วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 16 ฉบับที่ 2 กันยายน 2549

สารบัญ

♣ จากกองบรรณาธิการ 11

♣ การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ไตสุกร SK-6 บน microcarriers 13

นพคุณ มูลสิน ธวัชชัย ปัจฉานุกูล

♣ การทำแห้งวัคซีนฝีดาษไก่ปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. 25

สุรพัฒน์ เลาหวณิช อนันต์ ท้าวเพชร

♣ ไวรัสไตเตอร์ของวัคซีนกาฬโรคเป็ดหลังกรองด้วยที่กรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมครอน 37

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล กัญญา สุวินทรากร

♣ ประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดเมื่อใช้โด๊ส ขนาด 0.5 มล. ที่มีปริมาณไวรัส $10^{3.5}$ $TCID_{50}$ 43

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล นพคุณ มูลสิน พิงพันธ์ เจริญสุระสถล กัญญา สุวินทรากร

♣ ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัส ระดับแอนติบอดี และการฉีดพิษทับในสุกรของวัคซีนพีอาร์อาร์เอส ชนิดเชื้อเป็น 51

วิลาสินี ท้าวเพชร เกรียงไกร ไชยคำ จารุณี สาตรา

♣ ศึกษาความปลอดภัย การเปลี่ยนกลับรุนแรง และการแพร่กระจายของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น 61

วิลาสินี ท้าวเพชร เกรียงไกร ไชยคำ จารุณี สาตรา

♣ การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลกในเฟอร์เมนเตอร์ 71

วันชัย ตีรถะวรวรรณ วีรชาย ปู่สูงเนิน

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 16 No.2 September 2006

Contents

- **Editorial board** 11
- **Culture of swine kidney cell line SK-6 on microcarriers** 13

  Noppakun Moolsin Tawatchai Patchanukool
- **Freeze-drying of fowl pox vaccine in 3 ml vials** 25

  Surapat Laohawanich Anan Thaopech
- **The virus titers of duck plague vaccine after filtration with 0.2 μm and 0.45 μm membrane filters** 37

  Tawatchai Patchanukool Kunya Suvintarakorn
- **Efficacy of live attenuated duck plague vaccine at $10^{3.5}$ $TCID_{50}$ per 0.5 ml dose** 43

  Tawatchai Patchanukool Noppakun Moolsin Pingpun Charoensurasathol Kunya Suvintarakorn
- **Comparative studies on virus content, antibody level and pig challenge test of modified live PRRS vaccines** 51

  Wilasinee Thaopech Kriangkrai Chaikhum Jarunee Satra
- **Studies on safety, turning to virulence and transmission of modified live PRRS vaccines** 61

  Wilasinee Thaopech Kriangkrai Chaikhum Jarunee Satra
- **Development of blackleg vaccine production process in fermenter** 71

  Wanchai Teerathaworawan Weerachai Poosungnoen

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

http://www.dld.go.th/biologic

ปีที่ 16 ฉบับที่ 2 กันยายน 2549 Volume 16 No. 2 September 2006

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านการผลิตชีวภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีน
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

ปีที่ 16 ฉบับที่ 2 กันยายน 2549 พิมพ์เผยแพร่ ธันวาคม 2549 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

บรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ	**Editor**	Ratchanee	Atthi
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ	**Assistant editor**	Sahawatchara	Ungvanijban
ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	พยนต์	สินสุวงศ์วัฒน์	**Editorial advisor**	Payont	Sinsuwonkwat
ผู้จัดการวารสาร	ธนรัตน์	จานุกิจ	**Manager**	Thanarat	Janukit
ผู้ช่วยผู้จัดการวารสาร	ไชยา	สง่าประโคน		Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	แอบ	คงทน	**Editorial board**	Ab	Kongthon
	วันเพ็ญ	ชัยคำภา		Wanpenn	Chaikumpa
	สุมนา	ขมวิลัย		Sumna	Khomvilai
	ปานเทพ	รัตนากร		Parntep	Ratanakorn
	นพพร	พัฒนประสิทธิ์		Nopporn	Patanaprasit
	วิวัฒน์	ชัยชนะศิริวิทยา		Wiwat	Chaichanasiriwithaya
	มนยา	เอกทัตร์		Monaya	Ekgatat
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	กัญญา	สุวินทรากร		Kunya	Suvintarakorn
	วิไล	ลินจงสุบงกช		Wilai	Linchongsubongkoch
	ลัดดา	ตรงวงศา		Ladda	Trongwongsa
	วีรชาย	ปู่สูงเนิน		Weerachai	Poosungnoen

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130	**Office:**	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ: เดือนมีนาคม และกันยายน	**Publications:**	Twice a year in March and September

จัดพิมพ์โดย:

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน ผลงานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานวิจัย (Technical papers) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวน ไม่เกิน 14 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows และใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด เพื่อให้การจัดพิมพ์ผลงานวิชาการเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามรายละเอียดที่กำหนดให้อย่างเคร่งครัด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การส่งต้นฉบับเพื่อพิจารณาลงวารสารชีวผลิตภัณฑ์

เพื่อให้การพิจารณาผลงานวิชาการและการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ส่งต้นฉบับพร้อมเอกสารการนำส่งผลงานวิชาการ

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 3 ชุด โดยชุดที่ 1 ให้มีรายละเอียดครบตรงตามแบบฟอร์มของวารสารชีวผลิตภัณฑ์ อีก 2 ชุด ไม่ต้องพิมพ์ชื่อเจ้าของผลงานวิชาการและสถานที่ทำงาน และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

การส่งแผ่นบันทึกข้อมูลจะส่งมาให้ก็ต่อเมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากผู้ประเมินผลงานวิชาการแล้วเท่านั้น โดยทางเจ้าหน้าที่จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่ผู้ประเมินผลงานวิชาการให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่ถูกต้องหลังจากมีการแก้ไขจากผู้ประเมินผลงานวิชาการแล้ว ลงใน Diskette ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ.....
ชื่อเจ้าของผลงาน.....
ชื่อไฟล์.....
ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์.....

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้ผู้ประเมินผลงานวิชาการพิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาให้ ทั้ง 3 ชุด ต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

ส่ง
บรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

3.6 ติดต่อสอบถามได้ที่

สัตวแพทย์หญิงรัชนี อัตถิ หรือนายสัตวแพทย์สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122 (สพ.ญ.รัชนี อัตถิ) หรือ ต่อ 427 (น.สพ.สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ)
โทรสาร. 0-4427-9794

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้บรรทัดสุดท้ายของหน้าเป็นหมายเหตุ (foot note)

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แต่ละภาษาเขียนแยกหน้าต่างหาก

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ข้างล่างของหน้านั้น

4.5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่ก็ได้ โดยเขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไลและคณะ, 2532; นริศ และสินสมุทร, 2543)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Lin and Lee (1981), Kumagai et al. (1961) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Lin and Lee, 1981), (Kumagai et al., 1961)

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น .....similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data), ...for other bacteria (A. X. Jones, personal communication)

5. กรณีอ้างเอกสารที่มีสถาบันเป็นผู้แต่งแทรกในเนื้อความ ให้ระบุนามผู้แต่งที่เป็นสถาบันโดยเขียนชื่อเต็มในการอ้างครั้งแรก และถ้ามีชื่อย่อที่เป็นทางการก็ให้ระบุชื่อย่อนั้นหลังเครื่องหมาย , ไว้ด้วย กรณีนี้ในการอ้างครั้งต่อมาให้ใช้ชื่อย่อนั้นได้ ในกรณีที่ไม่มีชื่อย่อ การอ้างครั้งต่อๆมาให้ระบุชื่อสถาบันเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช. 2544. การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 11(1-2): 27-26.

Jason, R. H. and Collings, D. F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12 : 570-572.

กรณีอ้างอิงจากตำราหรือหนังสือ ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง หากเป็นตำราภาษาอังกฤษใช้ p. กรณีอ้างเพียง 1 หน้า ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. ดังตัวอย่าง

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 2543. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 81.

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช. 2520. โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา. ใน: หลักการทำไร่อ้อย เกษม สุขสถาน และอุดม พูลเกษ บรรณาธิการ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 141-145.

Office International des Epizootics. 2000. Principles of Veterinary vaccine production. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 42.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In: Disease of swine, 6th ed. Leman, A. D. ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

จันทรา แป้นดุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึ่งพิศ ดุลยพัชร์. 2541. อาหารจากข้าวโพด. คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา: http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm. 27 มีนาคม 2541.

Dimick, J. B., Welch, H. G. and Birkmeyer, J. D. 18 August 2004, posting {or revision} date. Surgical mortality as an indicator of hospital quality. JAMA. 292. Available source: http://jama.ama-assn.org/cgi/content/short/292/7/847. {For online journal; page numbers may not be available.}

Sullivan, C. J. (ed.). 1999-2001. Fungi: an evolving electronic resource for the microbiological community. ASM Press. Page numbers. Available source: http://link.asmusa.de/link/service/books/91090. Accessed 7 September 2001. {For online only books.}

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่าน และใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana new 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

-ตั้งกั้นด้านบนและด้านซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร

-ตั้งกั้นด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

-การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม

-กรณีคำสุดท้ายไม่จบในบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กองผลิตชีวภัณฑ์ ไม่ให้แยกเป็น กองผลิตชีว-ภัณฑ์ เป็นต้น

-หลังเครื่องหมาย . , ; : (และ) เคาะ 1 เคาะ

-ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง

-ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (วิไล และคณะ)

การลำดับหน้า

-ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3..... ที่กึ่งกลางหน้าด้านบน

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยให้มีรายละเอียดดังนี้

-ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

-กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

-กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ หรือ *พิมพ์ด้วยตัวเอน* ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม

(Binomial nomenclature) คือประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific epithet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ดังตัวอย่าง

จุลชีพ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*

พืช เช่น Oryza sativa หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*

สัตว์ เช่น Spiella inermis หรือพิมพ์ตัวเอน *Spiella inermis*

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 16 ฉบับที่ 2 นี้ ประกอบด้วย ผลงานวิชาการจำนวน 7 เรื่อง เป็นผลงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์จำนวน 5 เรื่อง ที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนสำหรับป้องกันโรคซึ่งมีการผลิตอยู่ในปัจจุบันทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ไตสุกรบน microcarrier ซึ่งอาจมีการพัฒนาเทคนิคนี้ต่อไปจนสามารถใช้ในการผลิตวัคซีนชนิดใดชนิดหนึ่งได้ในอนาคต รวมถึงผลงานวิชาการที่เกี่ยวกับกระบวนการผลิตของวัคซีนฝีดาษไก่ วัคซีนกาฬโรค และวัคซีนแบลคเลก ที่ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพและการผลิตวัคซีนทั้งสิ้นทั้งแง่ของการลดความสูญเสียระหว่างการผลิต การลดขนาดฉีด และการปรับขนาดการบรรจุขวดของวัคซีน นอกจากนี้ยังมีผลงานจากนักวิชาการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จำนวน 2 เรื่อง เป็นเรื่องที่ศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น ซึ่งเป็นวัคซีนนำเข้าจากต่างประเทศ ผลงานนี้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการตัดสินใจเลือกใช้วัคซีนและการนำวัคซีนเข้าจากต่างประเทศเพราะโรคพีอาร์อาร์เอสก็เป็นโรคสุกรที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศ และการใช้วัคซีนในสุกรก็มีข้อจำกัดหลายด้าน

กองบรรณาธิการหวังว่าท่านคงจะได้รับประโยชน์จากผลงานวิชาการดังกล่าวนี้ และเช่นเคยหากท่านมีข้อคิดเห็นที่จะเสนอแนะ กองบรรณาธิการยินดีรับคำติชมเพื่อนำมาปรับปรุงวารสารชีวผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพสูงยิ่งขึ้น

(สัตวแพทย์หญิงรัชนี อัตถิ)
บรรณาธิการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ไตสุกร SK-6 บน microcarriers

นพคุณ มูลสิน[1] ธวัชชัย ปัจฉานุกูล[1]

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 โดยใช้ microcarrier แบบไม่มีรูพรุน 3 ชนิด คือ Cytodex I, Cytodex III และ Cell Yard ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (bioreactor) ขนาด 500 มล. กับการใช้ขวดเพาะเซลล์ชนิด T-flask ขนาด 175 ซม.^{2} โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่ 2.5x10^5 เซลล์/มล. ปริมาตร 35 มล. เท่ากัน นาน 8 วัน พบว่าเซลล์ใน T-flask เจริญเติบโตเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง (confluency) ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 4.0x10^7 เซลล์/มล. Cytodex I เซลล์เจริญมีความหนาแน่นเท่ากับ 3.2x10^8 เซลล์/มล. คิดเป็น 8 เท่า เมื่อเทียบกับ T-flask ส่วน Cytodex III เซลล์เจริญมีความหนาแน่นเท่ากับ 3.5x10^8 เซลล์/มล. คิดเป็น 8.75 เท่า แต่ Cell Yard ไม่พบการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 โดยใช้ microcarrier ชนิด Cytodex 1 และ Cytodex III ให้จำนวนเซลล์มากกว่าเมื่อใช้เวลาและปริมาณอาหารที่เท่ากัน ดังนั้นสามารถใช้ Cytodex I และ Cytodex III เพื่อขยายสเกลการผลิตเซลล์ SK-6 ซึ่งง่ายและสะดวก อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการใช้ microcarrier เพื่อผลิตไวรัสสำหรับการทำวัคซีนในปริมาณมากและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาตร์ต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์ไลน์ไตสุกร SK-6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ microcarrier

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เพื่อผลิตวัคซีนสำหรับใช้ป้องกันโรคในมนุษย์และสัตว์โดยมากต้องอาศัยเซลล์ชนิดต้องการพื้นผิวยึดเกาะเพื่อการเจริญเติบโต anchorage-dependent cells (ADCs) การเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวกระทำในภาชนะที่เป็นจานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ stationary tissue culture flask (T-flask) หรือขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ roller bottle การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยภาชนะดังกล่าวให้ได้ปริมาณเซลล์จำนวนมากจะต้องใช้ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์และแรงงานคนจำนวนมากพร้อมทั้งสิ้นเปลืองเวลาในการปฏิบัติงาน การขยายสเกลการผลิตเซลล์ (scale up) จะกระทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดพื้นที่ผิวภายในขวดเพาะเลี้ยงที่จะให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตได้มีความพยายามคิดหาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ADCs ให้ได้ปริมาณเซลล์จำนวนมาก จนกระทั่ง Van Wezel (1967) นำอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก (microcarrier) ผลิตจากวัสดุ diethylaminoethyl sephadex มาเพาะเลี้ยง human diploid cells ซึ่งสามารถผลิตเซลล์และไวรัสโปลิโอได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นถึง 1,000 เทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม ต่อมาได้มีการพัฒนา microcarrier หลากหลายชนิด ขึ้นมาเพื่อให้เซลล์ชนิดต่างๆ สามารถยึดเกาะและเจริญบน microcarrier ได้ดีขึ้นรวมถึงการผลิตไวรัสให้ได้จำนวนมาก Van der velden-de Groot (1995) รายงานถึงการขยายสเกลการผลิตเซลล์โดยใช้ microcarrier สามารถทำได้โดยง่ายโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเฟอร์เมนเตอร์ Tree et al. (2001) เปรียบเทียบและคำนวณการผลิตเซลล์ไตสุนัข (MDCK) บน microcarrier ใน biorcactor 1,000 ลิตร จะผลิตเซลล์ได้ปริมาณเท่ากับการใช้ขวด roller bottle ขนาด 850 ซม.^{2} จำนวน 12,000 ขวด

เนื่องจากมีความหลากหลายของชนิด microcarrier และเซลล์เพาะเลี้ยงรวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ จึงต้องมีการศึกษาความเหมาะสมของ microcarrier ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิด การวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์ SK-6 (Kasza et al., 1972) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่เตรียมจากไตสุกรเพศเมียอายุ 6 เดือน ผ่านการเพาะเลี้ยงจำนวน 50 ครั้ง จนคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ที่ได้มีความคงที่ ทำการเพาะเลี้ยงบน microcarrier 3 ชนิด ซึ่งแตกต่างกันทั้งขนาดอนุภาคและประจุบริเวณผิวของ microcarrier ใน bioreactor เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงใน T-flask ทำการนับจำนวนเซลล์เพื่อดูปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งสองวิธี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เซลล์ไลน์และอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ SK-6 เพาะเลี้ยงโดยใช้ Eagle's minimal essential medium[1] ซึ่งมีส่วนผสมของ L-glutamine[2] 0.03%, sodium bicarbonate[3] 0.07%, penicillin[4] 200 Units/ml, streptomycin[5] 200 µg/ml และ bovine serum[6] 5%

---

[1]Nissui, Japan [2]Sigma, USA [3] Merck, Germany

[4,5]Hebei Pharmar, China [6]Starrate, Australia

2. การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจดูรูปร่างของเซลล์ ใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)[7] ชนิด phase contrast เพื่อดูรูปร่าง ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ thioglycolate broth[8], tryptic soy broth[9] (TSB) ตามวิธีทดสอบของ United States Pharmacopoeia (1970)

การทดสอบการปนเปื้อนมัยโคพลาสมาในเซลล์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป MycoTect[10] วิธีการทดสอบทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การทดสอบการปนเปื้อนแอนติเจนไวรัสอหิวาต์สุกร และ bovine viral diarrhea virus (BVDV) ในซีรัมโค และในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะ ตามรายงานวิจัย (ละมูล และคณะ, 2545)

การตรวจสอบปริมาณเอ็นโดท็อกซินในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และในน้ำบริสุทธิ์ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป[11] Pyrotell® Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test ทำตามคำแนะนำผู้ผลิต

3. การเตรียม microcarrier สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

Non-porous microcarrier สามชนิดถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

1. Cytodex 1[12] ทำจากวัสดุ DEAE-dextran เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 190 μM มีประจุบวกรอบอนุภาคมีพื้นที่ผิว 4,400 ซม.^{2}/กรัม

2. CytodexIII[13] ทำจากวัสดุ collagen coated dextran เส้นผ่าศูนย์กลาง 175 μM ไม่มีประจุ พื้นที่ผิว 2,700 ซม.^{2}/กรัม

3. Cell Yard[14] ทำจากวัสดุ hydroxyapatite ขนาดอนุภาคไม่สม่ำเสมอ

นำ microcarrier มาแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) ที่ปราศจาก Ca^{2+}, Mg^{2+} นาน 3 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วนึ่งไอน้ำ 115^0 C 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นแบ่ง microcarrier จากขวดที่เตรียมมาอย่างละ 1 กรัม เติมลงในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงใช้ความหนาแน่น microcarrier ต่อจำนวนเซลล์ ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

4. การเตรียม cell stock และการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ microcarrier

เริ่มต้นเพาะเลี้ยงในขวด T-flask[15] ขนาดพื้นที่ผิว 175 ซม.^{2} เลี้ยงเซลล์ SK-6 passage 71-75 เก็บเป็น cell stock เมื่อเซลล์โตครอบคลุมประมาณ 80% ของพื้นผิวภาชนะล้างด้วย PBS ทำการย่อยด้วย 0.25 % trypsin-EDTA ปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วนับจำนวนเซลล์ต่อจากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ T-flask ขนาด 175 ซม.^{2} จำนวน 10 ใบ โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์ตั้งต้นประมาณ 2.5x10^5 เซลล์/มล. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 35 มล. นำเข้าตู้บ่ม

---

[7]Olympus, Japan [8,9]Difco, Germany [10]Gibco Invitrogen, USA

[11]Cape Cod, USA [12,13]Amersham, Sweden [14]Pentax, Japan

[15]Corning, USA

ควบคุมอุณหภูมิ 37° C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลานาน 10 วัน สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน MiniPERM bioreactor[16] นำ microcarrier ซึ่งเตรียมในข้อ 3 เติมลงไป และเติมเซลล์เช่นเดียวกันกับใน T-flask ตั้งความเร็วรอบในการหมุน 2 rpm

5. การนับเซลล์ที่เจริญในภาชนะเพาะเลี้ยง

ใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ Nucleo Counter™[17] นำตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาย่อยผนังเซลล์โดยสารละลาย lysis buffer 200 ไมโครลิตร เติม neutralizing buffer 200 ไมโครลิตร ดูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ เครื่องจะทำการนับเซลล์โดยวัดความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้น propidium iodide ที่จับอยู่กับนิวเคลียสของเซลล์ ค่าที่อ่านได้คูณด้วย dilution factor เท่ากับความเข้มข้นเซลล์มีหน่วยเป็นจำนวนเซลล์/มล.

