได้ภายใน 1-2 วัน หลังฉีด non-specific protection

ข้อเสีย 1. มีโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของเชื้อที่ใช้ทำวัคซีน เชื้ออาจจะผ่านไปยังสัตว์ตัวอื่นและกลับรุนแรงขึ้นได้

2. มีโอกาสที่จะมีเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ปะปนมาในวัคซีนโดยเฉพาะวัคซีนของโรคสัตว์ปีกซึ่งผลิตจากไข่ไก่ฟักที่ไม่ได้เป็น ชนิด Specific pathogen-free (SPF eggs)

3. สัตว์ที่ได้รับวัคซีนอาจกลายเป็นตัวอมโรค (carrier)สามารถทำให้สัตว์ตัวอื่นเป็นโรคได้

4. ต้องเก็บในที่เย็นเสมอ เพราะความร้อนจะทำให้เชื้อตายได้ง่ายทำให้ยาก ในการขนส่ง และเก็บรักษา

วัคซีนเชื้อตาย

ข้อดี 1. ปลอดภัยสูง เพราะเชื้อได้ถูกทำให้หมดพิษแล้ว โอกาสแพร่กระจายของเชื้อไม่มี (หากผลิตและผ่านการทดสอบที่เชื่อถือได้) เหมาะสำหรับการใช้ในท้องที่ที่ไม่เคยมีโรค

2. การเก็บและการขนส่งทำได้ง่าย และถูกกว่าวัคซีนเชื้อเป็น

ข้อเสีย 1. ต้องใช้เชื้อต่อโดสจำนวนมากกว่าวัคซีนเชื้อเป็น เพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในระดับที่ป้องกันการติดโรคได้ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง

2. มีโอกาสแพ้วัคซีนได้มาก เพราะนอกจากตัวเชื้อซึ่งเป็น Antigen สำหรับกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันแล้ว ยังมีสารอื่น ๆ ที่ผสมลงไปเพื่อให้วัคซีนมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย

3. การให้ความคุ้มโรคช้ากว่าวัคซีนเชื้อเป็น และระยะความคุ้มโรคสั้น

4. ต้องเติมสาร adjuvant เพื่อทำให้วัคซีนมีความคุ้มโรคสูงขึ้นซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกริยาของบริเวณฉีด และทำให้วัคซีนมีความหนืด ฉีดยากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการใช้วัคซีน

1. เพื่อป้องกันโรคล่วงหน้านั่นคือฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ที่ประสงค์จะให้มีความคุ้มโรคทุกตัว

2. เพื่อป้องกันโรคในลูกสัตว์เกิดใหม่ โดยปกติลูกสัตว์แรกเกิดจะมีระบบสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่พอที่จะสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี การฉีดวัคซีนให้แก่แม่ ก่อนการคลอดระยะหนึ่งหรือก่อนการผสมพันธุ์จะทำให้แม่มีภูมิคุ้มกันโรค ที่จะถ่ายทอดไปยังลูกสัตว์เกิดใหม่ทางน้ำนมใน 48 ชั่วโมงหลังคลอด ลูกสัตว์ก็จะมีความคุ้มโรคได้ระยะหนึ่ง สัตว์บางชนิด เช่น สุนัข และแมว ถ่ายทอดภูมิคุ้มโรคให้แก่ลูกอ่อนในท้องทางรกได้

3. เพื่อหยุดหรือลดการระบาดของโรค เมื่อมีโรคระบาดเกิดขึ้นแล้ว วัคซีนบางชนิดสามารถให้ความคุ้มโรคได้เร็ว เช่น วัคซีนอหิวาต์สุกร ให้ความคุ้มโรคได้ภายใน 1 สัปดาห์ ฉะนั้นเมื่อรีบให้วัคซีนจะช่วยลดการสูญเสียลงได้บ้าง เพราะสัตว์ส่วนหนึ่งจะยังไม่ได้รับเชื้อ

4. เพื่อการรักษาเชื้อโรคบางชนิดมีระยะฟักตัวในร่างกายเป็นเวลานาน เช่น ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับเชื้อแล้ว รักษาได้โดยการฉีดวัคซีนทันที นอกจากจะได้รับเชื้อจำนวนมากและส่วนที่รับเชื้ออยู่ใกล้สมองมาก เช่น บริเวณใบหน้า การใช้วัคซีนอย่างเดียวไม่สามารถช่วยได้ จำเป็นต้องใช้ซีรั่มช่วย

การใช้วัคซีน (Administration of Vaccines)

การให้วัคซีนมีหลายทางแล้วแต่ชนิดของวัคซีน ผู้ใช้วัคซีนควรจะต้องเรียนรู้และปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตวัคซีน เพื่อให้การใช้วัคซีนนั้น ๆ ได้ผลดีที่สุด การให้วัคซีนที่ไม่ถูกต้องอาจจะทำให้ไม่ได้ผลในการป้องกันโรคตามความต้องการ

Route ต่าง ๆ สำหรับการให้วัคซีน

1. โดยการฉีดเข้าร่างกาย (Parenteral)
   - 1.1 ฉีดเข้าในผิวหนัง (intradermal)
   - 1.2 ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous)
   - 1.3 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular)
   - 1.4 ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitonial)
2. โดยทางอื่น ๆ
   - 2.1 ทางช่องจมูก (intranasal)
   - 2.2 ทางนัยตา
   - 2.3 ทางปาก
   - 2.4 ทางผิวหนัง
   - 2.5 ทาง cloaca

ผลแทรกซ้อนจากการให้วัคซีน

วัคซีนทุกชนิดและทุกชุดต้องผ่านการตรวจสอบคุณภาพในด้านความปลอดภัย ก่อนส่งออกใช้ในท้องตลาด แต่วัคซีนเชื้อเป็นสำหรับสัตว์บางชนิดอาจจะมีอัตราเสี่ยงต่อการแพ้วัคซีนค่อนข้างสูงไม่สมควรใช้ในสัตว์ที่สุขภาพไม่สมบูรณ์พอ ควรปฏิบัติตามคำแนะนำการใช้วัคซีนโดยเคร่งครัด

วัคซีนเชื้อตายบางชนิด ทำให้เกิด Anaphylactic shock ในสัตว์บางตัว และแพ้ถึงตายได้ในเวลาอันรวดเร็ว เช่น วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย และวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นต้น ซึ่งเป็นการแพ้เฉพาะตัวไม่สามารถทราบล่วงหน้าได้ จึงควรจะมียาสำหรับแก้ตามคำแนะนำของผู้ผลิตไว้เสมอเพื่อใช้แก้ไขได้ทันการณ์

สัตว์ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อนและมีภูมิคุ้มกันโรคสูงมาก เมื่อฉีดวัคซีนชนิดนั้นซ้ำอาจจะทำให้เกิด Anaphylactic shock ถึงตายได้เช่นกัน แต่โอกาสเช่นนี้มีไม่มากนัก

การฉีดวัคซีนซ้ำบ่อยครั้ง อาจทำให้ไตพิการได้ เนื่องจากเกิด antigen-antibody complexes ในกระแสโลหิตแล้วไปอุดท่อในไต

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีน

หลังการให้วัคซีนชนิดหนึ่งแก่สัตว์กลุ่มหนึ่ง สัตว์ส่วนใหญ่จะตอบสนองต่อวัคซีนนั้น ๆ ใกล้เคียงกัน แต่จะมีสัตว์บางตัวในกลุ่ม (individual animal) มีความคุ้มโรคสูงกว่าปกติและบางตัวอาจจะไม่มีความคุ้มโรคตอบสนองวัคซีนที่ให้เลยจึงกล่าวได้ว่าไม่มีวัคซีนชนิดใดไม่ว่าจะมีประสิทธิภาพสูงแค่ไหนก็ไม่อาจรับรองได้ว่าสามารถให้ความคุ้มโรคได้ร้อยเปอร์เซนต์ นอกจากสภาพของสัตว์แต่ละตัวแล้วมีสาเหตุอื่น ๆ อีกหลายประการที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีน

1. **อุปกรณ์และวิธีการ** การใช้อุปกรณ์และวิธีการที่ไม่ถูกต้องตามคำแนะนำของผู้ผลิตทำให้วัคซีนเสื่อมคุณภาพ หรือสัตว์ไปรับวัคซีนจำนวนน้อยกว่าที่กำหนดไว้ เช่น ใช้กระบอกฉีดยาและเข็มขนาดใหญ่เกินไปสำหรับฉีดวัคซีนที่มีขนาดจำนวนน้อย และฉีดโดยไม่ระมัดระวังเข็มและกระบอกฉีดยาที่กำลังร้อนหรือถูกทำความสะอาดด้วยน้ำฆ่าเชื้อ เมื่อนำไปเตรียมวัคซีนชนิดเชื้อเป็นทำให้เชื้อส่วนหนึ่งตายไป สัตว์จะได้รับปริมาณของแอนติเจนต่อโดสต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้

วัคซีนที่ผสม adjuvant บางชนิด หรือวัคซีนที่ผลิตจาก spore เมื่อตั้งทิ้งไว้นานส่วนที่เป็นแอนติเจนจะตกตะกอนที่ก้นขวด ต้องเขย่าให้เข้ากันก่อนใช้ มิฉะนั้นสัตว์บางตัวอาจจะได้รับแอนติเจนไม่พอเพียง

2. **การเก็บวัคซีน** การเก็บวัคซีนที่ไม่ถูกต้องตามคำแนะนำอาจทำให้วัคซีนเสื่อมคุณภาพได้วัคซีนที่แนะนำให้เก็บในตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิประมาณ 4-6 องศาเซลเซียส หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง คุณภาพจะเสื่อมลงรวดเร็วจนต่ำกว่ามาตรฐานก่อนวันหมดอายุได้ วัคซีนน้ำมัน (oil adjuvant) หากเก็บไว้ที่ในตู้แช่แข็งแทนที่จะเก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดา จะทำให้วัคซีนแยกตัวและเสื่อมคุณภาพได้

