การทดสอบความคงรอดของสปอร์ในวัคซีนแอนแทรกซ์

จิตรนภา ตีรถะวรวรรณ[1] วันชัย ตีรถะวรวรรณ[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาความคงรอดของสปอร์จากเชื้อ *Bacillus anthracis* ในวัคซีนแอนแทรกซ์ชนิดเชื้อเป็น โดยการนับจำนวนสปอร์มีชีวิตด้วยวิธี pour plate ทุกๆ 2 เดือน หลังจากการผลิต และเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 4°ซ. จนนับจำนวนสปอร์ได้น้อยกว่า 10^7 CFU/ml พบว่ายังคงมีจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตในวัคซีนไม่น้อยกว่า 10^7 CFU/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานหลังเก็บเป็นเวลา 18 เดือน ผลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มวันหมดอายุของวัคซีน

คำสำคัญ : วัคซีนแอนแทรกซ์ การนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิต

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคแอนแทรกซ์หรือโรคกาลี เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดในสัตว์กินพืชที่เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแกะ โค และกระบือ เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์สู่คน จึงจัดว่าเป็นโรคระบาดที่สำคัญโรคหนึ่งในพระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2523 กรมปศุสัตว์โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ผลิตวัคซีนชนิดเชื้อเป็นประกอบด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของ *Bacillus anthracis* ไม่ต่ำกว่า 10^7 CFU/ml (British Vet Codex, 1965; OIE, 2004) เพื่อป้องกันโรคแอนแทรกซ์ใน โค กระบือ แพะ แกะ และช้าง วัคซีนนี้ถูกกำหนดวันหมดอายุที่ 12 เดือน แต่เนื่องจากหน่วยงานทางด้านปศุสัตว์มีความต้องการใช้วัคซีนชนิดนี้ในปริมาณน้อยและช่วงเวลาไม่แน่นอน การเบิกจ่ายวัคซีนจะกระทำเมื่อมีปัญหาการระบาดของโรคเท่านั้น เป็นสาเหตุทำให้สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จำเป็นต้องเก็บวัคซีนสำรองไว้ เมื่อมีปัญหาการระบาดของโรคแอนแทรกซ์ก็สามารถนำไปใช้ได้ทันท่วงที ดังนั้นวัคซีนควรจะมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน

การทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความคงรอดของสปอร์เชื้อ *Bacillus anthracis* ในวัคซีนแอนแทรกซ์ โดยการนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลาต่างๆ และในช่วงระยะเวลาใดหลังจากบรรจุจะยังคงมีจำนวนสปอร์ตามมาตรฐานของวัคซีนชนิดนี้ ที่กำหนดให้มีปริมาณสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ไม่น้อยกว่า 10^7 CFU/ml (British Vet Codex, 1965; OIE, 2004) โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มวันหมดอายุของวัคซีนและใช้ประมาณค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของวัคซีนแอนแทรกซ์ให้เหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนแอนแทรกซ์

ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นวัคซีนสปอร์ชนิดเชื้อเป็นเตรียมจากเชื้อ *Bacillus anthracis* สเตรน 34F2 (Sterne strain) seed ได้มาจาก International Laboratory for Biological Standards, CVL Weybridge-United Kingdom อยู่ในรูป freeze dried เตรียมวัคซีนเข้มข้นโดยนำ seed มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง tryptose agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เพื่อทำเป็น seed culture จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว tryptose broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วเพิ่มจำนวนเชื้อโดยการนำเชื้อไปเพาะต่อบนอาหาร tryptose agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาบ่มในห้องมืดที่อุณหภูมิห้องอีก 4 วัน ตรวจสอบการเกิดสปอร์โดยย้อมสี endospore ด้วยวิธีของ Schaeffer-Fulton (สุราษฎร์ และคณะ, 2538) ต้องมีการสร้างสปอร์ไม่น้อยกว่า 80-90% (British pharmacopoeia, 1993; OIE, 2004) ชะล้างเชื้อออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลาย 0.85% NaCl แล้วผสม glycerol จำนวน 2 เท่าของปริมาตรเชื้อ เก็บวัคซีนเข้มข้นที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°ซ. เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จึงนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 40% glycerol ใน 0.85% NaCl โดยปรับให้มีจำนวนสปอร์แอนแทรกซ์ไม่น้อยกว่า 10^7 CFU/ml บรรจุในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อขวดละ 20 มล.

การหาปริมาณสปอร์ที่มีชีวิต (Viable spore count)

สุ่มตัวอย่างวัคซีนแอนแทรกซ์ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จำนวน 8 ชุดการผลิต ชุดละ 22 ขวด ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง หาจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตด้วยวิธี pour plate (Misra, 1991) ดังนี้ นำวัคซีนแอนแทรกซ์ชุดละ 2 ขวด ผสมให้เข้ากัน ทำเจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (ten fold serial dilution) ดูดเชื้อที่ความเจือจาง ที่เหมาะสมความเจือจางละ 1 มล. ใส่จานเพาะเชื้อแล้วเททับด้วย tryptose agar ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45-50°ซ. หมุนจานให้ส่วนผสมเข้ากันดีและกระจายทั่วถึง ทิ้งให้แข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจผลหลังจากบ่มเชื้อครบ 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีโดยเลือกชุดจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีเจริญอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี โดยมีลักษณะโคโลนีสีขาว ทึบแสง ขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 3-5 มม. ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบลักษณะเงามัน เหนียวหนืด นำไปอบต่ออีก 24 ชั่วโมง จึงนำมานับจำนวนโคโลนีที่มีเพิ่มขึ้นทำซ้ำเช่นนี้จนครบ 72 ชั่วโมง คำนวณจำนวนโคโลนี โดยรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมล. (CFU/ml) หาปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตทุกๆ 2 เดือน จนจำนวนสปอร์ที่นับได้น้อยกว่า 10^7 CFU/ml

ผล

เมื่อนับจำนวนสปอร์แอนแทรกซ์ที่มีชีวิตทุกๆ 2 เดือน พบว่าปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตของวัคซีนทั้ง 8 ชุดการผลิตจะลดลงตามระยะเวลาหลังบรรจุที่เพิ่มขึ้น โดยวัคซีนมีจำนวนสปอร์มากกว่า 10^7 CFU/ml หลังบรรจุไม่เกิน 18 เดือน (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

จากผลการทดลอง สปอร์ที่มีชีวิตของวัคซีนแอนแทรกซ์ เริ่มลดต่ำกว่า 10^7 CFU/ml ในเดือนที่ 20 ซึ่งไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลนี้ไปเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มวันหมดอายุของวัคซีนแอนแทรกซ์ให้มากขึ้น นอกจากนี้สามารถนำค่าปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตไปคำนวณหาความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นในวัคซีนแอนแทรกซ์ชนิดเข้มข้น เพื่อเจือจางเป็นวัคซีนแอนแทรกซ์สำเร็จรูปให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม การศึกษาความคงสภาพของวัคซีนแอนแทรกซ์เพื่อเพิ่มวันหมดอายุให้ได้มากกว่า 18 เดือนนั้น อาจทำได้โดยการทดลองปรับค่าปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตในวัคซีนแอนแทรกซ์ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นมากขึ้นกว่าเดิม อย่างไรก็ตามความคงสภาพของวัคซีนแอนแทรกซ์จะยังคงดำรงซึ่งคุณภาพและประสิทธิภาพในการป้องกันโรคภายในเวลาที่กำหนดวันหมดอายุหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการขนส่ง การเก็บรักษา โดยไม่ควรให้วัคซีนถูกความร้อนและแสงแดด ต้องเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ. ห้ามแช่แข็ง เนื่องจากวัคซีนที่ถูกแช่แข็งเมื่อละลายแล้วจะมีจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตลดลง (Turnbull, 2003) รวมทั้งต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนในสัตว์ด้วย

ตารางที่ 1 ปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตของวัคซีนแอนแทรกซ์หลังบรรจุทุกๆ 2 เดือน