ผล

1. เซลล์ไลน์และอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ SK-6 สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี tryptose phosphate broth (TPB) เป็นส่วนผสม

2. การตรวจสอบและการควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจดูรูปร่างของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ยังคงรูปร่าง epithelial-like cell เหมือนเซลล์ตั้งต้นและไม่พบ vacuole ในเซลล์

การตรวจดูการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพชนิดต่างๆ ไม่พบการปนเปื้อน รา แบคทีเรีย มัยโคพลาสมา และไวรัส ทั้งในเซลล์และในส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

การตรวจสอบปริมาณเอ็นโดท็อกซินในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และในน้ำบริสุทธิ์ปริมาณเอ็นโดท็อกซินในน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์น้อยกว่า 0.25 EU/ml

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เติม TPB ตรวจพบเอ็นโดท็อกซินมากกว่า 0.25 EU/ml

3. การเจริญเติบโตเซลล์ SK-6 บน mirocarrier และใน T-flask

เมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้เซลล์ $2.5x10^5$ เซลล์/มล. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 35 มล. คำนวณเซลล์ตั้งต้นทั้งหมด $8.8x10^6$ เซลล์ ภายใน12 ชั่วโมง เซลล์จะเริ่มเกาะบน microcarrier และ T-flask พบจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 7 ประมาณ $4.0x10^7$ เซลล์ ใน T-flask ส่วนบน microcarrier Cytodex 1 และ Cytodex III ปริมาณเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 ประมาณ $3.2 x10^8$ เซลล์ และ $3.5 x10^8$ เซลล์ ตามลำดับ ขณะที่ Cell Yard เซลล์ไม่เจริญ (ตารางที่ 1) เซลล์ SK-6 เริ่มยึดเกาะและเปลี่ยนรูปร่างบน Cytodex I โดยที่บางเซลล์จะยืดยาวออกจากเดิมที่มีลักษณะกลม (รูปที่ 1 ก-ข) ภายใน12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะเพิ่มจำนวนและพบว่ามีเซลล์กระจายตัวอยู่บนอนุภาคของ microcarrier เต็มทุกอนุภาคในระยะเวลา 3 วัน สำหรับ Cytodex III (รูปที่ 2 ก-ข) พบว่าเซลล์

---

[16]Vivascience, Germany [17] Chemometec, Denmark

มีปริมาณหนาแน่นมากบนอนุภาค microcarrier ภายในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยที่บนอนุภาค microcarrier เกิดการจัดเรียงชั้นเซลล์ซ้อนกันเป็นชั้นๆ ส่วนT-flask ภายใน 12 ชั่วโมง เซลล์จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์รูปกลมเป็น epithelial-like morphology และภายในวันที่ 3 เซลล์จะโตเต็มภาชนะเกิดการจัดเรียงเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเป็นชั้น monolayer (รูปที่ 2 ค-ง) Cell Yard พบการเกาะของเซลล์ SK-6 น้อยมากในช่วงต้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ไม่เจริญและพบการตายของเซลล์เกิดขึ้น (รูปที่ 1 ค-ง)

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เป็นการเพิ่มขยายจำนวนเซลล์นอกร่างกายสิ่งมีชีวิตการผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรม (large scale cell culture) ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกเมื่อ 40 ปีที่ผ่านมา (Arathoon and Birch, 1986) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตแฮมสเตอร์ในรูป suspension-adapted cell culture อย่างไรก็ตามการผลิตเซลล์ดังกล่าวไม่สามารถนำไปใช้ผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันโรคในมนุษย์เนื่องจากอาจเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์มีความเสี่ยงที่จะเกิดการสร้างมะเร็ง (U.S. Department of Health, 1967) และอีกประการคือการเพิ่มปริมาณไวรัสในการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยพบว่าทำให้คุณสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ลดลงเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ viral markers (Bahnemann, 1980) แนวทางแก้ปัญหาดังกล่าวคือการใช้ microcarrier เพาะเลี้ยงเซลล์ ADCs แทนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ suspension culture ข้อดีของ microcarrier มีหลายประการได้แก่การให้พื้นที่ผิวจำนวนมากสำหรับเซลล์ยึดเกาะ สามารถเพาะเลี้ยงใน bioreactor ซึ่งมีระบบควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆ ทำให้สามารถตรวจสอบและควบคุมการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ง่าย เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สะดวกกระทำครั้งเดียวเนื่องจากเซลล์เจริญเติบโตและใช้อาหารได้ใกล้เคียงกัน (homogeneous culture) จึงลดโอกาสการปนเปื้อน สามารถขยายสเกลการผลิตได้ง่าย ประหยัดแรงงานและพื้นที่สำหรับปฏิบัติงาน

งานวิจัยนี้แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 ซึ่งเป็น ADCs ให้ได้ปริมาณมากโดยการเพาะเลี้ยงด้วย microcarrier อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์มากมีปัญหาอื่นๆ ที่ควรตระหนักเพราะสร้างความสูญเสียมากเช่นการปนเปื้อนจุลชีพโดยเฉพาะมัยโคพลาสมาเนื่องจากตรวจพบยากมากและการปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้ง่าย (McGarrity and Coriell, 1973) และการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จากอินทรีย์สารที่ปนเปื้อนในน้ำคุณภาพต่ำ (Mather et al., 1986) ดังนั้นการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ในช่วงต้นการวิจัยพบว่าเซลล์ที่ได้รับจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเซลล์น้อยโดยที่ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของจุลชีพชนิดต่างๆ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนเอ็นโดท็อกซินในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีรายงานโดย Jia et al. (1998) พบว่าระดับเอ็นโดท็อกซิน 10 EU/ml ทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากปกติ $4.6 \pm 0.1 \times 10^6$ เซลล์ เหลือ $1.6 \pm 0.2 \times 10^6$ เซลล์ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานปริมาณของเอ็นโดท็อกซินที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบเซลล์ SK-6 อย่างไรก็ตามบริษัทซึ่งผลิตอาหารเลี้ยงเซลล์แนะนำระดับปริมาณเอ็นโดท็อกซินที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ทั่วไปไม่เกิน 1.0 EU/ml งานวิจัยนี้พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้นเองมีการปนเปื้อนเอ็นโดท็อกซินจาก TPB ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลของ

เอ็นโดท็อกซินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SK-6 จึงเตรียมอาหารโดยไม่มี TPB เป็นส่วนประกอบ พบว่าเซลล์เจริญในอาหารที่เตรียมขึ้นได้เป็นอย่างดี สำหรับ TPB มีบทบาทในการเป็นแหล่งกรดอะมิโนอิสระที่เติมเสริมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม ถึงแม้ยังไม่มีรายงานถึงหน้าที่ของสารอาหาร TPB ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตสุกรโดยตรง แต่พบว่า TPB มีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนไวรัส blue tongue ที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ BHK-21 (Plavsic and Prodafikas, 2000) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ SK-6โดยใช้อาหารที่ไม่มี TPB อาจจะทำให้ได้ไวรัสปริมาณต่ำ

การเจริญเติบโตของเซลล์บน mirocarrier ชนิดต่างๆ พบว่าเซลล์ SK-6 เจริญได้ดีที่สุดบน Cytodex III เนื่องจากพื้นผิวของ Cytodex III มีการเคลือบ Collagen ลงบน matrix ของ microcarrier ทำให้การยึดเกาะของเซลล์ในกลุ่ม epithelial-like morphology ดีขึ้น (Levine and Bang, 1964; Spier and Horaud, 1985) ส่วน Cytodex I เซลล์เจริญได้น้อยกว่า Cytodex III แม้ว่าใน 1 กรัม มีพื้นที่ผิวมากประมาณ 1.6 เท่า อาจเนื่องจากผลที่เรียกว่า toxic effect ซึ่งเกิดจากความหนาแน่นของประจุที่ผิว microcarrier ทำให้การแลกเปลี่ยนประจุที่พื้นผิวไม่เหมาะสมทำให้เซลล์ตายเป็นจำนวนมาก (Van Wezel, 1976) สำหรับ Cell Yard ไม่พบเซลล์เจริญอาจเป็นเพราะวัสดุ hydroxyapatite ไม่สนับสนุนการยึดเกาะและเจริญของเซลล์ SK-6 ซึ่งควรได้มีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ T-flask ได้เซลล์จำนวนสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงประมาณ $4.0x10^7$ เซลล์ หรือ $2.3x10^5$ เซลล์/ซม.^{2} เมื่อพิจารณาพื้นที่ผิว Cytodex III 1 กรัม มีพื้นที่ 2,700 ซม.^{2} ถ้าตั้งสมมติฐานว่า microcarrier ทุกอนุภาคมีเซลล์ยึดเกาะ เมื่อคำนวณจะได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ $2.3x10^5$ เซลล์ x 2,700ซม.^{2} ซึ่งคิดเป็นปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ $6.2x10^8$ เซลล์ ซึ่งมีค่ามากกว่าเซลล์ที่ได้จริงจากการทดลองในวันที่ 8 ($3.5x10^8$ เซลล์) เท่ากับ 1.77 เท่า นั้นแสดงถึงโอกาสที่จะเพิ่มการผลิต SK-6 โดยใช้ Cytodex III ให้ได้ปริมาณมากกว่าการทดลองนี้

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์สูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 ใน T-flask และ Cytodex III พบว่าปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน Cytodex III มีมากกว่าใน T-flask คิดเป็น 8.75 เท่า เนื่องมาจากพื้นที่ผิวบน microcarrier ให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตมีมากกว่า การศึกษาขั้นต่อไปจะศึกษาการเพาะไวรัสลง SK-6 ที่เจริญบน microcarrier เพื่อดูปริมาณไวรัสที่ได้รับ และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวไวรัส ซึ่งผลที่ได้รับนำไปคำนวณเป็นต้นทุนการผลิตก่อนที่จะตัดสินใจนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ผลิตวัคซีนต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ SK-6 ใน Bioreactor โดยใช้ microcarrier ชนิดต่างๆ ใช้เซลล์เริ่มต้น $8.8x10^6$ เซลล์ พบว่า Cytodex III สามารถให้ปริมาณเซลล์ได้สูงสุดซึ่งมากกว่าเซลล์ที่ได้จากการเพาะในขวด T-flask ประมาณ 8.75 เท่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr.Tamio Kajikawa (JICA senior volunteer) สนับสนุนสารเคมี บริษัท A.N.H. สนับสนุน Cell Yard microcarrier, Ms. Emma Field (Australian Youth Ambassador) ช่วยตรวจการปนเปื้อนไวรัส สุดท้าย ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา ที่ให้คำแนะนำในการเขียนรายงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ละมูล โว้ดี สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน วาสนา ภิญโญชนม์ สุจิรา ปาจริยานนท์ และสันนิภา สุรทัตต์. 2545. การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR และการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธีใช้ RT-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ดัดจำเพาะเซลล์. รายงานการวิจัย การวิจัยและพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย. หน้า 67-86.

Arathoon, W.R. and Birch J.R. 1986. Large-scale cell culture in biotechnology. Science. 232 (4756): 1390-1395.

Bahnemann, H. G. 1980. Animal cell, viral and vaccine. Abs Pap ACS. 180: 5.

Jia, J.B., Han, D.W., Xu, R.L., Chen, X.M., Zhao, Y.C. and Yan, J.P. 1998. Effect of endotoxin on fibronectin synthesis of rat primary cultured hepatocytes. World J Gastroenterology. 4 (4): 329-331.

Kasza, L., Shadduck, J. A. and Chistofinis, J. G. 1972. Establishment viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. Res. Vet. Sci. 13: 46-51.

Levin, J. and Bang, F.B. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265-274.

Mather, J., Kaczarowski, F., Gabler, R. and Wilkins, F. 1986. Effect of water purity and addition of common water contaminants on the growth of cells in serum-free medium. Biotechniques. 4 (1): 56-63.

McGarrity, G.J. and Coriell, L.L. 1973. Detection of anaerobic mycoplasmas in cell culture. Invitro. 9 (1): 17-18.

Plavsic, M. Z. and Prodafikas G. 2000. Effects of medium supplements on BHK-21cell growth and bluetongue virus production. Focus. 22: 35.

Spiear, R. E. and Horaud, F. 1985. The biotechnology future for animal cell in cultures. Ani. Cell. Biotechnol. 2: 431-458.

Tree, J. A., Richardson, C., Anthony, R. F., Clegg, J. C. and Looby, D. 2001. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine. 19: 3444-3450.

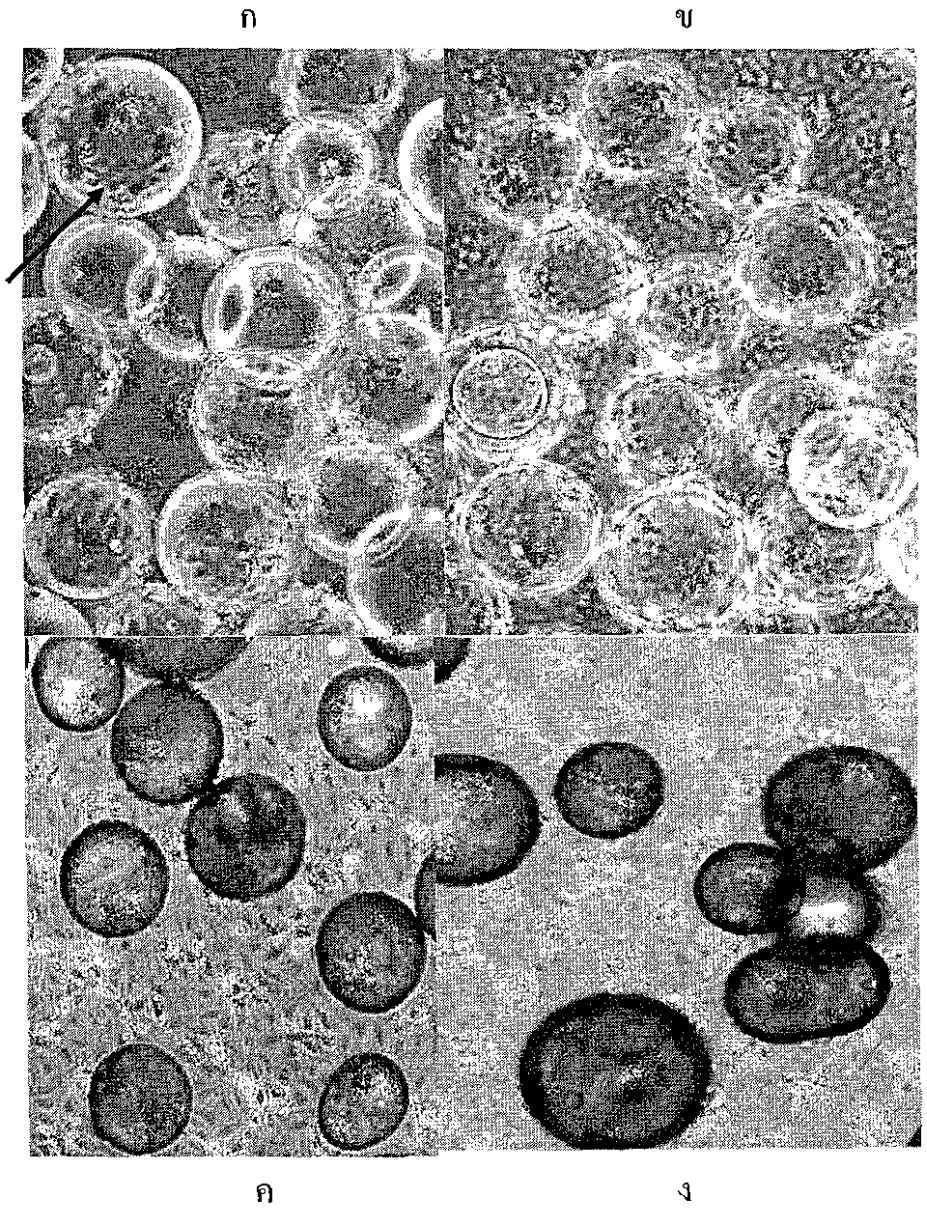
United States Pharmacopoeia. 1970. XVIII.

U.S. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service. 1967. Regulation for the manufacture of biological products. 42, part 73: 71-161.

Van der Velden-de Groot, C. A. M. 1995. Microcarrier technology, present status and perspective. Cytotechnology. 18: 51-56.

Van Wezel, A. L. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. Nature. 216: 64-65.

Van Wezel, A. L. 1976. The large scale cultivation of diploid cell strains in microcarriers in culture: Improvement of microcarriers. Dev. Biol. Stand. 37: 143-147.



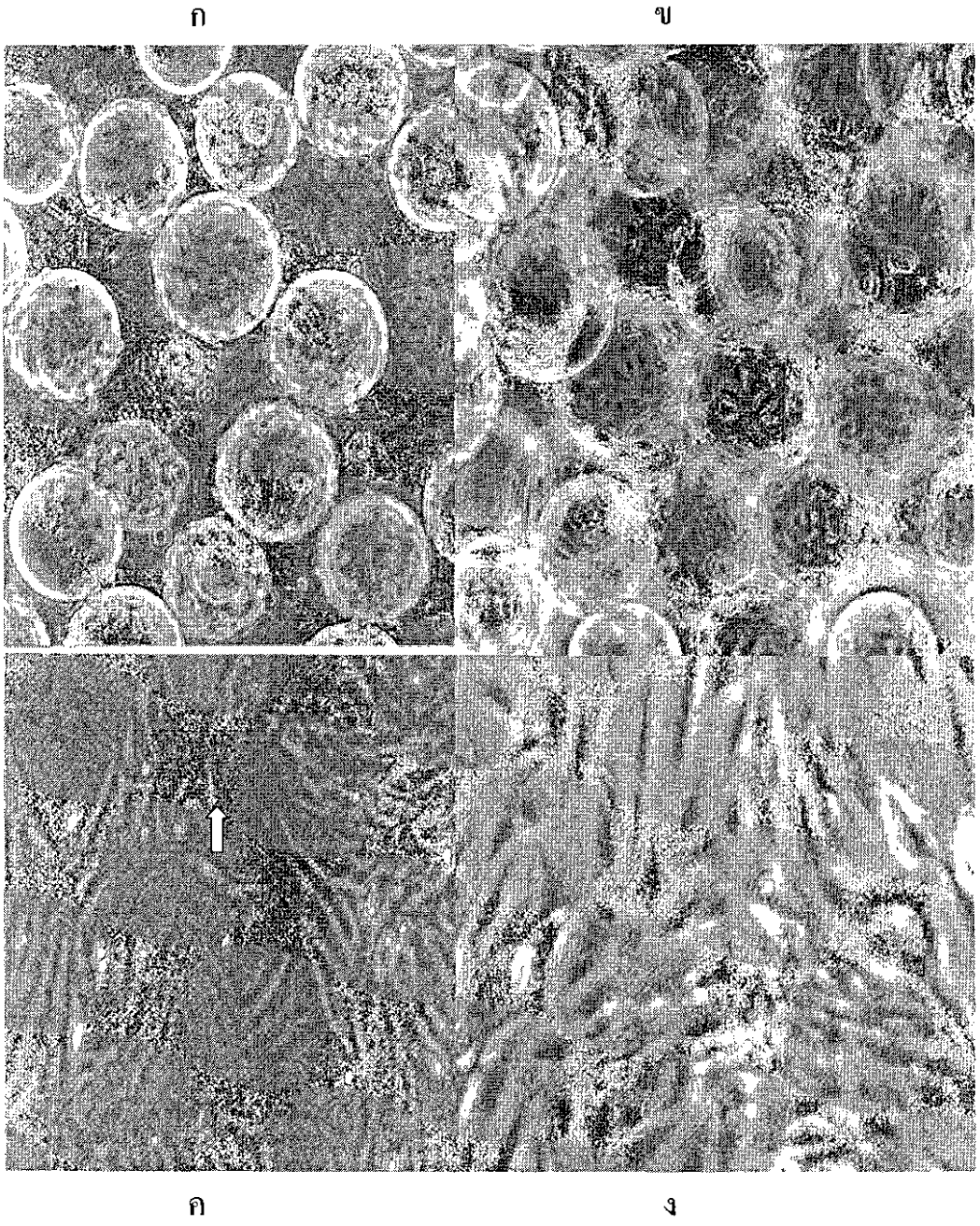
รูปที่ 1 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า แสดงเซลล์ SK-6 เจริญบน microcarrier ชนิดต่างๆ

(ก) Cytodex I ที่ 12 ชั่วโมง เซลล์เริ่มเกาะบน microcarrier แสดงโดยลูกศร

(ข) Cytodex I วันที่ 3 เซลล์เจริญเต็มผิว microcarrier

(ค) Cell Yard ที่ 12 ชั่วโมง บางเซลล์เกาะบน microcarrier

(ง) Cell Yard หลังเพาะเลี้ยง 8 วัน ไม่พบเซลล์เจริญบน microcarrier



รูปที่ 2 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า แสดงเซลล์ SK-6 เจริญบน microcarrier และ T-flask

(ก) Cytodex III ที่ 12 ชั่วโมง เซลล์จำนวนมากเกาะบน microcarrier

(ข) Cytodex III วันที่ 3 เซลล์เจริญหนาแน่นบน microcarrier เกิดการซ้อนเป็นชั้นๆ

(ค) T-flask ที่ 12 ชั่วโมง เซลล์ปรากฏรูปร่าง epithelial-like morphology (ลูกศรชี้)

(ง) T-flask วันที่ 3 เซลล์โตเต็มผิวภาชนะเรียงตัวเป็นชั้น monolayer

ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ SK-6 เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM 35 มล. ประกอบด้วยซีรัม 5% ซึ่งเจริญบน mirocarrier ชนิดต่างๆ อย่างละ 1 กรัมใน bioreactor และใน T-flask

วันที่	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (หน่วย:เซลล์)			
	Cytodex I	Cytodex III	Cell Yard	T-flask
1	$8.8x10^6$	$8.8x10^6$	$8.8x10^6$	$8.8x10^6$
2	$2.5 x10^7$	$2.5 x10^7$	0	$9.5x10^6$
3	$1.8 x10^8$	$2.7 x10^8$	0	$2.0x10^6$
4	$2.4 x10^8$	$3.0 x10^8$	0	$2.2x10^7$
5	$2.8 x10^8$	$3.0 x10^8$	0	$2.3x10^7$
6	$3.0 x10^8$	$3.1 x10^8$	0	$2.8x10^7$
7	$3.1 x10^8$	$3.3 x10^8$	0	$4.0x10^7$
8	$3.2 x10^8$	$3.5 x10^8$	0	$3.1x10^7$
9	$2.1x10^8$	$1.5 x10^8$	0	$3.4x10^7$
10	$4.2 x10^7$	$2.2 x10^7$	0	$1.0x10^7$

Culture of swine kidney cell line SK-6 on microcarriers

Noppakun Moolsin[1] Tawatchai Patchanukool[1]

Abstract

The propagation of SK6 cells on three non porous microcarriers, Cytodex I, Cytodex III and Cell Yard, in a 500 ml bioreactor and grown as monolayer on T-flask were compared. The bioreactor and T-flask were inoculated with 35 ml of medium and seeded at $2.5x10^5$ cells/ml. After 8 days, the total number of cells in the T-flask was $2.5x10^5$ cells compared with $3.2x10^8$ cells on Cytodex I, an 8 times increase in cell productivity. Similarly, the total cell on Cytodex III was $3.5x10^8$ cells, an 8.5 times increase in cell productivity. Cell Yard did not support the growth of SK-6 cells. The result showed that culture of SK-6 cells on cytodex I and Cytodex III microcarrier system not only achieved higher yield than T-flask but also the technical convenience and the ease of scaling up. Nevertheless, the high virus titer and cost-effective advantage should be further studied.

Key words: Swine kidney cell line SK-6, Cell culture, Microcarrier

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

การทำแห้งวัคซีนฝีดาษไก่ปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล.

สุรพัฒน์ เลาหวณิช[1] อนันต์ ท้าวเพชร[1]

บทคัดย่อ

การทำแห้งวัคซีนฝีดาษไก่ที่บรรจุปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. รวม 3 โปรแกรม คือ ใช้เวลาการทำแห้งในช่วงระยะระเหิดขั้นต้น (primary drying) 20, 25 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีระยะ pre-freeze นาน 4 ชั่วโมง และระยะ final drying นาน 6 ชั่วโมง เท่ากัน เมื่อนำวัคซีนสำเร็จรูปทำการตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป (property test) พบว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 12.6%, 63.3% และ 100% ตามลำดับ ทำการทดสอบความชื้น พบมีค่าเฉลี่ย 5.08%, 3.63% และ 3.21% ตามลำดับ ทำการหาปริมาณไวรัสพบว่ามีปริมาณไวรัสเท่ากันคือ $10^{2.6}$ 50% egg infection dose per dose (EID_{50}/dose) และทำการทดสอบความคงตัวที่ 37°C นาน 7, 14 และ 21 วัน พบว่ามีปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{2.02}$, $10^{2.0}$, $10^{1.56}$ EID_{50}/dose, $10^{2.2}$, $10^{1.98}$, $10^{1.54}$ EID_{50}/dose, $10^{2.02}$, $10^{1.6}$, $10^{0.62}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ เมื่อใช้เกณฑ์ตัดสินวัคซีนสำเร็จรูป เนื้อวัคซีนต้องมีเนื้อฟูเป็นเค้กไม่ฝ่อ ความชื้นไม่เกิน 4% และมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{2.0}$ EID_{50}/dose ดังนั้นโปรแกรมทำแห้งที่สามารถนำไปใช้ได้ คือ ระยะระเหิดขั้นต้น 30 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อรวมทั้งกระบวนการทำแห้งใช้เวลานาน 40 ชั่วโมง

คำสำคัญ: วัคซีนฝีดาษไก่ การทำแห้ง ขวดขนาด 3 มล.