ฉะนั้น จึงควรจะต้องศึกษาคำแนะนำการใช้วัคซีนให้ดี ว่าวัคซีนชนิดไหนควรเก็บอย่างไร

3. **อายุของสัตว์** สัตว์ที่มีอายุเกิน 3 เดือนขึ้นไปสามารถให้วัคซีนได้โดยไม่มีข้อแม้ใด ๆ แต่สัตว์แรกเกิดจนถึง 2-3 เดือน ต้องศึกษาคำแนะนำการใช้วัคซีนว่าเมื่อให้วัคซีนแล้วจะมีผลดีผลเสียอย่างไร เพราะลูกสัตว์ที่เกิดจากแม่ซึ่งมีความคุ้มโรค จะได้ภูมิคุ้มโรคถ่ายทอด (passive immunity) จากแม่ หากภูมิคุ้มกันถ่ายทอดมีสูงจะทำให้การให้วัคซีนลดประสิทธิภาพลง โดยเฉพาะวัคซีนเชื้อเป็น อายุของลูกสัตว์เท่าไรจึงควรให้วัคซีนได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนชนิดของสัตว์ ต้องศึกษาจากคำแนะนำการใช้วัคซีนนั้น ๆ

4. การให้วัคซีนมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันมีข้อดีที่ประหยัดเวลา และแรงงาน และวัคซีนหลาย ชนิดสามารถให้พร้อมกันได้ โดยไม่มีข้อเสียมากนัก อย่างไรก็ตามทางทฤษฎีการให้วัคซีนเชื้อเป็นพร้อม กับวัคซีนเชื้อตายจะทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายลดลง เนื่องจากวัคซีนเชื้อเป็นเพิ่มจำนวนใน ร่างกายได้รวดเร็วและจำนวนมาก จะครอบครองระบบสร้างภูมิคุ้มกันระยะหนึ่งทำให้วัคซีนเชื้อตาย ซึ่ง ปกติมีปริมาณของแอนติเจนจำนวนจำกัดอยู่แล้วมีโอกาสน้อยลง และประการสำคัญการฉีดวัคซีนเชื้อเป็น พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย จะต้องไม่เอาวัคซีน 2 ชนิด มาผสมกันแล้วนำไปฉีดเป็นอันขาดเพราะสารเคมี ฆ่าเชื้อในวัคซีนเชื้อตายจะทำลายเชื้อที่มีชีวิตในวัคซีนเชื้อเป็น

การให้วัคซีนเชื้อเป็น 2 ชนิด พร้อมกัน ก็ต้องศึกษาเช่นกันว่า ให้พร้อมกันได้หรือไม่เพราะวัคซีน เชื้อเป็น บางชนิดอาจลดประสิทธิภาพของวัคซีนอีกชนิดหนึ่งได้ โดยเฉพาะวัคซีนไวรัสเชื้อเป็น เชื้อ ไวรัสของวัคซีนชนิดที่แรงกว่าหรือเพิ่มจำนวนเร็วกว่าอีกชนิดหนึ่ง จะครอบครองระบบสร้างภูมิคุ้มกันเป็น ส่วนใหญ่ และผลิตสาร interferon มากันไวรัสของวัคซีนอีกชนิดหนึ่งทำให้โอกาสของเชื้อในวัคซีนอีก ชนิดหนึ่งลดน้อยลงไป

การให้วัคซีนซ้ำ (Booster inoculation)

วัคซีนหลายชนิดโดยเฉพาะวัคซีนเชื้อตาย การให้วัคซีนครั้งเดียวมักจะสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ไม่สูง พอ เมื่อมีการติดเชื้อภายหลัง อัตราคุ้มโรคของสัตว์ในฝูงจะต่ำ การให้วัคซีนซ้ำห่างจากครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ จะช่วยให้อัตราคุ้มโรคของสัตว์ในฝูงสูงขึ้น

สำหรับวัคซีนเชื้อเป็นที่ให้กับสัตว์อายุน้อย ๆ ซึ่งเกิดจากแม่ที่มีความคุ้มโรค ก็เช่นเดียวกันควรจะ ให้วัคซีนซ้ำอีกครั้งหนึ่ง หรือเป็นระยะ ๆ ตามแต่ชนิดของวัคซีน ผู้ผลิตจะให้คำแนะนำกำกับมาด้วย เสมอ

ขอแนะนำการใช้วัคซีนสำหรับสัตว์โดยทั่วไป

1. ศึกษารายละเอียดการใช้วัคซีนต่าง ๆ ก่อนใช้ เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดในการใช้วัคซีน ควรจะได้ศึกษารายละเอียดต่าง ๆ ของวัคซีนที่จะใช้ทุกครั้งจาก คำแนะนำการใช้วัคซีนเอกสารกำกับ ยาจากผู้ผลิต ฯลฯ ข้อที่ควรคำนึงมีดังนี้

1.1 โปรแกรมการใช้วัคซีน

1.2 ขนาดและวิธีใช้

1.3 อายุสัตว์

1.4 ข้อห้ามหรือข้อควรระวังต่างๆ

2. ตรวจสอบวัคซีนก่อนใช้ ตรวจวันหมดอายุ และการเก็บรักษาวัคซีนว่า เก็บไว้ถูกต้องตามคำ แนะนำ หรือไม่สภาพของวัคซีนหรือน้ำยาละลายผิดไปจากปกติหรือไม่ ไม่ควรเสี่ยงใช้วัคซีนที่มีสภาพผิด ปกติหรือไม่แน่ใจในคุณภาพ

3. การเตรียมอุปกรณ์การฉีดและการเตรียมสัตว์ ต้องเตรียมให้พร้อมก่อนละลายวัคซีน โดย เฉพาะวัคซีนเชื้อเป็น เพราะต้องรีบใช้ให้หมดในเวลาที่กำหนด

3.1 อุปกรณ์การฉีดวัคซีน ต้องผ่านการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อมาก่อน ซึ่งทำโดยการนึ่งฆ่าเชื้อหรือต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำมาผสมวัคซีน ห้ามใช้น้ำยาฆ่าเชื้อทำความสะอาดอุปกรณ์ฉีดวัคซีน

3.2 ต้องระมัดระวังในการจับสัตว์หรือควบคุมสัตว์เพื่อฉีดวัคซีน โดยเฉพาะสัตว์ที่ตั้งท้องอาจจะเกิดการแท้งจากการจับ เจ้าของสัตว์อาจจะเข้าใจผิดว่า เนื่องมาจากการฉีดวัคซีน

3.3 ตรวจสุขภาพทั่วไปของสัตว์ว่าเหมาะที่จะให้วัคซีนหรือไม่ ก่อนให้วัคซีนทุกครั้ง

4. การเตรียมวัคซีน

4.1 วัคซีนเชื้อตาย ต้องเขย่าขวดก่อนใช้ทุกครั้ง บางชนิดต้องเขย่าอย่างแรงและนานพอสมควร เช่น วัคซีนแอนแทรกซ์ เป็นต้น เพราะเชื้อที่ใช้ทำวัคซีนตกตะกอนอยู่ก้นขวด จะทำให้ขนาดของแอนติเจนที่ฉีดแต่ละครั้งไม่เท่ากัน

4.2 ทำความสะอาดจุกยางส่วนที่จะใช้เข็มเจาะด้วยแอลกอฮอล์ 70% และทิ้งให้แห้งก่อนแทงเข็มลงไป

4.3 วัคซีนแห้ง เมื่อผสมน้ำยาละลายแล้วต้องเขย่าให้เข้ากันหรือให้ละลายให้หมดก่อนใช้

4.4 วัคซีนเชื้อเป็น ต้องไม่ให้ถูกความร้อนหรือถูกแสงแดดโดยตรง

4.5 วัคซีนเชื้อเป็นชนิดละลายน้ำให้กิน ต้องใช้น้ำสะอากและไม่มีน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีนผสมอยู่ด้วย

5. ข้อปฏิบัติขณะฉีด

5.1 วัคซีนเชื้อเป็น อย่าให้ถูกแสงแดดโดยตรงขณะฉีด

5.2 วัคซีนเชื้อเป็นที่ละลายสำหรับฉีดสัตว์จำนวนมาก ส่วนที่อยู่ในขวดต้องแช่ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลา

5.3 วัคซีนเชื้อเป็นที่ละลายแล้วควรใช้ให้หมดภายใน 2 ชั่วโมง

6. ข้อควรระวังหลังฉีดวัคซีน

6.1 การแพ้วัคซีน

6.1.1 Anaphylactic shock

วัคซีนบางชนิดเช่น วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย อาจทำให้เกิดการแพ้วัคซีนชนิดนี้ได้ ซึ่งจะเกิดขึ้นรวดเร็วมีอาการรุนแรงหากแก้ไขไม่ทันทำให้ตายได้ ฉะนั้นหลังจากฉีดวัคซีน ควรให้สัตว์พักในที่ร่มเพื่อสังเกตอาการประมาณครึ่งถึงหนึ่งชั่วโมงและการฉีดสัตว์อายุต่ำกว่า 1 ปี ควรระวังเป็นพิเศษ

อาการของสัตว์แพ้วัคซีน จะแสดงอาการไม่เป็นสุข กระวนกระวาย น้ำมูกน้ำลายไหล หอบ ไอ ล้มลงชัก และตายในที่สุด อาการแพ้นี้จะเกิดภายหลังฉีดวัคซีน 5 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

6.1.2 General reaction วัคซีนเชื้อเป็นและเชื้อตายบางชนิด อาจทำให้สัตว์มีไข้และเบื่ออาหาร 3-4 วัน หากไม่มีโรคแทรกซ้อนก็จะหายเป็นปกติ ควรให้เจ้าของสัตว์ดูแลสัตว์ให้ดีภายหลังฉีดหนึ่งสัปดาห์

