เปรียบเทียบปริมาณไวรัสก่อนและหลังการทำแห้งของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่

อารีรัตน์ สุดโต[1] กังวาน จึงธีรพานิช[1]

บทคัดย่อ

มาตรฐานที่กำหนดของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ คือปริมาณไวรัสต้องไม่น้อยกว่า 3.5 $\log_{10}EID_{50}$/dose จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ในขั้นตอนการผลิตจำนวน 24 ชุด พบว่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีนนั้น ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่า กระบวนการผลิตวัคซีนที่ใช้ปัจจุบันเหมาะสม

คำสำคัญ: ปริมาณไวรัส วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ทำแห้ง

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

กระบวนการผลิตวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จะเก็บสต๊อกไวรัสไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4-6°ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงเพื่อใช้สำหรับผลิตวัคซีน เมื่อผลิตวัคซีนสำเร็จรูปจะนำสต๊อกไวรัสผสมกับ stabilizer จากนั้นบรรจุลงขวดโดยเครื่องบรรจุวัคซีนอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาในการบรรจุประมาณ 3 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้มีการควบคุมรักษาอุณหภูมิให้มีความเย็นอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4-6°ซ. เพื่อรักษาความคงตัวของไวรัส แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งเพื่อผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูป โดยวัคซีนสำเร็จรูปจะต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.5 $\log_{10}EID_{50}$/ml เมื่อคำนวณโดยวิธี Reed และ Muench (1938) และผ่านตามมาตรฐานที่กำหนดคือปริมาณไวรัสต้องไม่น้อยกว่า 3.5 $\log_{10}EID_{50}$/dose (Office International des Epizooties, OIE, 2004) ในขั้นตอนการละลายสต๊อกไวรัสที่เก็บไว้ในห้องเย็น การบรรจุขวด และการทำแห้งวัคซีนอาจทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณไวรัส ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด ก่อนทำแห้งวัคซีน และหลังทำแห้งวัคซีน ว่ามีการสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนใดบ้าง เพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างไวรัส

เก็บตัวอย่างไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะซึ่งผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปปีพ.ศ. 2548-2550 (ชุดการผลิต 1/48-12/48, ชุดการผลิต 1/49-9/49 และชุดการผลิต 1/51-3/51) จำนวน 24 ชุดๆ ละ 3 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยไวรัสก่อนบรรจุจำนวน 1 ตัวอย่าง ปริมาตร 15 มล. หลังบรรจุจำนวน 1 ตัวอย่าง ปริมาตร 15 มล. และวัคซีนสำเร็จรูปในชุดนั้นๆ จำนวน 1 ตัวอย่างๆ ละ 3 ขวด โดยเก็บตัวอย่างไวรัสหลังจากผสมกับ stabilizer ก่อนเริ่มการบรรจุวัคซีนโดยเครื่องบรรจุวัคซีนอัตโนมัติประมาณ 15 มล. หลังจากนั้นนำตัวอย่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-6°ซ. เพื่อรอการส่งไปทดสอบ เมื่อบรรจุวัคซีนแล้วเสร็จเก็บตัวอย่างประมาณ 15 มล. อีกครั้งเป็นวัคซีนหลังบรรจุ แล้วส่งตัวอย่างไปทดสอบพร้อมกันกับตัวอย่างวัคซีนก่อนบรรจุ และจะทดสอบทันที หลังจากได้รับตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างวัคซีนทำแห้งจะเก็บและส่งไปทดสอบในวันต่อมา เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำแห้งนาน 24-27 ชั่วโมง

2. การหาปริมาณไวรัส ตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีนด้วยวิธี virus titration (United States Department of Agriculture, USDA, 2005)

2.1 ทำ ten fold dilution ไวรัสก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และวัคซีนสำเร็จรูปด้วยสารละลาย PBS ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7}

2.2 นำ dilution ที่ 10^{-3} ถึง 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มล. ฉีดเข้าทาง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน โดยฉีดไข่ไก่ฟักจำนวน 5 ฟอง ต่อ 1 dilution

2.3 ฉีดสารละลาย PBS ปริมาตร 0.1 มล. เข้าทาง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักจำนวน 5 ฟอง เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

2.4 อบที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 5-7 วัน ส่องคัดไข่ตายทุกวัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 คำนวณหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Reed และ Muench (1938) โดยวัคซีนที่ผ่านการทดสอบจะต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.5 $\log_{10}$ EID_{50}/ml

3.2 เปรียบเทียบปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีนทางสถิติโดยวิธี ANOVA (ธานินทร์, 2548) ดังตารางด้านล่าง

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	k-1	SSTr	MSTr	MSTr/MSE
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	N-k	SSE	MSE	
รวม	N-1	SST		

คำนวณหาตัวสถิติได้แก่

1. SST คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ทั้งหมดของข้อมูล

$$SST = \sum\sum X_{ij}^2 - CM$$

โดยที่ $CM = (\sum T_i)^2/N$

2. SSTr คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ระหว่าง Treatment

$$SSTr = \sum Ti^2/n - CM$$

3. SSE คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ภายใน Treatment เดียวกัน

$$SSE = SST - SSTr$$

4. MSE = SSE/N-k (k = จำนวน Treatment ที่ศึกษา)

5. MSTr = SSTr/k-1

6. ตัวสถิติที่ใช้ทดสอบ F = MSTr/MSE

แทนค่าในตาราง ANOVA จากนั้นเปิดตาราง F เปิดที่ $F_{\alpha,v1,v2}$ โดยที่ α คือ ระดับนัยสำคัญ, v1 คือ df ของ treatment = k-1 และ v2 คือ df ของ error = N-k

ผล

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปปีพ.ศ. 2548-2550 (ชุดการผลิต 1/48-12/48, ชุดการผลิต 1/49-9/49 และชุดการผลิต 1/51-3/51) จำนวน 24 ชุด พบว่าค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของปริมาณไวรัส (geometric mean titers, GMT) (ธานินทร์, 2548) ก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีนเท่ากับ 5.96 $\pm$ 0.47, 5.91 $\pm$ 0.46 และ 5.83 $\pm$ 0.36 $\log_{10}$ EID_{50}/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี ANOVA พบว่าปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีนไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุป

จากการหาปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จากตัวอย่างวัคซีนจำนวน 24 ชุด โดยการฉีดไวรัสปริมาตร 0.1 มล. (10 โด๊ส) เข้าทาง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Reed และ Muench พบว่าวัคซีนผ่านการทดสอบทั้ง 24 ชุด คือ มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 5.5 $\log_{10}EID_{50}$/ml และผ่านตามมาตรฐานที่กำหนดคือปริมาณไวรัสต้องไม่น้อยกว่า 3.5 $\log_{10}EID_{50}$/dose (OIE, 2004) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีนนั้นไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตวัคซีนมีการสูญเสียไวรัสน้อยมาก