ระยะเวลาหลังบรรจุ (เดือน)	ปริมาณสปอร์ที่มีชีวิต (CFU/ml)								
	ชุดการผลิต								
	1	2	3	4	5	6	7	8	ค่าเฉลี่ย
0	$6.0X10^7$	$5.8X10^7$	$4.5X10^7$	$6.3X10^7$	$4.8X10^7$	$5.4X10^7$	$5.7X10^7$	$4.9X10^7$	$5.4X10^7$
2	$5.6X10^7$	$5.5X10^7$	$4.1X10^7$	$5.9X10^7$	$4.6X10^7$	$5.1X10^7$	$5.5X10^7$	$4.7X10^7$	$5.1X10^7$
4	$4.9X10^7$	$5.1X10^7$	$3.9X10^7$	$5.4X10^7$	$4.3X10^7$	$4.7X10^7$	$5.1X10^7$	$4.2X10^7$	$4.7X10^7$
6	$4.6X10^7$	$4.8X10^7$	$3.7X10^7$	$5.1X10^7$	$3.9X10^7$	$4.5X10^7$	$4.7X10^7$	$3.8X10^7$	$4.4X10^7$
8	$4.0X10^7$	$3.9X10^7$	$3.3X10^7$	$4.8X10^7$	$3.5X10^7$	$4.0X10^7$	$4.4X10^7$	$3.4X10^7$	$3.9X10^7$
10	$3.8X10^7$	$3.5X10^7$	$3.1X10^7$	$4.4X10^7$	$3.0X10^7$	$3.8X10^7$	$3.5X10^7$	$3.1X10^7$	$3.5X10^7$
12	$3.6X10^7$	$3.2X10^7$	$2.8X10^7$	$3.8X10^7$	$2.9X10^7$	$3.4X10^7$	$3.0X10^7$	$2.8X10^7$	$3.2X10^7$
14	$3.2X10^7$	$2.8X10^7$	$2.5X10^7$	$3.3X10^7$	$2.6X10^7$	$3.0X10^7$	$2.7X10^7$	$2.4X10^7$	$2.8X10^7$
16	$2.9X10^7$	$2.6X10^7$	$2.2X10^7$	$2.8X10^7$	$2.0X10^7$	$2.5X10^7$	$2.5X10^7$	$2.1X10^7$	$2.5X10^7$
18	$2.4X10^7$	$1.8X10^7$	$1.2X10^7$	$2.6X10^7$	$1.5X10^7$	$1.3X10^7$	$1.4X10^7$	$1.1X10^7$	$1.7X10^7$
20	$8.1X10^6$	$7.7X10^6$	$4.0X10^6$	$8.7X10^6$	$5.5X10^6$	$6.4X10^6$	$7.2X10^6$	$4.5X10^6$	$6.5X10^6$

สรุป

วัคซีนแอนแทรกซ์ที่มีอายุหลังบรรจุ 18 เดือนยังคงมีปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 10^7 CFU/ml และมีจำนวนลดลงน้อยกว่า 10^7 CFU/ml เมื่อมีอายุหลังบรรจุ 20 เดือน

เอกสารอ้างอิง

สุราษฎร์ กุฏอินทร์ อมรา จันทนโอ และสุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. การย้อมสีแบคทีเรีย. วิทยาแบคทีเรียดีเทอร์มิเนตีฟ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 79.

British veterinary codex. 1965. Antisera Vaccine and Related Product, 2nd ed. The Pharmaceutical Press. London. p. 441-443.

British pharmacopoeia (Veterinary). 1993. Veterinary Vaccines. HMSO. London. p. 106-107.

Misra, R.P. 1991. Production of vaccine and quality control tests. In: Manual for the production of anthrax spore vaccine. FAO, UN. Rome. [Online.] http://www.fao.org/DOCREP/004/T0278E/T0278E00.html

OIE. 2004. Anthrax. In: Manual of standards for diagnostic tests vaccine for terrestrial animals. OIE, World organisation for animal health. [Online.] http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00040.htm

Turnbull, P. C. B. 2003. Veterinary vaccines. In: Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals, 3rd ed. WHO. Geneva, Switzerland. p. 75.

Viability Test of Anthrax Spore Vaccine

Jitnapha Teerathaworawan[1] Wanchai Teerathaworawan[1]

Abstract

Viability of *Bacillus anthracis* spore in anthrax vaccine after keeping at 4°C was studied. The vaccines were tested for viable spore counts by pour plate method every 2 months until they contained less living spores than 10^7 CFU/ml. The result showed that the vaccines could be kept up to 18 months before the spore counts were less than 10^7 CFU/ml which is the standard minimum spore count in the vaccine. This study indicated the possibility to prolong presently designated expiry date of the anthrax spore vaccine.

Key words: Anthrax spore vaccine, Viable spore count

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

การวิเคราะห์ผลการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

จิตรนภา ตีรถะวรวรรณ[1] อารีรัตน์ พิศาลสุขสกุล[1]

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ผลการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะระหว่างปี พ.ศ. 2546-2548 โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1-3 สุ่มตัวอย่างจากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไข่ไก่ฟักอายุ 1 วัน ผ่านการจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ กลุ่มที่ 2 ไข่ไก่ฟักอายุ 7-11 วัน กลุ่มที่ 3 ไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตาย กลุ่มที่ 4-6 สุ่มตัวอย่างไข่ไก่ฟักอายุ 7-11 วัน จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ได้แก่ กลุ่มที่ 4 ไข่ไก่ฟักก่อนรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ กลุ่มที่ 5 ไข่ไก่ฟักหลังรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ และ กลุ่มที่ 6 ไข่ที่ตัวอ่อนตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังฉีด seed ไวรัสโดยใช้วิธีเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ฟักคิดเป็นร้อยละ 0.12, 0.47, 3.64, 1.07, 0.74 และ 2.51 ตามลำดับ จำนวนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะที่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน 112 ตัวอย่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม 44 ตัวอย่าง และแกรมลบ รูปร่างท่อน 68 ตัวอย่าง จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ด้วยชุดทดสอบ API® 20 E และชุดทดสอบ API® 20 NE แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* (41.176%) และ *Alcaligenes xylosoxidans* (30.882%)

คำสำคัญ : การปนเปื้อน แบคทีเรีย ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

กระบวนการผลิตวัคซีนสัตว์ปีก เช่น วัคซีนนิวคาสเซิล วัคซีนหลอดลมอักเสบในไก่ วัคซีนฝีดาษไก่ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ วัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการผลิตคือไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific pathogen free hatching eggs, SPF) ที่ได้มาจากฝูงไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก และการเลี้ยงดูภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่ปราศจากโรค 18 ชนิด ทั้งโรคที่สามารถติดต่อผ่านจากแม่พันธุ์สู่ลูก หรือเชื้อโรคที่ติดต่อมาจากภายนอก เช่น น้ำ อาหาร อากาศ การสัมผัส เป็นต้น เทคโนโลยีการผลิตฝูงไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะจะมีโปรแกรมการตรวจเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานวัคซีนที่ระบุว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตวัคซีนต้องปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (OIE, 2004) วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อรวบรวมผลการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสูญเสียของไข่ไก่ฟักระหว่างเดือนกันยายน 2546 – เมษายน 2548 และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

อุปกรณ์และวิธีการ

ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

เก็บตัวอย่างไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะระหว่างเดือนกันยายน 2546 – เมษายน 2548 โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1-3 สุ่มตัวอย่างจากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไข่ไก่ฟักอายุ 1 วัน ผ่านการจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ กลุ่มที่ 2 ไข่ไก่ฟักอายุ 7-11 วัน กลุ่มที่ 3 ไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตาย กลุ่มที่ 4-6 สุ่มตัวอย่างไข่ไก่ฟักอายุ 7-11 วัน จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ได้แก่ กลุ่มที่ 4 ไข่ไก่ฟักก่อนรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ กลุ่มที่ 5 ไข่ไก่ฟักหลังรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ และกลุ่มที่ 6 ไข่ที่ตัวอ่อนตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังฉีด seed ไวรัส ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ โดยเจาะเปลือกไข่แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มลงในไข่แดง นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar, Brilliant green phenol red lactose sucrose agar (BPLS) และ Gassner agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมสีแกรม นำแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

ชุดทดสอบสำเร็จ API®20 E [1]

เป็นชุดทดสอบสำหรับจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม Enterobacteriaceae โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและอ่านผลทดสอบที่ 24 ชั่วโมง เพื่อระบุชนิดเชื้อด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ API®20 E version 4.0 ตามวิธีการของผู้ผลิตชุดทดสอบ

---

[1] BioMérieux, Marcy-ÍEtoile, France

ชุดทดสอบสำเร็จ API®20 NE [2]

จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Non-Enterobacteriaceae โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และอ่านผลการทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อระบุชนิดเชื้อด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ API®20 NE version 6.0 ตามวิธีการของผู้ผลิตชุดทดสอบ