6.1.3 Local reaction ทำให้บวมเฉพาะที่บริเวณที่ฉีด เช่น วัคซีนแอนแทรกซ์และวัคซีนชนิดน้ำมันบางชนิด จะบวมบริเวณที่ฉีด 3-4 วันจะหายไป ในกรณีนี้ควรแจ้งให้เจ้าของสัตว์ทราบล่วงหน้า

6.2 การเคลื่อนย้ายสัตว์ สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน ไม่ควรเคลื่อนย้ายระยะไกลในระยะ 10-15 วัน หลังฉีด โดยเฉพาะไก่ เพราะทำให้เกิดความเครียด และมีผลต่อสุขภาพทั่วไป

การรักษา

1. ฉีด Adrenaline (1/1000) ขนาด 4-8 ซีซี หรือ 0.5-1 ซีซี ต่อน้ำหนักตัว 50 กก. เข้ากล้ามเนื้อหรือเข้าเส้นเลือดทันที เพื่อช่วยกระตุ้นหัวใจ และขยายหลอดลมเล็ก เพื่อให้สัตว์หายใจ สะดวกและแก้ไขระดับความดันโลหิต อาจให้ยาซ้ำได้ภายใน 20-30 นาที

2. ฉีด Antihistamine 0.5-1 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เข้ากล้ามเนื้อ หรือเข้าเส้นเลือด

บทวิจารณ์

บทความปริทัศน์เกี่ยวกับการใช้วัคซีนอย่างมีประสิทธิภาพนี้ ผู้เขียนเห็นว่าน่าจะเป็นประโยชน์ อย่างยิ่งต่อผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับวัคซีนในสัตว์ไม่ว่าจะเป็นผู้ผลิตวัคซีนเอง และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ ที่นำวัคซีนไปใช้น่าจะได้รับประโยชน์จากเอกสารนี้มากที่สุด แม้การแบ่งชนิดของวัคซีนในเอกสารนี้อาจ จะแบ่งหัวข้อต่างไปจากเอกสารวัคซีนฉบับอื่น แต่อย่างไรก็ตามชนิดวัคซีน และเนื้อหาคำอธิบายต่าง ๆ ก็ได้ครอบคลุมถึงวัคซีนทุกชนิด จนหมดจะขาดก็เฉพาะวัคซีนรูปแบบที่ควรจะเป็นในอนาคต ซึ่งผู้เขียน เห็นว่าจะเป็นไปทางเทคโนโลยีการผลิตและพัฒนาวัคซีนเกินไป จึงได้อธิบายเฉพาะรายละเอียดต่าง ๆ ของวัคซีนในปัจจุบัน ซึ่งตามความเห็นแล้วก็น่าจะเพียงพอสำหรับตอบปัญหาเบื้องต้นแก่ผู้ใช้วัคซีนไม่มากก็ น้อย

กิตติกรรมประกาศ

บทความปริทัศน์นี้ เนื้อหาส่วนใหญ่มาจากบทเรียบเรียงเอกสารในการประชุม "Work-shop on Haemorrhagic Septicaemia" ณ ประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2532 โดยนายสัตวแพทย์ สละ กองสมัคร อดีตผู้อำนวยการศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ จึงต้องขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Chedid, L., Carelli, C., and Audibert, F. Use of Adjuvants, Antigens and Carriers in SyntheticVeterinary Vaccines. In R.M. Nerig, P.M Gough, M.L. Kaeberle and C.A. Whetstone (eds) Advaces in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics. Iowa State University Press Ames, Iowa, 1986.

2. Herbert, W.J. : Veterinary Immunology. Black well Scientific Publications, Oxford, 1974.

การเตรียมวัคซีนฝีดาษไก่จากเซลล์ไข่ไก่ฟัก

PREPARATION OF FOWL POX FROM CHICK EMBRYO FIBROBLAST

นันทนา โปษณเจริญ[1]

Nantana Posanacharoen[1]

ABSTRACT

After inoculation of seed fowl pox virus from the chorioallantoic membrane to chick embryo fibroblast cell, it was found that the cytopathic effect was detected completely in 96 hours. The virus suspension of the 2nd or the 3rd passage was suitable for preparation the working seed which has good properties after tested. The virus content of the seed was high enough for a preparation of standard vaccine. The lyophilized fowl pox vaccine could protect chick 100% against a challenged virus. So this experiment is the basic data for improving the developement of the production in the future especially the adapted tissue culture seed must be more researches.

บทคัดย่อ

การนำไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากเยื่อไข่ไก่ฟัก (CAM) มาเพาะในเซลล์ไข่ไก่ฟักปฐมภูมิ พบว่าเกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์อย่างสมบูรณ์ หลังการเพาะเลี้ยงในเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งไวรัสซัสเพนชั่นที่ได้จากการผ่านเซลล์ครั้งที่ 2 ถึง 3 เหมาะสมที่จะใช้เตรียมเป็น seed เพื่อนำไปผลิตวัคซีนต่อไป วัคซีนดูดแห้งฝีดาษไก่ที่ผลิตได้จาก seed นี้มีปริมาณไวรัสเพียงพอที่จะให้ความปลอดภัย และให้ความคุ้มโรคในไก่ต่อการฉีดพิษทับ 100% ซึ่งผลของการวิจัยนี้จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นศึกษาการพัฒนาวัคซีนฝีดาษไก่ต่อไป

Keyword : Fowl pox Vaccine Chick embryo fibroblast

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง กรมปศุสัตว์ อำเภอปากช่อง นครราชสีมา 30130

[1] Veterinary Biologics Center, Veterinary Biologics Division, Department of Livestock and Development, Pakchong Nakhonratchasima. 30130.

คำนำ

การผลิตวัคซีนฝีดาษไก่วิธีเดิม เป็นการเพาะไวรัสฝีดาษไก่บนเยื่อไข่ไก่ฟัก (chorioallantoic membrane) ที่ทำช่องอากาศเทียมไว้ ซึ่งขั้นตอนนี้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและใช้วัตถุดิบจำนวนมากต่อครั้ง แต่ผลิตวัคซีนได้ปริมาณน้อย ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาการเตรียมวัคซีนฝีดาษไก่โดยเพาะเลี้ยงบนเซลล์ไข่ไก่ฟัก เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และเพิ่มปริมาณไวรัสให้เพียงพอสำหรับการผลิตวัคซีน ซึ่งเป็นไปตามแนวทางความก้าวหน้าในการศึกษาเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสฝีดาษไก่บนเซลล์ไข่ไก่ฟัก ตามวิธีการที่มีรายงานไว้ (Bang,1951)(Mayr,1963)(Hyde,1965) (Tajima and Ushijima, 1966) ซึ่งวิธีการเพาะไวรัสฝีดาษไก่บนเซลล์ไข่ไก่ฟักนี้เหมาะสมกับการขยายการผลิตวัคซีน เพราะประหยัดทั้งเวลาและวัตถุดิบ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ไข่ไก่ฟัก ใช้ไข่ไก่ฟักจากฟาร์มปลอดโรคอายุ 10 วัน

2. Seed ไวรัสฝีดาษไก่ ได้จากการเพาะ Attenuated fowl pox virus สเตรน Weybridge บนเยื่อไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ(SPF) อายุ 12 วัน แล้วเก็บเยื่อที่มีวิการมาบดปั่นเพื่อเก็บเชื้อไวรัส แล้วทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพเชื้อไวรัสที่ได้ตามมาตรฐานศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (1987)

ก. Seed ที่จะใช้ได้ผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์ (Sterility test)

- ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อรา และแบคทีเรีย รวมทั้งซัลโมเนลล่า
- ปราศจากเชื้อมัยโคพลาสม่า

ข. Seed ที่จะใช้ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพ

- มีความปลอดภัยในไก่ 100% เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 เท่าแทงปีกไก่ (wing web stab) ในลูกไก่อายุ 1 เดือน แล้วเลี้ยงดูอาการนาน 4 สัปดาห์
- มีประสิทธิภาพให้ความคุ้มโรค โดยไม่ปรากฏรอยโรคหลังการฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสในท้องที่
- มีปริมาณไวรัส $10^{6.3}EID_{50}/ml.$

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Growth medium ประกอบด้วย

M199* ใน Hank's balanced salt solution ปริมาตร	9.0 มล.
Goat serum	3.6 มล.
4.2% $NaHCO_3$	5.8 มล.
Vitamin	0.1 มล.
Penstrep 1.000 IU.	1.0 มล.
เติม distilled water ให้ครบ 100 มล.	

---

* Medium 199 ของ GIBCO BRL

ปรับ pH ด้วย CO_2 ให้ได้ pH = 6.8

3.2 Maintenance medium ประกอบด้วย

M199* ใน Hank's balanced salt solution ปริมาตร	4.7 มล.
F10**	4.0 มล.
Goat serum	3.6 มล.
Penstrep 1,000 I.U	1.0 มล.
4.2% $NaHCO_3$	5.8 มล.
Vitamin	0.1 มล.
L-glutamine	1.0 มล.

เติม distilled water ให้ครบ 100 มล.

ปรับ pH ให้ได้ pH=7.0

4. ไก่ทดลอง

- ใช้ไก่ทดลองพันธุ์เล็กฮอร์นขาว จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง อายุ 30 วัน จำนวน 130 ตัว ที่เลี้ยงในกรงมุ้งลวด
- ไก่พื้นบ้านเลี้ยงปล่อย มีสุขภาพแข็งแรง อายุ 1 เดือน จำนวน 200 ตัว ไก่ทั้งหมดนี้ใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน และต้องไม่เคยได้รับวัคซีนฝีดาษไก่มาก่อน

5. เชื้อไวรัสฝีดาษไก่ชนิดรุนแรง (Seed challenge) ที่แยกได้จากท้องที่ (Local strain) มีปริมาณไวรัส $10^5 EID_{50}/ml$.