จากตารางที่ 1 วัคซีนบางชุดมีปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนบรรจุลงขวดต่ำกว่าวัคซีนหลังบรรจุลงขวด และหลังทำแห้ง คือชุดที่ 1, 3, 10 และ 13 อาจเนื่องมาจากความคลาดเคลื่อนในการไตเตรตไวรัส หรือตัวอย่างน้ำไวรัสที่นำมาตรวจสอบมีการกระจายตัวของไวรัสไม่สม่ำเสมอ (non-homogenous)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณไวรัสในกระบวนการผลิตวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าขั้นตอนการละลายสต๊อกไวรัสที่เก็บไว้ในห้องเย็น การบรรจุขวด และการทำแห้งวัคซีนในกระบวนการผลิตที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีความเหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา ที่ให้คำปรึกษาในการทดลอง และจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

ธานินทร์ ศิลป์จารุ 2548 สถิติอ้างอิง ใน การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS พิมพ์ครั้งที่ 3 บริษัท วี. อินเตอร์ พริ้นท์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 173-204

Office International des Epizooties. 2004. Avian Infectious Bronchitis. *In* Manual of standards for diagnostic tests vaccine for terrestrial animals, 5th edition. Office International des Epizooties. Paris, France. pp. 1-11.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

United States Department of Agriculture. 2005. Supplemental assay method for the titration of Newcastle disease vaccine, infectious bronchitis vaccine and combination Newcastle disease – infectious bronchitis vaccine in chicken embryos. Available from http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/sama/series/400/411.pdf [Accessed 26 February 2008].

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสในขั้นตอนการผลิตวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ปีพ.ศ. 2548-2550 จำนวน 24 ชุด

ชุดการผลิต	ปริมาณไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ($\log_{10}$ EID_{50}/ml)		
	ก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด	หลังบรรจุวัคซีนลงขวด	หลังทำแห้งวัคซีน
1	5.3	5.9	5.7
2	5.9	5.5	5.5
3	5.5	5.8	5.8
4	5.9	5.5	5.5
5	6.1	5.9	5.7
6	5.5	5.5	5.5
7	6.1	6.1	5.7
8	6.1	6.1	6.1
9	6.3	6.3	5.7
10	5.1	5.1	5.5
11	5.7	5.5	5.5
12	5.5	5.5	5.5
13	5.3	5.7	5.7
14	5.7	5.7	5.7
15	6.3	5.9	5.9
16	5.9	5.7	5.7
17	6.3	5.5	6.1
18	6.1	6.1	6.1
19	6.5	6.7	6.7
20	6.6	6.6	6.6
21	6.6	6.8	6.4
22	5.7	5.7	5.5
23	6.9	6.5	5.7
24	6.5	6.5	6.3
GMT $\pm$ SD	$5.96 \pm 0.47^{*}$	$5.91 \pm 0.46^{**}$	$5.83 \pm 0.36^{***}$

GMT (Geometric mean titers) = ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของปริมาณไวรัส

SD (Standard deviation) = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*,**,*** ไม่มีความแตกต่างกันอย่างความมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณไวรัสในขั้นตอนก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และหลังทำแห้งวัคซีน โดยวิธี ANOVA

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	2	0.24	0.12	0.12/0.15 = 0.80
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	69	10.15	0.15	
รวม	71	10.39		

ค่า F ที่คำนวณได้ (0.80) น้อยกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตาราง ($F_{.05,2,69}$ = 3.15) แสดงว่าปริมาณไวรัสก่อนบรรจุวัคซีนลงขวด หลังบรรจุวัคซีนลงขวด และวัคซีนหลังทำแห้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

Comparison of virus content in infectious bronchitis vaccine before and after freeze drying

Areerat Sutto[1] Kungwan Jungtheerapanich[1]

Abstract

The standard of Infectious bronchitis vaccine produced from specific-pathogen-free (SPF) chicken eggs by Bureau of Veterinary Biologics specifies that the virus content must not less than 3.5 $\log_{10}$ EID_{50}/dose. This study is to compare the virus content in vaccine production steps of 24 batches. The average virus content of before freeze drying (before and after filling in vials) and after freeze drying (finish products) were not statistically significant difference. This shows that the present vaccine production process is appropriate.

Key words: virus content, infectious bronchitis vaccine, freeze drying

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

ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อบนผิวไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

กังวาน จึงธีรพานิช[1] อารีรัตน์ สุดโต[1]

บทคัดย่อ

ทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้จุ่มเพื่อฆ่าเชื้อบนผิวไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะจำนวน 4 ชนิด คือ Sorgene-5®, Virkon®S, Wofasteril™ E 400 และ Peratic 525™ ที่ความเข้มข้นตามวิธีใช้ที่ผู้ผลิตระบุ หลังจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อนาน 60 วินาที ทำการกลิ้งตัวอย่างไข่ลงบนจานเพาะเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนผิวเปลือกไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะที่ไม่ได้จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 98.28, 94.65, 98.75 และ 97.81 ตามลำดับ

คำสำคัญ: ประสิทธิภาพ น้ำยาฆ่าเชื้อ ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ในการผลิตและทดสอบวัคซีนสำหรับสัตว์ปีก ในหลายๆ ประเทศได้ให้ความสำคัญกับคุณภาพของวัคซีน โดยมีการนำไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะมาทดแทนไข่ไก่ที่ได้จากการเลี้ยงไก่ไข่ระบบสามัญธรรมดา (conventional eggs) เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตวัคซีนที่ใช้กับมนุษย์ และวัคซีนสำหรับสัตว์

ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะที่ใช้สำหรับผลิต และทดสอบวัคซีนจะต้องผ่านการจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวเปลือกไข่ ก่อนนำไปใช้ หากน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพต่ำ จะทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ภายในไข่ได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์จะผ่านเข้าสู่ไข่ทางรูพรุนผิวเปลือกไข่ (Henry, 2003)

ปัจจุบันฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ทำหน้าที่ผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะสำหรับการผลิตและทดสอบวัคซีนสัตว์ปีกโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ Sorgene-5® มาเป็นเวลาหลายปี แม้ว่าจะยังไม่พบปัญหาการดื้อยาหรือประสิทธิภาพที่ลดลง แต่ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดอื่น เพื่อเป็นข้อมูลต่อไป การทดลองนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม oxidizing จำนวน 4 ชนิด บนผิวเปลือกไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อหากมีปัญหาการดื้อยาเกิดขึ้นในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ

เก็บตัวอย่างไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 1 วัน จากฟาร์มผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จำนวน 50 ฟอง แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ฟอง โดย

กลุ่มที่ 1 ไม่จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ

กลุ่มที่ 2 จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ Sorgene-5®[1] ความเข้มข้น 1:300 นาน 60 วินาที