ผล

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ จำนวน 6 กลุ่ม (ตารางที่ 1) และเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะที่ปนเปื้อน รวมทั้งสิ้น 112 ตัวอย่าง ทำการทดสอบเบื้องต้นให้ผลการติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) จำนวน 44 ตัวอย่าง ติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อน (bacilli) จำนวน 68 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API® 20 E และชุดทดสอบ API® 20 NE เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Stenotrophomonas maltophilia* (41.176%) และ *Alcaligenes xylosoxidans* (30.882%) (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

ไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 1 มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุดเนื่องจากเป็นการเก็บตัวอย่างทันทีหลังจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ ถ้ามีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่ผิวไข่ เชื้อก็ยังไม่สามารถผ่านเข้าไปภายในไข่ได้ กลุ่มที่ 2 เป็นไข่ไก่ที่ถูกนำมาฟักต่อนาน 7-11 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีน เชื้อแบคทีเรียที่ผิวไข่สามารถผ่านเข้าไปภายในไข่ได้ ทำให้มีไข่บางส่วนตัวอ่อนตายเกิดการเน่าเสียโดยที่ยังไม่ถูกคัดทิ้งเมื่อมีการสัมผัสไข่โดยไม่ระวังจึงเกิดการปนเปื้อนไปยังไข่ฟองอื่น หรือวัสดุรองรับไข่สกปรกไม่ปลอดเชื้อทำให้มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น (Anonymous, 2002) ไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 4 คือไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 2 ซึ่งคัดฟองที่ตัวอ่อนตายออกไป และถูกส่งมายังโรงงานผลิตวัคซีน มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้สูงจากการเคลื่อนย้าย หรือคัดไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตายออกไปไม่หมดจึงพบว่ามีอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น จากนั้นไข่ไก่ฟักจะถูกรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 5 ซึ่งพบว่ามีอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียลดลง ส่วนไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 3 และ 6 เป็นไข่ไก่ฟักที่ถูกคัดทิ้งเพราะตัวอ่อนตาย จึงมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียสูง ชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบปนเปื้อนในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะมากที่สุดคือ *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Alcaligenes xylosoxidans* ตามลำดับ จัดอยู่ในกลุ่ม Non-Enterobacteriaceae พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ (Denton and Kevin, 1998) แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดอาจปนเปื้อนในน้ำที่ใช้เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับจุ่มไข่ การเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นไม่เหมาะสมทำให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อต่ำ การปนเปื้อนเชื้อ

---

[2] BioMérieux, Marcy-ÍEtoile, France

แบคทีเรียอาจเกิดการติดต่อจากไข่ฟองหนึ่งไปสู่ไข่อีกฟองหนึ่งได้ ถ้าไข่ที่นำมาจุ่มในน้ำยาฆ่าเชื้อมีจำนวนมากเกินไปโดยไม่ได้เปลี่ยนน้ำยาฆ่าเชื้อให้บ่อยขึ้น นอกจากนี้ การขนส่งหรือเคลื่อนย้าย ทำให้ไข่บางส่วนเกิดการแตกร้าว บุคลากรที่สัมผัสไข่ โดยขาดความระมัดระวังด้านความสะอาด น้ำดื่มสำหรับฝูงไก่ วัสดุรองรับไข่ กรงไก่ และอาคารสถานที่ที่ไม่ปราศจากเชื้อ เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อในไข่ได้ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบคุณภาพแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้อย่างเคร่งครัดเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

สรุป

ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ ที่ตัวอ่อนมีชีวิตอยู่ อายุ 1 วัน และผ่านการจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อแล้ว (กลุ่มที่ 1) มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะอายุ 7-11 วัน (กลุ่มที่ 4) ส่วนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ ที่ตัวอ่อนไม่มีชีวิต (กลุ่มที่ 3 และ 6) มีโอกาสพบเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนสูงกว่ากลุ่มอื่น การรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียลงอย่างเห็นได้ชัดในไข่ไก่ฟักกลุ่มที่ 5 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบมากที่สุดคือ เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* (41.176%) และเชื้อ *Alcaligenes xylosoxidans* (30.882%)

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 2002. Bacterial contamination of hen's egg. [Online.] http://www.sac.ac.uk./animal/External/ABDWeb/Avian/TechNotes/note1.html

Denton, M. and Kevin, G. K. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 57-80.

OIE, 2004. Test for sterility and freedom from contamination of biological materials. In: Manual of standards for diagnostic tests vaccine for terrestrial animals. OIE, World Organization for Animal Health. [Online.] http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00015.htm

ตารางที่ 1 ผลการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

กลุ่มที่	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (ฟอง)	จำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อน (ฟอง)	ร้อยละ
1	6,015	7	0.12
2	860	4	0.47
3	770	28	3.64
4	1,590	17	1.07
5	1,488	11	0.74
6	1,794	45	2.51

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ และระดับความเชื่อมั่นในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API® 20 E และ API® 20 NE

ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ	ผลของปฏิกิริยาชีวเคมี	ความเชื่อมั่นในการระบุชนิดเชื้อ (%)
Stenotrophomonas maltophilia	28	41.176	0 452 341[2]	99.9
Alcaligenes xylosoxidans	21	30.882	1 040 477[2]	94.5
Chryseomonas luteola	4	5.882	5 477 751[2]	80.1
Pseudomonas stutzeri	3	4.411	1 044 655[2]	99.9
Acinetobacter baumannii/ calcoaceticus	2	2.941	0 005 042[2]	99.0
Enterobacter cloacae	2	2.941	2 704 563[1]	99.4
Aeromonas hydrophila gr.I	1	1.470	7 206 177[2]	96.6
Bordetella avium	1	1.470	0 000 067[2]	96.6
Chromobacteriun violaceum	1	1.470	5 152 554[2]	99.9
Chryseobacterium indologenes	1	1.470	0 052 004[2]	99.5
Pasteurella pneumotropica	1	1.470	7 020 404[2]	96.2
Proteus mirabilis	1	1.470	0 536 000[1]	99.9
Shigella spp.	1	1.470	0 004 000[1]	81.6
Weeksella virosa/ Empedobacter brevis	1	1.470	0 010 004[2]	80.3

[1] ชุดทดสอบ API® 20 E [2] ชุดทดสอบ API® 20 NE

Analysis of Bacterial Contamination in Specific Pathogen Free Embryonated Chicken Eggs

Jitnapha Teerathaworawan[1] Areerat Phisansuksakul[1]

Abstract

An analysis of bacterial contamination in specific-pathogen-free (SPF) embryonated chicken eggs during the year of 2003 and 2005 was carried out. The eggs were divided into 6 groups. Group 1 to 3 were collected from SPF chicken farm; group 1, 1-day-old embryonated eggs after dipping in disinfectant; group 2, 7-to-11-day-old embryonated eggs; group 3, fertile dead germs. Group 4 to 6 were collected from poultry vaccine production section; group 4, 7-to-11-day-old embryonated eggs before fumigation with formaldehyde; group 5, 7-to-11-day-old embryonated eggs after fumigation and group 6, fertile dead germs after inoculated with virus for 24 hours. All samples were examined for bacterial contamination by cultivation method. The result showed that the contamination of each group was 0.12, 0.47, 3.64, 1.07, 0.74 and 2.51%, respectively. A total of 112 bacterial strains were isolated, comprising 44 gram positive cocci and 68 gram negative bacilli bacteria. Gram-negative bacilli bacteria were identified by using API® 20 E and API® 20 NE. *Stenotrophomonas maltophilia* (41.176%) and *Alcaligenes xylosoxidans* (30.882%) were the most commonly isolated bacteria.