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคฝีดาษไก่เกิดจากเชื้อ fowl pox virus มีการระบาดโดยทั่วไป อาการที่พบจะแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ cutaneous formation เกิดตุ่มแผลพุพองบริเวณผิวหนังไก่และ diphtheritic formation เกิดเป็นตุ่มแผลพุพองภายในระบบทางเดินอาหารและระบบหายใจ ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณการไข่ลดลงหากรุนแรงอาจตายได้ (Office International des Epizooties, OIE, 2004b)

กรมปศุสัตว์ ได้เริ่มดำเนินการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ เมื่อ พ.ศ. 2496 โดยนำ vaccine seed virus Weybridge strain ทำการผลิตเป็นวัคซีนทำแห้งบรรจุในหลอดแก้ว (ampule) ปีแรกผลิตได้จำนวน 40,000 โด๊ส ต่อมาได้พัฒนาเป็นขวดแก้วขนาด 5 มล. บรรจุ 1 มล. จนถึง พ.ศ. 2541 ได้สร้างโรงงานผลิตวัคซีนสัตว์ปีกใหม่เพื่อผลิตวัคซีนตามมาตรฐาน good manufacturing practice (GMP) และพัฒนายอดการผลิตให้สูงขึ้นซึ่งผลิตวัคซีนทำแห้งด้วยขวดขนาด 3 มล. พร้อมทั้งเครื่องจักรอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ สำหรับขวดขนาด 3 มล. การผลิตในโรงงานใหม่สามารถผลิตวัคซีนได้หลายชนิดรวมทั้งวัคซีนฝีดาษไก่ ดังนั้นต้องเปลี่ยนขนาดบรรจุของวัคซีนฝีดาษไก่ เป็นขวดขนาดบรรจุ 3 มล. เพื่อสามารถผลิตในโรงงานใหม่ได้

การทำแห้งเป็นขบวนการระเหยน้ำที่อยู่ในสารละลายเย็นแข็งให้กลายเป็นไอ ภายใต้สภาพความดันที่เหมาะสมโดยไม่ผ่านสถานะของเหลวหรือเรียกว่าวิธีการระเหิด (sublimation) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน (Heto-holten Industrial Group, 1998) คือระยะแรกทำให้สารละลายเย็นแข็ง (pre-freeze) ที่อุณหภูมิเย็นจัด (-40° C) จากการสัมผัสกับผิวหน้าที่เย็นจัดในอัตราการลดลง 0.1-2° C ต่อนาที ของแข็งที่ได้จะมีผลึกโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้ช่องว่างระหว่างโมเลกุล (lattice) ใหญ่และสะดวกต่อการระเหิด และระยะที่สองการระเหิดขั้นต้น (primary drying) คือการให้ความร้อนกับวัตถุเย็นแข็งในปริมาณสูงที่สุดที่วัตถุเย็นแข็งจะยอมรับได้โดยไม่ทำให้เกิดการละลายภายใต้ความดันที่เหมาะสม ส่วนระยะที่สามการระเหิดขั้นสุดท้าย (final drying) คือการกำจัดน้ำที่อยู่ในช่องเล็กๆ (crystallic bounded water) ออกให้หมด ขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อความชื้นของวัคซีน คือการระเหิดขั้นต้น ซึ่งจะเกิดการระเหิดของน้ำที่อยู่ในวัคซีน (ฉาย, 2539)

การทำแห้งวัคซีนนิวคาสเซิลและวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ซึ่งบรรจุปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. ใช้เวลาทำแห้งรวม 30 ชั่วโมง แบ่งเป็นระยะทำให้สารละลายเย็นแข็ง 4 ชั่วโมง ระยะระเหิดขั้นต้น 20 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้าย 6 ชั่วโมง ซึ่งส่วนประกอบของสต๊อกวัคซีนของทั้งสองวัคซีนเป็น allantoic fluid ของไข่ไก่ฟัก แต่สต๊อกวัคซีนของวัคซีนฝีดาษไก่เป็น chorioallantoic membranes (CAM) ซึ่งต้องนำมา homogenize กับ phosphate buffered saline (PBS) จากนั้น centrifuge ให้ตกตะกอน ใช้ส่วนใสเป็น antigen เพื่อเตรียมส่วนผสมวัคซีน จึงมีความแตกต่างจากส่วนผสมวัคซีนสองชนิดแรก ดังนั้นก่อนการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ในขวดขนาด 3 มล. จึงต้องมีการศึกษาระยะเวลาการทำแห้งก่อนเพื่อไม่ให้เกิดการเสียหายแก่วัคซีน

จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาโปรแกรมทำแห้งที่เหมาะสมของการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่เมื่อบรรจุขวด 3 มล. ปริมาตร 1 มล. ภายในโรงงานผลิตวัคซีนสัตว์ปีก สำหรับผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ของกรมปศุสัตว์เพื่อได้มาตรฐาน (ASEAN Secretariat, 1998; OIE, 2004b)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม fowl pox antigen

นำไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) อายุ 11-12 วัน ทำการฉีด seed fowl pox virus เข้าใน artificial air sac (OIE, 2004b) จากนั้นฟักไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 66-70 % ครบ 24 ชั่วโมง ส่องและคัดไข่ตายออกทุกวัน จนครบ 5 วัน จึงนำไข่ที่เหลือทำการเก็บ CAM และทดสอบ sterility ก่อนนำมาปั่นให้ละเอียดด้วย homogenizer นำไป centrifuge แยกส่วนใสซึ่งเป็น antigen มาทดสอบ sterility

การผสมวัคซีน

ผสมวัคซีนปริมาตร 900 มล. โดยนำ antigen ผสมกับ stabilizer (0.3% polyvinylpyrolidone และ 10% lactose) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็นน้ำวัคซีนพร้อมบรรจุ จากนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วนๆ ละ 300 มล. สำหรับทำแห้ง โปรแกรมที่ใช้ระยะเวลาระเหิดขั้นต้น 20, 25 และ 30 ชั่วโมง

การบรรจุวัคซีน

ใช้ขวด 3 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการบรรจุวัคซีนลงขวดละ 1 มล. พร้อมปิดจุกยางเพื่อทำแห้ง บรรจุครั้งละ 300 ขวด รวม 3 ครั้ง เพื่อเข้าเครื่องทำแห้งแต่ละโปรแกรม

การทำแห้งวัคซีน

ใช้เครื่องทำแห้ง[1] ทำแห้งวัคซีน 3 ครั้ง โดยใช้โปรแกรมที่มีระยะการระเหิดขั้นต้น 20, 25 และ 30 ชั่วโมง เป็นโปรแกรมที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ทุกโปรแกรมมีระยะ pre-freeze นาน 4 ชั่วโมง และระยะ final drying นาน 6 ชั่วโมง เท่ากัน

การทดสอบวัคซีน

1. การตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป โดยการดูลักษณะเนื้อวัคซีนในขวดต้องมีเนื้อฟูเป็นเค้ก (cake) รูปร่างสม่ำเสมอตามมาตรฐาน ASEAN Secretariat (1998)
2. การทดสอบหาปริมาณความชื้นโดย Karl Fischer's method โดยต้องมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 4% ตามมาตรฐาน Council of Europe (2005b)
3. ทดสอบหาปริมาณไวรัสโดย titration technique โดยต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{2.0}$ EID_{50}/dose ตามมาตรฐาน Council of Europe (2005a)
4. ทดสอบหาความคงตัวของวัคซีน (stability) ของวัคซีนด้วยการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 37°C (OIE, 2004a) นาน 7, 14 และ 21 วัน แล้วนำมาหาปริมาณไวรัสโดย titration technique

การสุ่มตัวอย่างวัคซีน

สุ่มตัวอย่างจาก 3 โปรแกรมๆ ละ 35 ขวดเพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณความชื้นและปริมาณไวรัสอย่างละ 10 ขวด ส่วนอีก 15 ขวด นำไปทดสอบหาความคงตัวของวัคซีน

---

[1]Heto-holten, Germany

ผล

ผลการตรวจคุณสมบัติทั่วไป

โปรแกรมที่ 1 วัคซีนสำเร็จรูปทั้ง 300 ขวด พบว่าเป็นเนื้อเค้กสม่ำเสมอผ่านการทดสอบจำนวน 38 ขวด คิดเป็น 12.6% (ภาพที่ 4) ส่วนวัคซีนที่เหลือมีลักษณะเป็นฟองอากาศอยู่ในก้อนวัคซีนและมีการฝ่อของวัคซีนที่ก้นขวดเป็นร่องลึก (ภาพที่ 1)

โปรแกรมที่ 2 วัคซีนสำเร็จรูป 300 ขวด พบว่าเป็นเนื้อเค้กสม่ำเสมอผ่านการทดสอบจำนวน 190 ขวด คิดเป็น 63.3% (ภาพที่ 4) ส่วนที่เหลือพบลักษณะที่มีฟองอากาศเพียงเล็กน้อยภายในเนื้อวัคซีนและพบการฝ่อที่ก้นขวดเป็นร่องลึกคล้ายกับโปรแกรมที่ 1 (ภาพที่ 2)

โปรแกรมที่ 3 วัคซีนสำเร็จรูปทั้ง 300 ขวด ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทั่วไปโดยเนื้อวัคซีนทุกขวด เป็นเนื้อเค้กสม่ำเสมอ (ภาพที่ 3) คิดเป็น 100% (ภาพที่ 4)

ผลการทดสอบความชื้น

การทำแห้งวัคซีนฝีดาษไก่ปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. โดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 20, 25 และ 30 ชั่วโมง พบว่ามีความชื้นระหว่าง 4.6-5.9% (เฉลี่ย 5.08%), 3.0-4.2% (เฉลี่ย 3.63%) และ 3.0-3.5% (เฉลี่ย 3.21%) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการหาปริมาณไวรัส

การหาปริมาณไวรัสของวัคซีนฝีดาษไก่หลังจากการทำแห้งปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. โดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 20, 25 และ 30 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณไวรัสเท่ากันคือ $10^{2.6}$ 50% egg infection dose per dose (EID_{50}/dose)

ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน

เมื่อทดสอบความคงตัวของวัคซีนฝีดาษไก่หลังจากการทำแห้งที่ใช้ระยะระเหิดขั้นต้น 20, 25 และ 30 ชั่วโมง ด้วยการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7, 14 และ 21 วัน แล้วนำไปหาปริมาณไวรัส พบว่าระยะระเหิดขั้นต้น 20 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{2.02}$, $10^{2.0}$ และ $10^{1.56}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ ส่วนระยะระเหิดขั้นต้น 25 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{2.2}$, $10^{1.98}$ และ$10^{1.54}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ สำหรับระยะระเหิดขั้นต้น 30 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{2.02}$, $10^{1.6}$ และ $10^{0.62}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุป

การทำแห้งวัคซีนฝีดาษไก่ปริมาตร 1 มล. ในขวดขนาด 3 มล. โดยใช้ระยะระเหิดขั้นต้น 30 ชั่วโมงจะได้วัคซีนที่ไม่ฝ่อ คือคุณสมบัติทั่วไปภายนอกของเนื้อวัคซีนเป็นเนื้อเค้กสม่ำเสมอ 100% ส่วนที่ใช้โปรแกรมระยะระเหิดขั้นต้น 20 และ 25 ชั่วโมง ได้วัคซีนไม่ฝ่อเพียง 12.6% และ 63.3% ตามลำดับ ซึ่งไม่ผ่านมาตรฐาน

คุณสมบัติทั่วไป โดยคุณสมบัตินี้เป็นมาตรฐานสำคัญของวัคซีนทำแห้งทุกชนิดถ้าผลการตรวจข้อนี้ไม่ผ่านมาตรฐานแล้วการตรวจสอบข้ออื่นไม่ต้องปฏิบัติ

การทดสอบหาความชื้น พบว่าการใช้เวลาระเหิดขั้นต้นนานขึ้นทำให้วัคซีนมีความชื้นน้อยลงในโปรแกรมที่ใช้เวลาระเหิด 25 ชั่วโมง มีความชื้นเฉลี่ย 3.63% และ 30 ชั่วโมง มีความชื้นเฉลี่ย 3.21% ซึ่งทั้งสองโปรแกรมมีความชื้นต่ำกว่า 4% ผ่านมาตรฐาน (ASEAN Secretariat, 1998) แต่โปรแกรมที่ใช้ระยะระเหิดขั้นต้น 20 ชั่วโมง จะมีความชื้นเฉลี่ย 5.08% ไม่ผ่านมาตรฐาน เนื่องจากส่วนผสมวัคซีนฝีดาษไก่มีคุณสมบัติของเหลวข้นกว่าส่วนผสมวัคซีนนิวคาสเซิลและวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่เป็นของเหลวใสซึ่งจะระเหิดง่ายกว่า

การทดสอบหาปริมาณไวรัส พบว่า วัคซีนสำเร็จรูปทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาณไวรัสตั้งต้นเท่ากัน คือ $10^{2.6}$ EID_{50}/dose เนื่องจากเป็นวัคซีนชุดเดียวกัน เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของวัคซีนด้วยการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 37° C (OIE, 2004a) นาน 7, 14 และ 21 วัน แล้วนำไปหาปริมาณไวรัส พบว่าภายหลังเก็บรักษานาน 7 วัน วัคซีนที่ทำแห้งโดยใช้ระยะระเหิดขั้นต้น 20, 25 และ 30 ชั่วโมง จะมีปริมาณไวรัสเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ $10^{2.02}$, $10^{2.2}$ และ $10^{2.02}$ EID_{50}/dose แต่เมื่อเก็บนาน 14 วัน ปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{2.0}$, $10^{1.98}$ และ$10^{1.6}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ และเก็บนาน 21 วัน มีปริมาณไวรัสเฉลี่ย $10^{1.56}$, $10^{1.54}$ และ $10^{0.62}$ EID_{50}/dose ตามลำดับ พบว่าระยะเวลาในการระเหิดขั้นต้นมีความสัมพันธ์กับความคงตัวของวัคซีนทำแห้งโดยวัคซีนที่ใช้เวลานานจะมีปริมาณไวรัสลดลงมากกว่า

การศึกษาครั้งนี้พบว่า โปรแกรมทำแห้งที่เหมาะสมของการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่เมื่อบรรจุขวด 3 มล. ปริมาตร 1 มล. ภายในโรงงานผลิตวัคซีนสัตว์ปีก คือโปรแกรมทำแห้งที่มีระยะทำให้สารละลายเย็นแข็ง 4 ชั่วโมง ระยะการระเหิดขั้นต้น 30 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้าย 6 ชั่วโมง รวม 40 ชั่วโมง ซึ่งทำให้วัคซีนมีคุณสมบัติทั่วไปเป็นก้อนเค้กสม่ำเสมอมีความชื้นน้อยกว่า 4% ได้ตามมาตรฐาน มีปริมาณไวรัสขั้นต้นและความคงตัวที่อุณหภูมิ 37° C นาน 7 วันผ่านเกณฑ์มาตรฐานขั้นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.อารี ทรัพย์เจริญ สพ.ญ. กมลทิพย์ ธัญพิมล น.สพ. พรชัย ศรีดามา นายประภูศักดิ์ ภักดีมี และนางสาว อารีรัตน์ พิศาลสุขสกุล รวมทั้งเจ้าหน้าที่หน่วยผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ หน่วยบรรจุวัคซีน และหน่วยทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีกทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ฉาย จอมเกาะ. 2539. การทำแห้ง. เอกสารเผยแพร่งานทางวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ เล่มที่ 2. หน้า 310-331.

ASEAN Secretariat. 1998. General requirements for veterinary vaccines. In: Manual of ASEAN Standards for Animal Vaccines, 2nd edition. Jakarta, Indonesia. p. 112.

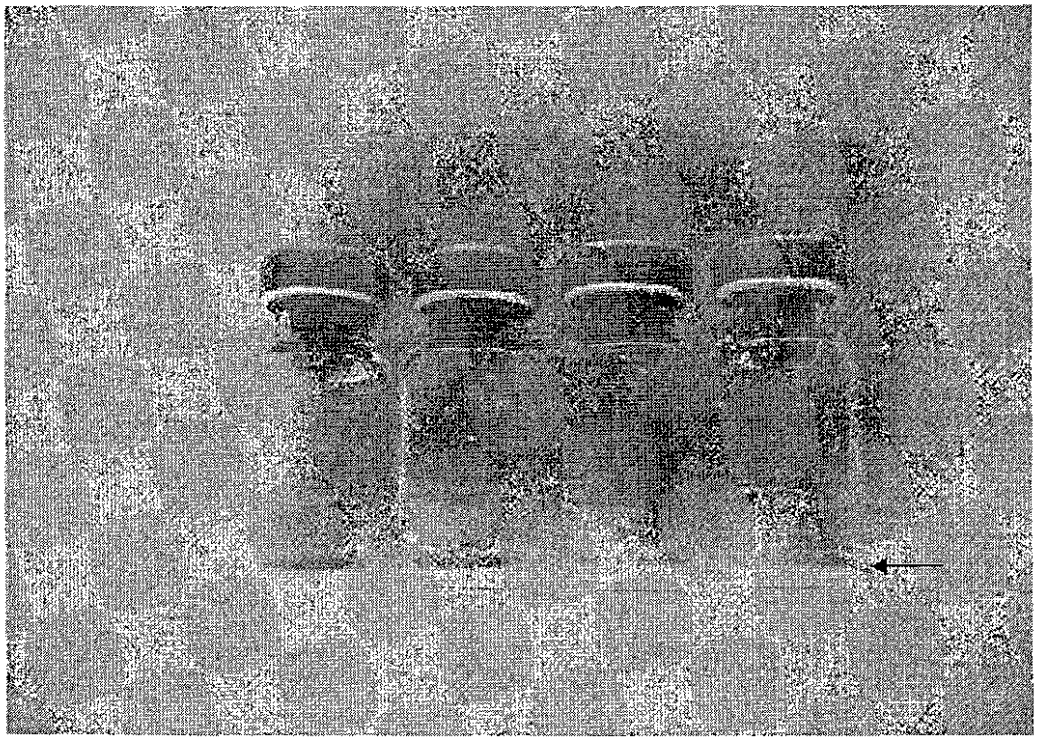
Council of Europe. 2005a. Fowl pox: Titration. In: European pharmacopoeia, 5th edition. Aubin, Liguge, France. pp. 766-767.

Council of Europe. 2005b. Water: Semimicro determination. In: European pharmacopoeia, 5th edition. Aubin, Liguge, France. pp. 130-131.

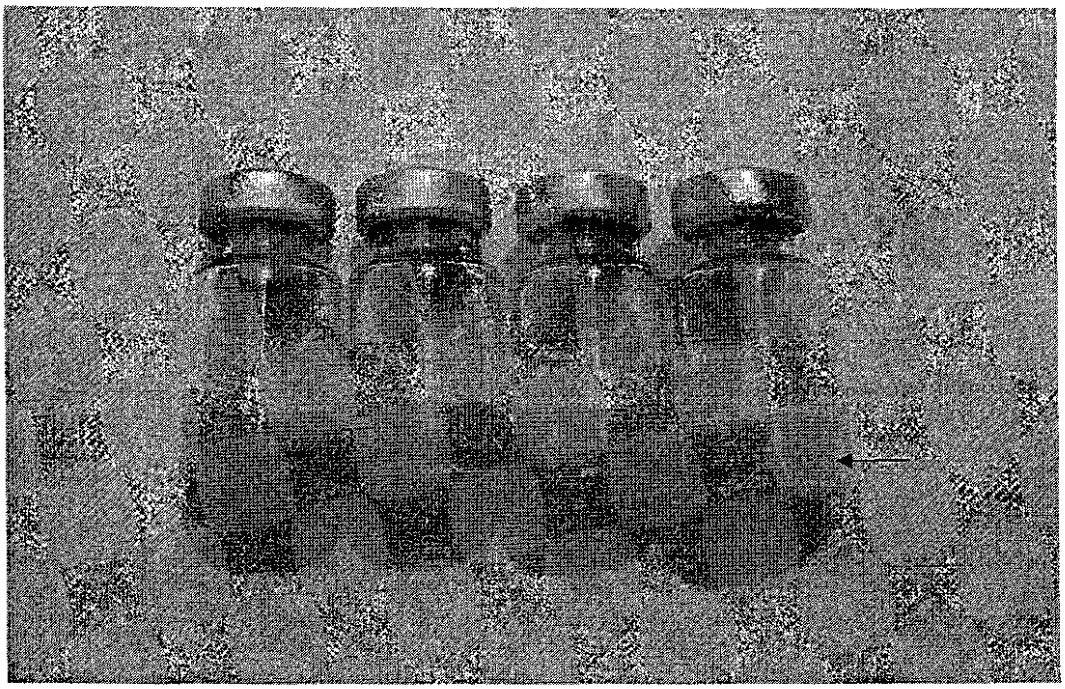
Heto-Holten Industrial Group. 1998. A brief description of the freeze drying process. In: Instruction manual for freeze dryer FD 150-12, 96-S-2RS-Allerd, Denmark. pp. 1-5.

Office International des Epizooties. 2004a. Fowl pox. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition. Office International des Epizooties. Paris, France. pp. 1-10.

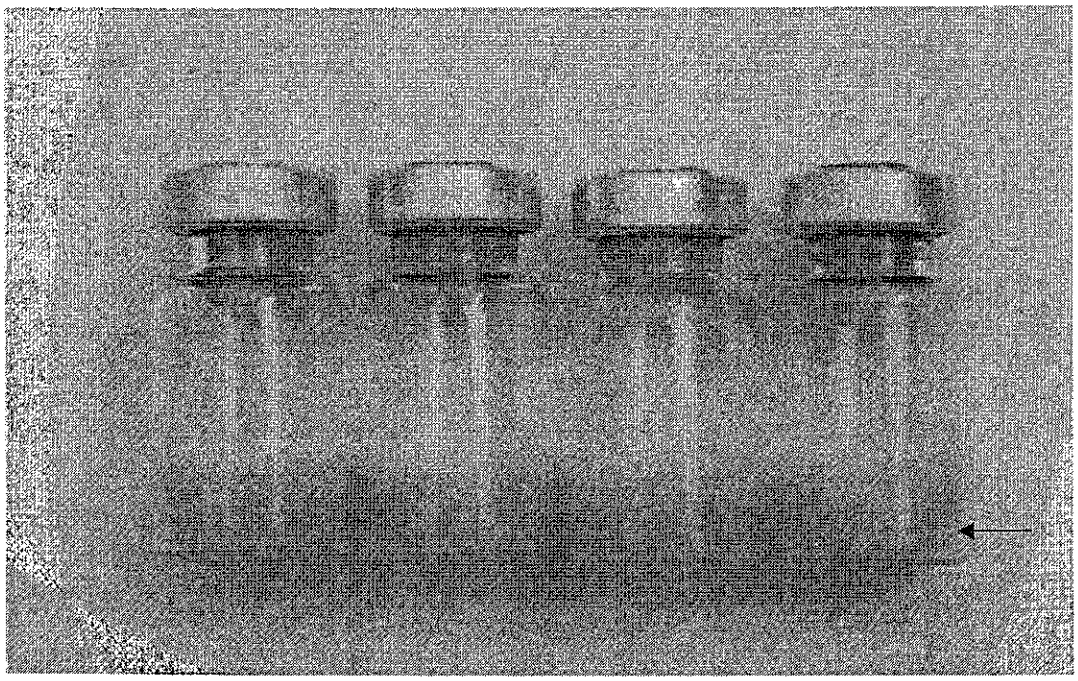
Office International des Epizooties. 2004b. Principles of veterinary vaccine production. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition. Office International des Epizooties. Paris, France. pp. 1-20.



