ผลของการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสต่อการเจริญเติบโตของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย

วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์[1] อนุรักษ์ ตระการรังสี[1]

บทคัดย่อ

ผลของการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสในถังเพาะขนาด 300 ลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ พบว่าการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% ได้ปริมาณอนุภาค 146S มากขึ้น 36.67% และ 24.19% ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนลดลง 23.47% และ 24.65% ตามลำดับ ดังนั้นการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส เพื่อเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ทำให้ได้ปริมาณอนุภาค 146S มากขึ้น และลดปริมาณโปรตีนที่ไม่ต้องการได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการผลิต ลดเวลาในขั้นตอนการทำน้ำไวรัสให้ใส และเข้มข้นได้

คำสำคัญ: เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ

---

[1]กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย (Makarasen and Sinsuwongwat, 1982) ซึ่งวิธีนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเพาะขนาด 2,000 ลิตร นาน 24 ชั่วโมงด้วย growth media suspension (GMS) ที่มีซีรั่ม 1% แล้วจึงเติมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยไม่เปลี่ยนมีเดียม (medium) เพาะเลี้ยงไวรัสใหม่ ส่วนการผลิตในปัจจุบันเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังเพาะขนาด 5,000 ลิตร โดยใช้ GMS สำเร็จรูปที่มีซีรั่ม 5% (สุรพล และวรพงษ์, 2543) นาน 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ $2.0x10^6$ เซลล์/มล. โดยเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วงเจริญเติบโตเต็มที่ (log phase) (Freshney, 1992) ซึ่งจะมีคุณภาพดีและปริมาณมากเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จึงทำการตกตะกอนเซลล์ที่ 4°C นาน 48 ชั่วโมง (วัชรี และคณะ, 2539) แล้วถ่ายมีเดียมเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งเหลือไว้ที่ระดับ 300 ลิตร แล้วเติมมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส คือ GMS ที่ไม่มีซีรั่มเพื่อเป็นมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส (maintenance medium) โดยการคำนวณปริมาณมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสที่จะเติมนั้น เมื่อหักจำนวนเซลล์ที่สูญเสียจากการถ่ายมีเดียมเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งไปแล้ว เติมมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสแล้วปั่นเซลล์ขึ้นมาใหม่ให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ $2.0x10^6$ เซลล์/มล. (พยนต์, 2547) ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันหลังจากที่เพาะเลี้ยงเซลล์ 48 ชั่วโมงแล้ว จึงเติมด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จากการศึกษาของพยนต์และจาตุรนต์ (2547) พบว่าการใช้ Van Bekkum medium (VBM) ทดแทน GMS สำหรับเป็นมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสในกระบวนการเพาะเลี้ยงไวรัสของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ทำให้ลดต้นทุนการผลิตลง และลดปริมาณโปรตีนที่ไม่ต้องการในวัคซีนได้ เนื่องจาก VBM มีราคาถูกกว่าและมีส่วนประกอบของโปรตีนน้อยกว่า GMS

การทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของการลดปริมาณมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสชนิด VBM ต่อปริมาณอนุภาค 146S ซึ่งเป็นอนุภาคสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย และปริมาณโปรตีนซึ่งทำให้สัตว์เกิดอาการแพ้วัคซีน ซึ่งถ้าหากสามารถลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลงได้จะลดเวลาในการทำน้ำไวรัส (viral fluid) ให้ใส และการทำให้เข้มข้นจากปกติที่ใช้เวลานานถึง 11-12 ชั่วโมง (วรากิจ และโฆษิต, 2539) นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการผลิตลง และวัคซีนจะมีปริมาณโปรตีนที่ไม่ต้องการลดลง

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O_{189} Udornthani 1987 passage ที่ 9 จากถังเก็บ seed virus ค่า infectivity titer = $10^{8.5}$ $TCID_{50}$/ml ปริมาณอนุภาค 146S = 5.4 µg/ml

เซลล์

เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากไตของตัวอ่อนหนู hamster (Nardelli and Panina, 1976)

มีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส

VBM (Rhone merieux, 1988)

กระบวนการเพาะเลี้ยงไวรัส

นำเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอย ความเข้มข้นประมาณ $2.0x10^6$ เซลล์/มล. จากถังเพาะขนาด 4,000 ลิตร มาแบ่งใส่ในถังเพาะขนาด 300 ลิตร จำนวน 3 ถัง ๆ ละ 250 ลิตร ตกตะกอนเซลล์ทั้ง 3 ถัง ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายมีเดียมเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งไป เหลือไว้ที่ปริมาตร 50 ลิตร แล้วเติมมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสใหม่ คือ VBM ลงไปในถังเพาะขนาด 300 ลิตร ทั้ง 3 ถังดังนี้ ถังที่ 1 เป็นถังควบคุมเติมมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสปริมาตร 150 ลิตร รวมเป็นปริมาตร 200 ลิตร จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $2.0x10^6$ เซลล์/มล. ถังที่ 2 เติมมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสปริมาตร 80 ลิตร รวมเป็นปริมาตร 130 ลิตร จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $3.0x10^6$ เซลล์/มล. คิดเป็นปริมาตรที่ลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ ถังที่ 3 เติมน้ำยาเพาะเลี้ยงไวรัสปริมาตร 50 ลิตร รวมเป็นปริมาตร 100 ลิตร จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $4.0x10^6$ เซลล์/มล. คิดเป็นปริมาตรที่ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เติม seed FMDV type O_{189} passage ที่ 9 ลงไปในถังเพาะ 300 ลิตรทั้ง 3 ถัง จำนวนถังละ 4 ลิตร ซึ่งคิดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรถังควบคุม (พยนต์, 2547) ให้อากาศ 10 ลิตร/นาที เพื่อควบคุม pH ที่ 7.4 ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ปั่นเซลล์แต่ละถังด้วยความเร็ว 150, 130 และ 100 รอบ/นาที ตามลำดับ เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างจำนวน 100 มล. จากทุกถังเพื่อตรวจดู cytopathic effect (CPE) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และ haemocytometer ชนิด spencer bright line ได้ CPE 80-100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างไวรัสไปตรวจหาปริมาณอนุภาค 146S โดยวิธี sucrose density gradient (Doel et al., 1982) และหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951) ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้นอีกจำนวน 4 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

ผล

ค่าเฉลี่ยปริมาณอนุภาค 146S ทั้งหมดในถังที่มีปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส 200 ลิตร, 130 ลิตร และ 100 ลิตร เท่ากับ 420,000 µg, 663,000 µg และ 554,000 µg ตามลำดับ เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ถังที่ลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% มีค่ามากกว่าถังควบคุม 36.67% และ 24.19% ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ส่วนค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนทั้งหมดในถังที่มีปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัส 200 ลิตร, 130 ลิตร และ 100 ลิตร เท่ากับ 426,800 mg, 326,560 mg และ 321,400 mg ตามลำดับ เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ถังที่ลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% มีค่าน้อยกว่าถังควบคุม 23.47% และ 24.65% ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

วิจารณ์

ปริมาณอนุภาค 146S ทั้งหมดในถังที่ลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% มีปริมาณมากกว่าในถังควบคุม 36.67% และ 24.19% ตามลำดับ แสดงว่าแม้จะลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง

มีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสก็ยังมีน้ำและองค์ประกอบที่จำเป็นได้แก่กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และแหล่งพลังงานพอเพียง สำหรับการเจริญเติบโตที่จำเป็นพื้นฐานของเซลล์ และมีสภาพแวดล้อมที่สามารถรักษาคุณภาพของเซลล์ไม่ให้ผิดปกติได้ (Parker, 1950) การลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง ทำให้อากาศ (O_2+CO_2+N_2) สามารถละลายในมีเดียมได้ดีขึ้น ส่งผลให้การควบคุม pH ของมีเดียมที่ระดับ 7.0-7.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการเกิด CPE และการเจริญเติบโตของไวรัสทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งต่างจากผลการศึกษาของ Makarasen et al. (1982) ที่ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสในการเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิด monolayer ซึ่งเพาะในขวด roller จำนวน 3 ปริมาตร พบว่าการเพิ่มปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสขึ้นอีก 100% จากปกติจะให้ปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้น 2 เท่า เนื่องจากสามารถควบคุม pH ได้ง่ายขึ้นเช่นเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้การลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 50% ได้ปริมาณไวรัสน้อยกว่าการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% อาจเนื่องมาจากการลดปริมาตรมีเดียมลงมากขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์มากเกินจุดสมดุลย์ส่งผลให้สภาพแวดล้อมต่างๆ ของเซลล์ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไวรัสเท่ากับการลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% ในขณะที่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในถังที่ลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% มีปริมาณน้อยกว่าในถังควบคุม 23.47% และ 24.65% ตามลำดับ การลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลงทำให้ปริมาณโปรตีนที่อยู่ในถังเพาะลดลง ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ไม่ต้องการในวัคซีนลดลงด้วย การลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลงจะสามารถลดต้นทุนการผลิต ลดเวลาในขั้นตอนการทำน้ำไวรัสให้ใสและเข้มข้น อีกทั้งเครื่องจักรและอุปกรณ์ในการผลิตเสื่อมสภาพช้าลงด้วย

สรุป

การลดปริมาตรมีเดียมเพาะเลี้ยงไวรัสลง 35% และ 50% เพื่อเพาะเลี้ยงไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ทำให้ได้ปริมาณอนุภาค 146S มากขึ้น 36.67% และ 24.19% ตามลำดับ และสามารถลดปริมาณโปรตีนลง 23.47% และ 24.65% ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.ไชยา สง่าประโคน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างและคณะกรรมการวิชาการที่ให้ข้อคิดเห็นและแก้ไขเอกสารนี้

เอกสารอ้างอิง

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 27-35

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ และจาตุรนต์ พลราช 2547 เปรียบเทียบการใช้ van bekkum medium ทดแทน growth media suspension สำหรับเป็น maintenance medium ในขบวนการ virus culture ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ Suspension วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(2): 27-34

วรากิจ จันทรัศมี และโฆษิต สินสุวงศ์วัฒน์ 2539 การใช้เครื่อง ultrafiltration ชนิด carbon-ceramic ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้มข้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6(2): 16-25

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ สุรพล ขุมทรัพย์ และวรากิจ จันทรัศมี 2539 ศึกษาการตกตะกอนของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ suspension ในกระบวนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 6 (2): 26-32

สุรพล ขุมทรัพย์ และวรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ 2543. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่เตรียมขึ้น วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2): 9-18

Doel, T. R., Flettom, B. W. and Stepple, R. F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradients. Dev. Biol. Stand. 50: 209-219.

Freshney, R. I. 1992. Animal cell culture. A practical approach, second edition, CRC Department of Medical Oncology, University of Glasgow. Oxford University Press. New York. p. 323.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Lewis, F. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 256-275.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and vaccine production Third country training program on foot and mouth disease control (group training course) February 24-March 16 1986, Bangkok, Thailand. pp. 180-183.

Makarasen, P., Sinsuwonkwat, P., Chinsawaddpun W., Tokui, T. and Motohashi, T. 1982. Large scale production of FMD vaccine using BHK cells in Thailand. The 16th conference on Foot and Mouth Disease. OIE Vol. 1. pp. 153-167.

Nardelli, L. and Panina, G. F. 1976. The use of suspension cultures for FMD vaccine production. Criteria for the evolution of cells. Virus, virus and vaccine. Dev. Biol. Stand. 35: 9-25.

Parker, R. C. 1950. Diluting fluids, pH determinations and osmotic pressure. Methods of tissue culture 2nd ed. Paul B. Hebert Inc. New York. pp. 75-86.

Rhone Merieux. 1988. Technique for production of foot and mouth disease vaccine. Section 1: culture media. (patent) pp. 167-170.

Table 1 The amount 146S particle of foot-and-mouth disease virus type O cultured in a 300 L fermenter with different volume of maintenance medium

No. of experiment	volume of maintenance medium					
	200 L (control)		130 L (reduced 35%)		100 L (reduced 50%)	
	146S (μg/ml)	total 146S (μg)	146S (μg/ml)	total 146S (μg)	146S (μg/ml)	total 146S (μg)
1	1.6	320,000	2.6	338,000	4.7	470,000
2	2.4	480,000	6.6	858,000	7.2	720,000
3	1.9	380,000	5.0	650,000	5.8	580,000
4	1.6	320,000	5.6	728,000	5.0	500,000
5	3.0	600,000	5.7	741,000	5.0	500,000
Mean	2.1	420,000	5.1	663,000	5.54	554,000
± SD	± 0.6	± 107,331	± 1.35	± 175,572	± 0.91	± 90,686
				increase		increase
				36.67%		24.19%

Table 2 The amount protein content of foot-and-mouth disease virus type O cultured in a 300 L fermenter with different volume of maintenance medium

No. of experiment	volume of maintenance medium					
	200 L (control)		130 L (reduced 35%)		100 L (reduced 50%)	
	protein content (mg/ml)	total protein content (mg)	protein content (mg/ml)	total protein content (mg)	protein content (mg/ml)	total protein content (mg)
1	2.48	496,000	1.78	231,400	4.35	435,000
2	2.00	400,000	1.60	208,000	2.23	223,000
3	2.88	576,000	3.00	390,000	3.83	383,000
4	1.86	372,000	2.78	361,400	2.93	203,000
5	1.45	290,000	3.40	442,000	2.73	273,000
Mean	2.13	426,800	2.51	326,560	321	321,400
± SD	± 0.49	± 99,000	± 0.70	± 91,000	± 0.86	± 77,000
				reduce 23.47%		reduce 24.65%

Effect of maintenance medium reduction on FMD virus type O growth in $BHK_{21}C_{13}$ suspension

Worapong Srivilirit[1] Anurak Trakarnrungsee[1]

Abstract

Effect of maintenance medium reduction on FMD virus type O growth in $BHK_{21}C_{13}$ suspension was that volume reduction of maintenance medium 35% and 50% resulting in the amount 146S particle increase of 36.67% and 24.19% and the amount of protein decrease 23.47% and 24.65%, respectively. Therefore, the reduction of maintenance medium yielded more virus antigen and less unnecessary protein. Moreover, the production cost is lower and the clarification and the concentration step is shorter.