Key words: Bacterial contamination, Specific pathogen free embryonated chicken eggs

---

[1]Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 3013

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียใน Allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า

อารีรัตน์ พิศาลสุขสกุล[1] จิตรนภา ตีรถะวรวรรณ[1]

บทคัดย่อ

การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ใน allantoic fluid ไข่ไก่ฟักที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ระหว่าง ปี พ.ศ. 2543 – 2547 จำนวน 2,236 ตัวอย่าง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้ คือ 37.62% (161/428), 17.06% (102/598), 27.21% (157/577), 20.90% (70/335) และ 9.73% (29/298) ตามลำดับ สำหรับ allantoic fluid ที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จะเก็บไว้เป็นสต็อกของไวรัสเพื่อใช้ผลิตวัคซีน และผลการตรวจในสต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ก่อนและหลังบรรจุขวด อย่างละ 468 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจได้แม่นยำและเพื่อได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

คำสำคัญ : เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย การปนเปื้อน วัคซีนนิวคาสเซิล

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในการผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เพื่อใช้ป้องกันโรคสำหรับสัตว์ปีก บางครั้งอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้คุณภาพของวัคซีนเสื่อม ไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน และอาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน ปัจจุบันโครงการผลิตวัคซีนป้องกันโรคสัตว์ปีกเพื่อสนับสนุนการส่งออก จำเป็นต้องพัฒนาและควบคุมระบบการผลิตให้ได้รับการรับรองมาตรฐานหลักเกณฑ์การผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices, GMP) ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาทุกขั้นตอนเพื่อให้วัคซีนมีคุณภาพดีและได้มาตรฐาน การผลิตเริ่มจากการฉีด seed virus เข้า allantoic sac ของไข่ไก่ฟัก นำเข้าตู้ฟักไข่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บไวรัสจาก allantoic fluid และนำไปตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จึงเก็บเป็นสต็อกไวรัสไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 ถึง 6°ซ. เพื่อใช้ผลิตวัคซีนต่อไป เมื่อมีการผลิตวัคซีนจะนำสต็อกไวรัสผสมกับ stabilizer และบรรจุลงขวด นำเข้าเครื่อง freeze dry เพื่อผลิตเป็นวัคซีน (OIE, 2000) เก็บตัวอย่างวัคซีนก่อนและหลังการบรรจุลงขวด เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ตามวิธีการของ Baker (1976) และ USDA (1992) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบเชื้อราได้แก่ Sabouraud dextrose broth และ Tryptic soy broth อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้แก่ Thioglycollate broth และ Tryptic soy broth (British Pharmacopoeia, 1985)

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อรวบรวมผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า โดยนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนา และปรับปรุงการผลิตวัคซีน เพื่อให้ได้วัคซีนที่ดี มีคุณภาพ ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2547

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

1. allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรนลาโซต้า สำหรับนำไปผลิตวัคซีน ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2547 จำนวน 2,236 ตัวอย่าง

2. สต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ก่อนและหลังบรรจุขวด เพื่อผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2547 อย่างละ 468 ตัวอย่าง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อรา คือ Sabouraud dextrose broth[1] และ Tryptic soy broth[2] หลอดละ 10 มล. ชนิดละ 2 หลอด ต่อ allantoic fluid 1 ตัวอย่าง และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียคือ Thioglycollate broth[3] และ Tryptic soy broth หลอดละ 10 มล. ชนิดละ 2 หลอด ต่อ

[1] Difco Laboratories, U.S.A. [2] Difco Laboratories, U.S.A. [3] Difco Laboratories, U.S.A.

allantoic fluid 1 ตัวอย่าง นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที (มยุรี และคณะ, 2530; สุวณี และมาลัย, 2540)

การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราในตัวอย่าง

การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราทำตามวิธีของ Baker (1967) และ USDA (1992) โดยดูดตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextose broth และ Tryptic soy broth ชนิดละ 2 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 22°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ทุกวันจนครบ 3 วัน และบันทึกผล

- การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบ

Negative control: เพื่อตรวจสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อราของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 22 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อรา

Positive control: เพื่อตรวจสอบความสามารถให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ โดยเพาะเชื้อรามาตรฐานคือ *Candida albican* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 22 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องสามารถให้เชื้อรามาตรฐานเจริญเติบโตได้

การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง

การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียทำตามวิธีของ Baker (1967) และ USDA (1992) โดยดูดตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycollate broth และ Tryptic soy broth ชนิดละ 2 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ทุกวันจนครบ 2 วัน และบันทึกผล

- การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบ

Negative control: เพื่อตรวจสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

Positive control: เพื่อตรวจสอบความสามารถให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานคือ *Escherichia coli*, *Clostridium sporogens* และ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 2 หลอดต่อเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องสามารถให้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานเจริญเติบโตได้

ผล

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในตัวอย่าง allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2547 จำนวน 2,236 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2547

ปี (พ.ศ.)	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ			การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใน Allantoic fluid	จำนวนตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบ
		รา	แบคทีเรีย	ราและแบคทีเรีย		
2543	428	13/428 (3.04%)	145/428 (33.88%)	3/428 (0.70%)	37.62%	267/428 (62.38%)
2544	598	2/598 (0.33%)	99/598 (16.56%)	1/598 (0.17%)	17.06%	496/598 (82.94%)
2545	577	21/577 (3.64%)	130/577 (22.53%)	6/577 (1.04%)	27.21%	420/577 (72.79%)
2546	335	3/335 (0.90%)	67/335 (20.00%)	0/335 (0.00%)	20.90%	265/335 (79.10%)
2547	298	0/298 (0.00%)	29/298 (9.73%)	0/298 (0.00%)	9.73%	269/298 (90.27%)

สำหรับ allantoic fluid ทุกตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จะเก็บเป็นสต็อกไวรัส เมื่อมีการผลิตวัคซีนจะนำสต็อกไวรัสมาผสมกับ stabilizer และทำการบรรจุลงขวดเพื่อผลิตวัคซีน ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อรา แบคทีเรีย และทั้งเชื้อราและแบคทีเรียในสต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ก่อนและหลังการบรรจุขวด อย่างละ 468 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและแบคทีเรียในตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในสต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ก่อนและหลังการบรรจุขวด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2547

ปี (พ.ศ.)	สต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ			จำนวนตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบ
			รา	แบคทีเรีย	ราและแบคทีเรีย	
2543	ก่อนการบรรจุขวด	94	0	0	0	94
	หลังการบรรจุขวด	94	0	0	0	94
2544	ก่อนการบรรจุขวด	122	0	0	0	122
	หลังการบรรจุขวด	122	0	0	0	122
2545	ก่อนการบรรจุขวด	100	0	0	0	100
	หลังการบรรจุขวด	100	0	0	0	100
2546	ก่อนการบรรจุขวด	96	0	0	0	96
	หลังการบรรจุขวด	96	0	0	0	96
2547	ก่อนการบรรจุขวด	56	0	0	0	56
	หลังการบรรจุขวด	56	0	0	0	56

วิจารณ์และสรุป

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียใน allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ระหว่างปี พ.ศ 2543 - 2547 จำนวน 2,236 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อราสูงสุดในปี พ.ศ. 2545 คือ 3.64% และต่ำสุดในปี พ.ศ. 2547 คือ 0.00% พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียสูงสุดในปี พ.ศ. 2543 คือ 33.88% และต่ำสุดในปี พ.ศ. 2547 คือ 9.73% พบการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสูงสุดในปี พ.ศ. 2545 คือ 1.04% และต่ำสุดในปี พ.ศ.2546 และ 2547 คือ 0.00% (ตารางที่ 1) จากข้อมูลพบว่าในปี พ.ศ. 2543 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใน allantoic fluid สูงสุดคือ 37.62% และต่ำสุดในปี พ.ศ. 2547 คือ 9.73%

การผลิตวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า จะใช้ไข่ไก่ฟักที่ได้รับจากฟาร์มเลี้ยงไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific pathogen free, SPF) ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยเริ่มเลี้ยงไก่และผลิตไข่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา ซึ่งไข่ที่ผลิตได้ในแต่ละวันมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการ ทำให้ต้องเก็บรวบรวมไข่ให้เพียงพอก่อนที่จะนำไปใช้สำหรับผลิตวัคซีน ไข่ที่เก็บไว้นานจะมีความต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยลงทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากชั้นโปรตีนที่หุ้มเปลือกไข่ถูกทำลายหรือเปลือกไข่แตก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) และลักษณะการเน่าเสียของไข่จะเกิดจากเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา (บัญญัติ, 2532) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบ นอกจากนี้การเลี้ยงไก่และผลิตไข่อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้สภาพการเลี้ยงไก่มีปัญหาส่งผลกระทบต่อไข่ที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีน ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงสภาพการเลี้ยงไก่เพื่อให้ไข่ที่ผลิตได้มีคุณภาพ เหมาะสมกับการนำมาผลิตวัคซีน พบว่า allantoic fluid ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546-2547 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใน allantoic fluid ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2543 สำหรับฝ่ายผลิตวัคซีนได้นำมาตรฐานการผลิตและการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการมาใช้อย่างเคร่งครัด ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ใน allantoic fluid ลดลงด้วยเช่นกัน

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในสต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ทั้งก่อนและหลังการบรรจุขวด ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ (ตารางที่ 2) เมื่อผลิตวัคซีนสำเร็จรูปจะมีการเก็บตัวอย่างวัคซีนเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย โดยฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่งเป็นการควบคุมคุณภาพภายในกระบวนการผลิต และกลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งเป็นการควบคุมคุณภาพจากหน่วยงานภายนอกกระบวนการผลิต โดยผลการตรวจสอบวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2547 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในทุกชุด ผลการตรวจสอบนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียในสต็อกไวรัสที่ผสมกับ stabilizer ทั้งก่อนและหลังการบรรจุขวด (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นการควบคุมการผลิตวัคซีนให้มีคุณภาพ และปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนให้การปฏิบัติงานนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 590.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. จุลชีววิทยา เล่ม 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 275 – 279.