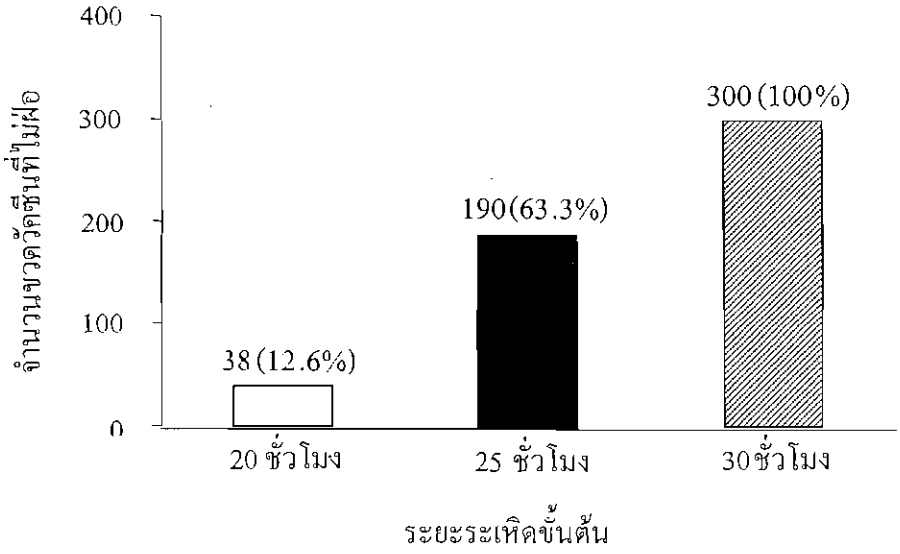
ภาพที่ 1 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของเนื้อวัคซีนฝีดาษไก่หลังจากการทำแห้งโดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 20 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของเนื้อวัคซีนฝีดาษไก่หลังจากการทำแห้งโดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 25 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของเนื้อวัคซีนฝีดาษไก่หลังจากการทำแห้งโดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 30 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 แสดงจำนวนขวดวัคซีนฝีดาษไก่สำเร็จรูปที่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป (ไม่ฝอ) เมื่อทำแห้งที่ใช้ระยะระเหิดขั้นต้นนาน 20, 25 และ 30 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบหาความชื้นของวัคซีนฝีดาษไก่เมื่อทำแห้งโดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 20, 25 และ 30 ชั่วโมง

การทำแห้งระยะระเหิดขั้นต้นนาน	ความชื้นของวัคซีนสำเร็จรูปขวดที่										ค่าเฉลี่ย % ความชื้น
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
20 ชั่วโมง	5.9	4.6	5.6	5.0	4.8	5.0	4.9	5.2	5.0	4.8	5.08
25 ชั่วโมง	3.5	3.6	4.0	4.1	3.5	3.0	4.2	3.5	3.4	3.5	3.63
30 ชั่วโมง	3.3	3.3	3.2	3.0	3.5	3.1	3.2	3.3	3.0	3.2	3.21

ตารางที่ 2 ปริมาณไวรัสของวัคซีนฝีดาษไก่สำเร็จรูปที่ได้จากการทำแห้งที่มีระยะการระเหิดขั้นต้นนาน 20, 25 และ 30 ชั่วโมง ด้วยการเก็บวัคซีนที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 7, 14 และ 21 วัน

การทำแห้ง ระยะการระเหิดขั้นต้นนาน	ปริมาณไวรัส (EID_{50}/dose) ภายหลังเก็บรักษาที่ 37°C																	
	7 วัน						14 วัน						21 วัน					
	1	2	3	4	5	เฉลี่ย	1	2	3	4	5	เฉลี่ย	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
20 ชั่วโมง	$10^{2.0}$	$10^{2.1}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.02}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{1.6}$	$10^{1.5}$	$10^{1.7}$	$10^{1.4}$	$10^{1.6}$	$10^{1.56}$
25 ชั่วโมง	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{2.0}$	$10^{1.9}$	$10^{2.0}$	$10^{1.98}$	$10^{1.6}$	$10^{1.4}$	$10^{1.6}$	$10^{1.6}$	$10^{1.5}$	$10^{1.54}$
30 ชั่วโมง	$10^{2.0}$	$10^{2.1}$	$10^{2.0}$	$10^{2.02}$	$10^{2.0}$	$10^{2.02}$	$10^{1.6}$	$10^{1.6}$	$10^{1.6}$	$10^{1.7}$	$10^{1.5}$	$10^{1.6}$	$10^{0.6}$	$10^{0.6}$	$10^{0.6}$	$10^{0.6}$	$10^{0.7}$	$10^{0.62}$

Freeze-drying of fowl pox vaccine in 3 ml vials

Surapat Laohawanich[1] Anan Thaopech[1]

Abstract

An experiment on three freeze-drying programs of fowl pox vaccine filled in 3 ml bottles by varying the primary drying's time to 20, 25 and 30 hours with pre-freeze time of 4 hours and final drying time of 6 hours was carried out. The percentage of finished vaccine that passed property test was 12.6, 63.3 and 100, respectively; moisture test was 5.08, 3.63 and 3.21, respectively. Virus titration of three programs was equal at $10^{2.6}$ 50% egg infection dose per dose (EID_{50}/dose). Stability test in 37° C on day 7, 14 and 21 was $10^{2.02}$, $10^{2.0}$, $10^{1.56}$ EID_{50}/dose, $10^{2.2}$, $10^{1.98}$, $10^{1.54}$ EID_{50}/dose, $10^{2.02}$, $10^{1.6}$, $10^{0.62}$ EID_{50}/dose respectively.

Key words: Fowl pox vaccine, Freeze-drying, 3 ml vials

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

ไวรัสไตเตอร์ของวัคซีนกาฬโรคเป็ดหลังกรองด้วยที่กรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมครอน

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล[1] กัญญา สุวินทรากร[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาไวรัสไตเตอร์ของวัคซีนกาฬโรคเป็ดจำนวน 5 ชุด หลังกรองด้วยที่กรองขนาด 0.2 ไมครอนและ 0.45 ไมครอน โดยนำน้ำสต๊อคไวรัสวัคซีนมาปั่นตกตะกอนก่อนกรองและหาปริมาณไวรัสก่อน หลังตกตะกอน และหลังกรองที่ 0.2 และ 0.45 ไมครอน พบว่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 6.23, 6.16, 4.84 และ 5.87 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) ต่อมล. ตามลำดับ ซึ่งการกรองที่ 0.45 ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการผลิต (ไม่น้อยกว่า 5.7 log $TCID_{50}$/ml) แต่ไม่สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้

คำสำคัญ: วัคซีนกาฬโรคเป็ด ไวรัสไตเตอร์ การกรอง

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

วัคซีนกาฬโรคเป็ดที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนไวรัสเชื้อเป็น สเตรน Jansen ชนิด ทิชชูคัลเจอร์ การผลิตวัคซีนจะเพาะเลี้ยงไวรัสใน chicken embryo fibroblast (CEF) ที่เพาะจนเต็มในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วเป็นเวลา 2 วัน จนเกิด cytopathic effect (CPE) เก็บไวรัสโดยวิธีแช่แข็งแล้วละลายเป็นน้ำสต๊อควัคซีน มาตรฐานปริมาณไวรัสของวัคซีนกาฬโรคเป็ดสำเร็จรูปที่กำหนดไว้ ต้องไม่น้อยกว่า 5.5 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/ml หรือ 3.5 log $TCID_{50}$/dose (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) สำหรับน้ำสต๊อควัคซีนก่อนผสมสเตบิไลเซอร์ทำเป็นวัคซีนแห้งสำเร็จรูป งานผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้กำหนดปริมาณไวรัสต้องไม่น้อยกว่า 5.7 log $TCID_{50}$/ml อนึ่งการเพาะไวรัสใน CEF ต้องใช้ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 225 ซม.^{2} จำนวนครั้งละประมาณ 200 ขวด ทำให้มีขั้นตอนมากและใช้เวลานานมีโอกาสที่จะทำให้มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ถ้าสามารถกรองน้ำสต๊อควัคซีนก่อนนำมาใช้โดยให้มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.7 log $TCID_{50}$/ml เพียงพอจะทำให้วัคซีนมีมาตรฐานและลดความสูญเสียลงได้

จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อกรองน้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ดด้วยที่กรองขนาด 0.2 ไมครอน และ 0.45 ไมครอน แล้วหาปริมาณไวรัสเพื่อศึกษาผลว่าหลังจากกรองแล้วสามารถนำมาใช้ผลิตวัคซีนสำเร็จรูปได้หรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ด

จำนวน 5 ชุด ชุดละ 1,500 มล. ปั่นให้ตกตะกอนที่ 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส แบ่งเป็นสองส่วน กรองโดยเครื่องกรองแบบกระดาษ ขนาด 293 มม. ขนาดรูกรอง 0.2 และ 0.45 ไมครอน เก็บตัวอย่างวัคซีนแต่ละชุดประกอบด้วย ก่อนปั่นตกตะกอน หลังปั่นตกตะกอน ภายหลังกรองด้วย 0.45 ไมครอน และภายหลังกรองด้วย 0.2 ไมครอน เก็บที่ -40 °C

การหาปริมาณไวรัส

นำตัวอย่างน้ำสต๊อควัคซีนจำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ทำการไตเตรตแบบ ten-fold dilution 10^{-1}-10^{-6} แล้วเพาะลงในไมโครเพลท 96 หลุม ที่เลี้ยง CEF มาแล้ว 3 วัน จากนั้นเพาะในตู้ 5% CO_2 incubator ที่ 37° C นาน 5 วัน อ่านผลการเกิด CPE คำนวณหาปริมาณไวรัส (Reed and Muench, 1938)

ผล

น้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ดจำนวน 5 ชุด ค่าปริมาณไวรัส 5.7-6.55 log $TCID_{50}$/ml เฉลี่ย 6.23 log $TCID_{50}$/ml หลังปั่นตะกอนที่ 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ย 6.16 log $TCID_{50}$/ml หลังกรองที่ 0.45

ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ย 5.87 log $TCID_{50}$/ml ลดลงเฉลี่ย 0.3 log $TCID_{50}$/ml และหลังกรองที่ 0.2 ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ย 4.84 log $TCID_{50}$/ml ลดลงเฉลี่ย 1.34 log $TCID_{50}$/ml เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสต๊อควัคซีนก่อนกรอง ตามตารางที่ 1

วิจารณ์และสรุป

น้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ดปั่นตกตะกอนที่ 1,000 รอบ/นาที 10 นาที ซึ่งการปั่นตกตะกอนจะกำจัดกากเซลล์และลดการการอุดตันของกระดาษกรอง ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยหลังตกตะกอนจะไม่แตกต่างกับน้ำวัคซีนก่อนปั่นตกตะกอน และเมื่อกรองที่ 0.45 ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสจะลดลงโดยเฉลี่ย 0.3 log $TCID_{50}$/ml แต่มี 2 ชุดที่ค่าปริมาณไวรัสลดลงมากถึง 0.5 log $TCID_{50}$/ml ไวรัสกาฬโรคเป็ดอยู่ใน family *Herpesviridae* โดยทั่วไปแล้วอนุภาคไวรัสจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 102-200 นาโนเมตร (0.102-0.20ไมครอน) (พิไลพันธ์ และคณะ, 2540) Sandhu and Leibovitz (1997) พบว่าไวรัสกาฬโรคเป็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 126-129 นาโนเมตร (0.126-0.129ไมครอน) และอนุภาคที่ใหญ่ที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 156-384 นาโนเมตร (0.156-0.384 ไมครอน) ถ้าพิจารณาจากขนาดไวรัสแล้วสามารถผ่านกระดาษกรองที่ 0.45 ไมครอน ได้เกือบทั้งหมด ส่วนการกรองที่ 0.2 ไมครอน ปริมาณไวรัสจะลดลงเฉลี่ย 1.34 log $TCID_{50}$/ml ซึ่งก็สอดคล้องกับขนาดไวรัสที่จะมีบางส่วนที่ขนาดใหญ่กว่า 0.2 ไมครอน ที่ไม่สามารถผ่านรูกรองไปได้ อย่างไรก็ตามไวรัสบางส่วนอาจถูกดูดซับด้วยกระดาษกรองเพราะว่ากระดาษกรองที่ใช้กรองไวรัสต้องผ่านกระบวนการเคลือบด้วยสารที่ช่วยลดการดูดซับไวรัส (Ver et al., 1968) มาตรฐานปริมาณไวรัสของวัคซีนกาฬโรคเป็ดสำเร็จรูปทำแห้งที่กำหนดไว้ต้องไม่น้อยกว่า 5.5 log $TCID_{50}$/ml หรือ 3.5 log $TCID_{50}$/dose (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) ดังนั้นน้ำสต๊อควัคซีนก่อนที่จะผสมสเตบิไลเซอร์ต้องมีปริมาณไวรัสมากกว่า 5.5 log $TCID_{50}$/ml ซึ่งงานผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้กำหนดปริมาณไวรัสต้องไม่น้อยกว่า 5.7 log $TCID_{50}$/ml จะเห็นได้ว่าหลังกรองที่ขนาด 0.45 ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ย 5.87 log $TCID_{50}$/ml อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อกรองที่ 0.2 ไมครอน ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ย 4.84 log $TCID_{50}$/ml ต่ำกว่าค่าปริมาณไวรัสที่งานผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้กำหนดไว้

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้การปั่นตกตะกอนเพื่อลดกากเซลล์ในกระบวนการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้ ส่วนการกรองน้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ดด้วยที่กรองขนาด 0.45 ไมครอน มีปริมาณไวรัสอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ไม่สามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ และการกรองที่ขนาด 0.2 ไมครอนสามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้เกือบทั้งหมดยกเว้น มัยโคพลาสมา (Mckane and Kandel, 1996) แต่จะได้ค่าไวรัสต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และพนักงานฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด และฝ่ายทดสอบวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด ที่ช่วยในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ ชโลบล อยู่สุข บุญยศ เรืองสกุลราช และวรรณี กัณฐกมาลากุล. 2540. การจำแนกไวรัส. ไวรัสวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์อักษรสมัย. กรุงเทพฯ. หน้า 2.1-2.9.

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์. 2530. มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดทำแห้ง (Minimum requirements for duck plague vaccine, freeze dried). กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์. หน้า 1-3.

Mckane, L. and Kandel, J. 1996. Control of microorganism. In: Microbiology essential and applications, 2nd ed. Mcgraw-Hill. New York. pp. 348-374.

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

Sandhu, T. and Leibovitz, L. 1997. Duck virus enteritis (Duck Plague). In: Diseases of poultry, 10th ed. Calnek, B.W. ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 675-683.

Ver, B.A., Melnick, J. L. and Walls, C. 1968. Efficient filtration and sizing of viruses with membrane filters. J. Virol. 2: 21-25.

ตารางที่ 1 ค่าไวรัสไตเตอร์ของน้ำสต๊อควัคซีนกาฬโรคเป็ดภายหลังกรองด้วยที่กรองขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.2 ไมครอน

น้ำสต๊อควัคซีน (ชุด)	ปริมาณไวรัส (log $TCID_{50}$/ml) ของน้ำวัคซีนกาฬโรคเป็ด						
	ก่อนปั่นตะกอน	หลังปั่นตกตะกอน		หลังกรองขนาด 0.45 ไมครอน		หลังกรองขนาด 0.2 ไมครอน	
		ปริมาณไวรัส	ปริมาณไวรัสที่ลดลง	ปริมาณไวรัส	ปริมาณไวรัสที่ลดลง	ปริมาณไวรัส	ปริมาณไวรัสที่ลดลง
9/48	5.70	5.70	0	5.66	0.12	4.66	1.14
11/48	6.05	5.70	0.35	5.55	0.15	4.30	1.40
12/48	6.30	6.30	0	5.80	0.50	5.30	1.00
2/49	6.55	6.55	0	6.30	0.25	4.90	1.65
19/49	6.55	6.55	0	6.05	0.50	5.05	1.50
ค่าเฉลี่ย	6.23	6.16	0.07	5.87	0.30	4.84	1.34

The virus titers of duck plague vaccine after filtration with 0.2 μm and 0.45 μm membrane filters

Tawatchai Patchanukool[1] Kunya Suvintarakorn[1]

Abstract

Five batches of duck plague vaccine were studied for virus titers after filtration with two different pore-size membrane filters, 0.2 μm and 0.45 μm. The harvested vaccine viruses were centrifuged. The supernatant was filtrated with, 0.2 μm and 0.45 μm membrane filters separately and determined for virus titers at each step. It was found that average virus titers of stock vaccine viruses before and after centrifugation were 6.23 and 6.16 log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/ml, respectively. After passing through 0.2 μm and 0.45 μm membrane filters, average virus titers were 4.84 and 5.87 log $TCID_{50}$/ml, respectively. This indicated that the filtration using 0.45 μm membrane filter resulted vaccine viruses at the amount of minimum standard requirement (at least 5.7 log $TCID_{50}$/ml). However, it was unable to reduce bacterial contamination of the vaccine.

Key words: Duck plague vaccine, Virus titer, Filtration

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

ประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดเมื่อใช้โด๊ส ขนาด 0.5 มล. ที่มีปริมาณไวรัส $10^{3.5}$ $TCID_{50}$

ธวัชชัย ปัจฉานุกูล[1] นพคุณ มูลสิน[1]
พิงพันธ์ เจริญสุระสถล[1] กัญญา สุวินทรากร[1]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ดโดยการฉีดวัคซีนขนาด 0.5 มล./โด๊ส เปรียบเทียบกับขนาด 1 มล./โด๊ส ซึ่งแต่ละขนาดมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/dose ในเป็ดพันธุ์กากีแคมเบลล์ จากการฉีดวัคซีนครั้งเดียวหาความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อพิษทับในขนาดไม่ต่ำกว่า 10^5 50% duck lethal dose (DLD_{50}) ต่อโด๊ส ในทุกๆ เดือนจากเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 12 เก็บซีรัมก่อนฉีดเชื้อพิษทับเพื่อตรวจหาค่าระดับแอนติบอดีด้วยวิธี virus neutralization พบว่าเป็ดที่ฉีดวัคซีนทั้งสองกลุ่มให้ความคุ้มโรค 90-100% ส่วนค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในเป็ดกลุ่มฉีดวัคซีนทั้งสองกลุ่มมีค่า 4-7.5 log_2 ดังนั้นการใช้วัคซีนขนาด 0.5 มล./โด๊ส ให้ความคุ้มโรคที่ไม่แตกต่างกับใช้วัคซีนขนาด 1 มล./โด๊ส

คำสำคัญ: วัคซีนกาฬโรคเป็ด ประสิทธิภาพ 0.5 มล./โด๊ส

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคกาฬโรคเป็ด (duck plague หรือ duck virus enteritis) เป็นโรคติดเชื้อที่มีความสำคัญ ในสัตว์ปีกตระกูล เป็ด ห่าน และหงส์ เกิดจากเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส (Sandhu and Leibovitz, 1997) มีลักษณะเฉพาะคือ มีการระบาดอย่างรวดเร็วจะแสดงอาการหลังจากได้รับเชื้อ ประมาณ 3 - 4 วัน เป็ดจะมีอาการอ่อนแอและอุจจาระร่วง ซึม เบื่ออาหาร กระหายน้ำ มีอาการทางประสาท กลัวแสง โรคจะดำเนินไป 1 - 3 วันก่อนที่จะตาย อัตราการตาย 78-100 % โรคนี้ระบาดในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2519 (เชิดชัย, 2529)

วัคซีนกาฬโรคเป็ดที่กรมปศุสัตว์ผลิต เป็นวัคซีนไวรัสเชื้อเป็น สเตรน Jansen ชนิดทิชชูคัลเจอร์ ทำแห้งบรรจุในขวดสุญญากาศ ขวดละ 200 โด๊ส ซึ่งเป็นเชื้อชนิดอ่อนไม่เป็นอันตรายต่อเป็ดที่ได้รับวัคซีน (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) การใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ดจะผสมวัคซีน 1 ขวด กับน้ำยาละลาย (0.85% NaCl) 200 มล. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 มล. แต่มีวัคซีนสัตว์ปีกหลายชนิดใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพียง 0.5 มล. เป็นวัคซีนของกรมปศุสัตว์ คือ วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตาย และกัมโบโรเชื้อตาย (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543) วัคซีนจากต่างประเทศ เช่น วัคซีนโรคไข่ลด และวัคซีนโรคหวัดหน้าบวม ซึ่งเป็นแนวทางการใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ดขนาด 0.5 มล. ถ้าปรับเปลี่ยนการใช้วัคซีนโดยผสมวัคซีน 1 ขวด กับน้ำยาละลาย 100 มล. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.5 มล. โดยมีปริมาณไวรัสวัคซีนต่อโด๊ส เท่ากับมาตรฐานคือไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ $TCID_{50}$ (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) แล้วประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการฉีดด้วยขนาด 1 มล./โด๊ส จะมีประสิทธิผลต่อการลดต้นทุนการผลิตน้ำยาละลาย การบรรจุ ลดแรงงาน สะดวกต่อการขนส่ง การผลิต และการใช้งาน

จุดประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาผลเปรียบเทียบการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดของกรมปศุสัตว์เข้ากล้ามเนื้อ โด๊สละ 0.5 มล. และ 1 มล. ที่มีปริมาณไวรัสเท่ากัน แล้วศึกษาประสิทธิภาพต่อความคุ้มโรคและระดับภูมิคุ้มกันนาน 12 เดือน

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

วัคซีนกาฬโรคเป็ดของกรมปศุสัตว์ ชุดที่ 9/47 ปริมาณไวรัส $10^{3.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส ขวดละ 200 โด๊ส จำนวน 2 ขวด พร้อมน้ำยาละลาย บรรจุ 200 มล. ต่อขวด

เชื้อพิษกาฬโรคเป็ด

จากฝ่ายทดสอบวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด ปริมาณไวรัส 10^5 50% duck lethal dose (DLD_{50})/มล. ขวดละ 1 มล. จำนวน 12 ขวด

เป็ดทดลอง

พันธุ์กากีแคมเบลล์ คละเพศ อายุ 7 สัปดาห์ จำนวน 300 ตัว

วิธีการ

1. แบ่งเป็ดทดลอง ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด ขนาด 1 มล./ตัว จำนวน 120 ตัว

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด ขนาด 0.5 มล./ตัว จำนวน 120 ตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม ทดสอบเชื้อพิษ จำนวน 60 ตัว

2. การใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ด

2.1 ขนาด 1 มล. : ละลายวัคซีน 1 ขวด ด้วยน้ำยาละลาย 1 ขวด (200 มล.) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็ดกลุ่มที่ 1 ทุกตัว ตัวละ 1 มล.

2.2 ขนาด 0.5 มล. : ละลายวัคซีน 1 ขวด ด้วยน้ำยาละลาย 100 มล. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็ดกลุ่มที่ 2 ทุกตัว ตัวละ 0.5 มล.