6. สารคงสภาพ (Stabilizer) เป็นส่วนประกอบในการทำแห้งวัคซีนจะใช้สารประกอบมีชื่อดังนี้ Polyvinyl pyrolidone (PVP), Casitone (Lab grade) และ Lactose dehydrated

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เตรียมเซลล์จากเซลล์ไข่ไก่ฟัก อายุ 10 วัน ตามวิธีการของ Youngner (1954) โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ growth medium เป็น 0.27% แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer ตามหลักการคำนวณนับเม็ดเลือดขาวทุกครั้ง จึงนำเซลล์มาเพาะให้เจริญเป็น monolayer ในขวดแก้ว เก็บเข้าตู้อบ 37°C. นาน 48 ชั่วโมง เซลล์ที่เจริญมีลักษณะเป็นรูปยาวรีคล้ายกระสวยการผลิต seed บนเซลล์ไข่ไก่ฟัก

1. การเพาะ seed ไวรัสฝีดาษไก่ เมื่อเซลล์เจริญดีเป็น monolayer แล้วเท growth medium ทิ้ง ใส่ seed ไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากเยื่อไข่ไก่ฟักซึ่งผ่านการทดสอบคุณภาพแล้วในขวดแก้วเพาะเซลล์ปริมาณ $10^{6.3} EID_{50}/ml$. เติม maintenance medium แล้วนำเข้าตู้อบ 37°C. สัง

---

* Medium 199 ของ GIBCO BRL

** Biochrom KG

เกตุการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X10 ทุกวัน เก็บขวดเพาะเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง 95-100% เข้าตู้แช่อุณหภูมิ -40°C.

2. การเก็บไวรัสซัสเพนชั่น นำขวดเพาะเซลล์ที่เก็บในตู้แช่แข็งออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำแข็งเริ่มละลาย จึงเขย่าขวดเพื่อให้น้ำแข็งครูดเซลล์แตก ซึ่งไวรัสและเซลล์จะหลุดลอยในน้ำเลี้ยงเซลล์ รวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์หรือไวรัสซัสเพนชั่นครั้งที่ 1 ไว้ และเก็บตัวอย่างซัสเพนชั่นไว้ตรวจสอบคุณภาพต่อไป

3. การทดสอบคุณภาพของไวรัสซัสเพนชั่น

- ทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อรา และแบคทีเรีย (Sterility test) รวมทั้งเชื้อซัลโมเนลล่าที่อาจติดมากับไข่ไก่ฟัก โดยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ fluid thioglycollate medium, blood agar และ saboraud dextrose medium ตามวิธีการของ Baker (1967)

- ทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนจากไวรัสชนิดอื่น โดยฉีดไวรัสซัสเพนชั่นในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน เข้า allantoic fluid นำเข้าตู้ฟัก 7 วัน แล้วตรวจดูวิการของไข่ไก่ฟัก

- ตรวจหาปริมาณไวรัส (virus content test) เป็นการตรวจหาปริมาณไวรัสโดยการไตเตรทในเซลล์ไข่ไก่ฟักแล้วคำนวณตามวิธีการของ Reed and Munch (1938)

4. การผ่านไวรัสผีดาษไก่ใน passage ต่อไป

นำไวรัสซัสเพนชั่นครั้งแรก มาผ่านในเซลล์ไข่ไก่ฟักปฐมภูมิครั้งที่ 2 เก็บเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (CPE) 95-100% เข้าตู้แช่แข็ง แล้วรวบรวมซัสเพนชั่นครั้งที่ 2 เพื่อผ่านในเซลล์ไข่ไก่ฟักต่อไปอีกเป็นครั้งที่ 3 ทำการผ่านไวรัสซัสเพนชั่นต่อไปอีกจนถึงครั้งที่ 5 เก็บตัวอย่างไวรัสซัสเพนชั่นทั้ง 5 ครั้งไว้ตรวจหาปริมาณไวรัสเปรียบเทียบกัน

การหาปริมาณไวรัสที่พอเหมาะและระยะเวลาที่เกิดปฏิกริยาดีที่สุด

นำไวรัสซัสเพนชั่นของ passage ที่มีปริมาณไวรัสดีที่สุดมา แล้วคำนวณหาปริมาณไวรัสซัสเพนชั่นที่จะใช้ใส่ในขวดเพาะเซลล์แต่ละขวด โดยกำหนดค่า m.o.i.(Multiplicity of infectivity) ขึ้น นับปริมาณเซลล์ปฐมภูมิก่อนเพาะในขวดแก้ว แล้วคำนวณตามสูตร ค่า M.O.I. คูณด้วย ปริมาณเซลล์ต่อ มล. เริ่มต้นเก็บตัวอย่างขวดเพาะเซลล์ใน 24 ชั่วโมง และไวรัสไตเตอร์ต่อ มล. เก็บตัวอย่างต่อไปทุก 12 ชั่วโมง จนถึงวันที่เซลล์ลอกหลุดไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40°C. นำไวรัสซัสเพนชั่นทั้งหมดมาทดสอบเปรียบเทียบปริมาณไวรัส

การเตรียมวัคซีนดูดแห้ง

นำไวรัสซัสเพนชั่น ที่มีปริมาณไวรัสดีที่สุด ของขั้นตอนที่ผ่านมาผสมกับสารคงสภาพ (Stabilizer) ชนิดต่าง ๆ ตามอัตราส่วน (ในข้อ ข.) แล้วแจกใส่ขวดบรรจุวัคซีนขนาดขวดละ 2 ซี.ซี. ชนิดละ 50 ขวด ปิดจุกยางแล้วนำเข้าเครื่องดูดแห้ง* (Freeze drying machine) นาน 27 ชั่วโมง

---

* Leybold - Heraeus รุ่น GT 402

1. การเตรียมสารคงสภาพ

1.1 เตรียม 0.3% PVP - ใช้ PVP 0.3 กรัม ผสม Lactose 10 กรัม เติมน้ำเป็น 100 มล.

1.2 เตรียม 1.5% PVP - ใช้ PVP 1.5 กรัม ผสม Lactose 50 กรัม เติมน้ำเป็น 100 มล.

1.3 เตรียม 20% casitone - ใช้ casitone 20 กรัม เติมน้ำเป็น 100 มล.

2. อัตราส่วนการผสมวัคซีนกับสารคงสภาพ

ชนิดที่ 1 วัคซีน 1.8 มล.+0.3% PVP 0.2 มล.
ชนิดที่ 2 วัคซีน 1.8 มล.+1.5% PVP 0.2 มล.
ชนิดที่ 3 วัคซีน 1.8 มล.+20% casitone 0.2 มล.
ชนิดที่ 4 วัคซีน 1.8 มล.+1.5% PVP 0.15 มล.+20% casitone 0.05 มล.
ชนิดที่ 5 วัคซีน 1.8 มล.+1.5% PVP 0.1 มล.-20% casitone 0.1 มล.
ชนิดที่ 6 วัคซีน 1 มล.+0.3% PVP 1 มล.

การทดสอบคุณภาพวัคซีนดูดแห้ง

1. การทดสอบคุณสมบัติทั่วไป ตามวิธีการของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (1987)

1.1 ตรวจหาคุณลักษณะภายนอก เป็นการตรวจดูลักษณะความเป็นก้อน (cake) และสีของวัคซีนแห้ง

1.2 ตรวจสอบสภาพสูญญากาศ เป็นการทดสอบว่ามีอากาศอยู่ในขวดบรรจุวัคซีนหรือไม่ โดยใช้เครื่องตรวจสูญญากาศ (Sparker tester)* ชนิดใช้ไฟฟ้าความถี่สูงจะให้แสงสีเขียวเกิดขึ้นในขวดที่เป็นสูญญากาศ

1.3 ตรวจความชื้น เป็นการทดสอบหาเปอร์เซนต์ความชื้นในวัคซีนแห้งโดยการไตเตรทหาปริมาณน้ำที่มีอยู่ในวัคซีน ซึ่งทำปฏิกริยากับสาร Karl Fischer ในเครื่องตรวจหาความชื้น**

2. ทดสอบความบริสุทธิ์

2.1 ทดสอบความปราศจากการปนเปื้อน เชื้อรา และแบคทีเรีย (Sterility test) โดยการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ fluid thioglycollate medium และ sabouraud dextrose medium ตามวิธีการของ Baker (1967)

2.2 ทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อมัยโคพลาสม่า (Test for mycoplasma) โดยการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ PPLO medium ตามวิธีการของ NAS (1971)

3. ทดสอบความปลอดภัย (Safety test) ตามวิธีการของ ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (1987) โดยละลายวัคซีนแต่ละชนิดทั้ง 6 ชนิด ในขนาด 10 เท่าของโด๊สปกตินำไปแทงปีกไก่อายุ 30 วัน ชนิดละ 10 ตัว แล้วเลี้ยงไว้ดูอาการนาน 2 สัปดาห์

---

* Edwards รุ่น ST 4m

** Schott gerate รุ่น TR 156

4. ทดสอบประสิทธิภาพ (Potency test) ตามวิธีการของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (1987)

4.1 การทดสอบความคุ้มโรค โดยแบ่งไก่ออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวละลายวัคซีนทั้ 6 ชนิด ในอัตราส่วนความเข้มข้น 1 ต่อ 5 ด้วยน้ำยาละลายกลีเซอรีนผสม normal salin (50% v/v) นำวัคซีนแต่ละชนิดที่ละลายแล้วมาแทงปีก (wing web stab) ให้ไก่แต่ละกลุ่ม (กลุ่ ที่ 1 ถึง 6) โดยมีไก่กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบไม่ทำวัคซีน

ภายหลังทำวัคซีน 10 วัน สังเกตตุ่มผีบริเวณที่แทงปีก ถ้าเกิดตุ่มผีขึ้นดี เรียกว่า Tak หมายความว่า วัคซีนใช้ได้ผลซึ่งตุ่มผีจะแห้งหายไปใน 15 วัน แล้วฉีดพิษทับให้ไก่ทุกกลุ่มด้วยเชื้ ไวรัสที่แยกได้จากท้องที่ (Local strain) ขนาด 10^5EID$_{50}$/มล. โดยวิธีป้ายเชื้อพิษทับบนหงอ ไก่ทุกตัวที่ทำรอยแผลไว้ สังเกตอาการนาน 10 วัน