มยุรี พันธัย ชื่นจิต บุญเฉิด ปราณี สิทธิสาร เพ็ญจิดร เปรมะบุตร จินดา นัยเนตร และวิรุฬห์ ไพฑีกุล. 2530. จุลชีววิทยา : ปฏิบัติการและหลักการเบื้องต้น พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สำนักพิมพ์ภาพพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 44, 80, 150, 152.

สุวณี สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร. 2540. แบคทีเรียพื้นฐาน พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะอนุกรรมการจ่ายงานเพื่อพัฒนาและประสานงานในด้านการสอนและการวิจัยสาขาแบคทีเรีย. โรงพิมพ์ศิริยอด. กรุงเทพฯ. หน้า 30, 186.

Baker, F.J. 1976. Handbook of bacteriological technique, 2nd ed. London Butterwords & Co. (Publishers) Ltd. p. 94 - 98, 103, 209 - 210.

British Pharmacopoeia (Veterinary). 1985. Appendix XVI A, A 123 - A 126, A 260 - A 263.

OIE. 2000. Newcastle disease. In : Manual of standards for diagnostic test and vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 221 - 232.

USDA. 1992. Code of federal regulations, Animals and plants health inspection service, 9 CFR Ch. 1 (1 - 1 - 92 Edition), 113.26 - 113.27.

The Detection of Fungal and Bacterial Contamination in Allantoic Fluid using for Live Newcastle Disease, La Sota Strain, Vaccine Production

Areerat Phisansuksakul[1] Jitnapha Teerathaworawan[1]

Abstract

The number of 2,236 samples from the allantoic fluid using for live Newcastle disease, La Sota strain, vaccine production during 2000 – 2004 were tested annually for fungal and bacterial contamination. The contamination of both microorganisms were 37.62% (161/428), 17.06% (102/598), 27.21% (157/577), 20.90% (70/335) and 9.73% (29/298), respectively. Such allantoic fluid should be proven to be free from contaminating microorganism in a large pool and should be kept at 4°C as virus stock before manufacturing. There were no contamination in 468 samples from the stock Newcastle virus, ever mixed with stabilizer before and after bottling. Consequently, the result can confirm that no microorganism be contaminated in the finished product.

Key words: Fungi, Bacteria, Contamination, Newcastle disease vaccine

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

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสก่อนและหลัง freeze dried ในวัคซีนนิวคาสเซิลชนิดเชื้อเป็น

พรชัย ศรีดามา[1] อัตพงศ์ นาละปักษิณ[1]

บทคัดย่อ

วัคซีนสำเร็จรูปนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้าที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักประกอบด้วยปริมาณไวรัสอย่างน้อย 6 $\log_{10}$ EID_{50} /โด๊ส เนื่องจากในกระบวนการผลิตอาจมีการสูญเสียไวรัสได้จากขั้นตอนการบรรจุและทำแห้งวัคซีน จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรนลาโซต้าในขั้นตอนการผลิต ซึ่งพบว่า ปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนบรรจุ หลังบรรจุลงขวดและวัคซีนสำเร็จรูปนั้นไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001 แสดงว่า กระบวนการผลิตวัคซีนมีการสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนการผลิตน้อยมาก และอาจจะลดปริมาณไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนลงได้อีก

คำสำคัญ: ปริมาณไวรัส วัคซีนนิวคาสเซิล สเตรนลาโซต้า

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในกระบวนการผลิตวัคซีน เริ่มต้นจากการฉีด seed virus เข้า allantoic sac ของไข่ไก่ฟัก แล้วนำเข้าตู้ฟักไข่อุณหภูมิ 37°ซ. จนครบ incubation period ที่ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้มากแล้วจึงเก็บไวรัสโดยการดูด allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักแต่ละฟองใส่ลงขวดขนาด 2 ลิตร ขวดละ 1.5 ลิตร โดยประมาณ เก็บตัวอย่างไปทดสอบในขั้นตอนการผลิต โดยทดสอบการปนเปื้อนเชื้อและหาปริมาณไวรัส เมื่อไม่พบการปนเปื้อนเชื้อและมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 9.50 $\log_{10}$ EID_{50}/มล.แล้ว จึงเก็บเป็นสต็อกไวรัสไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ. เพื่อใช้ผลิตวัคซีนต่อไป ซึ่งไวรัสนิวคาสเซิลสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ได้นาน 8 สัปดาห์ (Young et al., 2002) โดยที่ปริมาณลดลงเล็กน้อย แต่ถ้านำไปแช่แข็งแล้วนำมาละลายทำให้ปริมาณไวรัสลดลง 0.3 ถึง 0.5 $\log_{10}$ EID_{50}/มล. (Young et al., 2002) เมื่อมีการผลิตวัคซีนสำเร็จรูปก็จะนำสต็อกไวรัสผสมกับ stabilizer ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำการบรรจุลงขวดโดยเครื่องบรรจุวัคซีนอัตโนมัติแล้วนำเข้าเครื่อง freeze dried เพื่อผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปต่อไป ในช่วงที่บรรจุไวรัสลงขวดต้องใช้ระยะเวลานาน 3-5 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้มีการควบคุมรักษาอุณหภูมิให้มีความเย็นอยู่ตลอดเวลาที่ 4-6 °ซ. เพื่อรักษาสภาพไวรัสให้มีการสูญเสียน้อยที่สุด หลังจากบรรจุวัคซีนเสร็จแล้ว จะนำเข้าเครื่องทำแห้งวัคซีนซึ่งอาจมีการสูญเสียไวรัสประมาณ 0.25 $\log_{10}$ EID_{50}/มล. (Allan et al., 1978) จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนบรรจุ หลังบรรจุลงขวดและวัคซีนสำเร็จรูป (หลังทำแห้งวัคซีน) ว่ามีการสูญเสียไวรัสในขั้นตอนใดบ้าง เพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขวิธีการผลิตให้สูญเสียไวรัสน้อยที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัส

เก็บตัวอย่างไวรัสนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้าผลิตจากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อที่ผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปปี 2546 จำนวน 40 ชุดๆ ละ 3 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยไวรัสก่อนบรรจุ จำนวน 1 ตัวอย่าง ประมาณ 15 มล. หลังจากบรรจุเสร็จสิ้นแล้วจำนวน 1 ตัวอย่างประมาณ 15 มล. และวัคซีนสำเร็จรูปในชุดนั้นๆ จำนวน 1 ตัวอย่างๆ ละ 5 ขวด ของโครงการผลิตวัคซีนป้องกันโรคสัตว์ปีกเพื่อสนับสนุนการส่งออก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างไวรัสหลังจากที่ผสมกับ stabilizer เรียบร้อยแล้วก่อนบรรจุวัคซีนลงขวดแรกโดยเครื่องบรรจุวัคซีนอัตโนมัติ หลังจากนั้นนำตัวอย่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ. เพื่อรอการส่งไปทดสอบ เมื่อการบรรจุวัคซีนลงขวดสุดท้ายเสร็จสิ้นลงแล้ว เก็บตัวอย่าง ประมาณ 15 มล. อีกครั้งหนึ่งเป็นวัคซีนหลังบรรจุ แล้วส่งตัวอย่างไปทดสอบพร้อมกันกับตัวอย่างวัคซีนก่อนบรรจุและจะทดสอบทันทีหรือโดยเร็วที่สุดไม่เกิน 3 วัน หลังจากได้รับตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างวัคซีนทำแห้งจะถูกเก็บและส่งไปทดสอบในวันต่อมาเนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำแห้งนาน 24-27 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างที่รอการทดสอบทั้งหมดที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ.