Key words: $BHK_{21}C_{13}$ suspension, volume of maintenance medium, FMD virus type O

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

สัตว์ทดลอง

(Experimental animals)

วันทนีย์ รัตนศักดิ์[1]

ในการทำงานวิจัย นักวิจัยทุกคนย่อมต้องการผลการวิจัยที่ถูกต้องเป็นที่เชื่อถือได้ กรณีที่งานวิจัยมีสัตว์ทดลองเป็นองค์ประกอบคงจะปฏิเสธไม่ได้ว่า นอกจากขบวนการที่เหมาะสมและถูกต้องแล้ว สัตว์ทดลองที่เหมาะสมได้มาตรฐานคุณภาพ จะเป็นส่วนสำคัญมากส่วนหนึ่ง ในการที่จะทำให้ได้ผลการวิจัยที่มีคุณภาพ

การพิจารณาใช้สัตว์ทดลองที่เหมาะสมนั้น เป็นสิ่งที่นักวิจัยจะต้องหาคำตอบให้ได้ ก่อนที่จะเริ่มงานวิจัย ว่าจะต้องใช้สัตว์ชนิดใด มีคุณสมบัติอย่างไร ไม่ว่าจะเป็นเพศ อายุ น้ำหนัก จำนวนหรือคุณสมบัติพิเศษอื่นๆ ซึ่งสิ่งเหล่านี้ จะได้มาจากการสืบค้นศึกษาจากเอกสารอ้างอิง และจากข้อมูลเบื้องต้นของงานที่จะทำ อันดับแรกของการพิจารณาคือ ประเด็นพื้นฐานที่ชัดเจนเช่น ในการศึกษาเกี่ยวกับรังไข่ ก็ต้องใช้สัตว์เพศเมีย หากจะทำการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะความชรา ก็ต้องใช้สัตว์ที่มีอายุมากๆ ซึ่งเกณฑ์ทางอายุสำหรับสัตว์แต่ละชนิดก็ต่างกัน หรือในกรณีที่ต้องมีการผ่าตัด หากใช้สัตว์ขนาดค่อนข้างใหญ่จะสะดวกกว่าสัตว์ขนาดเล็ก แต่ก็จะต้องคำนึงถึงปัญหาการเลี้ยงดู ซึ่งจะยุ่งยากและสิ้นเปลืองมากกว่า เป็นต้น

การตอบสนองของสัตว์ต่อการทดลองนั้น ส่วนหนึ่งมาจากความซับซ้อนของตัวสัตว์แต่ละชนิด อันเนื่องมาจากปัจจัยทางพันธุกรรม ทั้งนี้เพราะอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมภายในของแม่ในระหว่างตั้งท้องต่อการแสดงออก (phenotype) ที่มีความแตกต่างกันไปของลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ซึ่งตัวอ่อนได้รับมาจากพ่อและแม่ เป็นผลมาจากอิทธิพลของสภาวะแวดล้อม ภายในท้องแม่เช่น ภายในท่อนำไข่หรือมดลูกเป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ จะมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งหากมีความผิดปกติเกิดขึ้นในระยะนี้ ก็จะมีผลต่อลักษณะภายนอกที่จะแสดงออกดังกล่าว ซึ่งการศึกษาผลการตอบสนองของสัตว์ต่อการทดลองนั้น จะเป็นการศึกษาการตอบสนองโดยตรงของลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออกมาต่อการทดลอง

แต่เราก็จะพบว่าหากนำสัตว์กลุ่มเดียวกันทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน แต่ต่างสภาวะแวดล้อม กลับได้ผลการตอบสนองที่ไม่เหมือนกัน ทั้งนี้เพราะสภาวะแวดล้อมมีผลต่อสรีรสภาพของสัตว์

ดังนั้น สิ่งสำคัญอย่างยิ่งที่นักวิจัยจะต้องทำ คือการทำให้สภาวะสรีรสภาพของสัตว์ทดลองที่จะนำมาใช้มีความคงที่ตลอดการทดลองโดยจะต้องควบคุมความคงที่ของ genotype, maternal effects, phenotypes และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งการควบคุมองค์ประกอบดังกล่าวจะส่งผลดีต่องานวิจัยดังนี้

- เป็นที่น่าเชื่อถือ (improved reliability)
- ผลที่ได้ไม่แปรเปลี่ยนเมื่อมีการทำซ้ำ (increased reproducibility)
- ลดจำนวนสัตว์ที่ใช้ (reduction in number of animals)

---

[1] คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

- ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย (reduction in time and cost)
- ลดความผิดพลาด (minimalization of errors)
- มีประโยชน์นำไปประยุกต์ใช้ได้ต่อไป (more realistic extrapolation to the same or other species, including man)

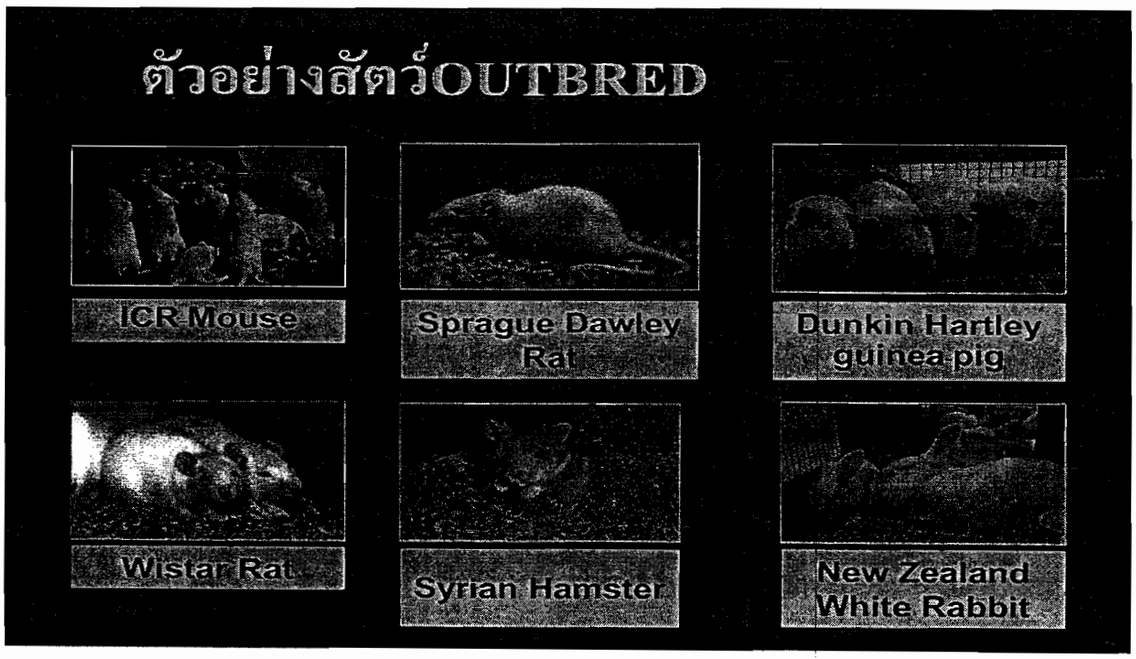
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสัตว์ทดลองที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้งานวิจัยหรืองานทดสอบจะต้องมีคุณภาพซึ่งหมายถึง การมีคุณภาพพันธุ์ (genetic quality) และคุณภาพสุขภาพ (health quality)

คุณภาพพันธุ์ (Genetic Quality)

สัตว์ทดลองที่มีคุณภาพพันธุ์คือ สัตว์ที่มีความคงที่ของ พันธุกรรมตามคุณสมบัติของสายพันธุ์ที่ชัดเจน ตรวจสอบได้ สัตว์ทดลองแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะและวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนั้นๆ

สายพันธุ์สัตว์ทดลอง

1. สัตว์ Outbred คือสัตว์ที่ได้จากการผสมพันธุ์ของสัตว์สายพันธุ์เดียวกันเลี้ยงอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน โดยให้ห่างจากความเป็นพี่-น้องกันมากที่สุดเพื่อให้เกิด inbreeding น้อยที่สุด สัตว์ outbred เหมาะสำหรับการใช้งานทางด้าน screening and assay of biological product และ assaying potency of pharmaceutical preparation ไม่ควรใช้กับงานที่มีความจำเพาะมากๆ เช่น งานทางด้าน immunology, cancer research



2. สัตว์ Inbred เป็นสัตว์ที่ได้จากการสืบสายพันธุ์โดยใช้พี่กับน้องจากพ่อ-แม่เดียวกัน ผสมพันธุ์ติดต่อกันอย่างน้อย 20 รุ่น (generation) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปรับสภาพ ของพันธุกรรมจาก heterozygous เป็น

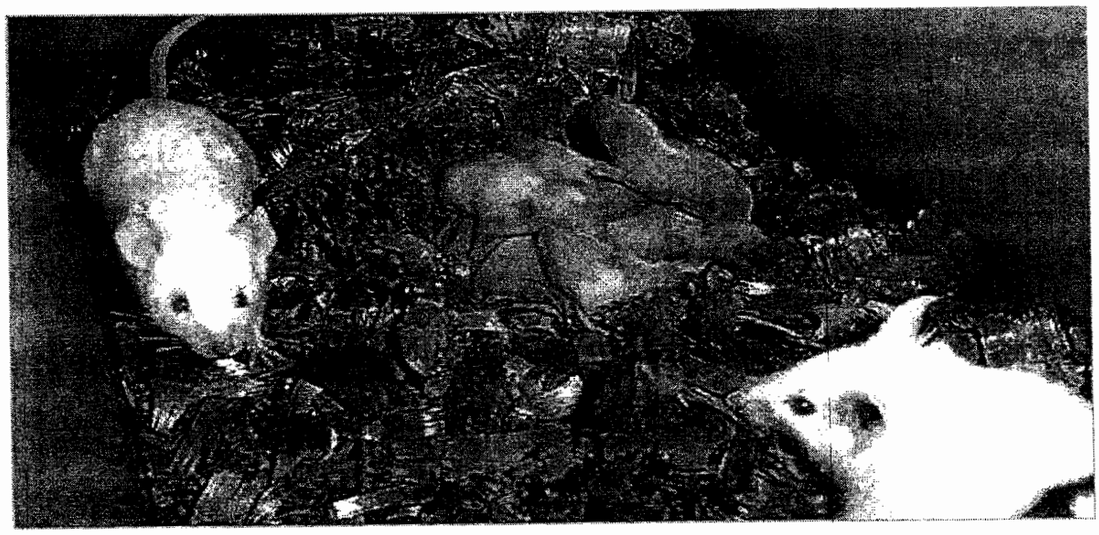
homozygous ในช่วงระหว่างการสืบสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง โดยจะวัดได้จากค่าของ coefficient of inbreeding ในระหว่าง 0-100% (ดังตาราง) และจากการปรับเปลี่ยนสภาพของพันธุกรรมทำให้ได้สัตว์ทดลองที่มีคุณลักษณะที่มีความจำเพาะ และมีความคงที่ของลักษณะทางพันธุกรรม แต่จากวิธีการดังกล่าวก็จะทำให้สัตว์ inbred มีปัญหาจาก inbreeding depression เช่น การไวต่อการติดเชื้อ ให้ลูกจำนวนน้อย เป็นต้น

Inbreeding Coefficient

Generation	Inbreeding Coefficient (%)	Generation	Inbreeding Coefficient (%)
0	0	11	90.8
1	25.0	12	92.6
2	37.5	13	94.0
3	50.0	14	95.1
4	59.4	15	96.1
5	67.2	16	96.8
6	73.4	17	97.4
7	78.5	18	97.9
8	82.6	19	98.3
9	85.9	20	98.6
10	88.6		

ตัวอย่างสัตว์ Inbred

BALB/c เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติ low mammary tumor incidence แต่ให้ monoclonal antibody production ดีมาก



C3H/He เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติ high incidence of mammary tumors, high incidence of hepatomas และ carries retinal degeneration gene

3. F1 hybrid คือสัตว์ที่ได้จากการผสมระหว่าง inbred 2 สายพันธุ์ เพื่อให้ได้คุณสมบัติที่เด่นชัดของแต่ละสายพันธุ์และเป็นการลดผลกระทบจาก recessive genes และลูกที่ได้จากการผสมดังกล่าวจะไม่ใช่ inbred แต่ทุกตัวจะมีลักษณะทางพันธุกรรมจำเพาะเหมือนกัน และแตกต่างไปจากพ่อและแม่ จะมีความแข็งแรงมากกว่าพ่อและแม่ เช่น

CAF1 เป็น F1 hybrid ที่ได้จากการผสมระหว่าง inbred เพศเมียสายพันธุ์ BALB/c และ inbred เพศผู้สายพันธุ์ A/J ซึ่งจะมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับ ascites production

CD2F1 เป็น F1 hybrid ที่ได้จากการผสมระหว่าง inbred เพศเมียสายพันธุ์ BALB/c และ inbred เพศผู้สายพันธุ์ DBA/2 ซึ่งจะมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการศึกษาทางด้าน radiation research, behavioral research, drugs and hormone

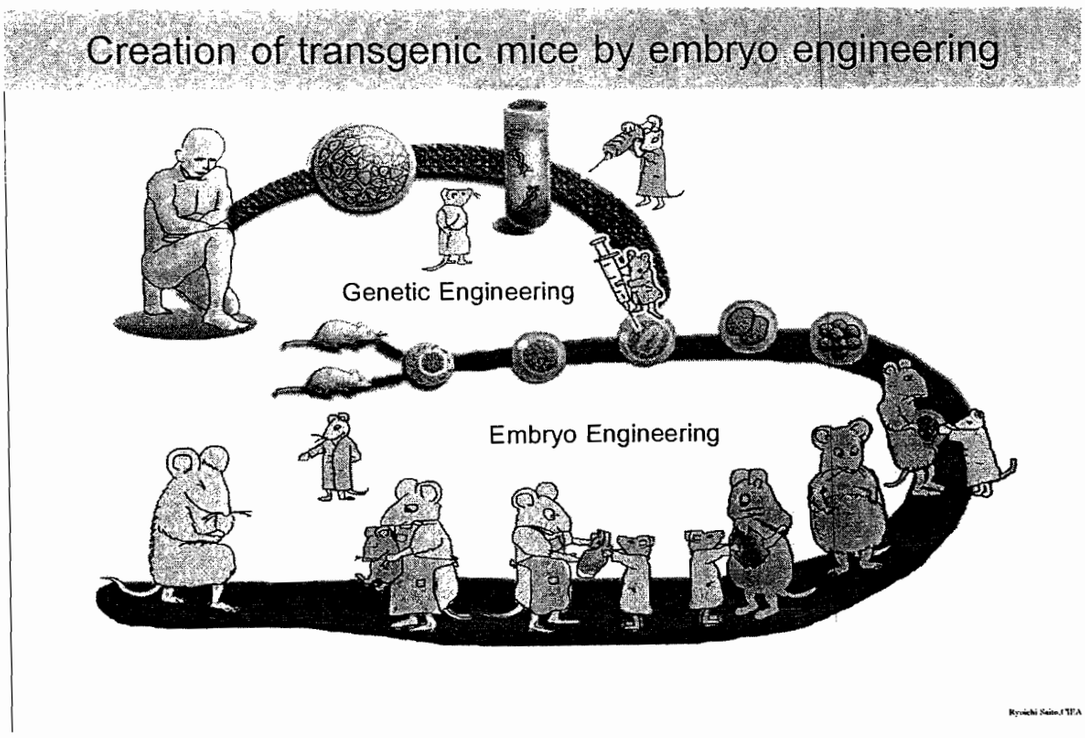
4. Mutant เป็นสัตว์ทดลองที่ได้จากการพัฒนาสายพันธุ์จากสัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีนส์ (gene mutation/mutate) อย่างชัดเจนและถาวร เช่น