4.2 การตรวจหาปริมาณไวรัส นำวัคซีนแห้งทุกชนิดมาไตเตรตโดยเจือจางไวรัสแบ Ten fold dilution แล้วใส่ไวรัสลงในหลอดแก้วที่มีเซลล์ไข่ไก่ฟักความเจือจางละ 6 หลอ เก็บเข้าตู้อบ 37°C. อ่านผลในวันที่ 5 และคำนวณตามวิธีการของ Reed and Muench (1938)

การทดสอบวัคซีนแห้งในลูกไก่อายุ 1 เดือน จำนวน 200 ตัว

ละลายวัคซีนดูดแห้งฝีดาษไก่ที่ผลิตได้ ด้วยน้ำยาละลายกลีเซอรีนผสม normal salin (50% v/v) ปริมาณ 5 ซีซี.โดยใช้เข็มแทงปีกจุ่มลงในวัคซีนที่ละลายแล้ว มาแทงปีกไก่ทุกตัวจำนว 200 ตัว แล้วเลี้ยงไก่ปล่อยไว้ในกรงธรรมดาที่ไม่มีมุ้งลวด สังเกตการเกิด take ภายใน 10 วั และเลี้ยงดูอาการต่อไปอีก 1 เดือน

ผลการทดลอง

การเพาะไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากเยื่อไข่ไก่ฟักปริมาณ $10^{6\cdot3}$EID$_{50}$/ml ลงในขวดแก้วเพา เซลล์ที่มีเซลล์จำนวน 8.3 X 10^8 เซลล์ต่อ มล. พบว่าไวรัสฝีดาษไก่สามารถทำให้เซลล์เกิดกา เปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ 95-100% โดยเซลล์มีลักษณะกลมเด่นชัดขึ้นทุกเซลล์เรียกว่า cytopathi effect (CPE) ซึ่งไวรัสซัสเพนชั่นครั้งแรกที่ได้ผ่านการทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพ มีปริมา ไวรัสสูงใกล้เคียงกับ seed เริ่มต้น และเมื่อผ่านไวรัสซัสเพนชั่นครั้งที่ 1 ต่อไปในเซลล์ปฐมภูมิอี 4 ครั้ง พบว่า ปริมาณไวรัสของซัสเพนชั่นต่อมาลดลงตามจำนวนครั้งที่ผ่านเซลล์ประมาณ 10^{-3} (ต ตารางที่ 1) ซึ่งไวรัสซัสเพนชั่น passage ที่ 2 หรือ 3 เหมาะสมที่จะใช้เป็น seed เริ่มต้นเพ เพาะในเซลล์ต่อไป

ในการหาปริมาณไวรัสที่พอเหมาะสำหรับเพาะในเซลล์ พบว่า การใช้ m.o.i. อย่างน้ 0.002 ทำให้เซลล์เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพหลังการเพาะเชื้อ 36 ชั่วโมง และ ชั่วโมงที่ 96 จะเกิดการเปลี่ยนแปลง 90-100% ดังผลการบันทึกปริมาณไวรัสจากตัวอย่างไวรัสซั เพนชั่นที่เก็บไว้ทุก 12 ชั่วโมง แสดงเปรียบเทียบกันตามตารางที่ 2

การนำชัสเพนชั่นที่มีปริมาณไวรัสสูงมาเตรียมเป็นวัคซีนดูดแห้ง โดยการผสมสารคงสภาพชนิดต่าง ๆ พบว่าอัตราส่วนการผสมสารคงสภาพกับวัคซีนชนิดที่ 2,4,5 และ 6 (ตามตารางที่ 3) วัคซีนมีคุณสมบัติเป็นก้อนคงรูปละลายง่ายมีความชื้นไม่เกิน 4% และมีประสิทธิภาพเป็นไปตามมาตรฐาน

เมื่อนำวัคซีนแห้งไปแทงปีกในลูกไก่อายุ 1 เดือน ที่เลี้ยงปล่อยจำนวน 200 ตัว พบว่าไก่ทุกตัวเกิด take ตรงบริเวณแทงปีกภายใน 7 วัน และไม่ปรากฏรอยโรคตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 1 เดือน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ของชัสเพนชั่น passage ที่ 1 ถึง 5 (เฉลี่ย 3 ครั้ง)

	mean Virus Titer log 10 $TCID_{50}$ per ml.				
	P1	P2	P3	P4	P5
Seed fowl pox virus titer $10^{6 \cdot 3} EID_{50}$/ml.	6.31	6.15	6.0	5.75	5.69

* P = passage

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเกิด CPE ของเซลล์ กับปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ตามค่า m.o.i. ที่กำหนด (multiplicity of infectivity)

m.o.i.	Virus titer log 10 $TCID_{50}$ per ml.									
Time	24 hr.	36hr.	48hr.	60hr.	72hr.	84hr.	96hr.	108hr	120hr	132hr
0.001	-	2.49	3.0	3.50	4.90	5.15	5.45	5.50	5.69	5.75
0.002	-	2.60	3.15	4.15	5.31	5.75	6.15	6.0	5.75	4.31
0.003	-	2.69	3.30	4.50	5.49	5.69	6.10	5.75	5.30	4.31
0.01	-	2.75	3.66	4.75	5.75	5.50	5.15	4.15	4.0	3.30

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบวัคซีนดูดแห้งฝีดาษไก่เมื่อผสมสารคงสภาพชนิดต่างๆ

Ratio of the vaccine with stabilizer in the freeze-dried vaccine	The properties of vaccine		Virus titer log10 $TCID_{50}$/ml	Safety test %	Protection %
	Contents	% Moisture			
1.วัคซีน 1.8 มล.+.03% PVP 0.2 มล.	ฝ่อ	-	-	-	-
2.วัคซีน 1.8 มล+1.5% PVP 0.2 มล.	ก้อนสีชมพู	1.27	5.75	100	100
3.วัคซีน 1.8 มล.+20% casitone 0.2 มล.	ไม่เป็นก้อน	4.27	5.5	100	100
4.วัคซีน 1.8 มล.+1.5% PVP 0.15 มล.+20% casitone 0.05 มล.	ก้อนสีเหลือง	1.31	5.80	100	100
5.วัคซีน 1.8 มล.+1.5% PVP 0.1 มล.+20% casitone 0.1 มล.	ก้อนสีเหลืองจัด	2.77	5.66	100	100
6.วัคซีน 1 มล.+0.3% PVP 1 มล.	ก้อนสีชมพู	2.23	4.62	100	100
7.กลุ่มควบคุม	-	-	-	-	-

สรุปและวิจารณ์

ไวรัสฝีดาษไก่ที่ได้จากเยื่อไข่ไก่ฟักสามารถปรับตัวเจริญในเซลล์ โดยทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (CPE) สมบูรณ์ได้ใน passage แรก ตรงตามรายงานของ Bang และคณะ (1951) และไวรัสซัสเพนชั่นที่เก็บ (Harvest)ได้ในวันที่เกิด CPE 100% มีปริมาณไวรัสสูงใกล้เคียงกับ seed เริ่มต้นซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Mayr (1963) ได้กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดมากเมื่อมีปริมาณไวรัสมากเช่นกัน ครั้นเมื่อผ่านไวรัสซัสเพนชั่นครั้งต่อ ๆ ไป พบว่าปริมาณไวรัสในซัสเพนชั่นต่อมาจะลดลงตามจำนวนครั้งที่ผ่านไวรัส จากการทดลองพบว่าไวรัสซัสเพนชั่น passage ที่ 2 หรือ 3 เหมาะสมสำหรับการเริ่มต้นเพาะเซลล์เพื่อผลิตวัคซีน

การหาค่า m.o.i. ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสที่ใช้เริ่มต้นและปริมาณเซลล์ต่อ มล. พบว่าการใช้ m.o.i. อย่างน้อย 0.002 และไม่เกิน 0.01 จะใช้เวลาในการเกิด CPE อย่างสมบูรณ์ภายใน 36-96 ชั่วโมง และหลังจากวันที่ 5 หรือ 120 ชั่วโมง เซลล์จะลอกหลุด เป็นไปตามรายงาน

ของ Change และ Jasty (1970) ซึ่งไวรัสซัสเพนชั่นที่รวบรวมได้มีปริมาณไวรัส $10^{6.15}$ $TCID_{50}/ml$. สามารถใช้ผลิตเป็นวัคซีนได้ แต่ถ้าใช้ m.o.i. 0.01 เพาะเซลล์ พบว่าเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและลอกหลุดก่อนเวลา 96 ชั่วโมง และมีปริมาณไวรัสในซัสเพนชั่นไม่พอกับการผลิตวัคซีน

การนำไวรัสซัสเพนชั่น มาผสมสารคงสภาพในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนทำเป็นวัคซีนดูดแห้ง พบว่าวัคซีนดูดแห้งที่มีส่วนผสมของวัคซีนกับสาร PVP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ PVP เป็น 0.15% มีคุณภาพและประสิทธิภาพเป็นไปตามมาตรฐาน (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 1987) มีความปลอดภัยในไก่ 100% และมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^4 TCID_{50}/ml$. ซึ่งสามารถให้ความคุ้มโรคในไก่ โดยไม่ปรากฏรอยโรคหลังการฉีดพิษทับใน 10 วัน ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Winterfield และ Hitchner (1954) ที่กล่าวว่าปริมาณไวรัสฝีดาษไก่ $10^4 EID_{50}/ml$. ก็เพียงพอให้ไก่สร้างความคุ้มโรคได้