การหาปริมาณไวรัส

ตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีนโดยวิธี Virus titration (Allan et al., 1978) และคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Karber (1931) และเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสวัคซีนในขั้นตอนการผลิตโดยวิธี z-test (วิสาข์, 2545) ที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001

ผล

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสในวัคซีนจำนวน 40 ชุด ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส (Geometric mean titers, GMT) ก่อนบรรจุ 7.35 $\pm$ 0.31 $\log_{10}$ EID_{50}/โด๊ส หลังบรรจุ 7.36 $\pm$ 0.38 $\log_{10}$ EID_{50}/โด๊ส วัคซีนสำเร็จรูป 7.25 $\pm$ 0.41 $\log_{10}$ EID_{50}/โด๊ส เมื่อนำมาคำนวณหาค่าทางสถิติโดยวิธี z-test พบว่า ปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนบรรจุ หลังบรรจุลงขวด และวัคซีนสำเร็จรูปนั้นไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001 ดังแสดงตาม table 1

วิจารณ์

จากการทดลองและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ z-test พบว่า ปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนบรรจุลงขวด ก่อนการทำแห้ง และวัคซีนสำเร็จรูปนั้น ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001 แสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียไวรัสน้อย ข้อกำหนดของปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลสเตรนลาโซต้า ตามมาตรฐาน British Pharmacopoeia (1998) คือ 6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/โด๊ส และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสในวัคซีนสำเร็จรูปที่ผลิตได้ซึ่งมีค่า 7.25 $\log_{10}$ EID_{50}/โด๊ส ได้ค่าสูงกว่ามาตรฐานประมาณ 17.8 เท่า (1.25 $\log_{10}$ เท่า) และค่าปริมาณไวรัสในวัคซีนสำเร็จรูปมีค่าต่ำสุดเพียง 2 ชุด จากทั้งหมด 40 ชุด คือชุดที่ 14/46 และ 32/46 ซึ่งมีค่า 6.50 $\log_{10}$ EID_{50} /โด๊ส จากตารางที่ 1 จะสังเกตข้อมูลบางค่าที่ปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนบรรจุลงขวด มีค่าต่ำกว่าปริมาณไวรัสในวัคซีนหลังบรรจุลงขวด อาจจะเนื่องมาจากการไตเตรตไวรัสซึ่งมีการเพิ่มจำนวนแบบ log phase ทำให้มีค่าผิดพลาดเกิดขึ้นได้

สรุป

จากผลการทดลองปริมาณไวรัสก่อนและหลังการบรรจุลงขวดรวมถึงวัคซีนสำเร็จรูปนั้นไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001 แสดงว่ากระบวนการผลิตวัคซีนมีการสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนการผลิตน้อยมาก มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถลดปริมาณไวรัสในการผลิตวัคซีนลงได้ แต่ทั้งนี้ควรจะมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของวัคซีนหลังจากผลิตและการเก็บรักษา (Keeping quality) เพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตและทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีกทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในด้านการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิสาข์ เกษประทุม. 2545. ความน่าจะเป็นและสถิติเบื้องต้น. ธนธัชการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 230-233.

Allan, W. H., Lancaster, J. E. and Toth, B. 1978. Potency and other tests. Newcastle disease vaccine their production and use. FAO, Rome. Italy. p. 50-57.

British Pharmacopoeia. 1998. British pharmacopoeia (veterinary). British Pharmacopoeia Commission. Her Majesty's Stationery Office. London. p.177-178.

Karber, G. 1931. Beitrag zur Kollectiven Bchandlung Pharmakologischa Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharm. 162 :480. Cited by Cruickshank, R.1965 in Medical Microbiology, 11th edition, E&S Livingstone Ltd. London.

Young, M., Alders, R., Grimes, S., Spradbrow, P., Dias, P., da Silva, A. and Lobo, Q. 2002. Controlling Newcastle disease in village chickens: A laboratory manual. ACIAR. Monograph No. 87. p. 51.

Table 1 The result of virus content of Newcastle disease virus, La Sota strain, in quality control of vaccine production

Batch No.	Geometric mean titers of virus content of Newcastle disease virus, La Sota strain ($\log_{10}$ EID_{50}/dose)		
	Before filling	After filling	Freeze dried
1	7.10	7.50	7.10
2	7.10	7.70	6.90
3	7.30	7.10	7.30
4	7.30	7.30	6.70
5	7.50	8.30	7.90
6	7.50	7.50	7.50
7	7.50	7.50	7.90
8	7.50	7.70	7.30
9	7.30	7.50	7.10
10	7.10	7.30	7.30
11	7.50	7.70	6.90
12	7.30	7.50	6.90
13	6.90	6.70	7.10
14	7.10	7.50	6.50
15	7.50	7.50	7.10
16	7.50	6.90	7.30
17	7.30	7.10	7.10
18	7.10	7.70	7.30
19	7.10	7.10	7.70
20	7.10	7.30	7.10
21	6.90	6.50	8.10
22	7.10	7.10	7.30
23	7.10	7.10	6.70
24	8.10	8.30	7.30
25	7.70	7.50	7.50
26	7.30	7.50	8.30
27	7.30	7.30	7.70
28	8.10	7.30	7.10
29	8.30	7.30	7.50
30	7.30	7.30	6.70
31	7.70	7.30	6.70
32	7.30	7.30	6.50
33	6.90	7.30	7.10
34	7.10	6.70	7.50
35	7.30	6.50	7.70
36	7.30	7.50	7.30
37	7.30	7.90	7.30
38	7.30	7.10	7.30
39	7.70	7.50	7.30
40	7.30	7.50	7.10
GMT ± SD	7.35 ± 0.31 [a]	7.36 ± 0.38 [b]	7.25 ± 0.41 [c]

[a, b and c] No significant difference ($P<0.001$)

GMT = Geometric mean titers

Comparison of Virus Content in Live Newcastle Disease Vaccine before and after Freeze Drying

Pornchai Sridama [1] Attapong Nakapaksin [1]

Abstract

Live Newcastle disease vaccine, La Sota strain, produced from chicken eggs should have virus content not less than 6 $\log_{10}$ EID_{50}/dose. In the vaccine production, the process of filling and freeze drying may result in a loss of virus titer. A comparison of virus content during the vaccine production process was performed. The result showed that the average titers of viral fluid before or after filling in vials and finish products were not significantly different ($p<100$). This study suggests that the vaccine production process causes little loss of virus titer.

Key words: Virus content, Newcastle disease vaccine, La Sota strain

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

การศึกษาระยะเวลาการเก็บวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้าโดยการหาปริมาณไวรัส

อัตพงศ์ นาคะปักษิณ [1] พรชัย ศรีดามา[1]

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า ในวันที่ผลิตเสร็จ และแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตัวอย่างเท่าๆ กัน โดยกลุ่มที่ 1 มีปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล 6.9 $\log_{10}$ EID_{50}/dose และกลุ่มที่ 2 มีปริมาณไวรัส 7.3 $\log_{10}$ EID_{50}/dose เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 4-6°ซ. เป็นระยะเวลานาน 26 เดือน แล้วจึงตรวจหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิล ผลการทดลองปรากฏว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มลดลง 0.82 $\pm$ 0.15 และ 1.28 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัส ในวันที่ผลิตเสร็จ โดยกลุ่มที่ 1 มีปริมาณไวรัส 6.02 $\pm$ 0.15 และ $\log_{10}$ EID_{50}/dose และกลุ่มที่ 2 มีปริมาณไวรัส 6.02 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose ซึ่งไม่มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ ($P<0.001$) ระหว่างปริมาณไวรัสจากผลการทดลองและค่ามาตรฐานที่ต้องการของวัคซีน (6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/dose) จึงสรุปได้ว่า วัคซีนนิวคาสเซิลที่มีปริมาณไวรัสในวันที่ผลิตเสร็จ ทั้ง 6.9 และ 7.3 $\log_{10}$ EID_{50}/dose นั้น สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ. เป็นระยะเวลานาน 26 เดือน โดยยังมีปริมาณไวรัสตามมาตรฐานที่ต้องการ

คำสำคัญ: ปริมาณไวรัส วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า วันผลิต ความคุ้มโรค