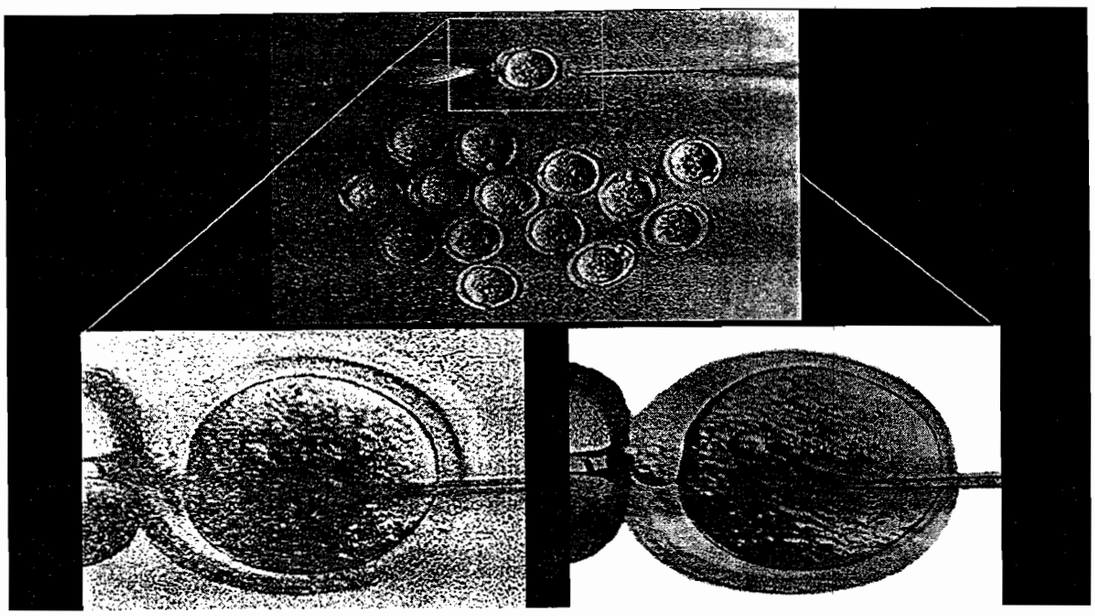
Nude mouse (BALB/c-nu) เกิดจากการพัฒนาสายพันธุ์ inbred BALB/c ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ gene ที่โครโมโซมที่ 11 ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติต่อการสร้างขน และต่อมไธมัส และยังทำให้จำนวน T cell ลดลง นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น

***Scid* mice (Severe Combined Immunodeficiency)** เป็น mutant ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ gene ที่โครโมโซมที่ 16 มีความผิดปกติที่ bone marrow คือไม่มี lymphocytes และ plasma cells ทั้ง B และ T lymphocytes ไม่ทำงานจึงทำให้ไม่สามารถผลิต antibodies

5. Transgenic animals เป็นสัตว์ทดลองที่องค์ประกอบทางพันธุกรรมได้เปลี่ยนแปลงโดยขบวนการทางพันธุวิศวกรรมสามารถทำได้โดย 3 วิธีหลักคือ DNA microinjection, retrovirus-mediated gene transfer และ embryonic stem (ES) cell mediated gene transfer เช่น

Tg 40.6 เกิดจากการฉีด lambda bacteriophage ที่มี *E.coli* LacZ gene เข้าไปใน psedopregnant BCBAF1 mice ทำให้ได้ transgenic mice ที่มีคุสมบัติสำหรับการศึกษา spontaneous mutation frequencies และ relation of DNA damage เป็นต้น





คุณภาพสุขภาพ (Health Quality)

สัตว์ทดลองที่มีคุณภาพสุขภาพ คือสัตว์ที่มีสภาวะของร่างกายปกติ มีพฤติกรรมและการเจริญเติบโตตามคุณสมบัติของพันธุ์สัตว์ปราศจากลักษณะอาการของโรคต่างๆ ทั้งที่แสดงออกมาชัดเจนและไม่ชัดเจน องค์ประกอบสำคัญที่เป็นสาเหตุของการทำให้เกิดโรค

1. สภาวะแวดล้อม ที่สำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสง เสียง และการปนเปื้อน ซึ่งจะทำให้สัตว์เครียดและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสรีรสภาพ

2. สภาวะโภชนาการ สัตว์จะต้องได้รับสารอาหาร อย่างเพียงพอตามชนิดของสัตว์ ต้องไม่ขาดและไม่มากเกิน ไม่ว่าจะเป็นไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ วิตามิน และน้ำ ซึ่งความไม่พอดีของสภาวะจะนำไปสู่ปัญหาสุขภาพได้

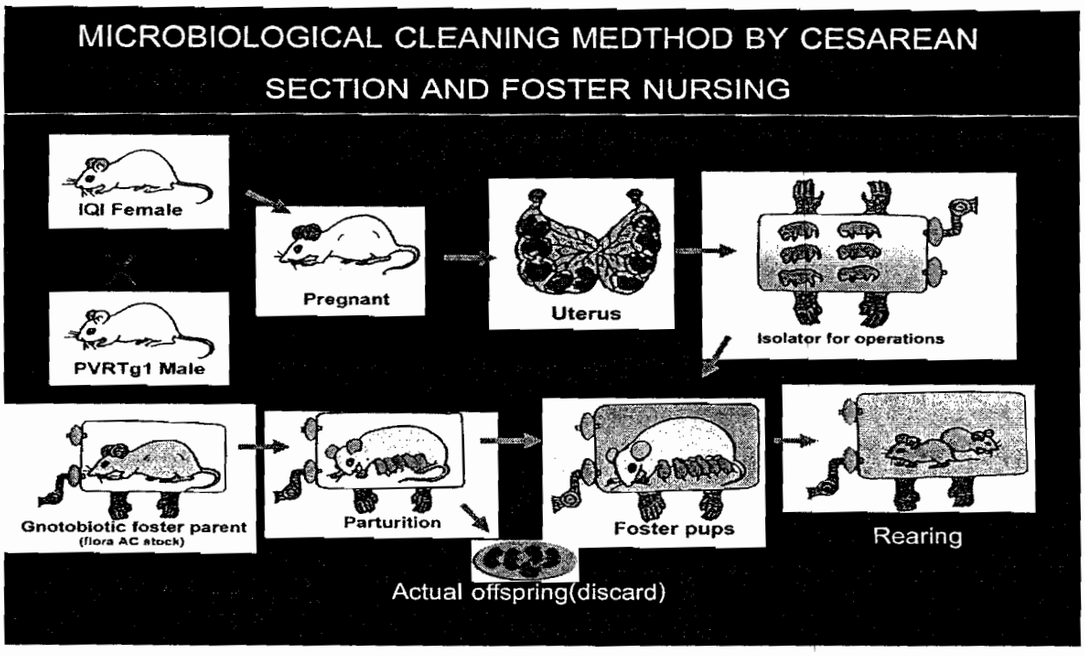
3. โรคทางพันธุกรรม เป็นความผิดปกติหรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสารพันธุกรรม เช่น ความผิดปกติของสีขน ขนาด ซึ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมบางอย่างจะมีผลต่อการตอบสนองปฏิกิริยาของยาหรือสารที่ทำการทดลอง

4. จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ทำให้สัตว์เป็นโรคที่เรียกว่า pathogenic organisms จะมีโอกาสไปถึงตัวสัตว์ได้จากสิ่งแวดล้อมโดยจะผ่านทางอากาศ อาหารและน้ำ เป็นต้น

5. ปรสิต ปรสิตที่เกิดขึ้นทั้งภายนอกและภายในตัวสัตว์อาจทำให้สัตว์ตายได้ แต่โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในลักษณะไม่แสดงอาการแต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อสรีรสภาพของสัตว์ อาการที่พบได้จากการติดเชื้อปรสิตได้แก่ ท้องเสีย อาเจียน เลือดจาง และขนร่วง เป็นต้น

ชนิดสัตว์ทดลองตามสภาวะความปลอดเชื้อ

1. Germfree (axenic) animal เป็นสัตว์ที่ได้มาโดยการผ่าท้อง (hysterectomy) และได้รับการเลี้ยงดูในสภาวะแวดล้อมและขบวนการที่ปลอดเชื้อภายในตู้เลี้ยงสัตว์ปลอดเชื้อ (vinyl isolator)



2. Gnotobiotic animal เป็นสัตว์ที่ได้มาโดยการผ่าท้อง (hysterectomy) และได้รับการเลี้ยงดูเช่นเดียวกับ Germfree แต่จะได้รับเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรค 1-2 ชนิด

3. Specific pathogen free (SPF) animal เป็นสัตว์ที่ได้มาโดยการผ่าท้อง (hysterectomy) และเลี้ยงในสภาวะที่ปลอดจากเชื้อที่จะทำให้เกิดโรคตามกำหนดอย่างต่อเนื่อง

4. Virus antibody-free animal สัตว์ทดลองที่ไม่มี antibody ของไวรัสที่ทำให้เกิดโรค

5. Monitored (clean conventional) animal สัตว์ทดลองที่ปลอดจาก pathogens ที่สำคัญเลี้ยงในสภาวะการควบคุมความปลอดเชื้อที่ไม่เข้มงวดมากมีการตรวจสอบคุณภาพเป็นประจำ

6. Conventional animal สัตว์ทดลองที่เลี้ยงอย่างไม่เข้มงวดกวดขันเกี่ยวกับการป้องกันการติดเชื้อ และไม่ทราบสภาวะการติดเชื้อ

ระบบที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. Isolator maintained เป็นการเลี้ยงสัตว์ในตู้ isolator ซึ่งเป็นตู้ปลอดเชื้อปกติจะทำด้วย stainless หรือพลาสติกชนิด vinyl สัตว์จะได้รับการเลี้ยงดูไม่ให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก

2. Barrier maintained เป็นระบบที่โครงสร้าง อุปกรณ์สภาวะแวดล้อมและขบวนการทั้งหมด ได้รับการควบคุมเพื่อไม่ให้เกิดโอกาสการติดเชื้อ หรือเกิดโอกาสการติดเชื้อน้อยที่สุดสำหรับการเลี้ยงสัตว์แบบ specific pathogen free

3. Conventional or no containment เป็นระบบการเลี้ยงที่ไม่มีการควบคุมหรือป้องกันการติดเชื้อ

สภาพแวดล้อม และการสัตวบาล

สัตว์ทดลองที่มีคุณภาพจะช่วยลดตัวแปรในการตอบสนองต่อสิ่งที่ใช้ทดสอบในขณะเดียวกัน สภาพแวดล้อม ที่อยู่อาศัยที่ใช้เลี้ยงสัตว์ระหว่างการทดลอง และการจัดการก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทดลองนั้นๆ

สัตว์ทดลองที่นิยมใช้ส่วนใหญ่จะเป็นพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพราะเป็นสัตว์ที่สามารถมีปฏิกิริยาตอบสนองหรือปรับตัวได้กับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง และเสียง เป็นต้น ซึ่งการตอบสนองและการปรับตัวสามารถตรวจพบได้จากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรสภาพและพฤติกรรม ซึ่งจะเกิดผลกระทบต่อผลการทดลองได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องลดตัวแปรอันอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมให้มากที่สุดโดยการควบคุมให้สัตว์ทดลองอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับสัตว์แต่ละชนิดและมีความสม่ำเสมอ

สภาพแวดล้อมที่สำคัญได้แก่

1. อุณหภูมิ (Temperature) สัตว์เกือบทุกชนิดจะได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายนอก โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในร่างกาย (deep body temperature-Tb)ได้ ซึ่งจะมีผลต่ออัตราการเผาผลาญพลังงานในร่างกาย (metabolic rate) การหมุนเวียนของเลือดและพฤติกรรมแม้ว่าสัตว์จะสามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่าง 18-28 องศาเซลเซียสได้ แต่โดยทั่วๆ ไปการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 22-25 องศาเซลเซียสและจะต้องได้รับการตรวจสอบทุกวัน กรณีที่สัตว์ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรุนแรงจะมีผลกระทบต่อการกินอาหารและน้ำ อัตราการเจริญเติบโต การผสมพันธุ์ การเพาะขยายพันธุ์ การตอบสนองต่อสารหรือยาที่ให้และการตอบสนองต่อโรค เป็นต้น

บางสภาวะอาจต้องการ อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมเพิ่มขึ้น ได้แก่ ระยะฟื้นตัวหลังการผ่าตัด การกกลูกไก่หลังฟักจากไข่สองสามวันแรก การเลี้ยงสัตว์ฟันแทะบางพวกที่ไม่มีขน และการเลี้ยงลูกสัตว์เกิดใหม่ที่ถูกแยกจากแม่ของมัน ความสำคัญของการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของที่อยู่อาศัยในกรณีที่สัตว์อาศัยอยู่ในพื้นที่จำกัด ควรให้การแปรเปลี่ยนขึ้นลงของอุณหภูมิแต่ละวันมีน้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการเผาผลาญอาหารที่มากเกิน

ค่าอุณหภูมิที่แนะนำสำหรับสัตว์ทดลองชนิดที่ใช้บ่อย

สัตว์	อุณหภูมิ	
	°ซ.	°ฟ.
หนูเมาส์ หนูแรท แฮมสเตอร์ เจอร์บิล หนูตะเภา	18-26	64-79
กระต่าย	16-22	61-72
แมว สุนัข ลิง	18-29	64-84
ปศุสัตว์ และไก่	16-27	61-81

2. ความชื้นสัมพัทธ์ (Relative Humidity-RH) ความชื้นสัมพัทธ์รอบๆ ตัวสัตว์มีผลต่อการระบายความร้อนออกจากตัวสัตว์ เนื่องจากสัตว์แทะที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองทั่วๆ ไปไม่มีต่อมเหงื่อและไม่สามารถระบายความร้อนทางผิวหนังได้ การระบายความร้อนจึงเป็นการระบายออกมาพร้อมกับลมหายใจ โดยเพิ่มอัตราการหายใจ ระดับความชื้นจะมีผลต่อการดูดซึมสารที่ผิวหนังของสัตว์ กล่าวคือหากระดับความชื้นรอบตัวสัตว์สูงกว่าปกติจะทำให้เกิดการสะสมของเสีย เช่น แอมโมเนีย ซึ่งจะมีผลต่อพยาธิสภาพของระบบทางเดินหายใจของสัตว์และก่อให้เกิดการสะสมและเพาะตัวของเชื้อราและเชื้ออื่นๆ ในทางตรงกันข้ามหากระดับความชื้นต่ำกว่าปกติจะเพิ่มโอกาสให้การเกิดโรคหางควั่น (ring tail) โดยเฉพาะในหนูแรท

ค่าความชื้นที่แนะนำสำหรับสัตว์ทดลองชนิดที่ใช้บ่อย

สัตว์	ความชื้น
หนูเม้าส์	50-70 %
หนูแรท	50-55 %
แฮมสเตอร์	45-65 %
หนูตะเภา	50-60 %
กระต่าย	40-50 %

3. การระบายอากาศ (Ventilation) การระบายอากาศจะมีผลต่อการระบายของเสียออกจากห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองและให้อากาศใหม่เข้ามาแทนที่อย่างเพียงพอ ของเสียที่เกิดขึ้นใน ห้องเลี้ยงสัตว์ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ออกมาพร้อมกับการหายใจ ก๊าซแอมโมเนียจากการขับถ่ายปัสสาวะ สารระเหยที่ปะปนมากับขี้เลื่อย ขี้กบ ซึ่งใช้เป็นวัสดุรองนอน นอกจากนี้ยังช่วยขจัดความร้อนจาก การหายใจของสัตว์ แสงไฟ และฝุ่นละอองที่ปนเปื้อน ปรับความชื้นของอากาศในห้องและสร้างความแตกต่างของความดันระหว่างพื้นที่ส่วนติดต่อกัน

การจัดการเกี่ยวกับระบบการถ่ายเทอากาศที่ถูกต้องจะต้องคำนึงถึงชนิดของสัตว์ อายุ เพศ ความหนาแน่นของจำนวนสัตว์ ชนิดของวัสดุรองนอน ความถี่ในการเปลี่ยนกรง ขนาดห้อง การทำความสะอาด อุณหภูมิ ความชื้น ตลอดจนคุณภาพอากาศที่เข้าไปห้องเลี้ยงสัตว์โดยทั่วๆ ไปจะจัดให้มีการถ่ายเทอากาศในห้องเลี้ยงประมาณ 10-15 ครั้ง/ชั่วโมง