กลุ่มที่ 3 จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ Virkon®S[2] ความเข้มข้น 1:200 นาน 60 วินาที

กลุ่มที่ 4 จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ Wofasteril™ E 400[3] ความเข้มข้น 1:800 นาน 60 วินาที

กลุ่มที่ 5 จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ Peratic 525™[4] ความเข้มข้น 1:100 นาน 60 วินาที

2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ

กลิ้งเปลือกไข่ลงบนจานเพาะเชื้อ (1 จานต่อไข่ 1 ฟอง) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น

---

[1]โซเรค, สหราชอาณาจักร

[2]แอนเทค อินเตอร์เนชั่นแนล, สหราชอาณาจักร

[3]เคสลา ฟาร์มา โวลฟ์เฟ่น, เยอรมันนี

[4]นันวา มาร์เก็ตติ้ง, ประเทศไทย

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างไข่ไก่ฟักที่จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยวิธี ANOVA (ธานินทร์, 2548) ดังตารางด้านล่าง

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	k-1	SSTr	MSTr	MSTr/MSE
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	N-k	SSE	MSE	
รวม	N-1	SST		

คำนวณหาตัวสถิติได้แก่

1. SST คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ทั้งหมดของข้อมูล

$$SST = \sum\sum X_{ij}^2 - CM$$

โดยที่ $CM = (\sum T_i)^2/N$

2. SSTr คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ระหว่าง Treatment

$$SSTr = \sum Ti^2/n - CM$$

3. SSE คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ภายใน Treatment เดียวกัน

$$SSE = SST - SSTr$$

4. MSE = SSE/N-k (k = จำนวน Treatment ที่ศึกษา)

5. MSTr = SSTr/k-1

6. ตัวสถิติที่ใช้ทดสอบ F = MSTr/MSE

แทนค่าในตาราง ANOVA จากนั้นเปิดตาราง F เปิดที่ $F_{\alpha,v1,v2}$ โดยที่ α คือ ระดับนัยสำคัญ, v1 คือ df ของ treatment = k-1 และ v2 คือ df ของ error = N-k

ผล

ผลการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะก่อนและหลังจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ พบว่าต่างกันอย่างชัดเจน คือไข่ที่ยังไม่จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 53 – 79 โคโลนี/ฟอง ส่วนกลุ่มที่จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 0 – 11 โคโลนี/ฟอง เมื่อคิดเป็นร้อยละของไข่ที่จุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนผิวเปลือกไข่ได้ถึงร้อยละ 94.55 – 98.75 ทั้งนี้ไม่พบเชื้อราในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1) จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะได้หลังจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุป

ผลการทดลองประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับจุ่มไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะจำนวน 4 ชนิด คือ Sorgene-5®, Virkon®S, Wofasteril™ E 400 และ Peratic 525™ พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนเปลือกไข่ได้ร้อยละ 98.28, 94.65, 98.75 และ 97.81 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2) จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด พบว่า Sorgene-5® มีส่วนประกอบของ hydrogen peroxide 23% และ peracetic acid 4.5%, Wofasteril™ E 400 มีส่วนประกอบของ peroxyacetic acid 40% และ hydrogen peroxide 15%, Peratic 525™ มีส่วนประกอบของ hydrogen peroxide 25% และ peracetic acid 5.0% ส่วน Virkon®S มีส่วนประกอบของ potassium monopersulfate 49.40% และ sodium dodecyl benzene sulphonate 13.17% แสดงว่าประสิทธิภาพของ Virkon®S ที่ต่ำกว่าน้ำยาฆ่าเชื้ออีก 3 ชนิด อาจเนื่องมาจากมีส่วนประกอบสำคัญแตกต่างจากตัวอื่นๆ

ในการทดลองนี้ได้ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่ม Quaternary Ammonium Compound (Bromosept–50®) ซึ่งเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ได้รับการแนะนำว่ามีความปลอดภัยต่อคนและสัตว์เหมาะสำหรับใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกไข่ รวมถึงราคาถูกจึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Office International des Epizooties, OIE, 2007) พบว่า Bromosept–50® มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนเปลือกไข่ได้เพียงร้อยละ 83.75 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้จุ่มฆ่าเชื้อไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ สำหรับการผลิตและทดสอบวัคซีน ซึ่งต้องการการปลอดเชื้อจุลินทรีย์ในระดับสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.รัชนี อัตถิ ที่ให้คำแนะนำ และน.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา ที่ให้คำปรึกษาในการทดลองและจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

ธานินทร์ ศิลป์จารุ 2548 สถิติอ้างอิง ใน การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS พิมพ์ครั้งที่ 3 บริษัท วี. อินเตอร์ พริ้นท์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 187-192, 195-201

Henry R. Wilson. 2003. Hatching egg sanitation. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. PS22.

Office International des Epizooties. 2007. Hygiene and disease security procedures in poultry breeding flocks and hatcheries. *In* Terrestrial animal health code (2007). Available from http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_3.4.1.htm [Accessed 24 July 2008].

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะหลังจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อ

ตัวอย่างไข่	น้ำยาฆ่าเชื้อ									
	ควบคุม (ไม่ใช้)		Sorgene-5®		Virkon®S		Wofasteril™ E 400		Peratic 525™	
	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แบคทีเรีย	เชื้อรา
ฟองที่ 1	70	0	2	0	4	0	0	0	3	0
ฟองที่ 2	53	0	1	0	0	0	0	0	1	0
ฟองที่ 3	71	0	1	0	8	0	3	0	2	0
ฟองที่ 4	67	0	1	0	5	0	1	0	1	0
ฟองที่ 5	65	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ฟองที่ 6	55	0	1	0	1	0	1	0	1	0
ฟองที่ 7	79	0	3	0	0	0	1	0	2	0
ฟองที่ 8	53	0	0	0	1	0	1	0	0	0
ฟองที่ 9	73	0	1	0	11	0	0	0	2	0
ฟองที่ 10	54	0	1	0	4	0	1	0	2	0
รวม (โคโลนี)	640	0	11	0	35	0	8	0	14	0
คิดเป็นร้อยละ	100	0	1.72	0	5.45	0	1.25	0	2.19	0

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะที่ทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดโดยวิธี ANOVA

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	3	45	15	15/4.04 = 3.71
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	36	145.40	4.04	
รวม	39	190.40		

ค่า F ที่คำนวณได้ (3.71) มากกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตาราง ($F_{.05,3,36}$ = 2.84) แสดงว่าประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

Efficacy of disinfectants on specific pathogen free embryonated chicken eggs

Kungwan Jungtheerapanich[1] Areerat Sutto[1]

Abstract

Four disinfectants were tested for efficacy on specific pathogen free embryonated chicken eggs at the concentration an indicated by manufacturers. After submerging in the solutions for 60 seconds, rolled each egg on an agar plate and incubated at 37°C for 48 hours. When compared the number of organisms on the agar plates of four treated groups to control group, the results showed that the number of organisms were reduced 98.28%, 94.55%, 98.75% and 97.81%, respectively.