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ปัจจุบันวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้าชนิดทำแห้งที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จะกำหนดวันหมดอายุประมาณ 1 ปี 2 เดือน หลังจากวันผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งควรมีปริมาณไวรัสสูงกว่า 6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/dose เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 เดือน (Alder et al., 2002) ดังนั้นถ้าสามารถเลื่อนวันหมดอายุของวัคซีนได้นานขึ้น จะทำให้สามารถผลิตวัคซีนเก็บสำรองไว้ได้ เพื่อรองรับกรณีที่เกิดเหตุการณ์ของเครื่องจักรในโรงงานผลิตชำรุดและรอการแก้ไขอยู่ หรือสำรองไว้ในกรณีเกิดโรคระบาดซึ่งมีความต้องการใช้วัคซีนเพิ่มมากขึ้น จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสของวัคซีนสำเร็จรูปหลังจากวันผลิต 26 เดือน เมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 4-6 °ซ. สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดวันหมดอายุของวัคซีนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

วัคซีนสำเร็จรูปนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้าชนิดทำแห้ง ผลิตจากไข่ไก่ฟัก ขนาดบรรจุขวดละ 100 โด๊ส ที่ผลิตในปี 2543-2544 ของโครงการผลิตวัคซีนป้องกันโรคสัตว์ปีกเพื่อสนับสนุนการส่งออก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา จำนวน 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างวัคซีนซึ่งมีปริมาณไวรัส ในวันผลิต 6.90 $\log_{10}$ EID_{50}/dose สำหรับทดสอบปริมาณไวรัส หลังจากวันผลิต 26 เดือน

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างวัคซีนซึ่งมีปริมาณไวรัส ในวันผลิต 7.30 $\log_{10}$ EID_{50}/dose สำหรับทดสอบปริมาณไวรัส หลังจากวันผลิต 26 เดือน

การหาปริมาณไวรัสในตัวอย่าง

เมื่อเก็บรักษาวัคซีนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-6 °ซ. ครบตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ทดสอบหาปริมาณไวรัสโดยละลายตัวอย่างวัคซีนจำนวน 3 ขวด/ชุด ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 1 มล./ขวด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง ใช้ไปเปตดูดน้ำวัคซีนแต่ละขวดมารวมกันในหลอดทดลอง จะได้ความเข้มข้นของวัคซีน 100 โด๊ส/มล. หลังจากนั้นทดสอบหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีนโดยวิธี Virus titration (Allan et al., 1978) ในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ พันธุ์ LSL ของบริษัท Lohmann ประเทศเยอรมนี คำนวณหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Karber (1931) เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสในวัคซีนหลังจากวันผลิต 26 เดือน กับปริมาณไวรัสตามมาตรฐานการทดสอบของ British Pharmacopoeia (1998) คือ 6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/dose โดยวิธี t-test (วิสาข์, 2545)

ผล

เมื่อทดสอบหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีนพบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 1 เมื่อเก็บรักษาครบ 26 เดือน หลังจากวันผลิต พบว่าปริมาณไวรัสลดลง 0.88 $\pm$ 0.36 $\log_{10}$ EID_{50}/dose คงเหลือ 6.02 $\pm$ 0.36 $\log_{10}$ EID_{50}/dose ส่วนวัคซีนกลุ่มที่ 2 เมื่อเก็บรักษาจนครบ 26 เดือน หลังจากวันผลิตพบว่า ปริมาณไวรัสลดลง 1.28 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose คงเหลือ 6.02 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose ส่วน table 1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสหลังจากวันผลิต เมื่อนำค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสในวัคซีนเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานซึ่งมีค่า 6.00 $\log_{10}EID_{50}$/dose โดยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ t-test พบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 1 และ 2 เมื่อเก็บรักษาหลังจากวันผลิตได้ 26 เดือน พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสไม่แตกต่างจากค่ามาตรฐานที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001

Table 1 The virus content in freeze dried Newcastle disease vaccine stored at 4-6 ^{O}C for 26 months after manufacturing date

Group of vaccine	Geometric mean virus content ($\times$ $\log_{10}$ EID_{50}/dose) 26 months after manufacturing date
1	6.02 $\pm$ 0.36 (n=5)
2	6.02 $\pm$ 0.23 (n=5)

วิจารณ์

จากการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ t-test (Table 1) พบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 1 และ 2 เมื่อเก็บรักษาหลังจากวันผลิตได้ 26 เดือน พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสไม่แตกต่างจากค่ามาตรฐานที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.001 ซึ่งสอดคล้องกันกับวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นชนิดทำแห้งควรมีปริมาณไวรัสสูงกว่า 6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/dose เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 เดือน (Alder et al., 2002) ดังนั้นวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นชนิดทำแห้งที่ผลิตขึ้นโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่งกำหนดวันหมดอายุ 14 เดือน หลังจากวันผลิต สามารถเลื่อนวันหมดอายุเป็น 26 เดือน หลังจากวันผลิต แต่ทั้งนี้วัคซีนที่ผลิตขึ้นจะต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 6.90 $\log_{10}$ EID_{50}/dose และจะต้องเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 4-6 °ซ. ตลอดเวลา

สรุป

วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นชนิดทำแห้งซึ่งมีปริมาณไวรัสในวัคซีนในวันผลิต 6.90 และ 7.30 $\log_{10}$ EID_{50}/dose สามารถกำหนดวันหมดอายุเป็น 26 เดือน หลังจากวันผลิต ซึ่งยังคงให้ปริมาณไวรัสคือ 6.00 $\log_{10}$ EID_{50}/dose ตามมาตรฐานของ British Pharmacopoeia (1998) จนถึงวันหมดอายุ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตและทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีกทุกท่านที่ช่วยเหลือในด้านการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิสาข์ เกษประทุม. 2545. ความน่าจะเป็นและสถิติเบื้องต้น. ธนธัชการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 229.

Alders, R., dos Anjos, F., Bagnol, B., Fumo, A., Mata, B. and Young, M. 2002. Controlling Newcastle disease in village chickens: a training manual. ACIAR. Monograph No. 86.

Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B. 1978. Potency and other tests. Newcastle disease vaccines their production and use. FAO. Rome. Italy. p. 50-57.

British Pharmacopoeia. 1998. British pharmacopoeia (veterinary). British Pharmacopoeia Commission. Her Majesty's Stationery Office. London. p. 177-178.

Karber, G. 1931. Beitrag zur Kollectiven Bchandlung Pharmakologischa Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharm. 162: 480. Cited by Cruickshank, R.1965 in Medical Microbiology, 11th edition, E&S Livingstone Ltd. London.

The Study on a Keeping Quality of Live Newcastle Disease Vaccine, La Sota Strain, by Virus Content test

Attapong Nakapaksin[1] Pornchai Sridama[1]

Abstract

Live Newcastle Disease (ND) vaccine, La Sota strain, were sampling on the manufacturing date and divided into two equal groups. The first group contained ND virus of 6.9 $\log_{10}$ EID_{50}/dose and the second group contained 7.3 $\log_{10}$ EID_{50}/dose. All vaccine samples were kept for 26 months at 4-6 ^{O}C then tested for ND virus content. The results showed that geometric mean virus titers of both groups were 0.82 $\pm$ 0.15 and 1.28 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose decrease respectively when compared with those on the manufacturing date. The titers were 6.02 $\pm$ 0.15 $\log_{10}$ EID_{50}/dose in group 1 and 6.02 $\pm$ 0.23 $\log_{10}$ EID_{50}/dose in group 2. There was no significant difference ($P<0.001$) in the virus titers between the resulted values and the standard requirement of the vaccine which was 6.0 $\log_{10}$ EID_{50}/dose. In conclusion, ND vaccine with virus content of either 6.9 or 7.3 $\log_{10}$ EID_{50}/dose on manufacturing date could be kept at 4-6 ^{O}C for 26 months.

Key words: Virus content, Live Newcastle disease vaccine, La Sota strain, Manufacturing date, Potency

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

ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า ที่ผลิตโดยเก็บรักษาม้าม และต่อมน้ำเหลืองที่ – 40 องศาเซลเซียส

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] พิงพันธ์ เจริญสุระสถล[1] กัญญา สุวินทรากร[1]

บทคัดย่อ

ในกระบวนการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ใช้ม้ามและต่อมน้ำเหลืองของกระต่ายที่ได้รับเชื้ออหิวาต์สุกร สเตรนไชน่า และถูกนำมาผลิตเป็นวัคซีนทันทีภายหลังจากการฉีดเชื้อ 3 วัน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองเก็บรักษาอวัยวะแช่เข็งก่อนนำมาผลิตเป็นวัคซีนโดยศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตจากอวัยวะดังกล่าวหลังเก็บที่อุณหภูมิ -40 °ซ. เป็นเวลา 104 วัน และ 118 วัน เปรียบเทียบกับวัคซีนที่ผลิตในปัจจุบัน พบว่าค่า 50% Protective dose (PD_{50}) เป็น $10^{3.50}$ และ $10^{3.83}$ PD_{50}/dose ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับวัคซีนที่ผลิตในปัจจุบันและผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า ม้าม ต่อมน้ำเหลือง – 40 °ซ.