การใช้อากาศเพื่อระบายอากาศในห้องเลี้ยงสัตว์ซ้ำเพื่อเป็นการประหยัดพลังงาน จะทำได้ปริมาณหนึ่ง แต่อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงภัย เชื้อหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ สามารถอยู่ในอากาศหรือเคลื่อนไปบนพาหะ เช่น ฝุ่น ละออง ดังนั้นอากาศที่ระบายออกเมื่อถูกนำไปใช้ซ้ำในระบบ heating, ventilation and air conditioning (HVAC) อีกหลายห้องจะทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามห้อง อากาศที่ระบายออก ควรถูกกรองด้วยแผ่นกรองฝุ่นละออง ชนิดมีประสิทธิภาพสูง (HEPA) เพื่อกำจัดฝุ่นละอองในอากาศออกก่อนนำมาใช้ซ้ำอีก อย่างไรก็ตามการไม่ใช้อากาศซ้ำจะเป็นที่พึงพอใจมากกว่า

4. แสง (Light) สัตว์ทดลองส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่พัฒนามาจากสัตว์ที่ออกหากินในเวลากลางคืน ดังนั้นจึงมีความสามารถในการปรับสายตาให้เข้ากับแสงที่มืดสลัวได้ แต่ส่วนใหญ่จะไม่สามารถแยกสีได้ แสงสามารถส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยา สภาพภายนอกและพฤติกรรมของสัตว์หลายชนิด แสงที่มากเกินไปจะสามารถทำลายเรตินาได้ โดยเฉพาะพวก Albino ที่อยู่ในสภาวะของการควบคุมในห้องทดลองที่มีช่วงระยะเวลามืดที่สั้น คุณสมบัติของแสง เกี่ยวกับความเข้มของแสง ชนิดของแสง และระยะเวลาที่ให้แสงจะมีผลต่อสัตว์ เช่น กระตุ้นให้เกิดวงจรการเป็นสัด การเคลื่อนไหวของระบบทางเดินอาหาร ขบวนการวิ่งบนล้อของหนูเม้าส์ อัตราการเจริญเติบโตของหนูแรท หรือมีพฤติกรรมความก้าวร้าวเป็นต้น แสงที่แตกต่างไปจากแสงสว่างจากธรรมชาติมากๆ จะมีผลต่อการลดประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์และสามารถกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกได้ ระดับความเข้มของแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (UV) ที่สูงจะสามารถทำให้เกิดตาต้อในหนูเม้าส์ได้ สิ่งที่จะต้องพิจารณาในการจัดแสงในห้องเลี้ยงสัตว์คือ ความเข้มแสง ช่วงเวลาของการสัมผัส ความยาวคลื่นแสง ประวัติของสัตว์เกี่ยวกับแสง เม็ดสีของสัตว์ ช่วงเวลาของการสัมผัสแสงในวงจรเวลากลางวันกลางคืน (circadian cycle) อุณหภูมิของร่างกาย สภาวะทางฮอร์โมน อายุ ชนิดสัตว์ เพศ และสต็อก (stock) หรือสายพันธุ์ (strain) ของสัตว์ ความเข้มของแสงที่เหมาะสม คือ ประมาณ 350-400 ลักซ์ และกระจายแสงให้ทั่วบริเวณที่มีสัตว์ เพื่อให้เกิดสวัสดิภาพที่ดีแก่สัตว์และเกิดความปลอดภัยของคนทำงาน ระยะเวลาที่ให้แสง คือ สว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง

5. เสียง (Noise) สัตว์ส่วนใหญ่จะสามารถรับคลื่นเสียงในช่วงความถี่ที่กว้างกว่ามนุษย์จะรับได้มาก โดยเฉพาะความถี่ที่สูงมากๆ เกินกว่าที่มนุษย์จะรับได้ เช่น หนูเม้าส์ สามารถรับคลื่นเสียงที่มีความถี่ถึง 80 กิโลเฮิร์ทซ์ สุนัขสามารถรับคลื่นเสียงอุลตร้าซาวด์ (25 กิโลเฮิร์ทซ์) ซึ่งนับว่าดังมากสำหรับสุนัขแต่ในขณะที่มนุษย์ไม่สามารถรับได้ ผลกระทบของเสียงที่มีต่อสัตว์ทดลองจะขึ้นกับความเข้ม ความถี่ ความเร็ว ของเสียงและความสามารถในการรับเสียงที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดสัตว์ ระดับเสียงที่เหมาะสมคือ 85 เดซิเบล การตกใจของสัตว์จะทำให้สัตว์เครียดและมีผลกระทบต่อสรีรสภาพต่างๆ เช่น อวัยวะภายในช่องหู โดยเฉพาะคอเคลีย (cochlea) ถูกทำลาย การเปลี่ยนแปลงของภูมิต้านทานในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาท ระบบการหมุนเวียนของเลือดค่าเลือด ความดัน ตลอดจนระดับ ฮอร์โมน และพฤติกรรม

การสัตวบาล

1. อาหาร สัตว์ควรได้กินอาหารที่มีองค์ประกอบของคุณค่าทางอาหารอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์แต่ละชนิดทุกวัน ไม่มีสิ่งปนเปื้อนทั้งสารเคมี เชื้อโรค และสารพิษจากธรรมชาติ ยกเว้นโครงร่างงานวิจัยต้องการเป็นอย่างอื่น สถานที่เก็บอาหารจะต้องสะอาดและมิดชิด สามารถป้องกันไม่ให้สัตว์หรือแมลงต่างๆ เข้ามาได้ ไม่ควรวางถุงอาหารบนพื้นโดยตรง ควรวางบนแท่นรอง หรือบนรถเข็น ถุงอาหารที่เปิดแล้วจะต้องเก็บไว้ในที่ที่มีฝาปิดมิดชิด การสัมผัสอุณหภูมิสูงเกิน 21 °ซ. (70 °ฟ.) และความชื้นสัมพัทธ์สูงเกินปกติ สภาพที่ไม่ถูกหลักสุขาภิบาล แสง ออกซิเจน และแมลง จะเร่งการเสื่อมสภาพของอาหาร อาหารควรเก็บไว้ในห้องที่อุณหภูมิ 4 °ซ. (39 °ฟ.) หรือต่ำกว่า ในการนำอาหารไปใช้ควรให้มีการจัดการที่เป็นระบบคือใช้ชุดที่ผลิตก่อน และที่ให้อาหารควรออกแบบให้สัตว์กินได้ง่าย รวมทั้งให้เกิดการปนเปื้อนจากอุจจาระและปัสสาวะให้ได้น้อยที่สุด เมื่อสัตว์ถูกเลี้ยงเป็นกลุ่มควรมีพื้นที่ว่างและมีจุดให้อาหารอย่างพอเพียงเพื่อลดการแย่งอาหาร และให้

แน่ใจว่าสัตว์ทุกตัวได้กินอาหาร ไม่ควรขนย้ายภาชนะบรรจุอาหารไปมาระหว่างบริเวณที่อาจเกิดความเสี่ยงของการปนเปื้อน ควรทำความสะอาดที่ให้อาหารโดยสม่ำเสมอ

ปริมาณอาหารสำหรับสัตว์ กรัม/ตัว/วัน

ชนิดสัตว์	ระยะกำลังโต	โตเต็มวัย	ระยะตั้งท้อง	ระยะให้นมลูก
หนูเม้าส์	3-5	5-7	6-8	7-15
หนูแรท	8-25	25-30	25-35	35-65
แฮมสเตอร์	6-12	10-12	12-15	20-25
หนูตะเภา	35-45	45-70	70-80	100-130
กระต่าย	120-200	200-300	300	300-400

2. น้ำ สัตว์ควรได้น้ำกินที่ไม่มีสิ่งปนเปื้อน โดยสอดคล้องกับความต้องการเฉพาะของสัตว์นั้น การคงคุณภาพของน้ำทำได้โดยการตรวจสอบความเป็นกรดด่าง ความกระด้าง และการปนเปื้อนของจุลชีพและสารเคมีเป็นระยะๆ เพื่อให้มั่นใจว่าคุณภาพน้ำ เป็นที่ยอมรับได้ การบำบัด หรือทำน้ำให้บริสุทธิ์เพื่อลดหรือออกำจัดการปนเปื้อนให้มีน้อยที่สุด ทำได้หลายวิธีได้แก่

- การเติมกรดไฮโดรคลอริค pH 2.3-2.5 (acidification)
- การเติมคลอรีน 12-15 ppm (chlorination)
- การอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
- การกรองด้วยระบบ reverse osmosis
- การฆ่าเชื้อด้วยรังสี ultraviolet

การตรวจอุปกรณ์ให้น้ำ เช่น หลอดดูดน้ำ และที่ให้น้ำอัตโนมัติทุกวัน เพื่อให้แน่ใจว่ายังคงความสะอาดและทำงานอย่างถูกต้อง บางครั้งสัตว์ต้องได้รับการสอนให้ใช้อุปกรณ์ให้น้ำอัตโนมัติ การเปลี่ยนขวดน้ำ ดีกว่าการเติมน้ำใส่ขวดเดิมเพราะมีโอกาสปนเปื้อนจุลชีพ อย่างไรก็ดี ถ้านำขวดมาเติมน้ำควรดูแลให้ขวด น้ำถูกใส่กลับไปยังกรงเดิมที่ถูกดึงออกมา

ปริมาณน้ำสำหรับสัตว์ มล./ตัว/วัน

ชนิดสัตว์	ระยะกำลังโต	โตเต็มวัย
หนูเม้าส์	3-10	5-10
หนูแรท	5-80	25-35
แฮมสเตอร์	8-10	5-15
หนูตะเภา	100-250	200-300
กระต่าย	100-400	300-400

3. วัสดุรองนอน (Bedding) วัสดุรองนอนของสัตว์เป็นปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ มีอิทธิพลต่อข้อมูลการทดลอง และต่อการเป็นอยู่ที่ดีของสัตว์ ชนิด และ ลักษณะของวัสดุรองนอนจะมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมภายในกรงเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในพวกสัตว์เล็กในระบบการเลี้ยงถือว่าการให้สัตว์ได้สัมผัสกับวัสดุรองนอนเป็นสิ่งที่เหมาะสม ดังนั้นหากวัสดุรองนอนที่ใช้ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดปัญหาต่อสัตว์ได้ โดยเฉพาะทางด้านพฤติกรรม และการตอบสนองทางสรีรสภาพต่อการทดลองทางด้านการทดสอบความเป็นพิษ หรือการเกิดมะเร็ง วัสดุรองนอนที่ไม่ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อยังเป็นแหล่งของเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นคุณสมบัติของวัสดุรองนอนที่เหมาะสมควรจะเป็นวัสดุที่สะอาดปลอดเชื้อ ไม่มีสารพิษและไม่เป็นอาหารสัตว์สามารถดูดซับน้ำได้ดีและไม่ยุ่ยเมื่อเปียกน้ำวัสดุรองนอนที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ขี้กบที่ได้จากไม้เนื้ออ่อน การจัดเก็บวัสดุรองนอน ควรวางบนแท่นรอง หรือรถเข็น เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ควรใช้วัสดุรองนอนในปริมาณที่พอเพียงสำหรับการดูดซับของเหลวจากสัตว์

References:

Carstensen, J. 1981. Improved specification of the test situation in animal experimentation. ICLAS Bulletin. (49): 11-21.

Clough, G. 1987. Quality in laboratory animals. Lab. Animals. pp. 79-96.

Donald, W.B. 1979. Definition of inbred strains Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Federation of American Societies for Experimental Biology. pp. 4-7.

Festing, M.F.W., Nomura, T. and Kagiyama, N. 1993. Animal quality control. Guidelines for breeding and care of laboratory animals. pp. 65-69.

Nomura, T. and Tajima, Y. 1982. Defined laboratory animals. Advances in Phamacology and Therapeutic II. (5): 325-333.

เกร็ดความรู้จากการพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม

(Other miscellaneous studies on development of large scale production of classical swine fever tissue culture vaccine)

กัญญา สุวินทรากร[1]

จากการวิจัยเรื่องการพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรม[2] มีข้อมูลโดยสรุปดังนี้ การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรน WPE$^-$/Th (วาสนาและคณะ, 2548) ในระดับอุตสาหกรรมจำนวน 4 ชุด ๆ ละ 100,000 โด๊ส แบบ stationary ใน flask ขนาด 225 ซม.^{2} 2 ชุด ๆ ละ 20 ขวด และแบบ roller ขนาด 850 ซม.^{2} 2 ชุด ๆ ละ 10 ขวด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 (Sakoda และ Fukusho, 1996) ด้วย Eagle's minimum essential medium ที่ประกอบด้วย tryptose phosphate broth 0.295%, bacto peptone 0.5% และ N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid 10 mM (BP medium) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เมื่อเซลล์อายุ 7 วัน ใส่ working seed (WS) ไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 multiplicity of infection (MOI) และใช้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีซีรัม (serum free medium, SFM) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. นาน 7 วัน แล้วทำการเก็บสต๊อคไวรัสวัคซีนและหาปริมาณเชื้อไวรัส ในการผสมเป็นวัคซีนเพื่อบรรจุขวดและทำแห้ง ใช้สต๊อคไวรัสวัคซีนผสมกับ stabilizer ในปริมาณที่เท่ากันโดยให้มีปริมาณไวรัสในวัคซีนไม่น้อยกว่า 3 log 50% tissue culture infection dose ($TCID_{50}$)/โด๊ส เมื่อทดสอบคุณภาพวัคซีนทางห้องปฏิบัติการ พบว่าวัคซีนผ่านตามมาตรฐาน มีปริมาณไวรัสวัคซีน 3.96, 3.75, 4.25 และ 4.13 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ เมื่อทดสอบวัคซีนในสุกรพบว่ามีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคได้ดี เริ่มให้ความคุ้มวันที่ 5 ภายหลังรับวัคซีน และมี 50% pig protective dose เท่ากับ $10^{4.0}$ PD_{50}/โด๊ส

เมื่อได้ศึกษา การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรม ขณะเดียวกันได้ศึกษาที่คาดว่าจะเป็นประโยชน์และได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ในการศึกษาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 จะอบในตู้ 37°ซ. การเพาะเลี้ยงไวรัส WPE$^-$/Th อบที่ 30°ซ. ส่วนการ absorb ไวรัส อบที่ 37°ซ. และหาปริมาณไวรัส (virus titer) โดยวิธี immunoperoxidase (สุจิราและคณะ, 2540) ทั้งหมดมี 6 เรื่องที่ศึกษา คือ

ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th เมื่อเพาะเชื้อไวรัสขนาด 0.1, 0.15 และ 0.2 MOI