Key words: efficacy, disinfectants, specific pathogen free embryonated chicken eggs

---

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

การทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีส ขนาด 2 โด๊ส ในขวด 6 มล.

คณิตา ภาสะฐิติ[1] วีรชาย ปู่สูงเนิน[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีสขนาด 2 โด๊ส ในขวด 6 มล. รวม 3 โปรแกรม คือ เปรียบเทียบเวลาทำแห้งในช่วงระยะระเหิดขั้นต้นนาน 15, 20 และ 25 ชั่วโมง โดยมีระยะทำให้สารละลายเย็นแข็งนาน 2 ชั่วโมง 30 นาที และระเหิดขั้นสุดท้ายนาน 3 ชั่วโมง 20 นาที ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป การตรวจความเป็นสุญญากาศ การตรวจสอบการละลายของวัคซีน การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน การตรวจสอบลักษณะโคโลนี การทดสอบความชื้น การทดสอบหาจำนวนเชื้อมีชีวิต พบว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้ง 3 โปรแกรม

คำสำคัญ: วัคซีนบรูเซลโลซีส การทำแห้ง ขวดขนาด 6 มล.

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคบรูเซลโลซีสหรือที่เกษตรกรนิยมเรียกว่า "โรคแท้งติดต่อ" เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่สำคัญของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น โค กระบือ สุกร แพะ ม้า สุนัข เป็นต้น และติดต่อสู่คนได้ ลักษณะที่ควรสังเกตของโรคนี้ คือ สัตว์จะแท้งลูกในช่วงท้ายของการตั้งท้อง และอัตราการผสมติดในฝูงจะต่ำ (ทัศนีย์ และคณะ, 2539) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีส จากเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 เป็นวัคซีนแบคทีเรียเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งขนาดบรรจุ 2 มล.ในขวดดูดแห้งขนาด 12 มล. บรรจุ 5 โด๊ส (กรมปศุสัตว์, 2549) เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่บางท้องที่มีจำนวนลูกโคเพศเมียไม่มาก ทำให้ใช้วัคซีนไม่หมดหลังเปิดใช้ ดังนั้นหากสามารถลดขนาดบรรจุต่อขวดลงจาก 5 โด๊ส เป็น 2 โด๊ส จะเป็นการลดความสูญเสียกรณีใช้วัคซีนไม่หมด เนื่องจากสัตว์ที่ต้องฉีดมีจำนวนน้อย โดยลดการบรรจุเป็น 1 มล. ในขวดขนาด 6 มล. แทนขนาด 12 มล. ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาหาระยะเวลาการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีสที่เหมาะสมในขวดขนาด 6 มล. เพื่อให้ได้คุณภาพเทียบเท่ากับขวดขนาด 12 มล. และข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้อ้างอิงเพื่อนำไปประกอบการวิจัยและพัฒนาวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การลดขนาดขวดของวัคซีนบรูเซลโลซีสเป็น 6 มล. บรรจุ 2 โด๊ส จากเดิมใช้ขวดขนาด 12 มล. บรรจุ 5 โด๊ส จำเป็นต้องศึกษาโปรแกรมการทำแห้งที่เหมาะสม ปัจจุบันโปรแกรมทำแห้งวัคซีนที่ใช้ในขวดขนาด 12 มล. คือ ระยะทำให้สารละลายเย็นแข็ง (pre-freeze) 2 ชั่วโมง 30 นาที ระยะระเหิดขั้นต้น (primary drying) 20 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้าย (final drying) 3 ชั่วโมง 20 นาที รวมเป็นเวลาทั้งสิ้น 25 ชั่วโมง 50 นาที

การทดลองนี้ เพื่อศึกษาหาเวลาระยะระเหิดขั้นต้นที่เหมาะสมที่สุด ในการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีสขนาด 2 โด๊ส (ปริมาตร 1 มล.) ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 6 มล. สำหรับผลิตวัคซีนบรูเซลโลซีสของกรมปศุสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนบรูเซลโลซีส

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 19 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 40 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเชื้อด้วยความเร็วรอบปั่น 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที และละลายส่วนตะกอนด้วยสเตบิไลเซอร์ (casein 29%, sucrose 59%, sodium glutamate 12%) และปรับให้มีปริมาณเชื้อมีชีวิตอยู่ 8×10^{10} เซลล์/โด๊ส (OIE, 2004) นำไปบรรจุวัคซีนในขวดแก้วสำหรับดูดแห้งขนาด 6 มล. ขวดละ 1 มล. จำนวน 300 ขวด

การทำแห้ง

นำตัวอย่างวัคซีนไปทำแห้งโดยใช้โปรแกรมทำแห้ง 3 โปรแกรม คือ

1. ระยะทำให้สารละลายเย็นแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ระยะระเหิดขั้นต้นเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้ายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 20 นาที จำนวน 100 ขวด

2. ระยะทำให้สารละลายเย็นแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ระยะระเหิดขั้นต้นเป็นเวลา 20 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้ายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 20 นาที จำนวน 100 ขวด
3. ระยะทำให้สารละลายเย็นแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ระยะระเหิดขั้นต้นเป็นเวลา 25 ชั่วโมง และระยะระเหิดขั้นสุดท้ายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 20 นาที จำนวน 100 ขวด

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

สุ่มตัวอย่างวัคซีนจาก 3 โปรแกรมๆ ละ 20 ขวด เพื่อนำไปทดสอบคุณภาพวัคซีนทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานอาเซียน (ASEAN, 1998) ดังนี้

การตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไป วัคซีนทำแห้งต้องมีลักษณะเนื้อฟูเป็นเค้ก (cake) รูปร่างสม่ำเสมอ สีขาว และเมื่อละลายกับน้ำยาละลายได้เป็นส่วนผสมเนื้อเดียวกันภายใน 2-5 นาที ไม่มีอนุภาคอื่นหรือสิ่งแปลกปลอมปนอยู่

ทดสอบความเป็นสุญญากาศ โดยใช้เครื่องตรวจสอบความเป็นสุญญากาศ วัคซีนต้องให้สีเขียวอมฟ้า (greenish-blue)

ทดสอบการปนเปื้อน โดยการย้อมสีแกรมต้องติดสีแกรมลบ รูปร่าง short rod ขนาดยาวประมาณ 0.6-1.5 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.5-0.7 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์และไม่ติดสี bipolar เพาะลงใน tryptose agar slant อบในตู้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 4 วัน และเพาะลงใน dextrose Andrade's broth อบในตู้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ดูการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป 2, 4 และ7 วัน

ตรวจสอบลักษณะโคโลนี (dissociation test) หาปริมาณ rough colony ต้องไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์