ดังนั้น การเตรียมวัคซีนฝีดาษไก่ โดยวิธีการเพาะบนเซลล์ไข่ไก่ฟักจึงเป็นวิธีพัฒนาการผลิตวัคซีนอีกขั้นหนึ่ง เพราะสามารถลดการปนเปื้อน เนื่องจากไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำช่องอากาศเทียม (artificial air sac) ก่อนเพาะไวรัสบนเยื่อไข่ไก่ฟัก สามารถลดจำนวนวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตได้แก่ ไข่ไก่ฟักซึ่งปกติใช้ประมาณ 3,000 ฟอง ต่อการผลิตวัคซีนแห้ง 1.5 ล้านโดส แต่การผลิตวัคซีนจากเซลล์ไข่ไก่ฟักจะใช้ไข่เพียง 900 ฟองเท่านั้น นอกจากนี้ยังประหยัดเวลาและลดจำนวนผู้ปฏิบัติงานต่อครั้ง และสามารถขยายการผลิตวัคซีนให้ได้จำนวนมากตามความต้องการของเกษตรกร

สรุป

การเตรียมวัคซีนฝีดาษไก่จากเซลล์ไข่ไก่ฟัก เป็นวิธีที่สามารถใช้ขยายการผลิตวัคซีนในอนาคตได้ โดยการผ่าน seed ไวรัสฝีดาษไก่ที่ปรับตัวแล้วบน monolayer ของเซลล์ไข่ไก่ฟักต่อไป แล้วเก็บซัสเพนชั่นของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอย่างสมบูรณ์ดีเพื่อใช้ผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง

ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น หรือเป็นแนวทางศึกษาค้นคว้าพัฒนาการขยายการผลิตวัคซีนด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยต่อไปในอนาคต สำหรับ seed ไวรัสฝีดาษไก่ที่ปรับตัวแล้วยังต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกคนของงาน ผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ งานผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด ที่อำนวยความสะดวกช่วยเตรียมการทดลอง และคณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์

เอกสารอ้างอิง

1. ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์,1987(2530)มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของวัคซีนฝีดาษไก่ชนิดทำแห้ง (Minimum requirements for fowl pox vaccine,freeze dried) กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่
2. นายฉาย จอมเกาะ 2530 การทำแห้งและการฝ่อของวัคซีนทำแห้ง รายงานวิชาการ พ.ศ. 2525-2530 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
3. Baker, F.J. 1967. Handbook of bacteriological technique. 2nd. London Butterwords & Co. (Publishers) Ltd.:94-98,103,209-201. Bang, F.B., Levy, E. and Gey, G.O.1951 : Some observations on host-cell-virus-relationships in fowl pox 1. Growth in tissure culture. 2. The inclusion produced by the virus on the chick chrioallantoic membrance. J. Immunol., 66,: 329-345.
4. Cunningham, C.H. 1973. A Laboratory Guide in Virology. 7thed. Mineapolis.
5. Cunningham, C.H. 1978. Avian Pox. In Diseases of Poultry,7thed. Iowa State University Press, Ames: 597-609.
6. Cunningham, C.H & Tripathy D. N. 1984. Avian pox. In Diseases of Poultry, 8thed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.: 524-534.
7. Chang, P.W. and Jasty, V .1970. Mutiplication of fowl pox virus in chicken embryo fibroblastic cell cultures. Am. J. Vet. Res. 31 : 1463-1467.
8. Gafford, L.G., Sine Lair, F. and Randall, C.C. 1969. Growth cycle of fowl pox virus and change in plaque morphology and cytopathology by contaminating mycoplasma, virology, 37:464-472.
9. Hyde. J.M., Gafford, L.H. and Randall, C.C. 1965. Avian pox. In Diseases of Poultry, 7thed. Iowa state University Press, Ames. : 597-609.
10. Morita, C.1973. Studies on fowl pox viruses. Plaque formation of fowl pox virus on chick embryo cell culture, Avian Dis,17:87-92.
11. Mayr.A.1963. Avian pox. In Diseases of poultry, 7thed. Iowa State University Press, Ames.: 597-609.
12. Mayr. A and Kalcher, K. 1961. Plaque Building beiden Geftugelpock-enviten-Arch Virusforscholl.: 304-325.

13.NAS. 1971. Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Qualifying Avian Pathogens. 1st ed. National Academy for Sciences, Washington, D.C. P22-24, 35-39, 215-244.

14.National Academy of Sciences Washington D.C. 1971. Fowl pox vaccine. Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens : 126-133.

15.Reed. L.J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Amer.J.Hyg. 27:493-497.

16.Tajima, M. and Ushijima, T. 1966. Avian pox. In Diseases of Poultry, 7th ed. Iowa State University Press, Ames. : 597-609.

17.Winterfield R.W. and Hitchner, S.B.1964. The Response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox virus. Avian Diseases. 17:237-241.

18.Youngner, J.S. 1954. Monolayer Tissue Cultures. I Preparation and standardization of suspensions oftrypsin dispersed Monkey kidney cells. Proc. Soc. Expt 1. Biol. Med. : 202-205.

การศึกษาวัคซีนรวมหลอดลมอักเสบไก่และนิวคาสเซิล

STUDY OF INFECTIOUS BRONCHITIS AND NEWCASTLE COMBINED VACCINE

นันทนา โปษณเจริญ[1] วิมล ปริยกนก[1] กมลทิพย์ อนุสกุลเจริญพร[1]
Nantana Posanachareon Wimon Pariyakanok
Kamonthip Anusakunchareonporn

ABSTRACT

The protective effect of Infectious bronchitis(IB) and Newcastle disease(ND) live virus dried vaccine were examined in 3 - 4 week old healthy chicken. Chicken vaccinated intranasally with combined vaccine containing 10^4 EID_{50} of IBV and $10^{6.5}$ EID_{50} of NDV per dose had the immunity and protected against IBV and NDV. The results showed that the combined vaccine was effective only when the virus titer of NDV higher than IBV.

บทคัดย่อ

วัคซีนรวมเชื้อเป็นชนิดแห้ง (Lyophilized vaccine) ระหว่างหลอดลมอักเสบติดต่อไก่(IB) และนิวคาสเซิล(ND) นำมาใช้กับลูกไก่สุขภาพแข็งแรง ไม่เคยได้รับวัคซีนอื่นมาก่อน อายุ 3-4 สัปดาห์ โดยการหยอดจมูก

Key words : Combined vaccine, Infectious bronchitis, Newcastle disease

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

วัคซีนผสม IB (10^4 EID_{50}ต่อตัว) และ ND ($10^{6.5}$ EID_{50} ต่อตัว) พบว่า วัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิด และวัคซีนรวมนี้ต้องมีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลมากกว่าไวรัสหลอดลมอักเสบ ถ้าปริมาณไวรัสระหว่างวัคซีนหลอดลมอักเสบและวัคซีนนิวคาสเซิลของวัคซีนรวมใกล้เคียงกันมากแล้ว ประสิทธิภาพความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิดจะลดลง

คำนำ

โรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบไก่ เป็นโรคระบาดที่ร้ายแรงของไก่ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เนื่องจากวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรนเอฟและวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่สเตรนพื้นบ้านมีวิธีการผลิตและวิธีการใช้คล้ายคลึงกับการใช้วัคซีนรวมย่อมก่อให้เกิดความสะดวกต่อผู้ใช้ (เศรษฐากุล, 2524) ได้กล่าวไว้ว่า การใช้วัคซีนรวมให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้วัคซีนแต่ละชนิดแยกกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของผู้ใช้ ในต่างประเทศได้ผลิตวัคซีนรวมระหว่างนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อไก่ มานานแล้วและยังนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่ง Bengelsdorff (1972) ได้รายงานว่า การให้วัคซีนนิวคาสเซิลก่อน แล้วให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อตามหลัง 10-14 วัน จะทำให้ความคุ้มโรคนิวคาสเซิลลดลงอย่างเห็นได้ชัด ด้วยเหตุนี้ควรให้วัคซีนนิวคาสเซิลพร้อมวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ สำหรับการทดลองครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตวัคซีนรวม ซึ่งจะทำให้เกษตรกรได้รับความสะดวกสองประการ คือ ได้รับวัคซีนทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกัน โดยไม่ต้องเสียเวลาในการทำวัคซีนสองครั้ง และให้ผลในการป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบไก่ได้ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Seed virus นิวคาสเซิลสเตรนเอฟ และ Seed virus หลอดลมอักเสบไก่สเตรนพื้นบ้าน โดยการผ่าน Seed attenuated virus แต่ละชนิดเข้า Chorioallantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ส่องคัดไข่ตายภายใน 24 ชั่วโมงทิ้ง เก็บน้ำไข่ (allantoic fluid) ของไข่เป็นสำหรับวัคซีนนิวคาสเซิลเก็บน้ำไข่ในวันที่ 4 ส่วนวัคซีนหลอดลมอักเสบให้เก็บน้ำไข่ในชั่วโมงที่ 48

นำตัวอย่างน้ำไข่ไปหาปริมาณไวรัสโดยเจือจางเป็น 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-10} แล้วฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวันนาน 7 วัน คำนวณหาค่า EID_{50}/cc ตามวิธี Reed and Muench วัคซีนสดนิวคาสเซิลมีปริมาณไวรัสประมาณ $10^{9.5}$ EID_{50}/cc และวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่มีปริมาณไวรัส 10^{7} 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) ซึ่งเป็นเชื้อพิษชนิดรุนแรงที่แยกได้ในท้องที่อำเภอปากช่อง ฉีดเข้ากล้ามลูกไก่ขนาด 10^{6} EID_{50} ต่อตัว แล้วดูผลในวันที่ 21 ภายหลังการฉีดพิษทับ

5. สารคงสภาพ(Stabilizer) ประกอบด้วย 0.3% Polyvinyl-pyrolidone และ 10% Lactose ทำเป็นสารละลาย แล้วนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน ใช้เป็นส่วนผสมของการทำวัคซีนแห้ง