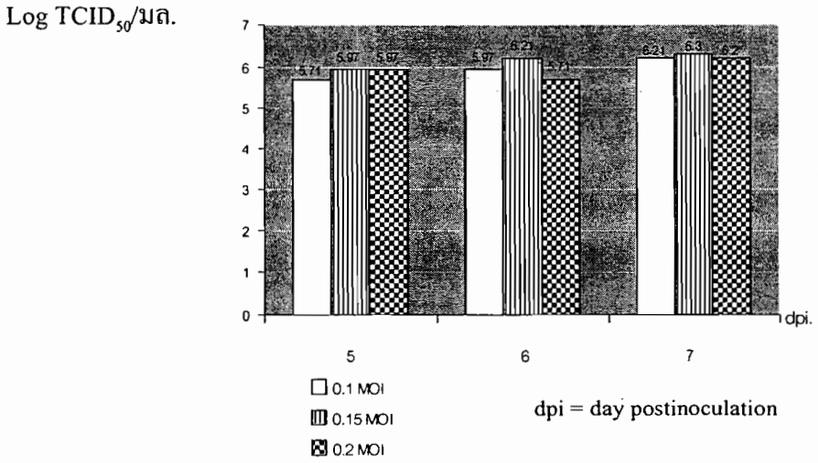
---

[1] กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2] เป็นโครงการย่อยที่ 2 ของโครงการชุด เรื่องการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th และการพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในปีงบประมาณ 2547 คณะวิจัย: กัญญา สุวินทรากร วาสนา ภิญโญชนม์ ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และพิงพันธ์ เจริญสุระสถล จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 ในขวด flask ขนาด 225 ซม.^{2} จำนวน 3 ขวด เมื่อเซลล์อายุ 7 วัน inoculation (inoc) เชื้อไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th ขนาด 0.1, 0.15 และ 0.2 MOI ในขวดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้น harvest เชื้อไวรัส WPE$^-$/Th จากทั้ง 3 ขวด ภายหลัง inoc 5, 6 และ 7 วัน โดยการ sampling ครั้งละ 5 มล. เก็บใส่ cryotube ๆ ละ 1 มล. นำไปหา virus titer โดยทำระยะเวลาละ 2 ซ้ำ

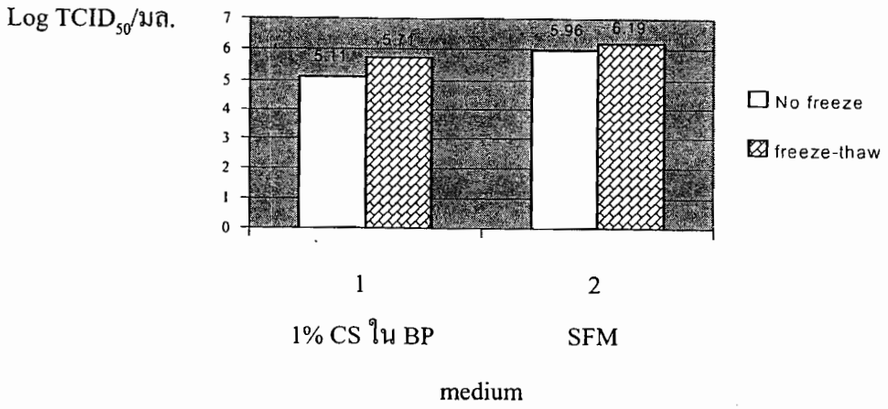
ผลการทดลองพบว่า เมื่อ inoc ไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1, 0.15 และ 0.2 MOI หลังจากนั้น 5, 6 และ 7 วัน sampling หา virus titer หน่วยเป็น log $TCID_{50}$/มล. ของขนาด 0.1 MOI เป็น 5.71 5.97 และ 6.21 ตามลำดับ และของขนาด 0.15 MOI เป็น 5.97 6.21 และ 6.30 ตามลำดับ ส่วนขนาด 0.2 MOI เป็น 5.97 5.71 และ 6.21 ตามลำดับซึ่งขนาดไวรัสที่ inoc ที่มากกว่า 0.1 MOI เมื่อ harvest ค่า virus titer เกือบไม่ต่างกัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 Virus titer log $TCID_{50}$/มล.จากการเพาะเลี้ยงไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1, 0.15 และ 0.2 MOI และ harvest หลังเพาะเลี้ยง 5, 6 และ 7 วัน

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th เมื่อเพาะเชื้อไวรัสขนาด 0.1 MOI ด้วยอาหาร 1% ซีรัมลูกโค ใน BP medium และ SFM และ harvest เชื้อไวรัสวัคซีนโดย freeze – thaw โดย เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 ในขวด flask ขนาด 225 ซม.^{2} จำนวน 2 ขวด เมื่ออายุ 7 วัน inoc เชื้อไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI ซึ่งขวดแรกใช้ 1% ซีรัมลูกโค (calfserum, CS)ใน BP medium เป็นอาหารเพาะเลี้ยงไวรัส ส่วนขวดที่ 2 ใช้ SFM เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส WPE$^-$/Th นาน 7 วัน จากนั้น sampling : virus fluid ทั้ง 2 ขวดๆ ละ 5 มล. ใส่ cryotube หลอดละ 1 มล. เพื่อหา virus titer ที่ไม่ freeze แล้ว freeze ขวดเพาะเลี้ยงไวรัสทั้ง 2 ขวดที่ –80°ซ. สภาพวางนอนนาน 1 วัน จึง thaw ทั้ง 2 ขวดโดยวางในอุณหภูมิห้องให้สภาพน้ำแข็งละลายจนเกือบหมด เขย่าก้อนน้ำแข็งครูดให้เซลล์หลุด ทำการ harvest แต่ละขวด โดยแยกเก็บ virus fluid แล้วนำไป centrifuge ที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อหา virus titer ที่ freeze-thaw

ผลการทดลองพบว่า virus titer ของที่ใช้อาหารเพาะเลี้ยงไวรัส 1% CS ใน BP medium ที่ไม่ freeze และ freeze จะเป็นค่าเฉลี่ย 5.11 และ 5.71 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ส่วนที่ใช้ SFM ที่ไม่ freeze และ freeze จะมีค่าเฉลี่ยเป็น 5.96 และ 6.19 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 Virus titer log $TCID_{50}$/มล. จากการเพาะเลี้ยงไวรัส WPE^{-}/Th ขนาด 0.1 MOI ใน BPที่มี 1% ซีรัมลูกโค และ SFM นาน 7 วัน โดยการ harvest แบบ freeze-thaw

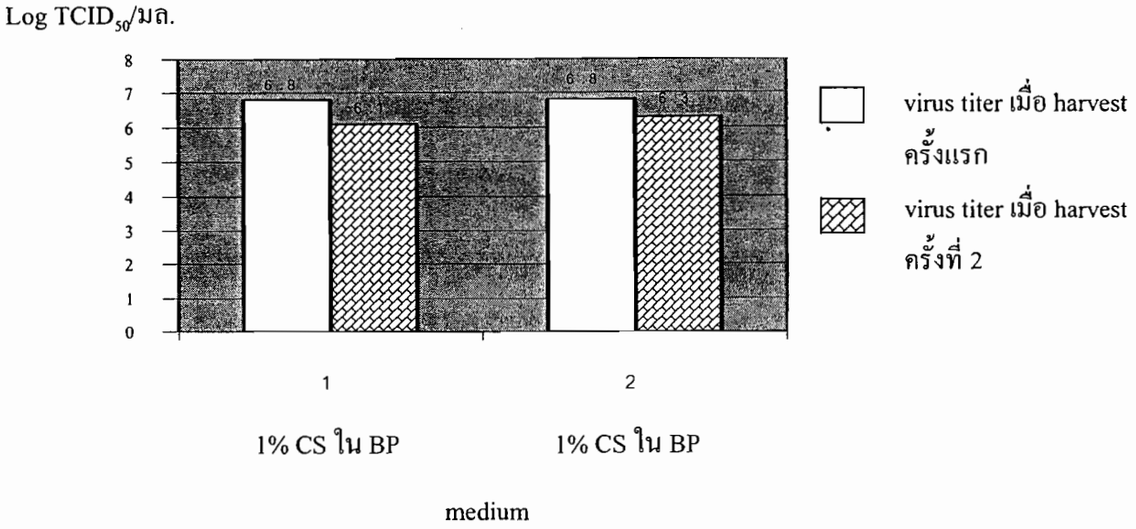
ซึ่งการเพาะเลี้ยงไวรัส WPE^{-}/Th ในเซลล์ FS-L_3 นาน 7 วันด้วย SFM จะได้ปริมาณไวรัสสูงกว่า 1% CS ใน BP เล็กน้อยและการ harvest แบบ freeze-thaw จะได้ปริมาณไวรัสสูงกว่าแบบไม่ freeze 0.6 และ 0.23 log $TCID_{50}$/มล. จาก medium 1% CS ใน BP และ SFM ตามลำดับ แต่ในการผลิตวัคซีนระดับอุตสาหกรรม เมื่อต้องใช้ขวดเพาะเซลล์จำนวนมาก ทำแบบ freeze-thaw ที่ต้องเพิ่มขั้นตอนการเก็บ freeze นำออกมา thaw อาจไม่สะดวกและควบคุมปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและราได้ยาก เป็นเรื่องต้องพิจารณาความเหมาะสม

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ media สำหรับไวรัส เป็น BP ที่มี 1% CS และ SFM จากการ harvest แบบไม่ freeze-thaw พบว่าทั้ง 2 แบบที่ใช้ SFM จะมีปริมาณไวรัสมากกว่า BP ที่มี 1% CS เช่นเดียวกันที่วาสนาและคณะ (2545) เคยทำไว้

จากการศึกษาปริมาณไวรัสวัคซีน WPE^{-}/Th เมื่อ Harvest ครั้งที่ 2 ภายหลังเติม medium 1% ซีรัมลูกโค ใน BP นาน 3 วัน โดย ภายหลัง harvest vaccine stock ชุด 2/ 04 โดยการเท virus fluid จากแต่ละขวด flask 225 ซม.^{2} ออกแล้ว แยกไว้สำหรับการทดลองนี้ 2 ขวด และ sampling : virus fluid สำหรับหาปริมาณไวรัส จากการ harvest ครั้งแรกจากนั้นเติม medium ที่เป็น BP medium ประกอบด้วย 1% CS ทั้ง 2 ขวดๆ ละ 100 มล. เพาะเลี้ยงไวรัสต่อที่ 30°ซ. นาน 3 วัน จึง harvest : virus fluid ครั้งที่ 2 โดยการเทออกจากขวดและ sampling สำหรับหาปริมาณไวรัสที่ harvest ครั้งที่ 2

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไวรัส WPE^{-}/Th จากการ harvest ครั้งแรกเป็น 6.8 log $TCID_{50}$/มล. เมื่อเติม medium และเพาะเลี้ยงต่ออีก 3 วัน ได้ไวรัส 6.1 และ 6.3 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ (รูปที่ 3) ซึ่งปริมาณไวรัส WPE^{-}/Th ที่ harvest ครั้งที่ 2 น้อยกว่าครั้งแรก แต่ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสเพียง 3 วัน เนื่องจากมีเซลล์ลอกหลุดบ้างจึงรีบ harvest และการทดลองนี้ทำต่อเนื่องจากการ harvest ครั้งแรกของ ชุด 2/04 จำนวน 20 ขวด ขั้นตอนที่ยาวนานอาจทำให้มีเซลล์ตายก่อนเติม medium ใหม่ ถ้าทำด้วยความระมัดระวังและใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานกว่านี้

อาจได้ประมาณไวรัสเท่ากับการ harvest ครั้งแรก แต่อย่างไรก็ตามทำให้ทราบว่าสามารถ harvest ครั้งที่ 2 เพื่อนำ virus fluid ไปใช้ได้ ซึ่งจะทำให้ย่นระยะเวลาการ passage เซลล์ และทำให้ประหยัดขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทาง ควรต้องศึกษาโดยละเอียดครอบคลุมต่อไป



รูปที่ 3 virus titer log $TCID_{50}$/มล.เมื่อ harvest ครั้งแรกและครั้งที่ 2 ภายหลังเติม medium 3 วัน

การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th แบบ absorb และ non-absorb เมื่อเพาะเลี้ยงในขวด Flask และ Roller โดย เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 ในขวด flask ขนาด 225 ซม.^{2} และ roller ขนาด 850 ซม.^{2} อย่างละ 10 ขวด เมื่ออายุเซลล์ 7 วันเพาะเลี้ยงไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI โดยแบ่งขวดเพาะเซลล์เป็น 4 กลุ่ม เพื่อทำแบบ absorb และ non-absorb โดยใช้ Flask และ Roller อย่างละ 5 ขวด คือ กลุ่ม absorb : ใส่ไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI ใน BP+1% CS จำนวน 20 และ 40 มล. สำหรับ flask และ roller ตามลำดับ absorb ที่ 37°ซ. นาน 2 ชม. แล้วเติม BP+1% CS จนครบ 100 มล. และ 200 มล. ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม non-absorb : ใส่ไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI ใน BP+1% CS เป็น 100 มล. สำหรับ flask และ 200 มล. สำหรับ roller โดยไม่ absorb จากนั้นนำขวดทั้ง 4 กลุ่ม เพาะเลี้ยงไวรัสที่ 30°ซ. นาน 7 วัน แล้วจึง harvest ทุกขวด แยก sampling แต่ละขวดเพื่อหาปริมาณไวรัสและรวม sampling ของแต่ละกลุ่มเป็น mix เพื่อหาปริมาณไวรัสด้วย

ผลการทดลองพบว่า มีบางขวดที่เซลล์ไม่ดีได้คัดออกก่อนบางกลุ่มจึงเหลือ 4 ขวด ซึ่งค่าเฉลี่ยของกลุ่ม absorb ที่ใช้ขวด flask จะเป็น 7.35 log $TCID_{50}$/มล. ส่วนขวด roller เป็น 7.40 log $TCID_{50}$/มล. ส่วนของกลุ่ม non-absorb ที่ใช้ขวด flask เป็น 7.05 log $TCID_{50}$/มล. ส่วนของ roller เป็น 7.05 log $TCID_{50}$/มล. เช่นกัน (ตามตารางที่ 1) และที่ sampling –mix จะมีค่า 6.8, 6.6, 7.1 และ 7.1 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ซึ่งค่า virus titer ของ WPE$^-$/Th เมื่อทำการเปรียบเทียบการเริ่มเพาะเลี้ยงไวรัสระหว่าง 2 วิธี คือการ absorb ไวรัส และไม่ได้ absorb พร้อมกันนี้ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างผลจากการเพาะเลี้ยงแบบขวด flask 225 ซม.^{2} และ roller 850 ซม.^{2}

ด้วย ถ้าดูค่าตัวเลขจะพบว่าวิธี absorb จะมีค่าตัวเลขสูงกว่า วิธีไม่ absorb ส่วนการเพาะเลี้ยงใน flask และ roller มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ทางสถิติด้วยวิธี t-test และวิธี ANOVA พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งแบบ absorb และการเพาะเลี้ยงในขวด ในการผลิตวัคซีนระดับอุตสาหกรรมที่ต้องเพาะเลี้ยงไวรัสในขวดจำนวนมากเมื่อสามารถลดขั้นตอนในการ absorb ได้จะประหยัดเวลาและลดโอกาสการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและราได้อีกขั้นตอนหนึ่ง

ตารางที่ 1 Virus titer log $TCID_{50}$/มล. ของ WPE^{-}/Th เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสแบบ absorb และ non-absorb ในขวด flask 225 ซม.^{2} และ roller 850 ซม.^{2}

ขวดเพาะเลี้ยง	Virus titer (log $TCID_{50}$/มล.)			
	แบบ absorb virus		แบบ non-absorb	
	flask 225 ซม.^{2}	roller 850 ซม.^{2}	flask 225 ซม.^{2}	roller 850 ซม.^{2}
1	7.3	7.3	7.3	7.1
2	7.1	7.1	7.1	7.3
3	7.3	6.8	6.8	5.8
4	7.3	7.8	6.8	7.1
5	7.6	-	-	-
ค่าเฉลี่ย $\bar{x}$	7.35	7.40	7.05	7.05
ค่า mix	6.8	7.1	6.6	7.1