3. การหาประสิทธิภาพวัคซีน

3.1 หาความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อพิษทับ (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530)

แบ่งเป็ดจากกลุ่มที่ 1 และ 2 กลุ่มละ 10 ตัว ต่อครั้ง และกลุ่มควบคุม ครั้งละ 5 ตัว นำไปฉีดพิษทับขนาด 10^5 DLD_{50}/ml ตัวละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อ ภายหลังฉีดวัคซีนนาน 1-12 เดือน ทุกเดือนรวม 12 ครั้ง บันทึกข้อมูล

3.2 การหาระดับความคุ้มโรค

เจาะเลือดเป็ดเพื่อเก็บซีรัมก่อนฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด และก่อนฉีดเชื้อพิษทับทุกเดือน เพื่อหาค่าระดับแอนติบอดีด้วยวิธี virus neutralization (VN) (นรินทร์ และคณะ, 2544) โดยการอุ่นซีรัมที่อุณหภูมิ 56° C แล้วเก็บที่ -40° C นำซีรัมแต่ละตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเจือจางแบบ serial two-fold dilution ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:256 จากนั้นเติมไวรัสวัคซีนกาฬโรคเป็ดสเตรน Jansen ขนาด 100 $TCID_{50}$ 50 ไมโครลิตร ในทุกหลุมของซีรัมที่เจือจาง แล้วบ่มที่ 37° C นาน 1 ชั่วโมง โดยมีหลุมที่ใส่ไวรัสในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเพื่อเปรียบเทียบ หลังจากบ่มนำส่วนผสมของไวรัสกับซีรัมเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม อีกเพลทหนึ่งที่เพาะเลี้ยงเซลล์ chicken embryo fibroblast (CEF) ไว้แล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37° C CO_2 5% นาน 5 วัน นำมาตรวจ cytopathic effect (CPE) อ่านผลระดับความเจือจางมากสุดที่ไม่เกิด CPE

ผล

เมื่อทำการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดให้เป็ด 2 กลุ่มๆ ละ 120 ตัว กลุ่มแรกฉีดวัคซีนขนาด 1 มล. โดยละลายวัคซีน 1 ขวด ต่อน้ำยาละลาย 200 มล. กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนขนาด 0.5 มล. โดยละลายวัคซีน 1 ขวด ต่อน้ำยาละลาย 100 มล. ภายหลังฉีดวัคซีนทุกเดือน นาน 1-12 เดือน แบ่งเป็ดกลุ่มละ 10 ตัว ต่อครั้ง พร้อมกลุ่มควบคุมเพื่อหาประสิทธิภาพของวัคซีนโดยการฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าทั้ง 2 กลุ่มที่ฉีดวัคซีนขนาด 1 มล. และ 0.5 มล. ให้ความ

คุ้มโรคภายหลังรับวัคซีนนาน 1-12 เดือน อยู่ในช่วงระหว่าง 90-100% โดยที่กลุ่มควบคุมเชื้อพิษเป็ดทุกตัวตายด้วยโรคกาฬโรคเป็ดภายหลังฉีด 4-7 วัน ตามตารางที่ 1 ส่วนการหาระดับความคุ้มโรคทุกเดือน ภายหลังฉีดวัคซีนนาน 1 ถึง 12 เดือน พบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ย $\log_2$ VN titer เป็น 4.5-7.5 ตามตารางที่ 2

วิจารณ์และสรุป

เมื่อฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดในเป็ด 2 กลุ่มๆ ละ 120 ตัว กลุ่มแรกฉีดขนาด 1 มล. กลุ่มที่ 2 ฉีดขนาด 0.5 มล. โดยมีปริมาณไวรัสวัคซีนเท่ากันและตามมาตรฐานศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (2530) คือไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส และมาตรฐาน Office International des Epizooties, OIE (2004) คือไม่น้อยกว่า $10^{3.0}$ 50% egg lethal dose (ELD_{50})/โด๊ส ภายหลังฉีดวัคซีนทุกๆ เดือน ตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 12 หาประสิทธิภาพของวัคซีนโดยหาความคุ้มโรคและ VN titer สำหรับผลของความคุ้มโรคพบว่า การฉีดวัคซีนทั้ง 2 ขนาด ให้ความคุ้มโรค 90-100% ตลอดการทดลองคือ 1 ปี ซึ่งไม่น้อยกว่า 1 ปี ตามมาตรฐาน (OIE, 2004) และเคยมีรายงานความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ดกรมปศุสัตว์ที่ไม่ต่ำกว่า 80% นานถึง 18เดือน (สุวรรณีและสายชล, 2533) แต่สำหรับการศึกษานี้ไม่สามารถทำได้เพราะต้องใช้เป็ดจำนวนมากและเวลานาน เนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับคอกเป็ดที่มีจำนวนจำกัด

ส่วนผลการทำ VN titer พบว่าการฉีดวัคซีนทั้ง 2 ขนาด ภายหลังฉีดวัคซีนนาน 1 ถึง 12 เดือน พบว่าค่า VN titer อยู่ที่ 4 - 7.5 $\log_2$ ซึ่งให้ความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับ ยังไม่มีรายงานที่ระบุระดับไตเตอร์ของวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรค แต่มีการทดลองของ สุวรรณี และสุดารัตน์ (2528) พบว่าหลังฉีดวัคซีน 3 วันเป็ดมีความคุ้มโรค 100% โดยที่แอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำ (ค่า neutralization index ของซีรัมกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเท่ากับ 0.72 และกลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.92) ซึ่งสอดคล้องกับทวีศักดิ์ (2531) ที่พบว่าระดับแอนติบอดีจะไม่สัมพันธ์กับความคุ้มโรค ดังนั้นภูมิคุ้มกันระดับเซลล์อาจมีบทบาทในการป้องกันโรคนี้ (Richter and Horzinek, 1993) สำหรับเป็ดที่นำมาหาระดับภูมิคุ้มกันนี้เป็นเป็ดที่จะนำไปฉีดพิษทับแต่ละเดือน ไม่ใช่เป็ดตัวเดียวกันตลอดการทดลองจึงอาจให้ค่าไม่ต่อเนื่องกัน

ผลการศึกษาที่พบว่าการฉีดวัคซีนขนาด 0.5 และ 1 มล. ที่มีประสิทธิภาพไม่ต่างกันและสามารถให้ความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 1 ปี สามารถนำมาปรับปรุงงานผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้ คือเปลี่ยนการผลิตน้ำยาละลายวัคซีนจาก 200 มล. เป็น 100 มล. สำหรับวัคซีนขนาด 200 โด๊ส และปรับปรุงโปรแกรมฉีดวัคซีนให้เหมาะสมกับคุณภาพ จากการใช้วัคซีนทุก 6 เดือน (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543) ในเป็ดพันธุ์กากีแคมเบลล์สามารถเปลี่ยนมาฉีดเป็นปีละครั้งได้ และการทดลองนี้ได้ทดสอบในคอกทดลองที่ปลอดโรคการใช้วัคซีนเพียงครั้งเดียวสามารถป้องกันโรคได้นาน แต่ถ้าในกรณีพื้นที่ที่มีการเลี้ยงเป็ดจำนวนมาก และเคยมีการระบาดของโรค ผลของความคุ้มโรคอาจจะแตกต่างจากการทดลองนี้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการทดลองในพื้นที่ที่เลี้ยงเป็ดและเคยมีการระบาดของโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และพนักงานฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด และฝ่ายทดสอบวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด ที่ช่วยในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์. 2543. วัคซีนกาฬโรคเป็ด. คู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หน้า 44-45.

เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล. 2529. โรคลำไส้อักเสบของเป็ดหรือโรคกาฬโรคเป็ด. โรคสัตว์ปีก. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 116-118.

ทวีศักดิ์ อุตตมะธนากร. 2531. ความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายในเป็ด. วิทยานิพนธ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-82.

นรินทร์ อุประกรินทร์ นำดี แซ่เฮง ปรีดา เลิศวัชระสารกุล วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ ภัทรา มูลจิตร สุชาติ สงวนพันธ์ และวรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2544. ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อเป็นในการป้องกัน duck enteritis virus สายพันธุ์ KU-KPS43. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. กรุงเทพฯ. หน้า 427-435.

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์. 2530. มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดทำแห้ง (Minimum requirements for duck plague vaccine, freeze dried). ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-3.

สุวรรณี ท้วมแสง และสุดารัตน์ ชินศักดิ์ชัย. 2528. การสร้างภูมิคุ้มกันโรคในเป็ดต่อวัคซีนกาฬโรคเป็ด. เอกสารวิชาการฝ่ายไวรัสวัคซีน ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์. หน้า 1-9.

สุวรรณี ท้วมแสง และสายชล จันทร์สำราญ. 2533. การตรวจหาระยะเวลาภูมิคุ้มกันโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 1(1): 1-4.

Office International des Epizooties, OIE. 2004. Duck virus enteritis. In: Manual of standard for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Word Organization for Animal Health. 10 p. Available source: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00111.htm. Accessed 5 May 2006.

Richter, J.H.M. and Horzinek, M.C. 1993. Duck plague. In: Virus infection of bird. Elsevier science publisher. Amsterdam, Netherlands. pp.77-90.

Sandhu, T. and Leibovitz, L. 1997. Duck virus enteritis (Duck Plague). In: Diseases of poultry, 10th ed. Calnek, B.W. ed. Iowa State University Press, Iowa. pp. 675-683.

ตารางที่ 1 แสดงความคุ้มโรคในเป็ด ต่อการฉีดพิษทับขนาด 10^5 DLD_{50}/ml ภายหลังฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด ขนาด 1 มล./โด๊ส และ 0.5 มล./โด๊ส นาน 1-12 เดือน

ระยะเวลา (เดือน) ภายหลังฉีดวัคซีน	กลุ่มฉีดวัคซีน 1 มล./โด๊ส		กลุ่มฉีดวัคซีน 0.5 มล./โด๊ส		กลุ่มควบคุม[1]	
	ตาย[2]/ทั้งหมด	ความคุ้มโรค (%)	ตาย[2]/ทั้งหมด	ความคุ้มโรค (%)	ตาย[2]/ทั้งหมด	ความคุ้มโรค (%)
1	0/10	100	0/10	100	5/5	0
2	0/10	100	0/10	100	5/5	0
3	0/10	100	0/10	100	5/5	0
4	0/10	100	0/10	100	5/5	0
5	0/10	100	0/10	100	5/5	0
6	0/10	100	0/10	100	5/5	0
7	0/10	100	0/10	100	5/5	0
8	0/10	100	0/10	100	5/5	0
9	0/10	100	0/10	100	5/5	0
10	1/10	90	0/10	100	5/5	0
11	0/10	100	1/10	90	5/5	0
12	1/10	90	0/10	100	5/5	0

[1] กลุ่มควบคุมไม่ได้ฉีดวัคซีนและฉีดเชื้อพิษทับ

[2] ตายด้วยอาการของโรคกาฬโรคเป็ดภายหลังฉีดเชื้อพิษทับ 4-7 วัน

ตารางที่ 2 แสดงค่า virus neutralization titer (VN) ของซีรัมเป็ด ภายหลังฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดขนาด 1 มล./โด๊ส และ 0.5 มล./โด๊ส ทุกเดือน นาน 1-12 เดือน

ระยะเวลา (เดือน) ภายหลังฉีดวัคซีน	ค่าเฉลี่ยของ log_2 virus neutralization titer		
	กลุ่มฉีดวัคซีน		กลุ่มควบคุม[1]
	1 มล./โด๊ส	0.5 มล./โด๊ส	
1	6	4	<1.0
2	5	5	<1.0
3	6	5	<1.0
4	7.5	5.5	<1.0
5	5	6.5	<1.0
6	5.5	6	<1.0
7	4.5	5.5	<1.0
8	5	4.5	<1.0
9	7	5.5	<1.0
10	4.5	5.5	<1.0
11	6	4.5	<1.0
12	4.5	4	<1.0

[1] กลุ่มควบคุมไม่ได้ฉีดวัคซีน

Efficacy of live attenuated duck plague vaccine at $10^{3.5}$ $TCID_{50}$ per 0.5 ml dose

Tawatchai Patchanukool[1] Noppakun Moolsin[1]

Pingpun Charoensurasathol[1] Kunya Suvintarakorn[1]

Abstract

The efficacy of duck plague (DP) vaccine was compared after vaccinating Khaki-Campbell ducks with $10^{3.5}$ 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) per dose in a volume of 0.5 ml and 1.0 ml. After single vaccination, the protective efficacy was evaluated monthly for one year by inoculating ducks with virulent virus at least 10^5 50% duck lethal dose/dose. The pre-challenge sera were collected and detected for antibody titers by virus neutralization every month. The result showed that vaccinated ducks in both groups, 0.5 and 1.0 ml/dose, were 90-100% protected after challenge experiments and showed neutralization titers between 4-7.5 log_2. This study indicated that the antibody level and protective efficacy in ducks after DP vaccination with either 0.5 ml or 1.0 ml/dose were not different.

Key words: Duck plague vaccine, Efficacy, 0.5 ml per dose

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

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัส ระดับแอนติบอดี และการฉีดพิษทับในสุกร ของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น

วิลาสินี ท้าวเพชร[1] เกรียงไกร ไชยคำ[1] จารุณี สาตรา[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัส แอนติบอดีและการฉีดพิษทับในสุกรของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น 4 สเตรน คือ สเตรน VP-046 BIS (วัคซีน A), สเตรน DV (วัคซีน B), สเตรน ATCC VR-2332 (วัคซีน C) และสเตรน ALL I83 (วัคซีน D) ตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีน A วัคซีน B วัคซีน C และวัคซีน D ในเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 พบมีปริมาณไวรัสเท่ากับ $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส และ $10^{5.4}$ $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนในลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เข้ากล้ามในขนาด 1 โด๊ส 5 ตัว/สเตรน โดยมีลูกสุกรจำนวน 5 ตัว ไม่ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม เจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ และหลังฉีดพิษทับ 10 วัน เพื่อนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในซีรัม โดยใช้ชุดตรวจสอบอีไลซ่า หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ ให้เชื้อพิษทับไวรัสพีอาร์อาร์เอสชนิดรุนแรงที่แยกได้จากสุกรป่วย (local strain, European type) แก่ลูกสุกรทุกตัว โดยการหยอดเข้าจมูกตัวละ 2 มล. และสังเกตอาการ 10 วัน เมื่อครบ 10 วัน ปลดลูกสุกรทุกตัว แล้วผ่าชากเพื่อตรวจดูวิการที่ปอด คำนวณเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค พบว่าวัคซีนทั้ง 4 สเตรน คือ วัคซีน A วัคซีน B วัคซีน C และวัคซีน D สามารถกระตุ้นแอนติบอดีในลูกสุกรส่วนใหญ่ของกลุ่มที่ฉีดวัคซีนได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของค่า S/P ratio หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ เท่ากับ 1.215, 1.503, 1.513 และ 0.423 ตามลำดับ และหลังให้เชื้อพิษทับ 10 วัน มีค่าเฉลี่ยของค่า S/P ratio เท่ากับ 1.270, 1.311, 1.496 และ 0.470 ตามลำดับ โดยสุกรกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของค่า S/P ratio ก่อนฉีดพิษทับและหลังฉีดพิษทับ 10 วัน เท่ากับ 0.140 และ 0.127 ตามลำดับ สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน A, B, C และ D ในขนาด 1 โด๊ส มีเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคเท่ากับ 80%, 60%, 80% และ 0% ตามลำดับ ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมมีวิการที่ปอดและมีการติดเชื้อ 100%

คำสำคัญ: ปริมาณไวรัส ระดับแอนติบอดี การฉีดพิษทับในสุกร วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น

[1]กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก พบการระบาดในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาเหนือ ช่วงปี ค.ศ. 1988-1989 (Keffaber, 1989; Loula, 1991) โดยในปี ค.ศ. 1991 และ ค.ศ. 1992 สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัส PRRS ได้ที่เนเธอร์แลนด์และแคนาดา (Wensvoort et al., 1991) ส่วนในประเทศไทยได้นำตัวอย่างซีรัมสุกรตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988-1999 ตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธีอีไลซ่า พบแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1989 โดยตรวจพบ 8.6% ในปี ค.ศ. 1991 และพบเพิ่มขึ้นเป็น 79% ในปี ค.ศ. 1999 (Thanawongnuwech et al., 2003) และจากรายงานของ Oraveerakul et al. (1995) ในฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 15 ฟาร์ม ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตรวจพบว่า 64% ของซีรัมสุกรมีแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRS ไวรัส PRRS มี 2 สายพันธุ์ (antigenic type) คือ European และ American type เชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (closely related) แต่ไม่สามารถคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ได้หรือได้เพียงเล็กน้อย (Mardassi et al., 1994; Van Woensel et al., 1998) ในประเทศไทยมีการเพาะแยกเชื้อไวรัส PRRS ครั้งแรกได้จากซีรัมและอวัยวะของลูกสุกรที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจเรื้อรังรุนแรง (severe chronic respiratory distress) โดยใช้เซลล์ porcine alveolar macrophages (PAMs) และตรวจโดยวิธี indirect immunofluorescence antibody (IFA) (Damrongwatanapokin et al., 1998) การเพาะแยกเชื้อไวรัส PRRS สามารถเพาะแยกเชื้อในเซลล์ 2 ชนิด คือ porcine alveolar macrophage (PAMs) และ African kidney cell line (MA-104 , MARC-145, CL 2621, CRL 11171) (Bautista et al., 1993; Kim et al., 1993; Meng et al., 1996) แต่ cell linc ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อ PRRS ได้ทุกเชื้อโดยเฉพาะ European serotype บางตัว (Office International des Epizootics, OIE, 2004; Yoon et al., 2003)

การเตรียมเชื้อไวรัส PRRS เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น จะเตรียมเชื้อไวรัส PRRS ในเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 หรือ Vero และวัคซีนไวรัสสามารถทำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพ (cytopathic effect, CPE)ได้ การตรวจหาปริมาณไวรัสในวัคซีนจึงใช้เซลล์ MA-104 โดยตรวจดูการเกิดพยาธิสภาพในเซลล์เพาะเลี้ยง และวัคซีนจะต้องสามารถป้องกันการเกิดโรค PRRS ในสุกรและมีความคุ้มโรคเมื่อฉีดพิษทับด้วยเชื้อ PRRS ต่างสายพันธุ์ (heterologous strain) (OIE, 2004) ภูมิคุ้มกันสามารถป้องกันการเกิดโรคซ้ำในเชื้อสเตรนเดียวกัน (re-challenge)ได้ระยะเวลานาน แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคจากสเตรนอื่น ซึ่งการป้องกันจะไม่แน่นอนและไม่สมบูรณ์ (Lager et al., 1999; Van Woensel et al., 1998) จากรายงาน OIE (2004) มีข้อเสนอแนะให้ใช้วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นกับลูกสุกรอายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป หรือใช้ในสุกรสาวและแม่สุกรช่วง 3-6 สัปดาห์ก่อนการผสมพันธุ์

การตรวจหาแอนติบอดีสามารถตรวจโดย indirect immunofluorescence antibody (IFA), immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ real time PCR (RT-PCR) (Meng et al., 1994; Yoon et al., 2003) ปัจจุบันการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธีอีไลซ่าเป็นที่นิยมเพราะสะดวกและชุด

ตรวจสอบอีไลซ่าบางบริษัทสามารถตรวจได้ทั้ง 2 antigenic types (Yoon et al., 2003) วิธีที่กล่าวข้างต้นจำเพาะต่อแอนติเจนตัวเดียว (viral antigen of one viral antigenic type) (OIE, 2004)

วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีน ตรวจหาแอนติบอดีและเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับในสุกรที่ฉีดวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นทั้ง 4 สเตรน ก่อนพิจารณาให้ทะเบียนตำรับยา

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

สุกรทดลองเป็นสุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large White, Landrace and Duroc Jersey) อายุ 4 สัปดาห์ และไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS จำนวน 25 ตัว

วัคซีน

วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นนำเข้าจากต่างประเทศ 4 สเตรนๆ ละ 1 ชุดการผลิต ดังนี้

วัคซีน A: เป็นวัคซีน PRRS สเตรน VP-046 BIS, European type ขนาด 2 มล./โด๊ส

วัคซีน B: เป็นวัคซีน PRRS สเตรน DV, European type ขนาด 2 มล./โด๊ส

วัคซีน C: เป็นวัคซีน PRRS สเตรน ATCC VR 2332, American type ขนาด 2 มล./โด๊ส

วัคซีน D: เป็นวัคซีน PRRS สเตรน ALL 183, European type ขนาด 2 มล./โด๊ส

เชื้อพิษทับ

เชื้อไวรัส PRRS ชนิดรุนแรงที่แยกได้จากสุกรป่วย (local strain, European type) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.น.สพ. ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาปริมาณไวรัส

ละลายวัคซีน PRRS เชื้อเป็น ชนิดดูดแห้ง (freeze dried vaccine) ด้วยน้ำยาละลายวัคซีน แล้วเจือจางวัคซีนแบบสิบเท่า (ten fold dilution) นำแต่ละความเจือจางใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 ซึ่งเพาะเลี้ยงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. ที่มี 5% CO_2 นาน 5-7 วัน สังเกตการเกิดพยาธิสภาพ (CPE) ของเซลล์ คำนวณปริมาณไวรัสตามวิธีของ Reed and Muench (1938) แล้วคำนวณเป็นต่อโด๊สของวัคซีนแต่ละสเตรน ซึ่งตามข้อกำหนดของ OIE (2004) จะต้องมีปริมาณไวรัสในวัคซีนไม่น้อยกว่า 1.2 log $TCID_{50}$ ของโด๊สวัคซีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองได้ หรือต้องมีปริมาณไวรัสในวัคซีนไม่ต่ำกว่าปริมาณที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

การทดสอบความคุ้มโรคในสุกร

ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนเข้ากล้ามลูกสุกรแต่ละกลุ่มๆ ละ 5 ตัว ในขนาดตัวละ 1 โด๊ส โดยมีลูกสุกรไม่ฉีดวัคซีนจำนวน 5 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ ให้เชื้อพิษทับไวรัส PRRS ชนิดรุนแรงที่แยกได้จากสุกรป่วย (สเตรน EU) แก่ลูกสุกรทุกตัว โดยการหยอดจมูกตัวละ 2 มล. วัดอุณหภูมิร่างกาย ชั่งน้ำหนักก่อน

ฉีดพิษทับและหลังฉีดพิษทับ 10 วัน สังเกตอาการ 10 วัน เจาะเลือดเก็บซีรัมตรวจหาแอนติบอดีก่อนฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ และหลังฉีดพิษทับ 10 วัน เมื่อครบ 10 วัน ปลดลูกสุกรทุกตัว ผ่าชากตรวจดูวิการของปอด แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค

% ความคุ้มโรค = (จำนวนลูกสุกรในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีอาการปกติและไม่พบวิการของโรค PRRS/ จำนวนลูกสุกรที่ฉีดวัคซีน PRRS ทั้งหมด) x 100

การตรวจหาแอนติบอดี

โดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA Herd Check*PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR[1] (Yoon et al., 2003) อ่านผลการตรวจหาแอนติบอดีเป็นค่า S/P ratio (OD sample/ OD positive control) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยค่า S/P ratio คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ค่า S/P ratio} = \frac{[\text{Sample A (650) : PRRS}] - [\text{Sample A (650) : NHC}]}{[\text{PC : PRRS}] - [\text{PC : NHC}]}$$

Sample A (650) : PRRS = ค่า OD ของ sample A ใน PRRS antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

Sample A (650) : NHC = ค่า OD ของ sample A ใน normal host cell (NHC) antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

PC : PRRS = ค่า OD ของ positive control ใน PRRS antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

PC : NHC = ค่า OD ของ positive control ใน normal host cell (NHC) antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

การอ่านผล: ซีรัมที่มีค่า S/P ratio <0.4 แสดงว่าให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS

ซีรัมที่มีค่า S/P ratio ≥ 0.4 แสดงว่าให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS

ผล

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น (modified live PRRS vaccines, MLV) ทั้ง 4 สเตรน คือ สเตรน VP-046 BIS, สเตรน DV, สเตรน ATCC VR-2332 และสเตรน ALL 183 พบว่ามีปริมาณไวรัสเท่ากับ $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส และ $10^{5.3}$ $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าไม่ต่ำกว่าข้อกำหนดของ OIE (2004)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบอีไลซ่าพบว่า วัคซีนทั้ง 4 สเตรน สามารถกระตุ้นแอนติบอดีในสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนได้บางตัว โดยมีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio มากกว่า 0.4 ดังนี้ หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ เท่ากับ 1.215, 1.503, 1.513 และ 0.423 ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio หลังให้เชื้อพิษทับ 10 วัน เท่ากับ 1.270, 1.311, 1.496 และ 0.470 ตามลำดับ โดยสุกรกลุ่มควบคุมมีแอนติบอดีก่อนฉีดพิษทับและหลังฉีดพิษทับ 10 วัน เท่ากับ 0.140 และ 0.127 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน A, B, C และ D ในขนาด 1 โด๊ส ให้ความคุ้มโรค 80%, 60%, 80% และ 0% ตามลำดับ ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมมีวิการที่ปอดและมีการติดเชื้อ 100% (ตารางที่ 3)

---

[1]IDEXX Laboratories, Inc., USA

วิจารณ์และสรุป

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นทั้ง 4 สเตรน คือ สเตรน VP-046 BIS (วัคซีน A), สเตรน DV (วัคซีน B), สเตรน ATCC VR-2332 (วัคซีน C) และสเตรน ALL 183 (วัคซีน D) พบมีปริมาณไวรัสเท่ากับ $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส, $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส และ $10^{5.3}$ $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่ต่ำกว่าปริมาณไวรัสที่บริษัทผู้ผลิตวัคซีนแต่ละสเตรนกำหนดไว้ ซึ่งตามข้อกำหนด OIE (2004) กำหนดให้ใช้การตรวจหาปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง สำหรับการตรวจหาปริมาณไวรัสของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น

ผลการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบอีไลซ่า หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 1.215, 1.503, 1.513 และ 0.423 ตามลำดับ แสดงว่าวัคซีน A, B และ C สามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้สูงกว่าวัคซีน D โดยวัคซีน A และ B เป็น European type และวัคซีน C เป็น American type แสดงว่าชุดตรวจสอบอีไลซ่าของ IDEXX สามารถใช้ตรวจแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS ได้ทั้ง 2 serotypes ซึ่งตรงกับรายงานของ Yoon et al. (2003) ในขณะที่วัคซีน D เป็น European type กระตุ้นแอนติบอดีได้ต่ำสุด ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีหลังให้เชื้อพิษทับ 10 วัน มีค่าเฉลี่ยของ S/P ratio เท่ากับ 1.270, 1.311, 1.496 และ 0.470 ตามลำดับ ซึ่งไม่สูงกว่าแอนติบอดีก่อนให้เชื้อพิษทับ โดยสุกรกลุ่มควบคุมมีแอนติบอดีก่อนฉีดพิษทับและหลังฉีดพิษทับ 10 วัน เท่ากับ 0.140 และ 0.127 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงว่าเชื้อพิษทับซึ่งเป็น European type ไม่ได้กระตุ้นแอนติบอดีให้สูงขึ้นในระยะเวลาที่สั้นเพียง 10 วัน เช่นเดียวกับรายงานของ Yoon et al. (1995) ได้ทำการทดสอบฉีดเชื้อ PRRS ในลูกสุกร พบว่าเริ่มตรวจพบแอนติบอดีระหว่างวันที่ 10-14 และคงอยู่จนถึง 2-3 เดือน

สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน A, B, C และ D ในขนาด 1 โด๊ส ให้ความคุ้มโรค 80%, 60%, 80% และ 0% ตามลำดับ ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมมีวิการที่ปอดและมีการติดเชื้อ 100% ซึ่งสอดคล้องกับแอนติบอดีที่มีค่า S/P ratio ที่ตรวจโดยวิธีอีไลซ่าก่อนให้เชื้อพิษทับ แต่ในวัคซีน D ซึ่งตรวจพบแอนติบอดีต่ำกว่าวัคซีนสเตรนอื่น (มีค่า S/P ratio สูงกว่า 0.4 เพียงเล็กน้อย) ไม่ให้ผลความคุ้มโรคต่อเชื้อพิษทับของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lager et al. (1999) ที่พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อสามารถป้องกันการเกิดโรคซ้ำในเชื้อสเตรนเดียวกัน (re-challenge) ได้ระยะเวลานาน แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคจากสเตรนอื่น ซึ่งการป้องกันจะไม่แน่นอนและไม่สมบูรณ์ ดังนั้นวัคซีนที่จะพัฒนาขึ้นควรให้ความคุ้มโรคในสุกรต่อเชื้อพิษทับไวรัส PRRS ต่างสายพันธุ์ (heterologous strain) ด้วย (OIE, 2004)

ปัญหาของโรคพีอาร์อาร์เอส (PRRS) เป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรและยังไม่ได้ข้อสรุปที่แน่นอนเกี่ยวกับการป้องกันการเกิดโรครวมถึงการพิจารณาเลือกใช้วัคซีน วัคซีนเชื้อเป็นแนะนำให้ใช้เฉพาะในลูกสุกรโดยฉีดวัคซีนให้ลูกสุกรที่อายุ 4 สัปดาห์เพื่อลดความรุนแรงของการเกิดโรคทางเดินระบบหายใจ ในสถานการณ์ปัจจุบันโรค PRRS ได้สร้างความเสียหายกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยเป็นอย่างมาก ทางสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ร่วมกับสมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย (2548) จึงได้จัดการประชุมเพื่อหาข้อสรุปและดำเนินการจัดทำคู่มือปฏิบัติงานทางคลินิกต่อโรค PRRS (Clinical Practice Guideline for PRRS) และได้จัดทำคู่มือแนวทางการปฏิบัติงานทางคลินิกต่อปัญหาโรค

PRRS สำหรับฟาร์มสุกรในประเทศไทย ครั้งที่ 1 (Clinical Practice Guideline, CPG, for PRRS in Pig Farms in Thailand: version 1) แต่แนวทางในการใช้วัคซีน PRRS สำหรับควบคุมป้องกัน หรือแก้ไขปัญหาโรคนี้ยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน ซึ่งจะต้องมีการจัดประชุมระดมสมองและหารือถึงแนวทางในการใช้วัคซีนในการควบคุมป้องกันหรือแก้ไขปัญหาโรคนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ และสมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย. 2548. แนวทางการปฏิบัติงานทางคลินิกต่อปัญหาโรคพีอาร์อาร์เอสสำหรับฟาร์มสุกรในประเทศไทย ครั้งที่ 1 (Clinical Practice Guideline (CPG) for PRRS in Pig Farms in Thailand: version 1)

Bautista, E. M., Goyal S. M., Yoon, I. J., Joo, H. S. and Collins, J. E. 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 163-165.

Damrongwatanapokin, S., Parcharyanon, S., Pinyochon, W. And Tantaswasdi, U. 1998. Isolation and characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. p. 321.

Keffaber, K. K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. American Association of Swine Practitioners Newsletter 1: 1-10.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S. and Frey, M. L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch. Virol. 133: 477-483.

Lager, K. M., Mengeling, W. L. and Brockmeier, S. L. 1999. Evaluation of the protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge–exposed with antigenically distinct PRRSV isolate. Am. J. Vet. Res. 60: 1022-1027.

Loula, T. 1991. Mystery pig disease. Agri Prac. 12: 23-34.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S. and Dea, S. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. J. Clin. Microbiol. 32: 2197-2203.

Meng, X. J., Paul, P. S. and Halbur, P. G. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'- terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 75: 1795-1801.

Meng, X. J.,Paul, P. S., Halbur, P. G. and Lum, M. A. 1996. Characterization of a high-virulence U. S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line ATCC CRL11171. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 374-381.

Office International des Epizooties, OIE. 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 18 p. Available source: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00099.htm. Accessed 25 October 2005.

Oraveerakul, K., Punarriwatana, D., Luengyosluechakul, S. 1995. The seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding forms in the central and northeastern part of Thailand. Thai J. Vet. Med. 25 (3): 233-240.

Reed, J. J. and Muench, R. H. 1938. A simple method for estimating 50% endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.

Thanawongnuwech, R., Damrongwatanapokin, S and Horcharoen, A. 2003. PRRS virus in Southeast Asia. In: 2003 PRRS Compendium: second edition, Zimmerman, J. J. and Yoon, K. J. ed. Iowa. pp. 269-273.

Van Woensel, P. A., Liefkens, K. and Denmaret, S. 1998. Effect on viremia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. Vet. Rec. 142 (19): 510-512.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M. A., Ter Laak, E. A., Bloemraad, M., De Kluyver, E.P., Kragten, C.,Van Buiten, L., Den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J. M., Moonen, P. L. J. M.,Zetstra, T., De Boer E.A., Tibben, H.J., Jong, M.F., Van't Veld,e P., Groenland, G.J.R., Van Gennep, J.A., Voets, M.Th., Verheijden, J. H. M. and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quarterly. 13: 121-130.

Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., McGinley, M. J., 1995. Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may lead to misdiagnosis. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 386-387.

Yoon, K. J., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E. A. 2003. Diagnosis of PRRS Virus. In: 2003 PRRS Compendium: producer edition, Zimmerman, J. J. and Yoon, K. J. ed. Iowa. pp. 57-67.

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น ทั้ง 4 สเตรน ต่อ 1 ชุดการผลิต

วัคซีนสเตรน	VP-046 BIS (วัคซีน A)	DV (วัคซีน B)	ATCC VR-2332 (วัคซีน C)	ALL 183 (วัคซีน D)
ปริมาณไวรัสที่ตรวจได้	$10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{4.5}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{5.3}$ $TCID_{50}$/โด๊ส
ปริมาณไวรัสที่กำหนดในวัคซีนแต่ละสเตรน	$10^{3.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{4.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{4.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส	$10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาแอนติบอดี (ค่า S/P ratio) ในซีรัมโดยชุดตรวจสอบอีไลซ่า (Herd Check*PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR) ในสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนทั้ง 4 สเตรน และกลุ่มควบคุม

หมายเลขสุกร	ค่า S/P ratio[1]									
	กลุ่มควบคุม		วัคซีนสเตรน VP - 046 BIS		วัคซีนสเตรน DV		วัคซีนสเตรน ATCC VR-2332		วัคซีนสเตรน ALL 183	
	ก่อนฉีดพิษทับ[2]	หลังฉีดพิษทับ[3]	ก่อนฉีดพิษทับ[2]	หลังฉีดพิษทับ[3]	ก่อนฉีดพิษทับ[2]	หลังฉีดพิษทับ[3]	ก่อนฉีดพิษทับ[2]	หลังฉีดพิษทับ[2]	ก่อนฉีดพิษทับ[2]	หลังฉีดพิษทับ[3]
1	0.122	0.128	1.337	1.587	1.979	1.881	1.669	1.703	0.679	0.553
2	0.139	0.136	0.534	0.997	0.131	0.878	1.433	1.254	0.532	0.626
3	**[4]	0.126	1.776	1.085	0.851	1.018	0.994	0.958	0.616	0.896
4	0.135	0.132	0.292	0.287	2.370	2.143	1.690	2.161	0.150	0.152
5	0.164	0.115	0.337	0.453	0.812	0.636	1.782	1.403	0.136	0.122
ค่าเฉลี่ย	0.140	0.127	1.215	1.270	1.503	1.311	1.513	1.496	0.423	0.470

[1] ค่า S/P ratio $\geq$ 0.4 แสดงว่าให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดี (positive serum)
และค่า S/P ratio $<$ 0.4 แสดงว่าให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดี (negative serum)

[2] เจาะเลือดเก็บซีรัมที่ระยะ 4 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีน

[3] เจาะเลือดเก็บซีรัมที่ระยะ 10 วันหลังฉีดพิษทับ

[4] Invalid

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับเชื้อไวรัส PRRS (local strain, European type) ในสุกรกลุ่มฉีดวัคซีนทั้ง 4 สเตรน และกลุ่มควบคุม

หมายเลขสุกร	กลุ่มควบคุม		วัคซีนสเตรน VP-046 BIS		วัคซีนสเตรน DV		วัคซีนสเตรน ATCC VR-2332		วัคซีนสเตรน ALL 183	
	อาการป่วย	วิการที่ปอด	อาการป่วย	วิการที่ปอด	อาการป่วย	วิการที่ปอด	อาการป่วย	วิการที่ปอด	อาการป่วย	วิการที่ปอด
1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
% ความคุ้มโรค		0% (0/5)[1]		80% (4/5)[1]		60% (3/5)[1]		80% (4/5)[1]		0% (0/5)[1]

+ หมายถึง แสดงอาการป่วยหรือมีวิการที่ปอด

- หมายถึง ไม่แสดงอาการป่วยหรือไม่มีวิการที่ปอด

[1] จำนวนลูกสุกรในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีอาการปกติและไม่พบวิการของโรค PRRS/จำนวนลูกสุกรที่ฉีดวัคซีนPRRS ทั้งหมด

Comparative studies on virus content, antibody level and pig challenge test of modified live PRRS vaccines

Wilasinee Thaopech[1] Kriangkrai Chaikhum[1] Jarunee Satra[1]

Abstract

Studies on virus content, antibody detection and challenge test (percent protection) of four strains of modified live porcine reproductive respiratory syndrome (PRRS) vaccines based on different strains: VP-046 BIS strain (vaccine A), DV strain (vaccine B), ATCC VR-2332 strain (vaccine C) and ALL 183 strain (vaccine D) were carried out. For virus content test, all vaccine strains (VP-046 BIS, DV, ATCC VR-2332 and ALL 183) were titrated in MA-104 cell line and virus contents of each vaccine were $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/dose, $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/dose, $10^{5.1}$ $TCID_{50}$/dose and $10^{5.3}$ $TCID_{50}$/dose, respectively. For challenge test and antibody detection, four groups of five piglets, 4 weeks old and free of antibody to PRRSV, were inoculated intramuscularly with one dose of each vaccine; another group of five piglets was not vaccinated and served as control group. Blood was collected pre-vaccination, 4 weeks post-vaccination and 10 days post-challenge. Serum antibodies were detected by using ELISA test kit. Four weeks post-vaccination, each piglet was challenged intranasally with 2 ml of virulent PRRSV isolated from sick pig (local strain, European type) and observed for 10 days. All piglets were then sacrificed and examined for macroscopic lesion of lung and calculated for percentages of protection. All vaccine strains, VP-046 BIS, DV, ATCC VR-2332 and ALL 183, could enhance antibody response in mostly vaccinated piglets. The S/P ratios (OD sample/OD positive control) at 4 weeks post-vaccination were 1.215, 1.503, and 1.513 and 0.423, respectively. The S/P ratios at 10 days post-challenge were 1.270, 1.311, 1.496 and 0.470, respectively. Whereas the S/P ratios of control group at 4 weeks post-vaccination and I0 days post-challenge were 0.140 and 0.127, respectively. The protection of piglets vaccinated with vaccine A, B, C and D were 80, 60, 80 and 0%, respectively. While the control group showed lung lesion and 100% infection with PRRS virus.

Key words: Virus content, Antibody, Pig challenge test, Modified live PRRS vaccine

[1]Veterinary Biologics Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ศึกษาความปลอดภัย การเปลี่ยนกลับรุนแรง และการแพร่กระจาย ของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น

วิลาสินี ท้าวเพชร[1] เกรียงไกร ไชยคำ[1] จารุณี สาตรา[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาความปลอดภัย การเปลี่ยนกลับรุนแรงและการแพร่กระจายของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น 4 สเตรน คือ สเตรน VP-046 BIS, สเตรน DV, สเตรน ATCC VR-2332 และสเตรน ALL 183 ทดสอบความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว น้ำหนัก 18-22 กรัม จำนวน 10 ตัว/สเตรน โดยฉีดวัคซีนเข้าใต้หนัง ตัวละ 0.5 มล. สังเกตอาการ 7 วัน ทดสอบความเป็นพิษในหนูตะเภา น้ำหนัก 250-400 กรัม จำนวน 2 ตัว/สเตรน โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้าม ตัวละ 2 มล. สังเกตอาการ 7 วัน ทดสอบความปลอดภัยทั่วไปในลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว/สเตรน โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้าม ตัวละ 10 โด๊ส สังเกตอาการ 21 วัน พบว่าวัคซีนทุกสเตรนมีความปลอดภัย 100% ต่อหนูขาว หนูตะเภาและลูกสุกร ทดสอบการเปลี่ยนกลับรุนแรงและการขับออกของวัคซีนไวรัสแต่ละสเตรน โดยผ่านวัคซีนไวรัสในลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ 5 passages จำนวน 1 ตัว/passage พบว่าวัคซีนทุกสเตรนไม่เปลี่ยนกลับรุนแรงและไม่มีการขับออกของวัคซีนไวรัส ทดสอบการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัส ในลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว โดยฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนเข้ากล้าม ตัวละ 1 โด๊ส แล้วนำลูกสุกรอีก 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนมาเลี้ยงรวมกับลูกสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนเป็นกลุ่มควบคุมสัมผัส พบว่าสุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส ทุกตัวไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

คำสำคัญ: ความปลอดภัย การเปลี่ยนกลับรุนแรง การแพร่กระจาย วัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น

---

[1]กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS, พีอาร์อาร์เอส) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศแถบยุโรป อเมริกา เอเชีย รวมทั้งประเทศไทย ปี ค.ศ. 1991 และ 1992 มีการเพาะแยกเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรก ที่ประเทศแคนาดาและประเทศเนเธอร์แลนด์ (Collins et al., 1992; Wensvoort et al., 1991) ส่วนในประเทศไทยได้ทดสอบตัวอย่างซีรัมที่เก็บตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988-1999 และตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS โดยวิธีอีไลซ่า เป็นครั้งแรกในปี 1989 (Thanawongnuwech et al., 2003) ไวรัส PRRS มี 2 antigenic types คือ European และ American type ไวรัสใน serotype เดียวกัน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (closely related) แต่ไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้าม serotype ได้หรือได้เพียงเล็กน้อย (Van Woensel et al., 1998)

โรค PRRS ก่อให้เกิดความสูญเสียต่อระบบสืบพันธุ์ในสุกรพ่อ แม่พันธุ์และมีผลต่อระบบทางเดินหายใจในลูกสุกรหย่านมและสุกรอนุบาล ในประเทศสหรัฐอเมริกา วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น (modified-live virus vaccine, MLV vaccine, American type) ได้ขึ้นทะเบียนเพื่อใช้ในการควบคุมโรค ในยุโรปวัคซีน MLV ได้ขึ้นทะเบียนทั้ง 2 antigenic types (American และ European type) ส่วนวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อตายได้ขึ้นทะเบียนทั้งในสหรัฐอเมริกาและยุโรป เพื่อลดอัตราการแท้งและลดจำนวนลูกสุกรอ่อนแอที่มีสาเหตุจากโรค PRRS การเลือกใช้วัคซีน PRRS ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากพื้นที่ที่มีการระบาด (Office International des Epizooties, OIE, 2004; Van Woensel et al., 1998) ถึงแม้ว่าการฉีดวัคซีนในสุกรจะไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส PRRS ได้สมบูรณ์ แต่อาจจะช่วยในฝูงสุกรที่มีปัญหาจากโรคหรือมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อไวรัส PRRS การใช้วัคซีน MLV ไม่แนะนำให้ใช้ในแม่สุกรตั้งท้อง สุกรสาว พ่อพันธุ์ในช่วงอายุที่ใช้ในการผสมพันธุ์และฝูงสุกรที่ปลอดเชื้อ เพราะไวรัสวัคซีนสามารถคงอยู่ในสัตว์ที่ได้รับวัคซีนเป็นเวลานาน มีโอกาสแพร่กระจายเชื้อให้กับสัตว์ที่ไม่ได้รับวัคซีน และพบว่าไวรัสวัคซีนมีการขับออกมาทางน้ำเชื้อได้ วัคซีน MLV ควรใช้ในสุกรสาวและแม่สุกรก่อนการผสมพันธุ์ 3-6 สัปดาห์ และลูกสุกรอายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป เพื่อลดอัตราการเกิดโรค PRRS (OIE, 2004; Torrison et al., 1996)

ตามมาตรฐาน OIE (2004) กำหนดให้การผลิตวัคซีน MLV จะต้องทราบประวัติที่มาของไวรัส ประวัติการผ่านของไวรัสที่ใช้ในการผลิต และต้องผลิตจาก master seed virus ไม่เกิน 5 passages เว้นแต่จะได้พิสูจน์ว่าถ้าผ่านเชื้อเกิน 5 passages ยังคงสามารถให้ความคุ้มโรคในสุกรได้ การผลิตวัคซีน MLV อาจเพาะเลี้ยงวัคซีนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น MA-104 หรือ Vero cells วัคซีนจะต้องปราศจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย ราไมโคพลาสม่า และเชื้อไวรัสชนิดอื่น มีความปลอดภัยในสุกรที่มีอายุตามคำแนะนำให้ใช้วัคซีน วัคซีนต้องไม่เปลี่ยนกลับรุนแรง (turning to virulence) หลังจากผ่านในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ โดยผ่านเชื้อวัคซีนไวรัสในสุกรที่มีความไวต่อเชื้อ PRRS ในทางที่ติดเชื้อตามธรรมชาติอย่างน้อย 5 passages และต้องแสดงว่า วัคซีน MLV ไม่รุนแรงต่อลูกสุกรและสุกรตั้งท้อง และให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ จากข้อเสียของวัคซีน MLV ที่อาจเกิดการเปลี่ยนกลับรุนแรง การขับออกของวัคซีนไวรัส การแพร่กระจายของเชื้อและมีความคุ้มโรคไม่ข้ามไทป์ จึงมีการพัฒนาวัคซีนชนิดซับยูนิต Verheije et al. (2003) กล่าวว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนไวรัส PRRSV recombinant

ต้องช่วยลดอาการจากการติดเชื้อ wild-type PRRSV ต้องไม่ทำให้เกิดโรค และไม่เปลี่ยนกลับรุนแรง มิฉะนั้นจะทำให้มีโอกาสกลายพันธุ์ได้ มีความคงตัว ป้องกันการแพร่กระจายของ wild-type PRRSV และการกลายพันธุ์จะมีการเปลี่ยน antigenic profile ของไวรัส

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นที่นำเข้าจากต่างประเทศ 4 สเตรน ทดสอบความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว ความเป็นพิษในหนูตะเภา ความปลอดภัยทั่วไปในลูกสุกร การเปลี่ยนกลับรุนแรง การขับออกและการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัส ก่อนให้ขึ้นทะเบียนตำรับยา

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ ICR คละเพศ น้ำหนัก 18-22 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม จำนวน 40 ตัว

หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley คละเพศ น้ำหนัก 240-400 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม จำนวน 8 ตัว

สุกรทดลองผสมสามสายพันธุ์ (Large White, Landrace and Duroc Jersey) อายุ 4 สัปดาห์ และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส จำนวน 73 ตัว

วัคซีน

วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็นนำเข้าจากต่างประเทศ 4 สเตรนๆ ละ 1 ชุดการผลิต ดังนี้

1. วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น สเตรน VP-046 BIS, European type มีปริมาณไวรัสวัคซีน $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส แนะนำให้ใช้ในลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ขึ้นไป

2. วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น สเตรน DV, European type มีปริมาณไวรัสวัคซีน $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส แนะนำให้ใช้ในลูกสุกรอายุ 3-4 สัปดาห์

3. วัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น สเตรน ATCC VR-2332, American type มีปริมาณไวรัสวัคซีน $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/โด๊ส แนะนำให้ใช้ในลูกสุกรอายุ 3-4 สัปดาห์

4. วัคซีนPRRS ชนิดเชื้อเป็น สเตรน ALL 183, European type มีปริมาณไวรัสวัคซีน$10^{5.1}$ $TCID_{50}$/โด๊ส แนะนำให้ใช้ในลูกสุกรอายุ 3-4 สัปดาห์

การทดสอบความปลอดภัยเฉพาะ (specific safety test)

ทดสอบความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว จำนวน 10 ตัว/สเตรน โดยฉีดวัคซีนเข้าใต้หนัง ตัวละ 0.5 มล. สังเกตอาการ 7 วัน (USDA, 2000a)

การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity test)

ทดสอบความเป็นพิษในหนูตะเภา จำนวน 2 ตัว/สเตรน โดยฉีดวัคซีนเข้ากล้าม ตัวละ 2 มล. สังเกตอาการ 7 วัน (USDA, 2000b)

การทดสอบความปลอดภัยทั่วไป (general safety test)

ทดสอบความปลอดภัยทั่วไปของตัวอย่างวัคซีนทั้ง 4 สเตรน โดยฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนเข้ากล้ามลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว ในขนาดตัวละ 10 โด๊ส สังเกตอาการ 21 วัน โดยวัดอุณหภูมิร่างกายทุกวัน (OIE, 2004)

การทดสอบการเปลี่ยนกลับรุนแรง (turning to virulence) และการขับออกของวัคซีนไวรัส (vaccinal virus shedding)

ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามลูกสุกร ในขนาดตัวละ 1 โด๊ส สเตรนละ 1 ตัว/passage โดยมีลูกสุกรที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนเป็นสุกรควบคุม 1 ตัว/passage สังเกตอาการ 10 วัน ฆ่าผ่าซาก ตรวจดูวิการที่ปอด ทอนซิล ต่อมน้ำเหลืองและม้าม นำทอนซิล น้ำหนัก 1 กรัม มาบดแยกเชื้อทำเป็น 10% suspension วัคซีนไวรัสปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นาน 30 นาที แล้วนำไปหยอดเข้าจมูกลูกสุกรชุดใหม่ ปริมาตร 2 มล./ตัว เป็นการผ่านไวรัส passage ที่ 2 ทำเช่นเดียวกันจนครบ 5 passages เพื่อตรวจสอบว่า วัคซีนแต่ละสเตรน มีการเปลี่ยนกลับรุนแรงหรือไม่