6. เครื่องดูดแห้ง (Freeze-drying machine) ใช้โปรแกรมการทำแห้งอัตโนมัติ มีระยะเวลาการทำแห้งวัคซีนแต่ละครั้งนาน 27 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การรวมน้ำวัคซีนสด (allantoic fluid) ระหว่างวัคซีนนิวคาสเซิล (ND) กับวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่(IB) ในปริมาณ 1 ซีซี. เท่ากัน โดยให้มีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลขนาด $10^{8.5}$ ถึง $10^{5.5}$ รวมกับหลอดลมอักเสบไก่ขนาด 10^{7} ถึง 10^{4} EID_{50}/cc หยอดจมูกหรือตาลูกไก่อายุ 10 วัน ซึ่งแบ่งเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว และกลุ่มควบคุม 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ซึ่งจัดเป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้ทำวัคซีน กลุ่มทำวัคซีน ND ชนิดเดียว และกลุ่มทำวัคซีน IB ชนิดเดียว รวมทั้งหมด 11 กลุ่ม ดังนี้

ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการทำวัคซีนรวม เจาะเลือดและเก็บซีรั่มไก่ทุกกลุ่มๆ ละ 10 ตัว ยกเว้นกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 9 และกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 11 นำซีรั่มมาหาค่า HI titer ตามวิธีการของ Hanson(Hanson, 1980) โดยเริ่มเจือจางจาก 1:2 และอ่านค่า Titer เป็น log 2 จากนั้นนำไก่ที่เก็บซีรั่มแล้ว ไปฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิล พร้อมไก่กลุ่มควบคุมที่ 9 ซึ่งเป็น

การรวมน้ำวัคซีนสดนิวคาสเซิล (ND) กับวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ (IB) ในปริมาณ 1 ซีซี.

กลุ่มที่	ได้รับวัคซีนสด ND + IB ในขนาดต่าง ๆ กัน (EID50/ตัว)
1	$10^{6.5}$ + 10^{5}
2	$10^{6.5}$ + 10^{4}
3	$10^{6.5}$ + 10^{3}
4	$10^{5.5}$ + 10^{3}
5	$10^{4.5}$ + 10^{5}
6	$10^{4.5}$ + 10^{4}
7	$10^{4.5}$ + 10^{3}
8	$10^{3.5}$ + 10^{2}
9*	-
10**	$10^{6.5}$
11***	10^{4}

* กลุ่มไม่ได้ทำวัคซีน ** กลุ่มทำวัคซีน ND *** กลุ่มทำวัคซีน IB

ไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย และกลุ่มควบคุมที่ 10 เป็นไก่ที่ได้รับวัคซีน ND ชนิดเดียวฉีดเชื้อพิษเข้ากล้ามในขนาด 10^{6} EID_{50} ต่อตัว สังเกตอาการภายใน 14 วัน บันทึกอัตราการป่วยและอัตราการตาย

ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการให้วัคซีนรวมเจาะเลือดและเก็บซีรั่มไก่ที่เหลือทุกกลุ่มๆ ละ 10 ตัว และกลุ่มที่ 11 ได้รับวัคซีน IB ชนิดเดียว ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่ 10 แล้วนำมาหาค่า Neutralizing Index (NI) โดยวิธีอัลฟ่า (Alpha method) คือ ใช้ปริมาณซีรั่มคงที่ แต่แปรค่าไวรัสจาก 10^{-1} ถึง 10^{-7} ฉีดส่วนผสมไวรัสกับซีรั่มเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน นำเข้าตู้ฟัก 37^{0} c. นาน 7 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวัน แล้วนำมาคำนวณตามวิธี Reed and Muench ค่าของ Virus control ลบค่าของไวรัสที่ผสมซีรั่ม จะได้ค่า NI

2. การทำวัคซีนรวมชนิดแห้งเชื้อเป็น (Lyophilized Vaccine) นำวัคซีนสดที่ได้จากการผ่าน Seed ของไวรัสทั้งสองชนิด ซึ่งทราบค่าปริมาณไวรัส ND = $10^{9.5}$ and IB = 10^{7} EID_{50}/cc มาผสมกันด้วย

สัดส่วนต่างๆ 2 ชนิด โดยมีวัคซีนแต่ละชนิดเป็นตัวควบคุม (control) คำนวนปริมาณไวรัสแต่ละชนิดต่อโดีสก่อนผสมวัคซีน แล้วเติมสารคงสภาพ (Stabilizer) ปริมาณเท่ากับวัคซีน แบ่งส่วนผสมเก็บไว้เป็นตัวอย่าง เพื่อหาปริมาณไวรัสก่อนเข้าทำแห้ง จากนั้นบรรจุวัคซีนผสมใส่ขวดๆ ละ 1 ซีซี. แล้วนำเข้าเครื่องดูดแห้ง (Freeze-drying machine) นาน 27 ชั่วโมง

กลุ่มที่	วัคซีนผสมก่อนเข้าทำแห้ง	วัคซีนผสมหลังทำแห้ง
1.	ND $10^{7.0}$+IB$10^{4.3}$$EID_{50}$/โดีส	ND $10^{6.8}$+IB$10^{4.0}$$EID_{50}$/โดีส
2.	ND $10^{7.5}$+IB$10^{3.0}$ EID_{50}/โดีส	ND $10^{7.2}$+IB$10^{2.4}$$EID_{50}$/โดีส
3.	ND $10^{7.0}$$EID_{50}$/โดีส	ND $10^{6.5}$$EID_{50}$/โดีส
4.	IB $10^{4.3}$$EID_{50}$/โดีส	IB $10^{4}$$EID_{50}$/โดีส

** วัคซีน 1 ขวด มี 100 โดีส

3. การทดสอบวัคซีนแห้งเชื้อเป็น (Quality control)

3.1 ทดสอบความบริสุทธิ์ (Sterility test) โดยเพาะวัคซีนแห้งที่ละลายด้วยน้ำยาละลายบน Tryptose agar plate และ Thioglycollate broth เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปกติไม่ควรมีแบคทีเรียเกิน 10 โคโลนีต่อโดีส

3.2 ทดสอบความปลอดภัย (Safety test) ใช้ไก่ทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 5 กลุ่ม แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้ทำวัคซีน 1 กลุ่ม กลุ่มให้วัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเดียว 1 กลุ่ม กลุ่มให้วัคซีนหลอดลมอักเสบชนิดเดียว 1 กลุ่ม และกลุ่มวัคซีนรวม 2 กลุ่ม ละลายวัคซีนแห้งด้วยน้ำยาละลาย (normal saline) ให้เข้มข้นเป็น 10 เท่า ของขนาดที่ใช้ในท้องที่ (field dose) นำไปหยอดจมูกหรือตาตัวละ 2 หยด เลี้ยงไว้ดูอาการ 3 สัปดาห์ ไก่ทุกตัวที่ได้รับวัคซีนไม่ควรแสดงอาการใด ๆ เกี่ยวกับระบบหายใจหรืออื่น ๆ

3.3 การหาปริมาณไวรัสแต่ละชนิดในวัคซีนรวม นำวัคซีนรวมชนิดแห้งมาละลายด้วย น้ำยาละลาย 1 ซีซี.ต่อขวด เติมHyperimmune serum ชนิดตรงข้ามกับไวรัสที่ต้องการหาปริมาณ เพื่อทำให้ไวรัสชนิดเดียวกับซีรั่มที่

ใส่เป็นกลาง (neutralized) เช่น ใช้ hyperimmune serum ของไวรัสนิวคาสเซิลรวมกับวัคซีนผสม ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อหาปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบเช่นเดียวกันเมื่อใช้ hyperimmune serum ของไวรัสหลอดลมอักเสบรวม กับวัคซีนผสม เพื่อหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล จากนั้นเอาวัคซีนผสมที่ถูกผสมที่ถูกทำให้เป็นกลางแล้วมาหาปริมาณไวรัส โดยวิธีการทำให้เจือจาง 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-10} ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน นำเข้าตู้ฟัก 37^{0}c. นาน 7 วัน บันทึกอัตราการตายทุกวัน แล้วจึงคำนวณหาปริมาณไวรัสตามวิธี Reed and Muench

3.4 การหาปริมาณความคุ้มโรคของวัคซีนรวม

การหาค่า HI titer ละลายวัคซีนรวมชนิดแห้งด้วยน้ำยาละลาย (normal saline) อัตราส่วน 1 ต่อ 4 หยอดจมูกหรือตาไก่อายุ 1 เดือน จำนวน 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ส่วนไก่ควบคุมอีก 2 กลุ่ม ที่ไม่ให้วัคซีนเลย และกลุ่มให้วัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเดียว ภายหลังการให้วัคซีน 14 วัน เจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่มไก่ทุกตัวยกเว้นไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีนเลย นำไปหาค่า HI titer ด้วยวิธี microtest (Beta method) หลังจากนั้นจึงนำไก่ทั้งหมดทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่มควบคุม ไปฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิล เข้ากล้ามตัวละ 0.5 ซีซี.ในขนาด 10^{6} EID_{50}/ตัว สังเกตอาการภายใน 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการป่วยและอัตราการตาย

การหาค่า NI ละลายวัคซีนรวมชนิดแห้งด้วยน้ำยาละลายอัตราส่วน 1 ต่อ 4 หยอดจมูกหรือตาไก่อายุ 1 เดือน จำนวน 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ส่วนไก่ควบคุม 10 ตัว จะให้วัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ชนิดเดียว ภายหลังการให้วัคซีน 3 สัปดาห์ เจาะเลือดและเก็บซีรั่มไก่ทุกกลุ่มเป็นซีรั่มรวม (pooled serum) นำมา inactivate ที่ 56^{0}c. นานครึ่งชั่วโมง ก่อนนำไปหาค่า neutralizing index (NI) โดยการทำ Virus neutralization (Alpha method)