- = ไม่ได้ทดสอบ

จากการศึกษาปริมาณไวรัสวัคซีน WPE^{-}/Th ในเซลล์ FS-L_3 ที่เพาะขยายอัตรา 1:4 1:5 และ 1:6 โดย เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 จากเซลล์อัตราที่ขยาย 1:4, 1:5 และ 1:6 (ทำการนับเซลล์ seeding ด้วย) ในขวด flask ขนาด 225 ซม.^{2} อย่างละ 1 ขวด นาน 7 วัน แล้ว suction BP medium ทุกขวดจากนั้นใส่ไวรัสวัคซีน WPE^{-}/Th titer 6.8 log $TCID_{50}$/มล. ใช้ 1 มล. ผสมกับ BP+1% CS รวมเป็น 20 มล. ต่อขวด ทำการ absorb ที่ 37°ซ. นาน 2 ชม. แล้วจึงเพิ่ม BP+1% CS จำนวน 80 มล. ต่อขวด จากนั้นเพาะเลี้ยงไวรัสนาน 7 วัน แล้ว harvest และ sampling เพื่อหาปริมาณไวรัส

ผลการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่ seeding ที่ 1:4, 1:5 และ 1:6 เป็น 17.47, 15.26 และ 10.40 ล้านเซลล์ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ 7 วัน แล้วทำการเพาะเลี้ยงไวรัส WPE^{-}/Th อีก 7 วัน จะได้ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสเป็น 6.45, 6.2 และ 6.1 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ (ตามตารางที่ 2) ซึ่งการเพาะขยายเซลล์ FS-L_3 อัตรา 1:4, 1:5 และ 1:6 เมื่ออายุ 7 วัน เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส WPE^{-}/Th จาก WS (titer 6.8 log $TCID_{50}$/มล.) ขวดละ 1 มล. ซึ่งคาดว่าประมาณ 0.1 MOI และอีก 7 วันต่อมา harvest พบว่าขวด 1:4 ได้ปริมาณไวรัสสูงสุด ส่วนขวด 1:6 ค่าเฉลี่ย

ต่ำสุด อัตราขยายเซลล์ 1:4 จึงเหมาะสำหรับเพื่อใช้ผลิตวัคซีน แต่อย่างไรก็ตามควรนับจำนวนเซลล์ seeding แต่ละครั้งเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสในขนาดที่เหมาะสม

ตารางที่ 2 Virus titer log $TCID_{50}$/มล. ของ WPE^{-}/Th เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ FS-L_3 อายุ 7 วัน จากการเพาะขยายเซลล์อัตรา 1:4, 1:5 และ 1:6 และ harvest เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสนาน 7 วัน

No. flask (225 ซม.^{2})	เซลล์ FS-L_3 เมื่อ seeding		Inoc. WPE^{-}/Th (เซลล์อายุ 7 วัน)	Virus titer เมื่อเพาะไวรัส 7 วัน (log $TCID_{50}$/มล.)	
	อัตราขยาย	จำนวนเซลล์		ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย
1	1:4	7.47 ล้าน	6.8 log $TCID_{50}$	6.3	
				6.6	6.45
2	1:5	15.26 ล้าน	6.8 log $TCID_{50}$	5.8	
				6.6	6.20
3	1:6	10.40 ล้าน	6.8 log $TCID_{50}$	6.1	
				6.1	6.10

สุดท้ายได้ศึกษาจำนวนเซลล์ FS-L_3 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกนับทุกวันนาน 7 วัน ส่วนกลุ่มหลัง นับเมื่อ seeding และวันที่ 7

กลุ่มแรก นับทุกวันนาน 7 วัน โดย ใช้เซลล์ FS-L_3 จากขวด flask ขนาด 25 ซม.^{2} ขยายอัตรา 1:5 รวมจำนวน 7 ขวด และจาก flask ขนาด 225 ซม.^{2} ขยายอัตรา 1:4, 1:5 และ 1:6 อัตราละ 7 ขวด รวม 21 ขวด ทำการนับ seeding ของแต่ละกลุ่ม จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วย BP medium ที่ 37°ซ. ดูอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ก่อนย่อยเซลล์ด้วย trypsin – versine (TV) แล้วทำการนับเซลล์เมื่อครบ 1, 2, 3 .... ถึง 7 วัน ตามลำดับ ใช้กลุ่มละ 1 ขวดต่อวัน ส่วนกลุ่มหลังนับเมื่อ seeding และวันที่ 7 ใช้เซลล์ FS-L_3 จากขวด flask ขนาด 75 ซม.^{2} ขยายอัตรา 1:5 จำนวน 1 ขวด และจาก roller ขนาด 850 ซม.^{2} ขยายอัตรา 1:4 และ 1:5 อย่างละ 1 ขวด รวม 2 ขวด ทำการนับ seeding ของแต่ละขวดและ เมื่อเซลล์อายุ 7 วัน ย่อยเซลล์ด้วย TV ออกทั้งหมด แล้วนับเซลล์

ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่นับทุกวัน เซลล์ seeding ของ FS-L_3 ใน flask ขนาด 25 ซม.^{2} และ 225 ซม.^{2} อัตรา 1:4 1:5 และ 1:6 เป็น 1.38, 17.47, 15.26 และ 10.40 ล้านเซลล์ ตามลำดับ และมีอัตราการเจริญเต็มพื้นที่ขวดในวันที่ 3, 3, 4 และ 4 ตามลำดับ และเมื่อเพาะเซลล์ได้ 7 วัน จะมีจำนวนเซลล์เป็น 11.16, 80.70, 73.55 และ 62.87 ล้านเซลล์ ตามลำดับ

สำหรับเซลล์ seeding ของ FS-L_3 ใน flask ขนาด 75 ซม.^{2} และ roller ขนาด 850 ซม.^{2} ที่ขยายเซลล์อัตรา 1:4 และ 1:5 พบเป็น 4.31, 50.25 และ 47.30 ล้านเซลล์ และเมื่อเพาะเซลล์ได้ 7 วัน นับจำนวนเซลล์ได้ 26.37, 210 และ 201 ล้านเซลล์ ตามลำดับ (ตามตารางที่ 3) ซึ่งการนับเซลล์เมื่ออายุ 1 วัน จากขวด flask 225 ซม.^{2} ได้จำนวนน้อยกว่า seeding อาจเนื่องจากเซลล์ตายเมื่อ seeding และเมื่อย่อยด้วย TV ที่ต้องใช้เวลานาน เพราะทำ

พร้อมกันหลายขวด ขณะที่เซลล์อายุน้อยมาก ส่วนอัตราที่เพิ่มขยายเมื่อเริ่มเต็มขวดกับจำนวนเซลล์ทำให้ประมาณได้ว่า flask ขนาด 25 ซม.^{2} และ 225 ซม.^{2} เต็มพื้นที่ขวดพอดีควรจะมีเซลล์ประมาณ 5 และ 35 ล้านเซลล์ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ต่อขวดจะเป็นข้อมูลขั้นต้นสำหรับการคำนวณการใช้ working seed ที่ 0.1 MOI

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ FS-L_3 ที่เพาะเลี้ยงในขวด flask ขนาด 25 ซม.^{2}, 75 ซม.^{2}, 225 ซม.^{2} และ roller 850 ซม.^{2} เมื่ออายุ 0-7 วัน

ขวดเพาะเซลล์	อัตราขยายเซลล์	ปริมาตร GM มล.	จำนวนเซลล์ x10^6 เมื่อเพาะเลี้ยงระยะเวลา (วัน) (% ที่เพิ่มขยายในขวด)							
			0	1	2	3	4	5	6	7
25 ซม.^{2}	1:5	5	1.38	2.88 (80)	4.79 (95)	7.24 (100)	9.52 (100)	10.81 (100)	11.80 (100)	11.16 (100)
75 ซม.^{2}	1:5	30	4.31	-	-	-	-	-	-	26.37
225 ซม.^{2}	1:4	100	17.47	12.6 (35)	23.30 (90)	36.90 (100)	61.60 (100)	74.73 (100)	79.30 (100)	80.70 (100)
225 ซม.^{2}	1:5	100	15.26	9.33 (20)	21.04 (90)	32.80 (98)	48.03 (100)	63.81 (100)	73.35 (100)	73.55 (100)
225 ซม.^{2}	1:6	100	10.40	7.75 (15)	16.13 (70)	29.65 (75)	44.43 (100)	59.60 (100)	70.20 (100)	62.87 (100)
850 ซม.^{2}	1:4	200	50.25	-	-	-	-	-	-	210
850 ซม.^{2}	1:5	200	47.30	-	-	-	-	-	-	201

- = ไม่ได้นับ

ทั้ง 6 เรื่องที่ศึกษามีผลทดลอง มีสรุปและวิจารณ์อยู่ในตัวเองเป็นการศึกษาพอรู้เป็นเบื้องต้น ด้วยมีเวลาและวัสดุอุปกรณ์จำกัดแต่ผลที่ได้จะมีประโยชน์เป็นแนวทางที่จะศึกษาต่อไป เพื่อปรับปรุงการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงได้ประโยชน์สูงสุดมีขั้นตอนการผลิตง่าย สะดวก ได้วัคซีนมีคุณภาพและลดต้นทุนในอนาคตและ ณ ที่นี้ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้สนับสนุนเงินทุนในโครงการหลัก เจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และเจ้าหน้าที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ทำให้ผลงานนี้สำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากร ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ และดุลยทัต คันธวร 2545 การพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาห์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง: รายงานการวิจัย การวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัยควบคุมและป้องกันโรคอหิวาห์สุกรในประเทศไทย จัดพิมพ์โดย สำนักวิจัยและบริการวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 177-213

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากร สมโภชน์ ทับเจริญ ปัณฑูรย์ ตระการวีระเดช วิวัฒน์ ชุณรักษา อภิเษก กองแก้ว และสมปรียา กองแก้ว 2548 การปรับปรุงคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรนWPE-/Th รายงานการวิจัยเรื่องการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE-/Th และการพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม ISBN 974-682-219-5 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กษ.: 6-29

สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน และวาสนา ภิญโญชนม์ 2540 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจระดับแอนติบอดีโรคอหิวาต์สุกรโดยนิวทราลไลซิงเปอร์ออกซิเดสลิงค์แอสเซ สัตวแพทยสาร 48(2): 27-33

Sakoda, Y. and Fukusho, A. 1996. Establishment and characterization of porcine kidney cell line FS-L_3 which forms unique multicellular domes in serum free culture. *In* Viro Cell. Dev. Biol. Anim. 34: 53-57.

กฎและระเบียบอาเซียนสำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์

(ASEAN rules and procedures for the registration of animal vaccines)

จารุณี สาตรา[1]

บทนำ

ประเทศสมาชิกอาเซียน ได้แก่ สิงคโปร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ บรูไน เวียดนาม ลาว พม่า กัมพูชา และไทย ได้จัดการประชุม working groups ต่างๆ ภายใต้ SOM-AMAF (Senior Officials Meeting – ASEAN Ministers on Agriculture and Forestry) เป็นประจำทุกปี โดยผลัดเปลี่ยนกันเป็นประเทศเจ้าภาพ วัตถุประสงค์ขั้นแรกของความร่วมมือของประเทศสมาชิกอาเซียนก็เพื่อสนับสนุนความร่วมมือทางเศรษฐกิจในภูมิภาค

ASEAN Coordinating Group on Livestock (ACGL) เป็นความร่วมมือในกลุ่มอาเซียนทางด้านปศุสัตว์ โดยทำหน้าที่แทนอำนาจสูงสุดทางสัตวแพทย์ของแต่ละประเทศสมาชิก ผู้แทนของประเทศสมาชิกได้ร่วมกันพิจารณาภายใต้หัวข้อการพัฒนาและการส่งเสริมอุตสาหกรรมปศุสัตว์ระหว่างประเทศสมาชิก

ปี พ.ศ. 2537 ACGL ได้รับผลสำเร็จจาก ASEAN Sectoral Working Group on Livestock (ASWGL) ซึ่งเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดในจุดรวมของอาเซียน เพื่อความคล่องตัวของการค้าอาเซียน รวมถึงการจัดตั้ง ASEAN Free Trade Area (AFTA)

อุปสรรคหลักในการพัฒนาอุตสาหกรรมปศุสัตว์ในภูมิภาคอาเซียนและน่าจะเป็นปัญหาของโลก คือ การเกิดโรคติดต่อในสัตว์ การติดเชื้อไม่ได้มีผลโดยตรงเฉพาะความสูญเสียในสัตว์เท่านั้นแต่ยังเป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศของสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เป็นโชคดีของประเทศสมาชิกอาเซียนที่ปลอดจากโรคสัตว์ที่ทำให้เสียหายมาก ได้แก่ african swine fever, african horse sickness และ bovine and caprine contagious pleuropneumonia อย่างไรก็ตาม มีโรคหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและสุขภาพ ซึ่งยังคงทำให้เกิดการเจ็บป่วยในบางประเทศสมาชิก รวมถึงโรคปากและเท้าเปื่อย โรคอหิวาต์สุกร โรคพิษสุนัขบ้า โรคนิวคาสเซิล และโรคไข้หวัดนก

จากการรู้ว่า การทำวัคซีนเป็นวิธีที่ใช้ปฏิบัติมากที่สุดในการควบคุมโรค CGL โดย ASWGL ได้จัดทำมาตรฐานสำหรับวัคซีนที่ใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ของประเทศสมาชิกอาเซียน เพื่อให้แน่ใจว่า วัคซีนที่ได้ระดับมาตรฐานสากลทั้งด้านความปลอดภัย ประสิทธิภาพและคุณภาพเท่านั้นที่จะนำไปใช้ป้องกันสุขภาพสัตว์ในเขตอาเซียน นอกจากนี้ได้มีการจัดทำระเบียบสำหรับการขึ้นทะเบียนของวัคซีนสัตว์ ความต้องการสำหรับข้อปฏิบัติที่ดีของโรงงานผลิตวัคซีนสัตว์และการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบวัคซีนสัตว์ ซึ่งเอกสาร

---

[1] กลุ่มตรวจสอบชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทรศัพท์ 0-4427-9948 โทรสาร 0-4431-3298

เหล่านี้ ได้จัดพิมพ์โดยเลขานุการอาเซียน ภายใต้หัวข้อ ดังนี้

1. คู่มือมาตรฐานอาเซียนสำหรับวัคซีนสัตว์
2. คู่มือกฎและระเบียบอาเซียนสำหรับการขึ้นทะเบียนของวัคซีนสัตว์
3. คู่มือมาตรฐานอาเซียนสำหรับข้อปฏิบัติที่ดีของโรงงานผลิตวัคซีนสัตว์
4. คู่มือบรรทัดฐานการขอรับรองมาตรฐานอาเซียนสำหรับห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบวัคซีนสัตว์
5. คู่มือหลักเกณฑ์อาเซียนของการปฏิบัติสำหรับการเก็บรักษา การขนส่งและการใช้วัคซีนสัตว์ในเชิงพาณิชย์

สำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียน ประเทศสมาชิกอาเซียนได้มีการประชุม National Focal Point for Animal Vaccines เพื่อจัดทำคู่มือกฎและระเบียบอาเซียนสำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ (Manual of ASEAN rules and procedures for the registration of animal vaccines, first edition, 1998) และได้จัดทำร่างแก้ไข (second edition) ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากที่ประชุม National Focal Point for Animal Vaccines ครั้งที่ 7 และที่ประชุมคณะทำงานด้านปศุสัตว์ (ASWGL) ครั้งที่ 13 เมื่อปี พ.ศ. 2548 (ค.ศ. 2005) โดยได้สรุปโครงร่างสำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียน ทั้งวัคซีนที่ผลิตโดยกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียน และวัคซีนที่นำเข้ามาจากภูมิภาคอื่นเพื่อนำมาใช้ในกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียนไว้ดังนี้

1. คำนำ

วัคซีนสัตว์ทุกชนิดที่ผลิตหรือนำเข้าหรือทำการตลาดในอาเซียน จะต้องจดทะเบียนในทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียน ซึ่งดูแลโดย ASEAN Focal Point for Animal Vaccines เพื่อให้แน่ใจว่า วัคซีนสัตว์ที่ผลิตหรือจำหน่ายเพื่อใช้ในอาเซียนได้มาตรฐานการผลิตและการทดสอบ วิธีการขึ้นทะเบียนในภูมิภาค จะอนุญาตให้มีการขายและการค้าวัคซีนสัตว์โดยอิสระในอาเซียน และเพื่อกระตุ้นการค้าระหว่างประเทศของวัคซีนสัตว์ที่ผลิตในอาเซียน

2. การขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์

2.1 โรงงานผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าวัคซีนสัตว์ จะต้องแน่ใจว่าวัคซีนได้ผลิตตามข้อกำหนดที่บรรจุอยู่ในคู่มืออาเซียน ดังนี้

2.1.1 Manual of ASEAN standards for good manufacturing practices (GMP) for animal vaccine

2.1.2 Manual of ASEAN standards for animal vaccines

2.2 โรงงานผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าวัคซีนสัตว์ จะต้องยื่นขอผ่านผู้มีอำนาจทางสัตวแพทย์ (veterinary authority) ในประเทศของผู้ผลิต (สำหรับวัคซีนที่ผลิตในอาเซียน) หรือนำเข้า (สำหรับวัคซีนที่นำเข้าโดยประเทศสมาชิกอาเซียน) สำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนในทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียนโดยส่งข้อมูลต่างๆ ดังนี้

2.2.1 สังเขปความของการผลิต (outline of production) ซึ่งแสดงรายละเอียดกรรมวิธีการผลิตและการทดสอบผลิตภัณฑ์

สังเขปความควรรวมถึงข้อมูลดังต่อไปนี้

จุลชีพ (Micro-organisms)

- แหล่งและข้อมูลของการได้มา (source and data of accession)

- ประวัติการแยกเชื้อและการผ่านเชื้อ (isolation and passage history)
- สายพันธุ์และสัดส่วน (strains and proportions)

การเพาะเชื้อ (Cultures)

- วิธีการและการพิสูจน์ของแต่ละจุลชีพ (method and identification of each microorganism)
- ข้อมูลของ master seed และ working seed (information on master seed and working seed)
- ข้อมูลแสดงความรุนแรงและความบริสุทธิ์ (virulence or pathogenicity and purity data)
- สารที่ใช้ในการเตรียมและส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด (substrate for propagation and all media composition)
- การเก็บ seed culture (seed culture storage)
- เทคนิคในการใส่เชื้อ (inoculation technique)
- ระบบของ Seed lot (seed lot system)

การเก็บเชื้อ (Harvesting)

- การเก็บรักษาเชื้อที่เพาะและอาหารเลี้ยงเชื้อ (handling of cultures and media) ระยะเวลาตั้งแต่ใส่เชื้อจนถึงเก็บเชื้อ (time from inoculation to harvest)
- เทคนิคในการเก็บเชื้อ (technique for harvesting micro-organism)

การเตรียมผลิตภัณฑ์ (Product preparation)

- อธิบายแต่ละขั้นตอนตั้งแต่เก็บแอนติเจนจนได้ผลิตภัณฑ์ที่สำเร็จรูปในบรรจุภัณฑ์สุดท้าย (step-by-step description from harvest of antigen to the finished product in final containers)

การทดสอบ (Testing)

- แสดงถึงตัวอย่างที่เก็บ (stages at which samples are collected)
- หลักฐานที่ใช้ได้กับมาตรฐานวัคซีนของอาเซียน (reference to applicable ASEAN standards of vaccines)
- รายละเอียดของการทดสอบเพิ่มเติมให้ได้ตามข้อกำหนดขั้นต่ำสำหรับความพอใจในแต่ละการทดสอบ (details of additional tests giving minimum requirements for each satisfactory test.)

ข้อมูลอื่น ๆ (Other information)

- การสุ่มตัวอย่างบรรจุภัณฑ์สุดท้าย (final container sampling)
- การคำนวณวันหมดอายุ (calculation of expiration date)
- ข้อแนะนำการใช้ (recommendations for use)
- ขนาดที่ใช้ (dosage)
- ทางที่ให้ (route of administration)
- ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (composition of final products)
- สภาวะการเก็บรักษา (storage condition)

- ผลข้างเคียงหรืออาการที่เป็นปรปักษ์ (side effect or adverse reactions)
- ข้อควรระวัง (precaution)

2.2.2 ร่างคร่าว ๆ และ/หรือ ฉลากยา (sketches and / or final labels)

2.2.3 ข้อมูลสนับสนุน (supporting data)

จัดหาข้อมูลเพื่อสนับสนุน การไม่เปลี่ยนกลับรุนแรง (absence of reversion to virulence) ความปราศจากการปนเปื้อน (sterility) ความบริสุทธิ์ (purity) ความปลอดภัย (safety) ความคุ้มโรค (potency) ความคงตัว (stability) และประสิทธิภาพ (efficacy) ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตตาม 1 สังเขปความของการผลิต (outline of production)

2.2.4 ใบรับรองและเอกสาร (certificates and documents)

คำขอขึ้นทะเบียนต้องส่งมาพร้อมกับใบรับรองการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis) ใบรับรองของแหล่งเริ่มต้น (certificate of origin) ใบรับรองให้จำหน่ายโดยอิสระ (certificate of free sale) ใบรับรองการปฏิบัติสม่ำเสมอที่ดีของโรงงาน (certificate of good manufacturing practice, GMP) ใบรับรองการขึ้นทะเบียนจากผู้มีอำนาจทางสัตวแพทย์ที่เกี่ยวข้องในประเทศผู้ผลิต (certificate of registration from the relevant veterinary authority in the country of manufacture) ในกรณีของวัคซีนนำเข้า ควรแสดงจดหมายแต่งตั้งให้เป็นตัวแทนสำหรับผลิตภัณฑ์นั้นจากผู้ผลิตด้วย

2.3 เมื่อผู้มีอำนาจทางสัตวแพทย์ของประเทศผู้ผลิตวัคซีนหรือนำเข้า พอใจว่าวัคซีนถึงข้อกำหนดของคู่มืออาเซียนข้อ 2.1 ก็จะส่งข้อมูลของวัคซีน ผ่าน National Focal Point for Animal Vaccines ไปยัง ASEAN Focal Point for Animal Vaccines เพื่อรวบรวมวัคซีนนั้นขึ้นทะเบียนของ ASEAN โดยส่งคำขอพร้อมกับข้อมูลของวัคซีนสัตว์ดังต่อไปนี้

2.3.1 ประเทศผู้ผลิต (country of manufacture)

2.3.2 ชื่อและที่อยู่ของผู้ผลิต (name and address of manufacturer)

2.3.3 ใบอนุญาตทำการค้า (business license)

2.3.4 ชื่อผลิตภัณฑ์ (product name)

2.3.5 ส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ (active component)

2.3.6 วันที่ลงนามรับรองโดยผู้มีอำนาจทางสัตวแพทย์ของประเทศผู้ผลิตหรือนำเข้า (date of endorsement by veterinary authority of country of manufacture or import)

2.3.7 ชื่อผู้จำหน่าย (name of distributor)

2.4 ASEAN Focal Point for Animal Vaccines จะดำเนินการประเมินคำขอบนพื้นฐานของข้อมูลที่ส่งมาและเป็นไปตามข้อกำหนดของของคู่มืออาเซียน ข้อ 2.1

2.5 ASEAN Focal Point for Animal Vaccines จะทำการทดสอบวัคซีนโดยตรงก่อนการขึ้นทะเบียนโดยใช้ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองภายใต้เกณฑ์การรับรองของอาเซียนสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจสอบวัคซีนสัตว์

2.6 เมื่อมีความจำเป็น ถ้าห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองจากอาเซียน ไม่สามารถทำการทดสอบคุณภาพวัคซีน และ/หรือถ้าผู้ผลิตไม่สามารถจัดหาข้อมูลได้เพียงพอเกี่ยวกับข้อกำหนดของ GMP สำหรับวัคซีนสัตว์ อาจจัดตั้ง ASEAN Review Committee ซึ่งประกอบด้วยประเทศสมาชิกอาเซียนไม่ต่ำกว่า 3 ประเทศ (นอกเหนือจากประเทศสมาชิกอาเซียนที่โรงงานผลิตตั้งอยู่) เพื่อดำเนินการตรวจหลักฐานที่โรงงานผู้ผลิต ถ้าถูกร้องขอโดยผู้ผลิตหรือผู้นำเข้า โดยผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าสนับสนุนค่าใช้จ่ายทั้งหมด

2.7 ASEAN Focal Point for Animal Vaccines จะต้องทำการประเมินคำขอที่ส่งมาและผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการก่อนการขึ้นทะเบียนที่ได้รับ ถ้ายอมรับได้ (applicable) แจ้งให้ National Focal Points ทราบถึงเกี่ยวกับคำขอขึ้นทะเบียนวัคซีนดังกล่าว National Focal Points อาจคัดค้านคำขอโดยการเขียนและให้เหตุผลเพื่อสนับสนุนคำค้านภายใน 30 วัน หลังจากได้รับแจ้งจาก ASEAN Focal Point for Animal Vaccines ถ้าไม่ได้รับคำค้านจากประเทศสมาชิก ASEAN Focal Point for Animal Vaccines จะนำเข้า update ในทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียน คำขอจะถูกทบทวนในกรณีที่ได้รับคำค้าน

2.8 วัคซีนสัตว์ที่ขึ้นทะเบียนอาเซียนจะสามารถขายได้อย่างอิสระในกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียน โดยดำเนินการให้ถูกต้องตามคู่มือหลักเกณฑ์อาเซียนของการปฏิบัติสำหรับการเก็บรักษา การขนส่ง และการใช้วัคซีนสัตว์ในเชิงพาณิชย์ (Manual of ASEAN code of practice for the commercial storage, transportation and handling of animal vaccines)

2.9 สำหรับประเทศที่ปลอดจากโรคสัตว์บางชนิด การนำเข้าวัคซีนสัตว์ควรส่งผ่านไปยังหน่วยงานที่ควบคุมการนำเข้าของประเทศที่นำเข้าวัคซีน

2.10 หมายเลขทะเบียน (registration number) ใช้ได้นาน 10 ปี การขอต่ออายุ ใช้วิธีการและหลักฐานที่จำเป็นเช่นเดียวกับการขอขึ้นทะเบียน

สำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ของประเทศไทย อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งได้กำหนดขั้นตอนการขึ้นทะเบียน และได้ออกประกาศระเบียบสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาว่าด้วยข้อกำหนดชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ พ.ศ. 2543 และระเบียบสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ว่าด้วยการควบคุมชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ก่อนออกจำหน่ายหลังได้รับทะเบียนตำรับยา พ.ศ. 2543 เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ. 2543 ไว้ดังนี้

1. ขั้นตอนการขึ้นทะเบียนตามคู่มือ/หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาสามัญ (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1 วันที่ 22 มีนาคม 2547)

2. ระเบียบสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาว่าด้วยข้อกำหนดชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ พ.ศ. 2543 ซึ่งมีสาระสำคัญกำหนดให้การผลิตชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ ผู้รับอนุญาตต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การผลิตขั้นต่ำขององค์การอนามัยโลกหรือข้อกำหนดตามตำรับยาที่รัฐมนตรีประกาศ หรือข้อกำหนดอื่นๆ ตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเห็นชอบ และให้กระทรวง ทบวง กรม ในหน้าที่ป้องกันหรือบำบัดโรค สภากาชาดไทย และองค์การเภสัชกรรม ที่ประสงค์จะผลิตหรือสั่งชีววัตถุเข้ามาในราชอาณาจักร ยื่นคำขอใบอนุญาต และขอขึ้นทะเบียนตำรับชีววัตถุ นับแต่วันที่ระเบียบนี้ใช้บังคับ

3. ระเบียบสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ว่าด้วยการควบคุมชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ก่อนออกจำหน่าย หลังได้รับทะเบียนตำรับยา พ.ศ. 2543 ซึ่งมีสาระสำคัญกำหนดให้ ผู้รับอนุญาตผลิตหรือผู้รับอนุญาตนำหรือสั่งชีววัตถุเข้ามาในราชอาณาจักร ต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การควบคุมชีววัตถุสำหรับสัตว์ก่อนออกจำหน่ายหลังได้รับทะเบียนตำรับยา (lot release) และให้กระทรวง ทบวง กรม ในหน้าที่ป้องกันหรือบำบัดโรค สภากาชาดไทย และองค์การเภสัชกรรม ที่ประสงค์จะผลิตหรือสั่งชีววัตถุเข้ามาในราชอาณาจักรต้องยื่นคำขอหนังสือรับรองรุ่นการผลิตชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์ ใบอนุญาต และขอขึ้นทะเบียนตำรับชีววัตถุ นับแต่วันที่ระเบียบนี้ใช้บังคับ

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศสมาชิกอาเซียน หากกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียนเริ่มใช้กฎและระเบียบอาเซียนสำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ ประเทศไทยจะต้องทำการปรับปรุงเกณฑ์การขึ้นทะเบียนชีววัตถุที่ใช้สำหรับสัตว์หรือวัคซีนสัตว์ให้สอดคล้องกับกฎและระเบียบสำหรับการขึ้นทะเบียนวัคซีนสัตว์ของอาเซียน

****

ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่า เมื่อใช้ซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อ 5%

ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] กัญญา สุวินทรากร[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า โดยใช้ซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อเป็นส่วนผสมของวัคซีน 5% เปรียบเทียบกับวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันซึ่งมีซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อเป็นส่วนผสมของวัคซีน 10% โดยเตรียมวัคซีนอหิวาต์สุกรอย่างละ 2 ชุด แล้วทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพของวัคซีนตามเกณฑ์มาตรฐานคือ คุณลักษณะและคุณสมบัติการละลายของวัคซีน ความเป็นสุญญากาศ ปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ความปลอดภัยและความคุ้มโรค 50% ผลการทดสอบพบว่าวัคซีนที่มีซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อเป็นส่วนผสมของวัคซีน 5% และ10% มีคุณภาพและประสิทธิภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน แต่ความคุ้มโรค 50% ของวัคซีนที่มีซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อ 5% จะต่ำกว่าวัคซีนที่มีซีรัม กระต่ายที่ฉีดเชื้อ 10% 0.5-1 log

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า ซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อ 5%