นำตัวอย่าง nasal swabs ในลูกสุกรแต่ละตัวไปตรวจหาวัคซีนไวรัส ในเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 โดยนำ nasal swabs ใน maintenance medium with 2 % fetal calf serum (FCS) ปริมาตร 5 มล. ไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นาน 30 นาที เก็บส่วนใส และกรองที่ 0.2 ไมครอน นำเอาส่วนใสที่ได้ใส่ลงในเซลล์ MA-104 ที่เจริญเต็มผิวขวด ขนาด 25 ซม.^{2} แล้วเติม maintenance medium with 2 % FCS ปริมาตร 5 มล. และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. 5% CO_2 นาน 5-7 วัน สังเกตการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) เมื่อครบ 7 วัน นำไป freezed-thawed 3 ครั้ง แล้วปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นาน 30 นาที เก็บส่วนใสและกรองที่ 0.2 ไมครอน นำเอาส่วนใสที่ได้ใส่ลงในเซลล์ MA-104 เป็น passage ที่ 2 และทำจนครบ 3 passages เพื่อตรวจสอบว่าวัคซีนแต่ละสเตรนมีการขับออกของวัคซีนไวรัสหรือไม่ (OIE, 2004)

การทดสอบการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัส (transmission of vaccine virus)

ใช้ลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรนเข้ากล้ามลูกสุกรแต่ละกลุ่มในขนาดตัวละ 1 โด๊ส แล้วนำลูกสุกรอีก 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ซึ่งไม่ฉีดวัคซีนแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงรวมกับกลุ่มที่ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรน เป็นกลุ่มควบคุมสัมผัส หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ เจาะเลือดเก็บซีรัม เพื่อนำไปตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA (Sorensen et al., 1997; Sorensen et al., 1998) โดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA Herd Check*PRRS Virus Antibody Test Kit 2XR[1] (Yoon et aL, 2003) อ่านผลการตรวจหาแอนติบอดีเป็นค่า S/P ratio (OD sample/ OD positive control) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยค่า S/P ratio คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ค่า S/P ratio} = \frac{[\text{Sample A (650) : PRRS}] - [\text{Sample A (650) : NHC}]}{[\text{PC : PRRS}] - [\text{PC : NHC}]}$$

Sample A (650) : PRRS = ค่า OD ของ sample A ใน PRRS antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

Sample A (650) : NHC = ค่า OD ของ sample A ใน normal host cell (NHC) antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

PC : PRRS = ค่า OD ของ positive control ใน PRRS antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

PC : NHC = ค่า OD ของ positive control ใน normal host cell (NHC) antigen โดยวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

---

[1] IDEXX Laboratories, Inc., USA

การอ่านผล: ซีรั่มที่มีค่า S/P ratio <0.4 แสดงว่า ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS

ซีรั่มที่มีค่า S/P ratio ≥0.4 แสดงว่า ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS

ผล

จากการทดสอบความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว พบว่าวัคซีนทั้ง 4 สเตรนไม่ทำให้หนูขาวป่วยหรือตาย แสดงว่ามีความปลอดภัยต่อหนูขาว 100% และจากการทดสอบความเป็นพิษในหนูตะเภา ไม่พบอาการบวมแดงบริเวณที่ฉีดวัคซีนและไม่ทำให้หนูตะเภาป่วยหรือตาย แสดงว่ามีความปลอดภัยต่อหนูตะเภา 100% เมื่อทดสอบความปลอดภัยทั่วไปในลูกสุกร พบว่า ลูกสุกรทุกตัวปกติ ไม่มีไข้หรือแสดงอาการป่วย แสดงว่ามีความปลอดภัยต่อลูกสุกร 100% (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบการเปลี่ยนกลับรุนแรงและการขับออกของวัคซีนไวรัส เมื่อผ่านเชื้อวัคซีนไวรัสทั้ง 4 สเตรนในลูกสุกร 5 passages ตรวจไม่พบวัคซีนไวรัสทั้ง 4 สเตรน จาก nasal swabs แสดงว่าไม่มีการขับออกของเชื้อวัคซีนไวรัสจากสุกรที่ฉีดวัคซีนแต่ละสเตรน โดยลูกสุกรทุกตัวทั้ง 5 passages ยังคงมีสุขภาพแข็งแรง ไม่พบวิการที่ปอด ทอนซิล ต่อมน้ำเหลืองและม้าม แสดงว่าวัคซีนทั้ง 4 สเตรน ไม่เปลี่ยนกลับรุนแรง หลังจากผ่านเชื้อวัคซีนไวรัสในลูกสุกร 5 passages (ตารางที่ 2)

ผลทดสอบการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัสในลูกสุกร พบว่าสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนทั้ง 4 สเตรน ส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัสทุกตัวไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัส PRRS แสดงว่าวัคซีนทั้ง 4 สเตรน สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนทั้ง 4 สเตรน ไม่ได้แพร่กระจายเชื้อให้แก่สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

วัคซีน PRRS ทั้ง 4 สตรน มีความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว ไม่มีความเป็นพิษในหนูตะเภาและมีความปลอดภัยทั่วไปในสุกร ไม่มีการขับออกของเชื้อวัคซีนไวรัสจากสุกรที่ฉีดวัคซีน ไม่มีการเปลี่ยนกลับรุนแรงหลังจากผ่านเชื้อวัคซีนไวรัสในลูกสุกร 5 passages ไม่มีการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัสจากลูกสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนให้แก่ลูกสุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2004) กำหนดไว้ว่าวัคซีนต้องมีความปลอดภัยสำหรับสุกรที่มีอายุตามคำแนะนำให้ใช้วัคซีน(แนะนำให้ใช้ในลูกสุกรหย่านม 3-4 สัปดาห์) ไวรัสสำหรับผลิตวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น ต้องไม่เปลี่ยนกลับรุนแรง (turning to virulence) หลังจากผ่านในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ และ MLV ต้องไม่มีความรุนแรงในลูกสุกรและสุกรตั้งท้อง เมื่อผ่านเชื้อในสุกรที่มีความไวต่อเชื้อ PRRS ในทางที่ติดเชื้อตามธรรมชาติอย่างน้อย 5 passages อย่างไรก็ตามเนื่องจากระยะเวลาในการทดสอบอยู่ในช่วงสั้น การตรวจหาแอนติบอดีหลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ อาจตรวจไม่พบ และลูกสุกรก็อยู่ในสภาวะที่มีสุขภาพแข็งแรงอาจยังไม่อยู่ในช่วงเวลาที่มีการขับออกของวัคซีนไวรัส ซึ่ง OIE (2004) ก็ได้รายงานไว้ว่า MLV สามารถคงอยู่ในสัตว์ที่

ได้รับวัคซีนเป็นเวลานาน และเคยมีรายงานว่ามีการแพร่กระจายของวัคซีนไวรัสให้แก่สุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนและบางครั้งวัคซีนไวรัสก็ทำให้เกิดโรค

การพิจารณาเลือกใช้ชนิดของวัคซีน PRRS จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของการใช้วัคซีนเป็นอันดับแรก โดยต้องแน่ใจว่าวัคซีนชนิดนั้นมีความปลอดภัยสูง ไม่มีความรุนแรงต่อสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและวัคซีนไวรัสต้องไม่สามารถเปลี่ยนกลับมารุนแรงหรือแพร่กระจายให้กับสัตว์ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน มิฉะนั้นวัคซีนไวรัสอาจกลายพันธุ์หรือมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและอาจกลับมารุนแรงขึ้น ทำให้สัตว์ที่ได้รับเชื้อป่วยหรือตายได้

เอกสารอ้างอิง

Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hinnings, J. C., Shaw, D. P., Goyal, S. M., McCullough, S., Morrison, R. B., Joo, H. S., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126.

Office International des Epizooties, OIE. 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 18 p. Available source: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00099.htm. Accessed 25 October 2005.

Sorensen, K. J., Botner, A., Madsen, E. S., Strandbygaard, B. and Nielsen, J. 1997. Evaluation of a blocking ELISA for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vet. Microbiol. 56: 1-8.

Sorensen, K. J., Strandbygaard, B., Botner, A., Madsen, E. S., Nielsen, J. and Have, P. 1998. Blocking ELISA for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Microbiol. 60: 169-177.

Thanawongnuwech, R., Damrongwatanapokin, S and Horcharoen, A. 2003. PRRS virus in Southeast Asia. In: 2003 PRRS Compendium: second edition, Zimmerman, J. J. and Yoon, K. J. ed. Iowa. pp. 269-273.

Torrison, J., Knoll, M. and Wiseman, B. 1996. Evidence of pig-to-pig of a modified-live PRRS virus vaccine. Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners. 89-91.

USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. 2000a. Code of Federal Regulations 9 Parts 1 to 199 Animal and Animal Products, 113.33. Mouse safety test. Washington. p. 550.

USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. 2000b. Code of Federal Regulations 9 Parts 1 to 199 Animal and Animal Products, 113.38. Guinea pig safety test. Washington. pp. 552-553.

Van Woensel, P. A., Liwjkens, K. and Denmaret, S.1998. Effect on viremia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. Vet. Rec, 142: 510-512.

Verheije, M. H., Kroese, M. V., van der Lenden, I. F. A., de Boer-Luijtze, E. A., van Rijn, P. A., Pol, J. M. A., Muelenberg, J. J. M. and Steverink, P. J. G. M. 2003. Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. Vaccine. 3711:1-8.

Wensvoort, G., Terpstra C., Pol J. M. A., Ter Laak E. A., Bloemraad M., De Kluyver E. P., Kragten C., Van Buiten L., Den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J. M., Moonen P. L. J. M., Zetstra T., De Boer E. A., Tibben H.J., Jong M. F., Van't Velde P., Groenland G. J. R., Van Gennep J. A., Voets M. Th., Verheijden J. H. M. and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quarterly. 13: 121-130.

Wensvoort, G., De Kluyver, E. P., Luijtze, E. A., Den Besten, A., Harris, L., Collins, J. E., Christianson, W. T. and Chladek, D. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. J. Vet. Dagn. Invest. 4: 134-138.

Yoon, K. J., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E. A. 2003. Diagnosis of PRRS Virus. In: 2003 PRRS Compendium: producer edition, Zimmerman, J. J. and Yoon, K. J. ed. Iowa. pp. 57-67.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว ความเป็นพิษในหนูตะเภาและความปลอดภัยทั่วไปในสุกรของวัคซีนพีอาร์อาร์เอสชนิดเชื้อเป็น 4 สเตรน

วัคซีนสเตรน	ความปลอดภัยเฉพาะในหนูขาว		ความเป็นพิษในหนูตะเภา		ความปลอดภัยทั่วไปในสุกร	
	จำนวน (ตัว) ป่วย,ตาย/ทั้งหมด	%	จำนวน (ตัว) ป่วย,ตาย/ทั้งหมด	%	จำนวน (ตัว) ป่วย,ตาย/ทั้งหมด	%
VP-046 BIS	0/10	100	0/2	100	0/2	100
DV	0/10	100	0/2	100	0/2	100
ATCC VR-2332	0/10	100	0/2	100	0/2	100
ALL 183	0/10	100	0/2	100	0/2	100

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการเปลี่ยนกลับรุนแรง (turning to virulence) และการขับออกของวัคซีนไวรัส (vaccinal virus shedding) ในลูกสุกร อายุ 4 สัปดาห์ ทั้ง 5 passages ของวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น 4 สเตรน

Vaccine strain	VP-046 BIS			DV			ATCC VR-2332			ALL 183		
passage level	nasal swab[1]	clinical signs[2]	lung lesion[3]	nasal swab[1]	clinical signs[2]	lung lesion[3]	nasal swab[1]	clinical signs[2]	lung lesion[3]	nasal swab[1]	clinical signs[2]	lung lesion[3]
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1] - หมายถึง เซลล์ไม่เกิดพยาธิสภาพ (CPE)

[2] - หมายถึง ไม่พบอาการผิดปกติ

[3] - หมายถึง ไม่เกิดรอยโรค

ตารางที่ 3 การตรวจหาแอนติบอดีของลูกสุกรหลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ฉีดวัคซีน PRRS ชนิดเชื้อเป็น 4 สเตรน และกลุ่มควบคุมสัมผัสของวัคซีนทั้ง 4 สเตรน

ค่า S/P ratio[1]							
วัคซีนสเตรน VP-046 BIS		วัคซีนสเตรน DV		วัคซีนสเตรน ATCC VR-2332		วัคซีนสเตรน ALL 183	
สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน	สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส	สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน	สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส	สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน	สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส	สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีน	สุกรกลุ่มควบคุมสัมผัส
1.337	0.143	1.979	0.218	1.669	0.048	0.679	0.056
0.534	0.027	0.851	0.203	1.433	0.128	0.532	0.084
1.776	0.134	2.370	0.152	0.994	0.113	0.616	0.045
0.292	0.084	0.812	0.122	1.690	0.012	0.150	0.115
0.337	0.069	0.131	0.054	1.782	0.222	0.136	0.065

[1] ค่า S/P ratio $\geq$ 0.4 แสดงว่าให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดี (positive serum)

และค่า S/P ratio $<$ 0.4 แสดงว่าให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดี (negative serum)

Studies on safety, turning to virulence and transmission of modified live PRRS vaccines

Wilasinee Thaopech[1] Kriangkrai Chaikhum[1] Jarunee Satra[1]

Abstract

Studies on safety, turning to virulence and transmission of four modified live PRRS vaccines based on different strains, VP-046 BIS, DV, ATCC VR-2332 and ALL 183 strains, were carried out. For specific safety test, groups of ten mice, weighing 18 to 22 grams, were inoculated subcutaneously with 0.5 ml of the vaccines and observed for 7 days. For toxicity test, groups of two guinea pigs, weighing 250 to 400 grams, were inoculated intramuscularly with 2 ml of the vaccines and observed for 7 days. For general safety test, groups of two piglets, 4 weeks old, were inoculated intramuscularly with 10 doses of vaccines and observed for 21 days. All vaccines were shown to be 100 percent safe in all tests. Virulence turning and shedding of vaccinal viruses were tested. The results showed that all vaccinal viruses, passaged in a 4-week-old pig for 5 times, one piglet/passage, did not turn virulent and no virus shedding was found. For transmission test, four groups of 5 piglets, 4 weeks old, were vaccinated with one dose of each vaccine strain. Five unvaccinated piglets that served as a contact control group were housed in the same room of each vaccinated group. The results showed that all vaccinal viruses were not transmitted from vaccinated pigs to contact control pigs because no antibodies to PRRS virus were detected in all contact control groups.

Key words: Safety test, Turning to virulence, Transmission, Modified live PRRS vaccines

[1]Veterinary Biologics Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลกในเฟอร์เมนเตอร์

วันชัย ตีรถะวรวรรณ[1] วีรชาย ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium chauvoei* เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบลคเลกในเฟอร์เมนเตอร์ โดยทดลองเพาะในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนคือ glucose และแหล่งไนโตรเจน คือ tryptose และ meat extract ปริมาณต่างๆ กัน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glucose, tryptose และ meat extract เท่ากับ 15, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อขยายการเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 และ 500 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่ามีการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร มีระยะพักตัวของเชื้อ (lag phase) 15 ชั่วโมง และระยะที่เชื้อแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณเชื้อที่เป็น vegetative cell สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ของ log phase และเมื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนได้วัคซีนที่มีคุณภาพและปลอดภัยเมื่อทดสอบในหนูตะเภาและแกะ ดังนั้นสามารถใช้ผลการทดลองครั้งนี้ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนแบลคเลกในเฟอร์เมนเตอร์

คำสำคัญ: วัคซีนแบลคเลก ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม เฟอร์เมนเตอร์

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคแบลคเลก หรือโรคไข้ขา เป็นโรคติดต่อร้ายแรงของโค กระบือ แพะ และ แกะ เกิดจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* ทำให้เกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อโดยเฉพาะบริเวณต้นขาหลัง มีอัตราการตายสูงหรือพิการในสัตว์ที่รอดชีวิตทำให้เกิดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ โรคเกิดได้ในทุกฤดูกาลและมักเกิดซ้ำในจุดที่เคยเกิดโรคอยู่เสมอ เนื่องจากเชื้อ *C. chauvoei* เป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญแบบไม่ใช้อากาศ สามารถสร้างสปอร์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และสปอร์มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีชีวิตอยู่ในดินได้เป็นเวลาหลายปี ในประเทศไทยยังคงพบสัตว์เป็นโรคนี้จึงต้องควบคุมโดยการฉีดวัคซีนแก่สัตว์ในท้องที่ที่เคยเกิดโรค

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ผลิตวัคซีนแบลคเลกชนิด formalinized whole cell ของเชื้อ *C. chauvoei* ในสภาพเป็น vegetative cell ซึ่งเป็นส่วนที่ก่อให้เกิดความคุ้มโรค (Micalizzi and Guzman, 1997; Tamura and Tanaka, 1984; Tamura et al., 1984; Chandler and Hamilton, 1975) ดังนั้นในกระบวนการผลิตวัคซีนให้ได้ผลผลิตของเชื้อที่เป็น vegetative cell สูงจึงมีความสำคัญ วิธีเดิมที่ผลิตวัคซีนแบลคเลกมีขีดจำกัดเนื่องจากใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่บรรจุในขวดบอลลูนปริมาตร 8-9 ลิตร ทำให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์ปริมาณน้อยไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้วัคซีนปริมาณมากในคราวเดียวได้รวมถึงสิ้นเปลืองแรงงานในการเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาจึงปรับปรุงโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร ซึ่งปัจจุบันการผลิตวัคซีนนี้ในเฟอร์เมนเตอร์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย tryptose phosphate broth 29.5 กรัม glucose 8 กรัม tryptose 3 กรัม meat extract 2 กรัม และ L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร (Cameron et al., 1986) แต่ยังพบปัญหาไม่ทราบช่วงเวลาระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะเก็บเชื้อเพื่อผลิตเป็นวัคซีน ระยะนี้เชื้ออยู่ในรูป vegetative cell มากมีสปอร์น้อย การกำหนดระยะเวลาเก็บเชื้อจึงเกิดการผิดพลาดได้ง่ายเนื่องจากการเจริญของเชื้ออาจเข้าสู่ระยะ stationary phase ทำให้ได้ปริมาณผลผลิต vegetative cell ของเชื้อต่ำ เกิดสปอร์จำนวนมาก ไม่สามารถนำมาผลิตเป็นวัคซีนได้ นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ผลิตได้ไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดความสูญเสียระหว่างขั้นตอนการผลิต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ เพื่อลดข้อบกพร่องดังกล่าว การทดลองนี้เป็นการศึกษาปริมาณสารอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. chauvoei* ได้แก่ สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนคือ glucose และแหล่งไนโตรเจนคือ tryptose และ meat extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร แบบคราวเดียว (batch cultivation) เพื่อให้ได้ผลผลิตของเชื้อสูงสุด คัดเลือกปริมาณสารอาหารที่ให้ผลผลิตของเชื้อสูงสุดเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงขยายในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 และ 500 ลิตร และที่ขนาด 500 ลิตรนำมาผลิตวัคซีนแบลคเลก และทำการทดสอบตามมาตรฐานเพื่อได้คุณภาพและมีผลิตผลสูงสุด

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ผลิตวัคซีนแบลคเลก

สปอร์ของเชื้อ *C. chauvoei* สายพันธุ์ท้องถิ่น ในรูปทำแห้ง มีจำนวนสปอร์ 10^5 CFU ต่อขวด ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

การศึกษาปริมาณสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. chauvoei* ที่เหมาะสมในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร[1]

ศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม 3 ชนิดคือ glucose, tryptose และ meat extract โดยศึกษาผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ดังนี้

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glucose[2] ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย tryptose phosphate broth[3] 29.5 กรัม tryptose[4] 3 กรัม meat extract[5] 2 กรัม และ L-cysteine HCl[6] 1 กรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรปริมาตร 700 มิลลิลิตรในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อดังนี้ ให้ก๊าซไนโตรเจนเพื่อทำให้เป็นสภาพปราศจากก๊าซออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.2 และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ tryptose ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร โดยเลือกปริมาณ glucose ที่เหมาะสม วิธีการและการควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อจากผลของ glucose ข้างต้น ปรับเปลี่ยนเฉพาะความเข้มข้นของ tryptose

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ meat extract ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 กรัมต่อลิตร โดยเลือกปริมาณ glucose และ tryptose ที่เหมาะสม วิธีการและการควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อจากผลการทดลองข้างต้น ปรับเปลี่ยนเฉพาะความเข้มข้นของ meat extract

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกปริมาณของ glucose tryptose และ meat extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อเจริญสูงสุดนำมาเพาะเชื้อเพื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดิม ก่อนนำสูตรอาหารที่ได้คัดเลือกมาเพาะขยายขนาดการเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ ขนาด 3 ลิตร และ 500 ลิตร

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร

ทำการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร[7] โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 ลิตร ตามสูตรที่คัดเลือกและควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร

เพาะเชื้อปริมาตร 2 ลิตร ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร ให้เชื้อเจริญและเข้าสปอร์จนหมด นำมาเพาะเลี้ยง

---

[1]B. Braun, Model Biostat® Q-DCU3, Germany [2]BDH, UK [3]Alpha Biosciences, USA
[4]Lab M, UK [5]Difco, USA [6]Gibco BRL, USA [7]Bioengineering, Model KLF 2000, 3.7 L, Switzerland

ลงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร[8] ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 ลิตร มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรที่คัดเลือก ควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 และ 3 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อโดยใช้ฟอร์มาลีน 0.5% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างของเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1, 3 และ 500 ลิตรทุกๆ ชั่วโมง นำมาตรวจการเจริญของเชื้อจากค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 580 นาโนเมตร วัดความเข้มข้นของน้ำตาลโดยวิธี Dinitrosalicylic acid (Chaplin, 1986) และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมสีแกรม

การเตรียมและผลิตวัคซีน

นำเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตรตามสูตรที่ได้คัดเลือกมาผลิตเป็นวัคซีน โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.26% PCV ด้วย 0.85% sodium chloride และผสมกับ potash alum 0.65% ของปริมาตรวัคซีน จากนั้นบรรจุลงขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร (20 โด๊ส) เป็นวัคซีนแบลคเลกสำเร็จรูป ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างสำหรับทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของวัคซีน

ทดสอบคุณภาพของวัคซีนตามมาตรฐานที่กำหนด (British pharmacopoeia, 1993; British veterinary codex, 1965; European pharmacopoeia, 2004) ดังนี้

1. Sterility test ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยนำตัวอย่างวัคซีนเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ fluid thioglycollate medium และ tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose broth และ tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน วัคซีนที่ผ่านการทดสอบต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบต้องไม่ขุ่น

2. Toxicity test ทดสอบความเป็นพิษของวัคซีน โดยฉีดวัคซีน 2 มิลลิลิตรเข้าใต้ผิวหนังหนูตะเภาขนาดน้ำหนักตัว 250-400 กรัม จำนวน 2 ตัว สังเกตอาการเป็นเวลา 10 วัน วัคซีนที่ผ่านการทดสอบต้องมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง หนูตะเภาที่ฉีดวัคซีนต้องไม่มีอาการป่วยหรือเสียชีวิต

3. Safety test ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน โดยฉีดวัคซีน 5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นขนาด 2 เท่าของโด๊สปกติ เข้าใต้ผิวหนังแกะจำนวน 2 ตัว สังเกตอาการเป็นเวลา 7 วัน วัคซีนที่ผ่านการทดสอบต้องมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง แกะที่ฉีดวัคซีนต้องไม่มีอาการป่วยหรือเสียชีวิต