ทดสอบหาจำนวนเชื้อมีชีวิต ตามวิธีของอัลตันและคณะ (Alton et al., 1988) ต้องมีปริมาณเชื้อมีชีวิตอยู่ระหว่าง 5.0-8.0 x 10^{10} เซลล์/โด๊ส (OIE, 2004)

ทดสอบปริมาณความชื้น ตามวิธีของคาร์ล ฟิชเชอร์ (Council of Europe, 2005) ต้องมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 4 เปอร์เซ็นต์

ผล

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนจากการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีสขนาด 2 โด๊ส ในขวด 6 มล.โดยใช้โปรแกรมที่มีระยะระเหิดขั้นต้น 15 ชั่วโมง, 20 ชั่วโมง และ 25 ชั่วโมง พบว่าวัคซีนสำเร็จรูปของทั้ง 3 โปรแกรมมีลักษณะเนื้อฟูเป็นเค้ก รูปร่างสม่ำเสมอ สีขาว และเมื่อผสมกับน้ำยาละลายสามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันทันที และไม่มีอนุภาคอื่นหรือสิ่งแปลกปลอมปนอยู่ การตรวจความเป็นสุญญากาศของวัคซีนโดยใช้เครื่องตรวจสอบความเป็นสุญญากาศให้ผลสีเขียวอมฟ้า การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีนไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดอื่น การตรวจสอบลักษณะโคโลนี (dissociation test) พบว่า ปริมาณ rough colony น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบหาจำนวนเชื้อมีชีวิตจากตัวอย่างวัคซีนโปรแกรมที่ 1, 2 และ 3 พบว่ามีจำนวนเชื้อมีชีวิตเฉลี่ย 8.0 x 10^{10}, 6.4 x 10^{10} และ 6.0 x 10^{10} เซลล์/โด๊ส ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบหาปริมาณความชื้นของวัคซีนทั้ง 3 โปรแกรม โดยวิธีของคาร์ล ฟิชเชอร์ พบว่ามีความชื้นระหว่าง 2.68% - 2.97% (2.79% ± 0.10%), 2.32% - 2.77% (2.52 ± 0.13%) และ2.04% - 2.43% (2.26 ± 0.14%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์และสรุป

การทำแห้งเป็นขบวนการระเหยน้ำที่อยู่ในสารละลายเย็นแข็งให้กลายเป็นไอ ภายใต้สภาพความดันที่เหมาะสม โดยไม่ผ่านสถานะของเหลว หรือเรียกว่า วิธีการระเหิด (sublimation) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน(Heto-holten Industrial Group, 1998) คือ ระยะแรกทำให้สารละลายเย็นแข็งที่อุณหภูมิเย็นจัด (-40°ซ.) จากการสัมผัสกับผิวหน้าที่เย็นจัดในอัตราการลดลง 0.1–2°ซ. ต่อนาที ของแข็งที่ได้จะมีผลึกโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้ช่องว่างระหว่างโมเลกุล (lattice) ใหญ่ และสะดวกต่อการระเหิด และระยะที่สองการระเหิดขั้นต้น คือการให้ความร้อนกับวัตถุเย็นแข็งในปริมาณสูงที่สุดที่วัตถุเย็นแข็งจะยอมรับได้ โดยไม่ทำให้เกิดการละลายภายใต้ความดันที่เหมาะสม ส่วนระยะที่สามการระเหิดขั้นสุดท้าย คือการกำจัดน้ำที่อยู่ในช่องเล็กๆ (crystallic bounded water) ออกให้หมด ขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อความชื้นของวัคซีน คือการระเหิดขั้นต้น ซึ่งจะเกิดการระเหิดของน้ำที่อยู่ในวัคซีน (ฉาย, 2539)

การทดลองครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบการทำแห้งวัคซีนบรูเซลโลซีสขนาด 2 โด๊ส ในขวด 6 มล. โดยเปรียบเทียบระยะระเหิดขั้นต้นระหว่าง 15, 20 และ 25 ชั่วโมง เมื่อทดสอบคุณภาพวัคซีนพบว่า คุณสมบัติทั่วไป, ความเป็นสุญญากาศ, การละลายของวัคซีน, ความบริสุทธิ์ของวัคซีน และลักษณะของโคโลนีทั้ง 3 โปรแกรมผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (ASEAN, 1998)

การทดสอบหาจำนวนเชื้อ พบว่าในระยะระเหิดขั้นต้น 15, 20 และ 25 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อมีชีวิตเท่ากับ 8.0×10^{10}, 6.4×10^{10} และ 6.0×10^{10} เซลล์/โด๊ส ตามลำดับ แสดงว่าระยะเวลาในการระเหิดขั้นต้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อมีชีวิตของวัคซีนทำแห้ง โดยวัคซีนที่ใช้เวลานานจะมีปริมาณเชื้อมีชีวิตลดลง อย่างไรก็ตามทั้ง 3 โปรแกรมมีปริมาณเชื้อมีชีวิตอยู่ระหว่าง $5.0–8.0 \times 10^{10}$ เซลล์/โด๊ส ผ่านมาตรฐานที่กำหนด (OIE, 2004)

การทดสอบความชื้นพบว่าการใช้ระยะระเหิดขั้นต้นนานขึ้นทำให้วัคซีนมีความชื้นน้อยลงในโปรแกรมที่ใช้ระยะระเหิดขั้นต้น 25, 20 และ 15 ชั่วโมง มีความชื้นอยู่ระหว่าง 2.04%–2.97% ซึ่งต่ำกว่า 4% ตามเกณฑ์มาตรฐาน (ASEAN, 1998)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะระเหิดขั้นต้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 15 ชั่วโมง โดยคุณภาพวัคซีนคงเดิมตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.รัชนี อัตถิ สพ.ญ.กมลทิพย์ ธัญพิมล ที่ให้คำแนะนำ และ น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา ที่ให้คำปรึกษาในการทดลองและจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2549 คู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 14

ฉาย จอมเกาะ 2539 การทำแห้ง เอกสารเผยแพร่งานทางวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ เล่มที่ 2 หน้า 310–331

ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ มนัสนันท์ ประสิทธิรัตน์ และมนยา เอกทัตร์ 2539 คู่มือการดูแลสุขภาพโคนม สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ฟันนี่พับบลิชิ่ง แหล่งที่มา http://www.dld.go.th/niah/AnimalDisease/zoonosis/zoonosis_bru.htm 26 กรกฎาคม 2550

Alton, G.G., Jones L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National De La Recherche Agronomique. Paris. pp. 149-150.

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. 2005. 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. 2004. Bovine brucellosis. *In* Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial animals. Available from http://www.oie/int/esp/normes/mmanual/A_00052.htm [Accessed 11 January 2007].