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (classical swine fever) เป็นโรคระบาดเฉพาะสุกรที่ร้ายแรง เกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม pestivirus ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับโรค bovine viral diarrhea ในโคและ border disease ในแกะซึ่งมีคุณสมบัติทางด้าน antigenic ใกล้เคียงกัน โรคนี้รักษาไม่ได้ผลต้องควบคุมโรคโดยการป้องกันซึ่งการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรเป็นวิธีหนึ่ง ในประเทศไทยมีการระบาดครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2493 และเป็นปีแรกที่กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อตายชนิด crystal violet (Kongsmak, 1980) ที่ให้ภูมิคุ้มกันช้าและหมดเร็ว จึงปรับปรุงเป็นผลิตวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน SFA แต่สุกรมีปฏิกิริยาหลังฉีด ต้องฉีด hyperimmune serum ควบคู่ไปด้วย ต่อมาในปี พ.ศ. 2518 ได้เชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่า (lapinized swine fever, China strain) จากประเทศฮังการี ได้ทดลองใช้ผลิตวัคซีนพบว่าเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัยสูง ไม่มีปฏิกิริยาภายหลังฉีด ไวรัสไม่แพร่ไปยังตัวอื่น ให้ความคุ้มโรคได้เร็วเพียง 5 วันภายหลังฉีดวัคซีน (ฉาย, 2529) และภูมิคุ้มกันอยู่ได้นานกว่า 1 ปี กรมปศุสัตว์จึงได้ผลิตวัคซีนสเตรนไชน่าตั้งแต่ พ.ศ. 2519 จนถึงปัจจุบัน

การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่า เริ่มจากทำการเพิ่มปริมาณไวรัสวัคซีนในกระต่ายนาน 3 วัน แล้วเก็บไวรัสวัคซีน โดยเก็บม้ามและต่อมน้ำเหลืองมีเซนเทอริค (mesenteric lymph node, MLN) และเลือด (ถ้าเขย่าให้เม็ดเลือดแตกเรียก defibrinated blood แต่ถ้าปล่อยให้เลือดแข็งตัวแล้วเก็บส่วนใสเรียก infected rabbit serum, IRS) จากการทำ virus titration พบว่าม้ามและต่อมน้ำเหลืองมีไวรัสวัคซีนสูงกว่าอวัยวะอื่นคือ มี titre 10^5/มล. ส่วน defibrinated blood มี titre $10^{2.7}$/มล. (Lin *et al.*, 1963) สารที่ใช้เพื่อทำแห้งและรักษาไวรัสวัคซีนที่มีชีวิตระหว่างทำแห้งและเก็บรักษาวัคซีน ได้ผลดีคือ ซีรัมม้า (horse serum, HS) ซีรัมกระต่ายปกติและ IRS (Lin and Lee, 1981)

ส่วนผสมวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรนไชน่าของกรมปศุสัตว์ เดิมใช้ม้ามและ MLN 4% defibrinated blood 75% ยาปฏิชีวนะ (antibiotic, AB) 1% และเติมสารคงตัว (stabilizer) จนครบ 100% (สละ, 2529) เมื่อทำแห้งและนำไปใช้ ปรากฏว่าวัคซีนละลายยากมากเพราะมีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดง ต่อมา ฉายและกัญญา (2529ก) จึงทดลองปรับปรุงเปลี่ยนแปลงส่วนผสมของวัคซีน พบว่ามี 3 สูตรที่ละลายได้ง่าย มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคตามมาตรฐานคือ 10^2PD_{50}/โด๊ส (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530) โดยทั้ง 3 สูตรมีส่วนผสมที่เท่ากันคือ ม้ามและMLN 1 ส่วน stabilizer 20 ส่วน AB 1% ที่ต่างกันคือซีรัม โดยสูตรแรกมี HS 10 ส่วน สูตรที่สองมี IRS 10 ส่วน และสูตรที่สามมี HS 4 ส่วน และ IRS 5 ส่วน ซึ่งในสูตรแรกถึงแม้ไม่มี IRS ก็สามารถให้ความคุ้มตามมาตรฐาน ต่อมามีการทดลองลดส่วนผสมของวัคซีน เนื่องจากขณะนั้นใช้ส่วนผสมม้ามและ MLN ไม่น้อยกว่า 3% วัคซีนมีปริมาณไวรัสวัคซีน $10^{4-5}PD_{50}$/โด๊ส ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานโดยทดลองลดส่วนของม้ามและ MLN คือใช้ 3% 2.5% 2% 1.5% และ 1% ทั้ง 5 สูตรมี IRS 10% AB 1% เท่ากัน และเติม stabilizer จนครบ 100% ซึ่งทุกสูตรให้ความปลอดภัยและความคุ้มโรคเมื่อให้ขนาดต่ำกว่ากำหนด 100 เท่า (ฉายและกัญญา, 2529ข) ในปี 2526 การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรของกรมปศุสัตว์เลือกใช้สูตรม้ามและ MLN 2% IRS 10% AB 1% และ stabilizer 87% จนถึงปัจจุบัน(กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530)

การทดลองนี้เพื่อศึกษาว่าเมื่อลดปริมาณ IRS เป็น 5% จะมีผลต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่าหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชน่า

เตรียมวัคซีนอหิวาต์สุกรจำนวน 2 ชุดคือ ชุด A และB โดยแต่ละชุดมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดลองมีส่วนผสมของวัคซีนคือ IRS 5% ม้ามและ MLN จากกระต่ายที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชน่า 2% AB 1% และ Stabilizer 92% และกลุ่มควบคุม มีส่วนผสมของวัคซีนคือ IRS 10% ม้ามและ MLN จากกระต่ายที่ได้รับไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชน่า 2% AB 1% และ stabilizer 87% ในแต่ละกลุ่มผลิตจำนวน 200 ขวด ๆ ละ10 โด๊ส รวม 2,000 โด๊ส/กลุ่ม

สุกรทดลอง

สุกรปลอดภูมิคุ้มโรคอหิวาต์สุกรอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว

เชื้อไวรัสโรคอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สเตรนท้องถิ่น

สำหรับฉีดพิษทับมีปริมาณไวรัส 10^5 pig infection dose/มล.

การทดสอบคุณภาพวัคซีนสำเร็จรูป

ตามมาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของไวรัสวัคซีน (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530) ดังนี้

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ :

ตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป (property test): วัคซีนทำแห้งต้องมีลักษณะเป็นเค้ก(cake) สีเนื้อ(white-pink) และเมื่อละลายกับน้ำยาละลายได้เป็นส่วนผสมเนื้อเดียวกันไม่มีอนุภาคอื่นหรือสิ่งแปลกปลอมปนอยู่

ทดสอบความเป็นสุญญากาศ (vacuum test): โดยใช้เครื่องเช็คสภาพสุญญากาศ ชนิดไฟฟ้าความถี่สูง[1] วัคซีนต้องให้สีเขียวอมฟ้า (greenish-blue)

ทดสอบปริมาณความชื้น (moisture test): โดยตรวจสอบด้วยวิธีของคาร์ล ฟิชเชอร์ (Council of Europe, 2005) ต้องมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 4%

ทดสอบการปนเปื้อน (sterility test): โดยละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลาย 10 มล. ต่อวัคซีน 1 ขวด แล้วแบ่งใส่หลอด thioglycollate broth และ sabouraud dextrose broth หลอดละ 1 มล. ชนิดละ4 หลอด นำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. และ 22°ซ. ตามลำดับ นาน 14 วัน ต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

การทดสอบในสุกรทดลอง :

ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน (safety test) : ในขนาด 10 เท่าของขนาดกำหนดให้ใช้โดยละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลาย 5 มล. ต่อวัคซีน 1 ขวด แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อสุกรตัวละ 5 มล. จำนวน 4 ตัว สังเกตอาการและอุณหภูมิร่างกายสุกรเช้าและเย็น นาน 7 วัน สุกรทุกตัวต้องไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ

---

[1] ST4M spark tester® Edwards, England

ทดสอบความคุ้มโรค 50% ของวัคซีน (50% pig protection dose, PD_{50}): โดยเจือจางวัคซีน ten-fold ที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อสุกรที่ความเจือจางละ 2 ตัวๆ ละ 1 มล. รวมจำนวน 6 ตัว สังเกตอาการและวัดอุณหภูมิร่างกายสุกรเช้าและเย็น นาน 14 วัน แล้วฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในขนาด 10^5minimum lethal dose เข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 มล. พร้อมกับสุกรควบคุมจำนวน 2 ตัว สังเกตอาการและวัดอุณหภูมิร่างกายสุกรเช้าและเย็น นาน 21 วัน คำนวณหาความคุ้มโรค 50% ของวัคซีนด้วยวิธีของ Reed & Muench (1938) วัคซีนที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานต้องมีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 10^2 PD_{50}/โด๊ส (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530; ASEAN, 1998; Office International des Epizooties, OIE, 2004)

ผล

การทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่า จำนวน 2 ชุดคือ ชุด A และB แต่ละชุดมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดลองมี IRS เป็นส่วนผสมของวัคซีน 5% และกลุ่มควบคุมมี IRS เป็นส่วนผสมของวัคซีน 10% รวมตัวอย่างวัคซีนที่ทดสอบจำนวน 4 ตัวอย่าง การทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่า ผล property test ของวัคซีน 4 ตัวอย่างมีลักษณะเป็นเค้กสีเนื้อเมื่อละลายได้ส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันไม่มีอนุภาคอื่นหรือสิ่งแปลกปลอม ผล vacuum test มีความเป็นสุญญากาศตามเกณฑ์ที่กำหนด ผล moisture test ของวัคซีนชุด A ทั้งกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมมีความชื้น 2.15% วัคซีนชุด B ทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมีความชื้น 2.55% สำหรับผลของ sterility test ของวัคซีนทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา การทดสอบในสุกรทดลอง ผล safety test ในทุกกลุ่ม พบว่าสุกรไม่แสดงอาการผิดปกติและผลการหาความคุ้มโรค 50% ของวัคซีนพบว่าชุด A กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมคือ $10^{2.5}$ และ$10^{3.5}$ PD_{50}/โด๊ส และของชุด B กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมคือ$10^{2.5}$ และ$10^{3.0}$ PD_{50}/โด๊ส ตามลำดับ(ตารางที่ 1)

วิจารณ์ และสรุป

จากผลการทดลอง วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่า ที่มีส่วนผสมของ IRS 5% ทั้งชุด A และ B คือ$10^{2.50}$ PD_{50}/โด๊ส และกลุ่มที่มี IRS 10% ในชุด A และ B คือ $10^{3.50}$ และ $10^{3.0}$ PD_{50}/โด๊ส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความคุ้มโรค 50% ของวัคซีนกลุ่มที่มี IRS 5% กับ 10% พบว่าวัคซีนที่มี IRS 5% มีความคุ้มโรคน้อยกว่าวัคซีนที่มี IRS 10% เท่ากับ 0.5-1 log Lin และคณะ (1963) พบว่าใน defibrinated blood มีปริมาณไวรัสวัคซีน ประมาณ $10^{2.7}$/มล. ดังนั้นค่าความคุ้มโรค 50% ที่น้อยลงของวัคซีนที่มี IRS 5% เป็นส่วนผสมอาจเนื่องจากการลดปริมาณ IRS จาก 10% ที่มีปริมาณไวรัสมากกว่าลงมาเป็น 5% ที่มีปริมาณไวรัสน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามวัคซีนที่มีส่วนผสมของ IRS 5 % ยังคงมีคุณภาพและประสิทธิภาพทางด้านคุณสมบัติทั่วไป ความเป็นสุญญากาศ ปริมาณความชื้น การปนเปื้อน ความปลอดภัยของวัคซีน และความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 10^2 PD_{50}/โด๊ส ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2530; ASEAN, 1998; OIE, 2004) เช่นเดียวกับวัคซีนที่มีส่วนผสมของ IRS 10%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรค เป็ดทุกท่าน ที่ช่วยให้งานทดลองครั้งนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ 2530 เอกสารทางวิชาการ มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของไวรัสวัคซีน พิมพ์โดยศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ หน้า 5-30

ฉาย จอมเกาะ 2529 วัคซีนอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร รายงานทางวิชาการ 2526-2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 384-390

ฉาย จอมเกาะ และกัญญา สุวินทรากร 2529ก การทดลองเปลี่ยนแปลงส่วนผสมของวัคซีนอหิวาต์สุกร รายงานทางวิชาการ 2526-2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 354-356

ฉาย จอมเกาะ และกัญญา สุวินทรากร 2529ข การทดลองลดจำนวนส่วนผสมของต่อมในวัคซีนอหิวาต์สุกร รายงานทางวิชาการ 2526-2329 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 379-383

สละ กองสมัคร 2529 วัคซีนและสารวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย เอกสารวิชาการ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร หน้า 29-35

ASEAN. 1998. Manual of ASEAN standards for Animal Vaccines. Livestock Publication Series No. 2A: 26-27.

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

Kongsmak, S. 1980. Swine fever in Thailand. Proceedings of symposium on Tropical Agriculture Research, 3-7 November 1979. Tsukuba, Japan. pp. 163-166.

Lin, T. T. C. and Lee, R. C. T. 1981. An Overall Report on the Development of a Highly Safe and Potency Lapinized Hog Cholera Virus Strain for Hog Cholera Control in Taiwan. NSC.No 5. Taipei, Taiwan Republic of China. pp. 15-37.

Lin, T. T. C., Yang, T. J., Chow, M. S. and Chang, M. L. 1963. Studies on lyophillization of lapinized hog cholera vaccine. First Report. Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep.1: 1-27.

Office International des Epizooties. 2004. Classical Swine Fever (hog cholera). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th ed. Paris, France. Chapter 2.1.13.

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

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนสำเร็จรูปทางห้องปฏิบัติการและในสุกรทดลองของวัคซีนที่มีซีรัมกระต่ายที่ฉีดเชื้อ (IRS) เป็นส่วนผสมของวัคซีน 5% (กลุ่มทดลอง) และ10% (กลุ่มควบคุม)

การทดสอบ	ชุด A		ชุด B		การตัดสินผ่าน
	IRS 5%	IRS 10%	IRS 5%	IRS 10%	
Property test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	เป็นเค้ก สีเนื้อ
Vacuum test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	เป็นสุญญากาศ
Moisture test	2.15%	2.15%	2.55%	2.55%	ไม่เกิน 4%
Sterility test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่มีแบคทีเรียและรา
Safety test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่มีอาการผิดปกติ
50% pig protection dose (PD_{50}/โด๊ส)	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{2.5}$	$10^{3.0}$	ไม่น้อยกว่า 10^2 PD_{50}/โด๊ส

Efficacy of lapinized swine fever vaccine, China strain by using 5% infected rabbit serum

Ritluechai Poosungnuen[1] Kunya Suvintarakorn[1]

Abstract

Efficacy of lapinized swine fever vaccine, China strain, containing 5% infected rabbit serum was studied. Two batches of the vaccine, each batch consisting of vaccine containing 5% and 10% infected rabbit serum, were produced. Vaccine samples were tested in the following aspects: property and solubility, vacuum, moisture, bacterial and fungal contamination, and 50% pig protection dose (PD_{50}). Results showed that the vaccine samples containing 5% infected rabbit serum passed all the tests as same as those containing 10% infected rabbit serum. But the PD_{50} value of the vaccine containing 5% infected rabbit serum was lower than that of the vaccine containing 10% infected rabbit serum at about 0.5 – 1 log.

Key words: Lapinized swine fever vaccine, China strain, 5% infected rabbit serum

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