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ของกรมปศุสัตว์ในปัจจุบัน เป็นชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า ซึ่งภายหลังการฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรให้กับกระต่ายนาน 3 วัน จะเก็บม้ามและต่อมน้ำเหลืองเพื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนทันที ซึ่งระยะเวลาหลังจากฉีดเชื้อจนถึงการผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปจะต้องดำเนินการต่อเนื่องกัน หากมีขั้นตอนใดในกระบวนการผลิตประสบปัญหาจะต้องหยุดการผลิตวัคซีน

ในการทดลองครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรที่ผลิตจากม้ามและต่อมน้ำเหลืองของกระต่ายที่ได้รับการฉีดเชื้ออหิวาต์สุกร สเตรนไชน่าและเก็บรักษาที่ -40 °ซ. นาน 104 วัน และ 118 วัน ก่อนนำมาผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูป จะได้นำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงวิธีการผลิตวัคซีนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า ตามวิธีของสละ (2529) จำนวน 3 ชุด คือ ชุดที่ RS-1, RS-2 ผลิตจากม้ามและต่อมน้ำเหลืองที่เก็บรักษาที่ – 40 °ซ. และ ชุดที่ RS-3 ผลิตจากม้ามและต่อมน้ำเหลืองที่ไม่ได้เก็บรักษาที่ – 40 °ซ.

การทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน (Manual of ASEAN standard for animal vaccine, 1998)

1. การทดสอบการปนเปื้อน โดยละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลายวัคซีน จากนั้นใส่ในหลอด thioglycollate broth นำไปอบในตู้บ่มเชื้อ 37 °ซ. และ 22 °ซ. ตรวจผลเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทุกวัน นาน 14 วัน วัคซีนต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

2. การทดสอบความปลอดภัย โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อสุกรที่ได้จากแม่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ในขนาด 10 เท่าของโด๊สที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ ชุดละ 4 ตัว จำนวน 12 ตัว สังเกตอาการของสุกร และวัดอุณหภูมิร่างกายวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น นาน 14 วัน สุกรที่ฉีดวัคซีนจะต้องมีอุณหภูมิร่างกายปกติ ไม่มีอาการหรือวิการใดๆของโรค

3. การทดสอบความคุ้มโรค โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อสุกรที่ได้จากแม่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ในขนาด 1/100 เท่าของที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ ชุดละ 4 ตัว จำนวน 12 ตัว สังเกตอาการของสุกรและวัด อุณหภูมิร่างกายวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็นนาน 7 วัน แล้วฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในขนาด 10^5 Minimum lethal dose (MLD) ตัวละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อ พร้อมกับสุกรยืนยันเชื้ออหิวาต์สุกรจำนวน 1 ตัว สังเกตอาการของสุกร และวัดอุณหภูมิร่างกาย วันละ 2 เวลา เช้าและเย็น ต่ออีก 21 วัน สุกรที่ฉีดวัคซีนจะต้องมีอุณหภูมิร่างกายปกติ ไม่มีอาการหรือวิการใดๆ ของโรคปรากฏ และสุกรยืนยันเชื้ออหิวาต์สุกรจะต้องตายโดยแสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกรชัดเจน

4. การหาค่าความคุ้มโรค โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อสุกรที่ได้จากแม่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ตัวละ 1 มล. ที่ความเจือจางเป็น 10^{-1} - 10^{-4} ของโด๊สที่กำหนดให้ใช้ในท้องที่ ความเจือจางละ 3 ตัว จำนวน 37 ตัว สังเกตอาการของสุกรและวัดอุณหภูมิร่างกายวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น นาน 7 วัน แล้วฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในขนาด 10^5 MLD ตัวละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อพร้อมกับสุกรยืนยันเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร จำนวน 1 ตัว สังเกตอาการของสุกรและวัดอุณหภูมิร่างกายวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น นาน 21 วัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938)

ผล

ผลการทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า จำนวน 3 ชุด คือ RS-1, RS-2 และ RS-3 และผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนทั้ง 3 ชุด แสดงผลตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการปนเปื้อน การทดสอบความปลอดภัย การทดสอบความคุ้มโรค และการหาค่าความคุ้มโรค ของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชุดที่ RS-1, RS-2 และ RS-3

ชุดที่	จำนวนวันที่เก็บที่ -40 °ซ.	การทดสอบการปนเปื้อน	การทดสอบความปลอดภัย	การทดสอบความคุ้มโรค	การหาค่าความคุ้มโรค
RS-1	104	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	$10^{3.50}$ PD_{50}/โด๊ส
RS-2	118	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	$10^{3.83}$ PD_{50}/โด๊ส
RS-3	0	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	$10^{3.50}$ PD_{50}/โด๊ส

วิจารณ์และสรุป

วัคซีนชุดที่ RS-1, RS-2 ซึ่งเป็นชุดที่มีการเก็บรักษาอวัยวะที่ -40 °ซ. ก่อนนำมาผลิตเป็นวัคซีน และวัคซีนชุดที่ RS-3 เป็นชุดที่นำอวัยวะมาผลิตเป็นวัคซีนในทันที มีค่าความคุ้มโรค (50% Protective Dose, PD_{50}) ในสุกร คือ $10^{3.50}$ PD_{50}/dose, $10^{3.83}$ PD_{50}/dose และ $10^{3.50}$ PD_{50}/dose ตามลำดับ ซึ่งพบว่าวัคซีนที่ผลิตจากอวัยวะที่เก็บที่อุณหภูมิ -40 °ซ. หรือไม่เก็บ มีค่า PD_{50} ใกล้เคียงกันและผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน (OIE, 2000) ที่กำหนดให้มีค่า PD_{50} อย่างน้อย 10^7 PD_{50}/dose รวมทั้งผล การทดสอบการปนเปื้อน การทดสอบความปลอดภัย และการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน ผ่านมาตรฐานทั้ง 3 ชุด

ดังนั้นจากการทดลองจึงสรุปได้ว่าสามารถเก็บม้ามและต่อมน้ำเหลืองของกระต่ายที่ได้รับเชื้ออหิวาต์สุกร สเตรนไชน่าที่ -40 °ซ. นาน 104 วันและ 118 วัน สามารถนำมาผลิตเป็นวัคซีนที่ผ่านมาตรฐานได้ และประโยชน์จากการทดลองครั้งนี้คือสามารถปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิต ในกรณีที่มีการหยุดซ่อมหรือบำรุงรักษา

เครื่องจักร ซึ่งบางครั้งต้องใช้เวลายาวนาน ผู้ผลิตสามารถฉีดเชื้อแล้วเก็บรักษาอวัยวะที่ -40 °ซ. และเมื่อเครื่องจักรพร้อมสามารถนำมาผลิตเป็นวัคซีนได้ทันที

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่งานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร และฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ดทุกท่าน ที่ช่วยให้งานทดลองครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สละ กองสมัคร. 2529. วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 29-35.

Manual of ASEAN standard for animal vaccine. 1998. Livestock Publication Series. No. 2a: 26-27.

OIE. 2000. Classical swine fever (hog cholera). In: Manual of OIE standard for diagnostic test and vaccine. 4th ed. OIE. Paris, France. p. 1-18.

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

Efficiency of Lapinized Swine Fever Vaccine, China Strain, Produced by Keeping Harvested Spleens and Lymph Nodes at -40^{0}C

Rithuechai Poosungnuen[1] Pingpun Charoensurasathol[1] Kunya Suvintarakorn[1]

Abstract

Bureau of Veterinary Biologics has been producing swine fever vaccine, China strain, by using spleens and mesenteric lymph nodes of the rabbit after inoculating with seed virus for three days. The organs are harvested and immediately formulated. To study the efficiency of the vaccine using frozen organs, the vaccines were produced from spleens and lymph nodes after keeping at -40^{0}C for 104 and 118 days. They were determined for 50% protective doses (PD_{50}). The result showed that PD_{50} of the vaccines were $10^{3.50}$ and $10^{3.83}$ PD_{50}/dose, respectively. In addition, all vaccines met the standard minimum requirement and showed no difference when compared to the present vaccine.

Key words: Lapinized swine fever vaccine, China strain, Spleen, Mesenteric lymph node, -40^{0}C

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