4. Potency test ทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน โดยฉีดวัคซีนขนาดโด๊สปกติ 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังหนูตะเภากลุ่มทดลอง ขนาดน้ำหนักตัว 250-400 กรัม จำนวน 10 ตัว หลังจากนั้น 28 วัน ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 ขนาดโด๊สเท่าเดิม เมื่อครบ 14 วัน ฉีดเชื้อพิษขนาด 50% minimum lethal dose (MLD_{50}) เข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภากลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 5 ตัว สังเกตอาการเป็นเวลา 5 วัน หนูตะเภาในกลุ่มทดลองต้องรอดชีวิตทั้งหมด ส่วนกลุ่มควบคุมต้องตายทั้งหมด

---

[8]Bioengineering, Model P500 litres, Switzerland

ผล

การศึกษาปริมาณสารอาหารต่อการเจริญของ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร

พบว่าการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ glucose 2, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร มีระยะพักตัวของเชื้อ (lag phase) นาน 16 ชั่วโมง ระยะที่เชื้อแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) นาน 4.5-5 ชั่วโมง เมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของระยะนี้ (late log phase) ที่ชั่วโมง 22 เชื้อจะเริ่มเข้าสปอร์และระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) จะพบเพียงสปอร์ของเชื้อเท่านั้น ยกเว้นความเข้มข้นของ glucose ที่ 2 กรัมต่อลิตร เชื้อจะยังคงรูปของ vegetative cell อยู่ ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อที่เลี้ยงใน glucose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เท่ากับ 1.08, 1.63, 2.05 และ 2.28 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

ความเข้มข้นของ tryptose ที่ 1, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* พบว่ามีช่วง lag phase และ log phase นาน 15-16 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ ลักษณะรูปร่างของเชื้อเมื่อการเจริญเข้าสู่ปลาย stationary phase ที่ชั่วโมง 22-23 เชื้อจะเข้าสปอร์ทั้งหมด ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.99, 2.06, 2.01 และ 1.96 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

ความเข้มข้นของ meat extract ที่ 0.5, 1, 3 และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* มีช่วง lag phase และ log phase นาน 15 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.91, 1.96, 2.01 และ 1.96 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3

การเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกจากการทดลองมีส่วนประกอบดังนี้ tryptose phosphate broth 29.5 กรัม glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม meat extract 3 กรัม และ L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตรให้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.01 เปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. chauvoei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ tryptose phosphate broth 29.5 กรัม glucose 8 กรัม tryptose 3 กรัม meat extract 2 กรัม และ L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.85 ดังแสดงในรูปที่ 4

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร

พบว่าการเจริญของเชื้อในช่วง lag phase ใช้เวลานาน 15 ชั่วโมง log phase ใช้เวลา 4-5 ชั่วโมง เชื้อ *C. chauvoei* จะเริ่มเข้าสปอร์ที่เวลา 19 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 4.30 ในขณะที่ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 5.5 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในเฟอร์เมนเตอร์เท่ากับ 1.96 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 5

ผลการขยายขนาดการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร

การเจริญของเชื้อในช่วง lag phase ใช้เวลานาน 15 ชั่วโมง log phase ใช้เวลานาน 4-5 ชั่วโมง เชื้อ *C. chauvoei* จะเริ่มเข้าสปอร์ที่เวลา 19 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อมีค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 4 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในเฟอร์เมนเตอร์เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลีน ดังแสดงในรูปที่ 6

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน

วัคซีนสำเร็จรูปที่ผลิตจากเชื้อที่เลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร เมื่อทำการทดสอบคุณภาพพบว่าปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ไม่มีพิษ มีความปลอดภัย และให้ความคุ้มโรคในสัตว์ทดลอง ตามตารางที่ 1

วิจารณ์

การศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ ปัจจัยซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อขึ้นอยู่กับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อได้แก่ glucose พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ glucose เพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตของเชื้อก็จะเพิ่มขึ้นด้วยซึ่งสอดคล้องกับ Cortinas et al. (1994) ที่ศึกษาพบว่าปริมาณสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า glucose tryptose และ meat extract ขนาด 15, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ทำให้เชื้อมีการเจริญสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารอาหารทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้อยู่ในปัจจุบันพบว่า tryptose และ meat extract ที่เหมาะสมจากการทดลองมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่ 3 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของ glucose ที่เหมาะสมจะมากกว่าเดิมที่ใช้ 8 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาปริมาณ glucose 2 กรัมต่อลิตร แม้ว่าเชื้อยังคงรูป vegetative cell แต่ให้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.08 ซึ่งปริมาณเซลล์น้อยไม่เหมาะในการนำไปผลิตวัคซีน ส่วนการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใหม่กับสูตรเดิมโดยวัดจากการดูดกลืนแสงจะมีค่ามากกว่าสูตรเดิมเล็กน้อย

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกปริมาณ glucose, tryptose และ meat extract วิธีการและการควบคุมสภาวะที่เลี้ยงเชื้อจากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร พบว่าระยะการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ทั้งสองขนาดมีระยะ lag phase และ log phase ใกล้เคียงกัน แต่อัตราการเจริญของเชื้อที่วัดจากค่าดูดกลืนแสงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตรมีค่ามากกว่าซึ่งอาจมีสาเหตุจากขนาดที่ต่างกันของเฟอร์เมนเตอร์ และเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างบริษัท ซึ่งอาจจะมีระบบการทำงานแตกต่างกัน หรือระบบการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 1 ลิตร มีการกระจายของฟองอากาศอาจไม่ทั่วถึงเมื่อเทียบกับฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 และ 500 ลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัทเดียวกัน พบว่ามีระยะ lag phase และ log phase เท่ากัน และอัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดจากการดูดกลืนแสงมีค่าใกล้เคียงกันคือ 4.3 และ 4 จากผลการทดลองทำให้ทราบถึงรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ ระยะเวลาในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ ระยะ lag phase นาน 15 ชั่วโมง และระยะ log phase นาน 4-5 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อเพื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนที่มีปริมาณความเข้มข้นของ vegetative cell มากมีสปอร์น้อยคือ 19 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ การศึกษาครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียวคือใส่สารอาหารแต่แรกเพียงครั้งเดียว ไม่เปลี่ยนอาหารอีก เมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดแล้วจะลดลงตามสารอาหารที่น้อยลง และมีการสะสมของ secondary metabolites ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (Moreira et al., 1981) เซลล์จะเปลี่ยนรูปเป็นสปอร์ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการผลิตวัคซีน การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนแบบคลอเลกเพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้น สามารถทำโดยการเพาะเลี้ยงแบบเติมอาหารเป็นระยะ (fed-batch cultivation) เพื่อรักษาระดับสารอาหารให้คงที่เชื้อจะเจริญได้ต่อเนื่อง สามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมาก (Whitaker, 1980) ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรทำการศึกษาต่อไป

สรุป

การผลิตวัคซีนแบลคเลกในเฟอร์เมนเตอร์ เมื่อใช้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. chauvoei* คือ glucose, tryptose และ meat extract ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยการเจริญของเชื้อโดยพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม และ meat extract 3 กรัม ที่มี tryptose phosphate broth 29.5 กรัม และ L-cysteine HCl 1 กรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อเพื่อผลิตวัคซีนให้มีปริมาณความเข้มข้นของ vegetative cell มาก และมีสปอร์น้อยคือ หลังจากเชื้อเข้าสู่ช่วง log phase นาน 4 ชั่วโมง มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 4 และวัคซีนสำเร็จรูปที่ผลิตได้ผ่านเกณฑ์การทดสอบคุณภาพตามมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ข้อเสนอแนะ รวมทั้งบุคลากรของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) และ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

British pharmacopoeia (Veterinary). 1993. Veterinary vaccines. HMSO. London. p. 117.

British veterinary codex. 1965. Antisera vaccine and related product, 2nd ed. The pharmaceutical press. London. pp. 447-449.

Cameron, C. M., Botha, W. J. S. and Schoeman, J. H. 1986. Immunization of guinea-pigs and cattle with a reduced dose *Clostridium chauvoei* vaccine produced in a semi-synthetic medium. Onderstepoort J. Vet. Res. 53: 51-53.

Chandler, H. M. and Hamilton, R. C. 1975. The preparations of immunogenic cell walls from a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. J. Gen. Microbiol. 88: 27–35.

Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides. In: Carbohydrate analysis, Chaplin, M.F. and Kennedy, J. F. ed. IRL Press. Oxford. pp. 1–13.

Cortinas, T. I., Micalizzi, B. and de Guzman, A. M. S. 1994. Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*. J. Appl. Bacteriol. 77: 382-385.

European Pharmacopoeia. 2004. *Clostridium chauvoei* vaccine for veterinary use, 5th ed. EDQM. Strasbourg. pp. 745-746.

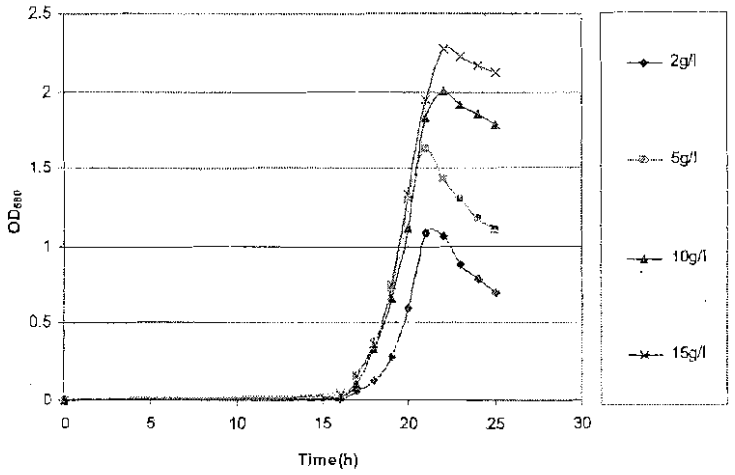
Micalizzi, B. and de Guzman, A. M. S. 1997. Immunogeneeity of an extract of *Clostridium chauvoei* in guinea pig. Clinical Infectious Diseases. 20 (suppl 2): S171-S172.

Moreira, A. R., Ulmer, D. C. and Linder, J. C. 1981. Butanol toxicity in the butyric fermentation. J. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11: 567-579.

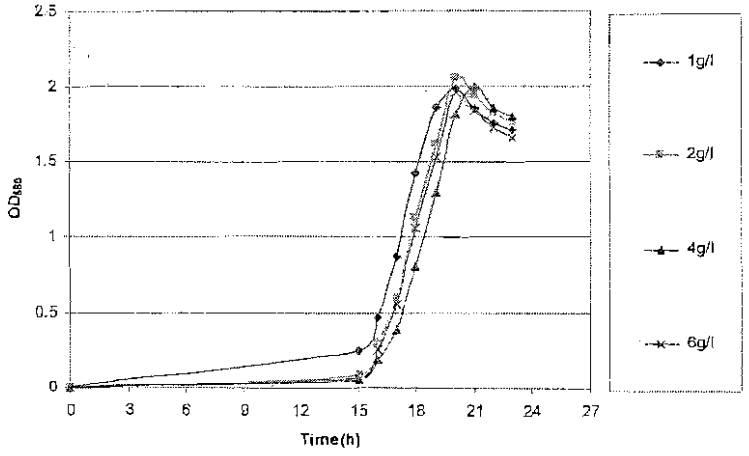
Tamura, Y., Minamoto, N. and Tanaka, S. 1984. Demonstration of protective antigen carried by *Clostridium chauvoei*. Microbiology and Immunology. 28(12): 1325-1332.

Tamura, Y. and Tanaka, S. 1984. Effect of antiflagella serum in the protection of mice against *Clostridium chauvoei*. Infectivity and Immunity. 43(2): 612-616.

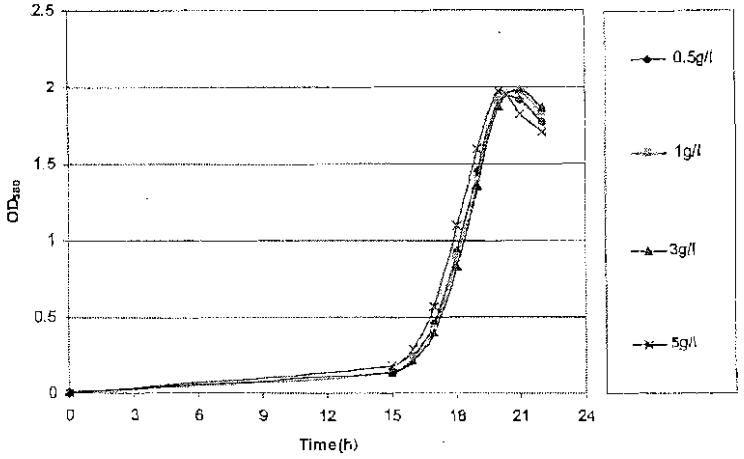
Whitaker, A. 1980. Fed-batch culture. Proc. Biochem. 15(4): 10-15.



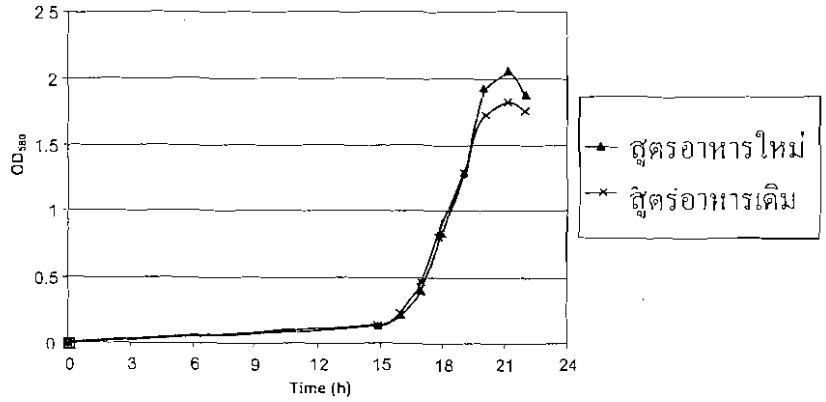
รูปที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงในการเจริญของ *C. chauvoei* เมื่อใช้ glucose ที่ 2, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tryptose 3 กรัม และ meat extract 2 กรัม



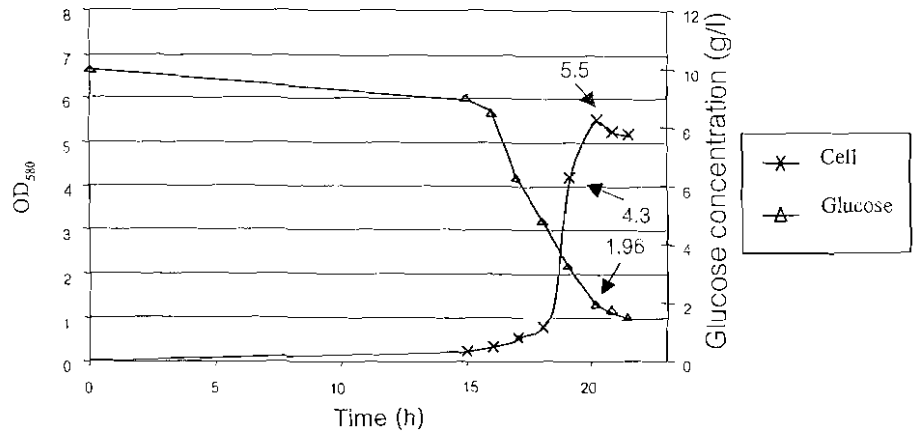
รูปที่ 2 ค่าดูดกลืนแสงในการเจริญของ *C. chauvoei* เมื่อใช้ tryptose ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose 15 กรัม และ meat extract 2 กรัม



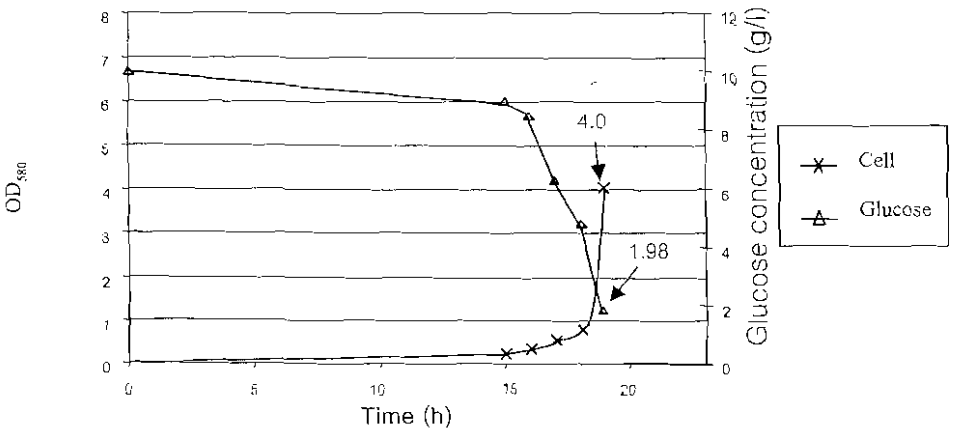
รูปที่ 3 ค่าดูดกลืนแสงในการเจริญของ *C. chauvoei* เมื่อใช้ meat extract ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose 15 กรัม และ tryptose 2 กรัม



รูปที่ 4 ค่าดูดกลืนแสงในการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใหม่ (glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม และ meat extract 3 กรัมต่อลิตร) และสูตรเดิม



รูปที่ 5 ค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลในการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 3 ลิตร เมื่อใช้ glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม และ meat extract 3 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อลิตร



รูปที่ 6 ค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลในการเจริญของเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร เมื่อใช้ glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม และ meat extract 3 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อลิตร

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนแบลคเลกที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. chauvoei* ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตร ที่ใช้ glucose 15 กรัม tryptose 2 กรัม และ meat extract 3 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อลิตร

การทดสอบ	การตัดสิน	ผล
Sterility test	ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา	ผ่าน
Toxicity test	หนูตะเภาไม่มีอาการผิดปกติ	ผ่าน
Safety test	แกะไม่มีอาการผิดปกติ	ผ่าน
Potency test	หนูตะเภารอดชีวิตทั้งหมด	ผ่าน

Development of blackleg vaccine production process in fermenter

Wanchai Teerathaworawan[1] Weerachai Poosungnoen[1]

Abstract

The optimization of medium compositions for *Clostridium chauvoei* growth was studied to develop blackleg vaccine production process in a fermenter. The bacteria were cultured in medium containing different concentrations of a carbon source (glucose) and nitrogen sources (tryptose and meat extract) in 1-L fermenter. The optimum concentrations of glucose, tryptose and meat extract in the medium were 15, 2 and 3 grams/L, respectively. Thereafter, the scale-up culturing in 3-L and 500-L fermenters were carried out. The resulting growth characteristics of *C. chauvoei* were similar to those when cultured in 1-L fermenter. The duration of lag phase and log phase were 15 and 5 hours, respectively and the culturing yielded highest vegetative cell density at the fourth hour of the log phase. In addition, the vaccine formulated from these cultures was found to be safe and efficient when tested in guinea pigs and sheep. Therefore, this result could be used for the development of blackleg vaccine production process in a fermenter.

Key words: Blackleg vaccine, Optimization of medium compositions, Fermenter

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

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

เขียนที่.....

วันที่.....

ข้าพเจ้าในนาม บริษัท/ห้างหุ้นส่วน.....เลขที่.....

ถนน.....แขวง.....เขต.....

จังหวัด.....โทรศัพท์.....โทรสาร.....มือถือ.....

ยินดีให้ความอุปการะจัดพิมพ์ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" จำนวน.....เล่ม

เป็นเงินจำนวน.....บาท (.....)

☐ ปีที่..... เล่มที่..... เดือน.....

โดยการลงโฆษณา ข้อความที่แนบมาด้วยแล้วในส่วนของ

☐ เต็มหน้าในเล่ม (ขาว – ดำ) 4,000 บาท

ข้าพเจ้าจะชำระเงินค่าโฆษณาแจ้งข้อความกับเจ้าหน้าที่ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่นำใบเสร็จรับเงิน และหนังสือ "วารสารชีวผลิตภัณฑ์" มาให้ข้าพเจ้าเป็นจำนวน 3 เล่ม เมื่อหนังสือได้พิมพ์เสร็จเรียบร้อยแล้ว

ลงนาม .....

(.....)

ตำแหน่ง .....

ขอขอบคุณ

ผู้ให้การสนับสนุนการพิมพ์เผยแพร่ในครั้งนี้

บริษัท นันวา มาร์เก็ตติ้ง จำกัด

บริษัท ซีทีไอ เทคโนโลยี จำกัด

บริษัท รีเนาน์ เทคนิคอล จำกัด

อภินันทนาการ

จาก

บริษัท นันวา มาร์เก็ตติ้ง จำกัด

102/222 ถนนประชาอุทิศ 57

แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กทม. 10140

โทร. 02-428-3850, 02-872-6860

01-846-9223

Fax. 02-428-5113

อภินันทนาการ

จาก

WITH THE COMPLEMENT

OF

บริษัท ซีทีไอ เทคโนโลยี จำกัด
C.T.I. TECHNOLOGY CO.,LTD.

6/193 หมู่ 4 ถนนนาคนิวาส
แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว
กรุงเทพฯ 10230
โทร. 02-932-8523-4
แฟ็กซ์. 02-932-9165
มือถือ 01-823-6585

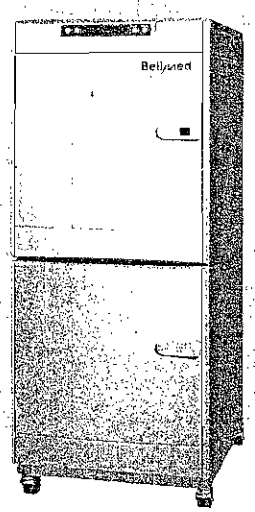
6/193 MOO 4 NAKNIVAS ROAD,
LADPRAO, BANGKOK 10230
Tel. 02-932-8523-4 Fax. 02-932-9165
MOBILE : 01-823-6585
E-mail : ctico@inet.co.th
w_kung@inet.co.th

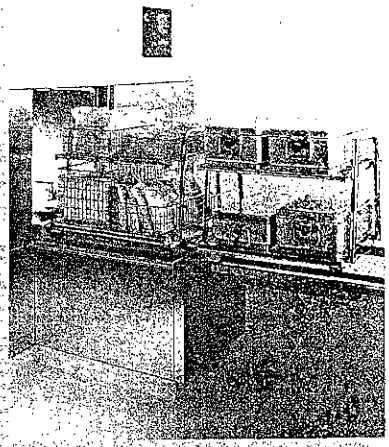
อภินันทนาการ

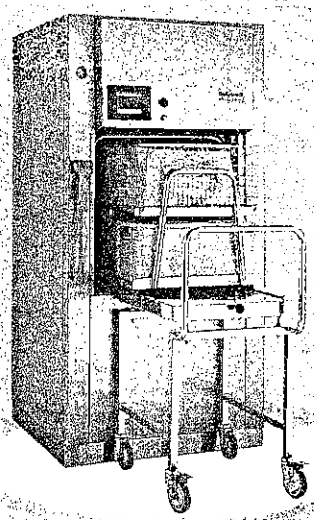
จาก

Belimed

Infection Control







เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำขนาดใหญ่
(Steam Sterilizer)

- เหมาะสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อเสื้อผ้า และอุปกรณ์การแพทย์ในโรงพยาบาล
- มีให้เลือกทั้งแบบประตูเดียว และ สองประตู
- มีขนาดให้เลือกตั้งแต่ 80 ลิตร จนถึงขนาดใหญ่กว่า 1,000 ลิตร
- สั่งงานผ่านหน้าจอแบบสัมผัส (Touch Screen)
- สามารถเลือกติดตั้งระบบผลิตไอน้ำร้อนบริสุทธิ์ภายในเครื่อง หรือเลือกใช้ไอน้ำจากภายนอกเครื่อง
- สามารถติดตั้งพร้อมระบบ Bar Code และคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการเก็บบันทึกข้อมูลสิ่งของที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
- ผ่านการรับรองมาตรฐาน EN ISO 9001

พร้อมทีมออกแบบ จัดสร้าง และวางระบบหน่วยจ่ายกลาง (CSSD) ในโรงพยาบาล