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการทดสอบคุณภาพวัคซีนที่ได้จากโปรแกรมที่มีระยะระเหิดขั้นต้น 3 โปรแกรม

การทดสอบ	โปรแกรมที่มีระยะระเหิดขั้นต้น		
	15 ชั่วโมง	20 ชั่วโมง	25 ชั่วโมง
คุณสมบัติทั่วไป	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
สภาพสุญญากาศ	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
ความสามารถในการละลาย	ละลายทันที	ละลายทันที	ละลายทันที
ความบริสุทธิ์ของวัคซีน	ไม่พบการปนเปื้อน	ไม่พบการปนเปื้อน	ไม่พบการปนเปื้อน
ปริมาณเชื้อมีชีวิต (เซลล์/โด๊ส)[1]	8.0×10^{10}	6.4×10^{10}	6.0×10^{10}
ลักษณะโคโลนี[2]	< 1%	< 1%	< 1%

[1]เกณฑ์มาตรฐาน: อยู่ระหว่าง $5.0 - 8.0 \times 10^{10}$ เซลล์/โด๊ส

[2]เกณฑ์มาตรฐาน: rough colony ไม่เกิน 5%

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความชื้นของวัคซีนบรูเซลโลซีสเมื่อทำแห้งโดยใช้ระยะการระเหิดขั้นต้น นาน 15, 20 และ 25 ชั่วโมง

การทำแห้งระยะระเหิดขั้นต้นนาน	ความชื้นของวัคซีนสำเร็จรูปขวดที่										ค่าเฉลี่ย % ความชื้น
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
15 ชั่วโมง	2.97	2.73	2.75	2.81	2.70	2.71	2.89	2.68	2.73	2.92	2.79 ± 0.10
20 ชั่วโมง	2.77	2.58	2.48	2.52	2.46	2.62	2.50	2.32	2.38	2.58	2.52 ± 0.13
25 ชั่วโมง	2.21	2.43	2.26	2.16	2.40	2.25	2.04	2.40	2.10	2.37	2.26 ± 0.14

Freeze-drying of brucellosis vaccine 2 doses in 6-ml vials

Kanita Bhasathiti[1] Weerachai Poosungnoen[1]

Abstract

A study of three freeze-drying programs for brucellosis vaccine 2 doses in 6-ml vials was carried out. By varying the primary drying time to 15, 20 and 25 hours, with pre-freeze time of 2 hours 30 minutes and final drying time of 3 hours 20 minutes. Results showed that vaccines samples from all three programs passed property test, vacuum test, reconstitution test, purity test, dissociation test, moisture test and viable organism test as determined by vaccine standards.

Key words: brucellosis vaccine, freeze-drying, 6-ml vials

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

การศึกษาการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในถังเพาะเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นต่างกัน

วีรชาย ปู่สูงเนิน[1] คณิตา ภาสะฐิติ[1]

บทคัดย่อ

ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ จำนวน 3 ชุดในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 400 ลิตร ใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น (inoculum size) ต่างกัน คือ 0.5%, 1% และ 2% เก็บตัวอย่างจากถังเพาะเชื้อทุกๆชั่วโมงเป็นเวลา 9 ชั่วโมง วัดความขุ่นของตัวอย่างเชื้อที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540}) และนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความขุ่นของเชื้อ พบว่าหากใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นเพิ่ม ขึ้นจาก 1% เป็น 2% จะสามารถลดระยะเวลาในการเพาะลงได้จาก 9 ชั่วโมง เป็น 5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามน่าจะทำการศึกษาต่อไปโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นสูงขึ้น เช่น 4% และ 8% เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่สูงที่สุดที่สามารถเพาะเชื้อได้ปริมาณมากที่สุด (maximum yield) ในเวลาที่น้อยที่สุด

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ความขุ่นของเชื้อ ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera vaccine) ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในปัจจุบันมีขั้นตอน และระยะเวลาในการผลิตดังนี้ คือ เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่นในขวดเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth ปริมาตร 4 ลิตรคิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ (1% inoculum) ในสภาพมีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 400 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ความเร็วรอบใบพัด 130 รอบต่อนาที นาน 9 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลิน 0.3% (v/v) เพื่อฆ่าเชื้อ นำตัวอย่างเชื้อมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540}) แล้วปรับด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl)

ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดลองว่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นจะมีผลกระทบต่อระยะเวลาในการเพาะเชื้อ (incubation time) และปริมาณเชื้อที่ได้อย่างไร เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงขั้นตอนการผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่นในขวดเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth ในสภาพมีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 6 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 0.5%, 1% และ2% คิดเป็นปริมาตร 2, 4 และ8 ลิตร ตามลำดับ

การเตรียมบรอทแบคเทอริน

นำเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 0.5%, 1% และ2% ไปเพาะในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 400 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ความเร็วรอบใบพัด 130 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างหลังเพาะทุกชั่วโมง เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.3% (v/v) ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง

การวัดความขุ่น

นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บทุกชั่วโมงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และนำความขุ่นที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความขุ่น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำความขุ่นที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี ANOVA (ธานินทร์, 2548) ดังตารางด้านล่าง

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	k-1	SSTr	MSTr	MSTr/MSE
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	N-k	SSE	MSE	
รวม	N-1	SST		

คำนวณหาตัวสถิติได้แก่

1. SST คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ทั้งหมดของข้อมูล

$$SST = \sum\sum X_{ij}^2 - CM$$

โดยที่ $CM = (\sum T_i)^2/N$

2. SSTr คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ระหว่าง Treatment

$$SSTr = \sum Ti^2/n - CM$$

3. SSE คือ ความแปรปรวน (ความผันแปร) ภายใน Treatment เดียวกัน

$$SSE = SST - SSTr$$

4. MSE = SSE/N-k (k = จำนวน Treatment ที่ศึกษา)

5. MSTr = SSTr/k-1

6. ตัวสถิติที่ใช้ทดสอบ F = MSTr/MSE

แทนค่าในตาราง ANOVA จากนั้นเปิดตาราง F เปิดที่ $F_{\alpha,v1,v2}$ โดยที่ α คือ ระดับนัยสำคัญ, v1 คือ df ของ treatment = k-1 และ v2 คือ df ของ error = N-k

ผล

ความขุ่นของตัวอย่างเชื้อ (OD_{540}) ที่เพาะในถังเพาะเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น (inoculum size) 0.5%, 1% และ 2% ที่เวลาหลังเพาะ 1- 9 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 0 - 2.76, 0 - 3.01 และ 0 - 3.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับเวลา พบว่า มีความขุ่นเพิ่มขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยใน 1 - 2 ชั่วโมงแรกหลังเพาะความขุ่นค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และจากชั่วโมงที่ 3 - 5 ความขุ่นเพิ่มขึ้นอย่างก้าวกระโดด และชั่วโมงที่ 6 - 9 ความขุ่นเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า (รูปที่ 1) เมื่อทำการทดลองซ้ำ พบว่า ความขุ่นของตัวอย่างเชื้ออยู่ระหว่าง 0 – 2.81, 0 - 3.1 และ 0 - 3.28 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ พบว่า ความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 2)