4. ทำวัคซีนรวมชนิดแห้ง ในลูกไก่อายุ 1 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว ซึ่งได้ทดสอบหาปริมาณไวรัสของวัคซีนนิวคาสเซิล ได้เท่ากับ $10^{6.8}$ EID_{50}/โดส และหลอดลมอักเสบไก่ ได้เท่ากับ 10^{4} EID_{50}/โดส กลุ่มควบคุมไม่ให้วัคซีนชนิดใด จำนวน 20 ตัว

หลังจากทำวัคซีนแล้ว 14 วัน เจาะเลือดและเก็บ serum ไปตรวจหาค่า HI titer และค่า NI แล้วนำไปฉีดเชื้อพิษทับ ด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิลเข้ากล้ามตัวละ 0.5 ซีซี. ในขนาด 10^{6} EID_{50}/โดส สังเกตอัตราการ

ป่วยและอัตราการตายของไก่ภายใน 2 สัปดาห์

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบ ไก่ชนิดสดที่มีปริมาณไวรัสแน่นอนในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์ ปรากฏว่า ไก่กลุ่มที่ 1 ถึง 4 ที่ให้วัคซีนรวม ND กับ IB ซึ่งมีปริมาณไวรัส ND มากกว่า IB นั้น จากการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มโดยวิธี HI พบว่า ค่า HI titer สัมพันธ์กับการฉีดพิษทับด้วยไวรัส ND โดยไก่ทั้ง 4 กลุ่ม มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับไวรัส ND 100% แต่ในไก่กลุ่มที่ 5 ถึง 7 ที่ให้วัคซีนรวมที่มีปริมาณไวรัส ND น้อยกว่า IB หรือปริมาณไวรัส ND ใกล้เคียงกับ IB พบว่า มีค่าHI titer อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ และมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับไวรัส ND เพียง 80% สำหรับผลการทดลองในไก่กลุ่มที่ 8 ซึ่งได้รับวัคซีนที่มีปริมาณไวรัส ND และ IB ต่ำกว่ามาตรฐาน พบว่า มีค่า HI titer อยู่ในระดับต่ำกว่า log 2^3 ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานและมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับไวรัส ND เพียง 30% สำหรับค่า Neutralizing index ต่อไวรัส IB ก็อยู่ในระดับต่ำกว่า 2 ซึ่งต่ำกว่าระดับมาตรฐานด้วย สำหรับปริมาณไวรัส IB ที่ใช้รวมวัคซีนนั้น ถ้ามีปริมาณมากกว่า 10^3 EID_{50}/cc แล้ว จะให้ความคุ้มโรคเสมอ(National Academy of Sciences, 1971) เช่นเดียวกันปริมาณไวรัส ND ก็ควรมีอย่างน้อย $10^{6.5-7}$ EID_{50}ต่อตัว(Allan และคณะ 1978) จากผลการทดลองนี้ปรากฏว่า ในไก่กลุ่มที่ 2 ที่ได้รับวัคซีนที่มีปริมาณไวรัส ND = $10^{6.5}$ และมีปริมาณไวรัส IB = 10^4 EID_{50}/ตัว ซึ่งปริมาณไวรัสทั้งสองชนิดต่างกันประมาณ 2 log เป็นกลุ่มที่มีค่าระดับแอนติบอดี้ดีที่สุด คือ มีค่า HI titer ต่อไวรัส ND เท่ากับ log $2^{6.11}$ โดยมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ 100% และมีค่า Neutralizing index ต่อไวรัส IB เท่ากับ 3.21 (ตารางที่ 1)

2. การทดสอบวัคซีนแห้งเชื้อเป็น

- ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ (Sterility test) ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในวัคซีน

- ผลการทดสอบความปลอดภัย (Safety test) ไก่ทุกตัวที่ได้รับวัคซีนไม่แสดงอาการใดๆ ทั้งระบบหายใจหรืออื่นๆ และมีสุขภาพแข็งแรง

- ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสแต่ละชนิดและการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนรวม ได้แก่เปอร์เซนต์ความคุ้มโรค ค่าเฉลี่ย HI titer และ Neutralizing index ปรากฏว่ากลุ่มที่ 2 มีปริมาณไวรัสของวัคซีนทั้งสองชนิดพอดีที่ทำให้ค่าความคุ้มโรคดีที่สุด (ตารางที่ 2)

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนรวมชนิดแห้ง ซึ่งมีไวรัสนิวคาสเซิล $10^{6.8}$ และมีไวรัสหลอดลมอักเสบไก่ $10^{4.0}$ EID_{50} ต่อโด๊ส ในลูกไก่อายุ 1 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ให้วัคซีนจำนวน 20 ตัว ปรากฏว่า วัคซีนมีความปลอดภัย 100% ให้ความคุ้มโรคหลังฉีด พิษทับ 97% ค่า HI titer เฉลี่ย $2^{5.59}$ และค่าเฉลี่ย NI = 2.63

ตารางที่ 1 แสดงผลความคุ้มโรคของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบไก่ชนิดสด ที่มีปริมาณไวรัสแน่นอน ในลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์

กลุ่มที่	ปริมาณไวรัส ND+IB/ตัว (EID_{50}/ตัว)	*ค่าเฉลี่ย HI titer (Log 2)	จำนวนไก่ รอด/จำนวน ไก่ฉีดพิษทับ	%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	$10^{4.5}+10^{3}$	3.15	9/10	90%	2.78
8	$10^{3.5}+10^{2}$	1.4	3/10	30%	1.83
(9)	-	-	0/10	0%	-
(10)	$10^{6.5}$ ND	7	10/10	100%	-
(11)	10^{4} IB	-	-	-	2.4

* มาตรฐาน HI titer= log 2^{3} ** มาตรฐาน NI= 2 (9) กลุ่มควบคุมไม่ทำวัคซีน (10) กลุ่มควบคุมทำวัคซีน ND ชนิดเดียว (11) กลุ่มควบคุมทำวัคซีน IB ชนิดเดียว

ตารางที่ 2 แสดงผลการใช้วัคซีนรวมชนิดแห้งตามสัดส่วนต่าง ๆ 2 ชนิด และกลุ่มควบคุมในลูกไก่ 4 สัปดาห์

ชนิดที่	ปริมาณไวรัสของวัคซีนรวมแต่ละชนิด/โดส (EID_{50}/โดส)	ค่าเฉลี่ย HI titer (Log 2)	จำนวนไก่รอด/จำนวนไก่ฉีดพิษทับ	%ความคุ้มโรค	ค่าเฉลี่ย NI (Log 10)
1	ND+IB=$10^{6.8}+10^{4.0}$	4.5	10/10	100%	3
2	ND+IB=$10^{7.2}+10^{2.4}$	5.28	10/10	100%	1.85
*3	ND=$10^{6.5}$	5.7	10/10	100%	-
*4	IB=10^{4}	-	-	-	2.51

* กลุ่มที่ 3 & 4 เป็นกลุ่มควบคุม

สรุปและวิจารณ์

การรวมวัคซีนระหว่างนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบไก่ ต้องมีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลอย่างน้อย $10^{6.5}$ EID_{50}/ตัว และปริมาณไวรัส IB อย่างน้อย 10^{4} EID_{50}/ตัว จึงมีประสิทธิภาพความคุ้มโรคต่อไวรัสทั้งสองชนิดดีที่สุด ดังจะเห็นว่าปริมาณไวรัสของวัคซีนทั้งสองชนิดต่างกันประมาณ 2 log ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับ Winterfield และคณะ 1957 ที่กล่าวว่าการรวมไวรัส ND กับ IB นั้น ไวรัสนิวคาสเซิลควรจะมีค่ามากกว่าไวรัสหลอดลมอักเสบไก่ 2 ถึง 3 log จึงจะให้ความคุ้มโรคได้ดี ถ้าใช้ในปริมาณเท่ากันจะให้ความคุ้มโรคไม่ดี ในการทดลองรวมวัคซีนนี้ไก่บางกลุ่มที่ให้วัคซีนรวม ซึ่งมีปริมาณไวรัส IB มากกว่า ND พบว่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคต่อไวรัส ND ลดลง ภายหลังการฉีดพิษทับ ทั้งนี้อาจเป็นผลการยับยั้งของไวรัส IB ต่อ ND ดังที่ R.P. HANSON และคณะ 1956 กล่าวไว้ว่าเมื่อไวรัสหลอดลมอักเสบไก่รวมกับไวรัสนิวคาสเซิลนั้น ถ้ามีไวรัสหลอดลมอักเสบมากกว่านิวคาสเซิล จะมีผลยับยั้งต่อไวรัส ND และผลยับยั้งจะน้อยลงเมื่อมีไวรัส ND มากกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงกรรณิกา จิรจุมพล และสัตวแพทย์หญิงวิรงรอง พุ่นสุวรรณ ที่ได้ช่วยประสานงานในการทดลองครั้งนี้ จนประสบผลสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เสรษฐากุล 2524 การใช้วัคซีนนิวคาสเซิลในวิทยาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้ทางสัตวแพทย์ โดยบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิและคณะ กรุงเทพฯ หน้า 99-122

Allan, W. H., Lancaster, J. E., Toth, B.1978: Newcastle Disease vaccines, Their production and use. In the report of FAO, Rome: pp. 57-69 and 125-128.

Bangelsdorff, H. J. 1972. Protective effect of vaccination and the antibody production after combined administration of Newcastle Disease Infectious 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 Infectious bronchitis viruses. Am. J. 17: pp. 294-298.

Hanson, L. E. 1980 : Newcastle Disease ; pp. 63 - 66x; Hitchner, 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, Infectious Bronchitis; pp. 66-108 ; In Methods for Examining Poultry Biologics and for Indentifying and Thornton, D.H., Meskett, J. C. 1975 : Effect of Infectious bronchitis vaccination on the performance of Live Newcastle Disease vaccine ; Vet. Rec. Vol. 96; pp.467-468.

Reed,L.J. and Muench, H.1938: A Simple method of estitmating fifty percent end points. Am. J. Hyg.27:493-497.

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