เมื่อนำความขุ่นที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 ครั้งไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 0.5%, 1% และ 2% ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 3 และ 4)

วิจารณ์และสรุป

จากความขุ่นของตัวอย่างเชื้อที่เก็บชั่วโมงที่ 1 - 9 หลังเพาะ เมื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความขุ่น กราฟที่ได้มีลักษณะเป็น S-curve ซึ่งเป็นลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (lag phase) เป็นระยะการปรับตัวของเชื้อแบคทีเรียจะยังไม่แบ่งเซลล์อย่างฉับพลัน, ระยะที่ 2 (log phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว, ระยะที่ 3 (stationary phase) เป็นระยะที่ประชากรของแบคทีเรียเริ่มคงที่ และระยะที่ 4 (death phase) แบคทีเรียจะตายอย่างรวดเร็ว (บัญญัติ, 2534)

เมื่อเปรียบเทียบความขุ่นที่ได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.5%, 1% และ 2% เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบความขุ่นที่ชั่วโมงที่ 5 หลังเพาะ ได้ความขุ่นใกล้เคียงกันคือ การทดลองที่ 1 มีค่าเท่ากับ 1.05, 1.80 และ 2.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และการทดลองที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.11, 2.01 และ 2.65 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง (ตารางที่ 3 และ 4)

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อมีชีวิตกับค่า OD_{540} (รัชนี และคณะ, 2535) พบว่าที่เวลา 5 ชั่วโมงหลังเพาะ จำนวนเชื้อมีชีวิตของตัวอย่างจากวัคซีนที่เพาะด้วยความเข้มข้นของเชื้อที่ 0.5%, 1% และ 2% เท่ากับ 41.86×10^{14}, 71.73×10^{14} และ 108.39×10^{14} โคโลนี ตามลำดับในการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 1) และ 44.46×10^{14}, 80.42×10^{14} และ 105.69×10^{14} โคโลนี ตามลำดับในการทดลองที่ 2 (ตารางที่ 2) ซึ่งตามกระบวนการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในปัจจุบันใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และทำการเพาะเชื้อนาน 9 ชั่วโมง จะได้ความขุ่นอยู่ระหว่าง 2.5 - 3.0 คิดเป็นจำนวนเชื้อมีชีวิตเท่ากับ 99.9×10^{14} - 119.88×10^{14} โคโลนี จากกราฟในรูปที่ 1 และ 2 จะพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 2% หลังการเพาะ 5 ชั่วโมงจะได้ความขุ่นเท่ากับ 2.7 และ 2.65 คิดเป็นจำนวนเชื้อมีชีวิตเท่ากับ 108.39×10^{14} โคโลนี และ 105.69×10^{14} โคโลนี ตามลำดับ ดังนั้นหากใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นเพิ่ม ขึ้นจาก 1% เป็น 2% จะสามารถลดระยะเวลาในการเพาะลงได้จาก 9 ชั่วโมง เป็น 5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามน่าจะทำการศึกษาต่อไปโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นสูงขึ้น เช่น 4% และ 8% เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่สูงที่สุดที่สามารถเพาะเชื้อได้ปริมาณมากที่สุด (maximum yield) ในเวลาที่น้อยที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.รัชนี อัตถิ ที่ให้คำแนะนำ และ น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยาที่ให้คำปรึกษาในการทดลอง และจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

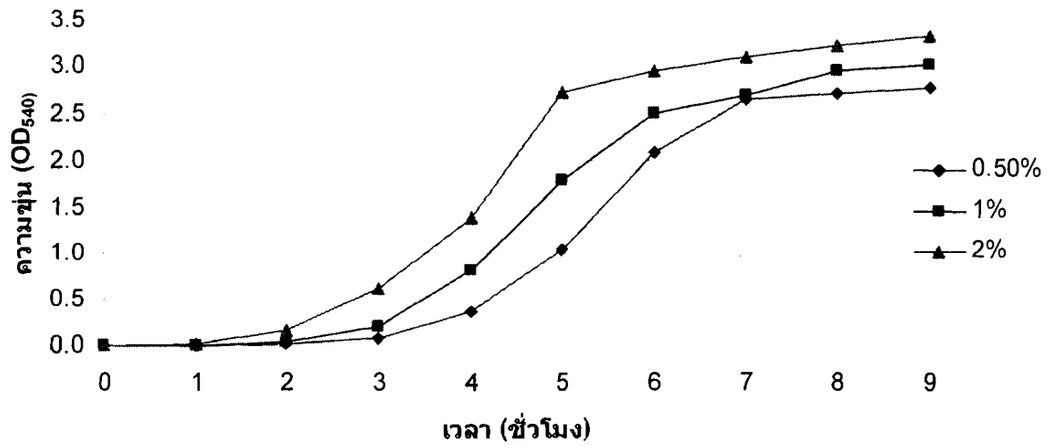
ธานินทร์ ศิลป์จารุ 2548 สถิติอ้างอิง ใน การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS พิมพ์ครั้งที่ 3 บริษัท วี. อินเตอร์ พริ้นท์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 187-192, 195-201

บัญญัติ สุขศรีงาน 2534 จุลชีววิทยาทั่วไป การเจริญของแบคทีเรีย พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ หน้า 137-138

รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา และนิเทศ เลิศลิมชลาลัย 2535 การหาขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(2): 18-23

ตารางที่ 1 ความขุ่น (OD_{540}) และปริมาณเชื้อ (viable bacterial count) ของตัวอย่างเชื้อที่เก็บ (การทดลองครั้งที่ 1)

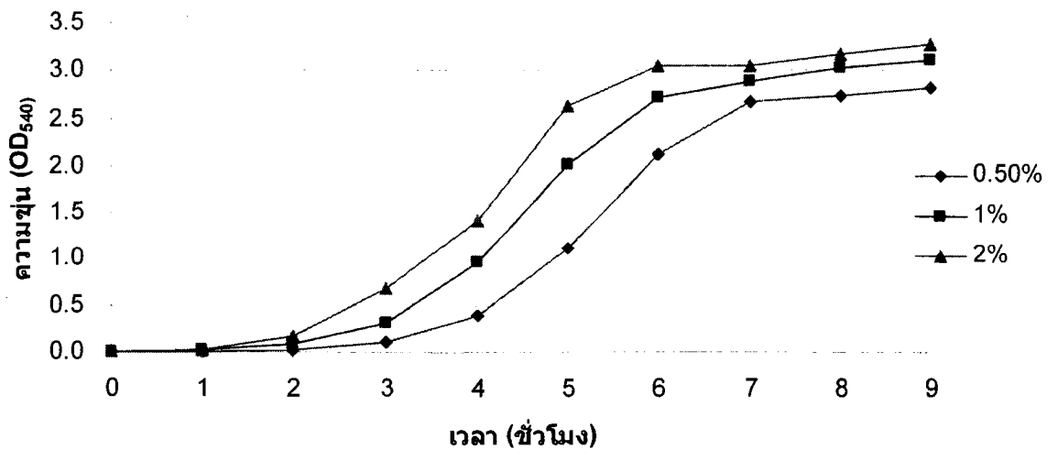
เวลาหลังเพาะ (ชั่วโมง)	การทดลองครั้งที่ 1 เชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น					
	0.5%		1%		2%	
	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)
1	0.01	0.20	0.01	0.40	0.03	1.12
2	0.02	0.60	0.04	1.52	0.16	6.39
3	0.09	3.60	0.20	7.87	0.62	24.86
4	0.37	14.95	0.83	33.09	1.40	55.90
5	1.05	41.86	1.80	71.73	2.71	108.39
6	2.08	83.22	2.48	99.20	2.94	117.48
7	2.64	105.29	2.68	107.09	3.10	123.78
8	2.70	107.99	2.95	117.78	3.22	128.57
9	2.76	110.09	3.01	120.28	3.31	132.17



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับเวลา (การทดลองครั้งที่ 1)

ตารางที่ 2 ความขุ่น (OD_{540}) และปริมาณเชื้อ (viable bacterial count) ของตัวอย่างเชื้อที่เก็บ (การทดลองครั้งที่ 2)

เวลาหลังเพาะ (ชั่วโมง)	การทดลองครั้งที่ 2 เชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น					
	0.5%		1%		2%	
	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)	ความขุ่น (OD_{540})	ปริมาณเชื้อ ($x10^{14}$ CFU)
1	0.01	0.24	0.01	0.56	0.02	0.92
2	0.02	0.72	0.08	3.08	0.16	6.51
3	0.10	3.88	0.31	12.43	0.69	27.37
4	0.39	15.66	0.97	38.64	1.43	57.10
5	1.11	44.46	2.01	80.42	2.65	105.69
6	2.12	84.52	2.73	108.99	3.04	121.48
7	2.68	106.89	2.89	115.48	3.05	121.88
8	2.74	109.39	3.03	121.18	3.18	127.07
9	2.81	112.39	3.10	123.88	3.28	131.07



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับเวลา (การทดลองครั้งที่ 2)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความขุ่นของเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 0.5%, 1% และ 2% โดยวิธี ANOVA (การทดลองที่ 1)

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	2	1.88	0.94	0.94/1.70 = 0.55
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	24	40.79	1.70	
รวม	26	42.67		

ค่า F ที่คำนวณได้ (0.55) น้อยกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตาราง ($F_{.05,2,24}$ = 3.40) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.5%, 1% และ2% ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความขุ่นของเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 0.5%, 1% และ 2% โดยวิธี ANOVA (การทดลองที่ 2)

แหล่งของความแปรปรวน	องศาอิสระ	ผลบวกกำลังสอง	ค่าเฉลี่ยกำลังสอง	F
ระหว่างกลุ่ม (ระหว่าง Treatment)	2	1.71	0.86	0.86/1.74 = 0.49
ภายในกลุ่ม (ภายใน Treatment)	24	41.72	1.74	
รวม	26	43.44		

ค่า F ที่คำนวณได้ (0.49) น้อยกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตาราง ($F_{.05,2,24}$ = 3.40) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.5%, 1% และ2% ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความมีนัยสำคัญ 0.05

Fowl cholera vaccine production with different inoculum sizes

Weerachai Poosungnoen[1] Kanita Bhasathiti[1]

Abstract

Three batches of fowl cholera vaccines were produced in a 400-liter fermenter with three different inoculum sizes as 0.5%, 1% and 2%. Samples were collected from the fermenter every hour for nine hours and the optical density was read at 540 nm (OD_{540}). Graphs of OD_{540} values plotted again time of culture showed that when the inoculum size was increased from 1% to 2%, the incubation time reduced from 9 hours to 5 hours. However, it should be studied further using bigger inoculum size i.e. 4% and 8% to determine the biggest inoculum size that gives the maximum yield in the minimum time.

Key words: fowl cholera vaccine, optical density, inoculum size

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

ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลก และการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

รัชนี อัตถิ[1] นิตยา รักศรี[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลกสำหรับโค-กระบือ โดยเตรียมวัคซีนแบลคเลกชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม มีขนาดฉีดโด๊สละ 5 และ 2 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว โดยการฉีดเชื้อพิษทับพบว่าวัคซีนทั้ง 2 ชุดให้ความคุ้มโรค 100% เมื่อทดลองเตรียมวัคซีนรวมแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม ให้มีขนาดฉีดโด๊สละ 3 มล. นำมาทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่า วัคซีนให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก (100 %) และต่อเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (ค่า log protection มากกว่า 4)

อย่างไรก็ตามวัคซีนที่เตรียมในการทดลองนี้ใช้อะลัมเป็นแอดจูแวนท์ซึ่งให้ความคุ้มโรคระยะสั้น จึงควรมีการศึกษาทดลองโดยใช้แอดจูแวนท์ชนิดอื่นเช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล หรือแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพสูงขึ้น และให้ระยะคุ้มโรคนานยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: วัคซีนแบลคเลก วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ขนาดฉีด วัคซีนรวม

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

แบลคเลก เป็นโรคติดต่อร้ายแรงของโค กระบือ แพะ และแกะ เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Clostridium chauvoei* ซึ่งมีการเจริญแบบไม่ใช้อากาศ ในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อจะสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและมีชีวิตอยู่ในดินได้เป็นเวลาหลายปี อาการเฉพาะของโรค คือ กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังอักเสบ ทำให้สัตว์ป่วยเดินขากะเผลกข้างเดียวหรือทั้งสองข้าง มีไข้สูง ซึม และส่วนใหญ่ตายภายใน 12-24 ชั่วโมง หลังแสดงอาการ เกิดในสัตว์อายุระหว่าง 6 เดือนถึง 2 ปี ทุกฤดูกาลและมักเกิดโรคซ้ำในจุดที่เคยเกิดโรคอยู่เสมอ จึงมีความจำเป็นต้องฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดโรคเป็นประจำทุกปี (Blood et al.,1983)

วัคซีนป้องกันโรคแบลคเลกที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ผลิตเป็นวัคซีนเดี่ยวชนิด formalinized whole cell เตรียมจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ตกตะกอนด้วยอะลัม ใช้ฉีดใต้ผิวหนัง มีขนาดฉีดตัวละ 5 มล. (โค-กระบือ) ขณะที่วัคซีนแบลคเลกชนิดวัคซีนเดี่ยวที่ผลิตจำหน่ายในต่างประเทศส่วนใหญ่มีขนาดฉีดตัวละ 2 มล.[1,2] นอกจากนี้มีการผลิตวัคซีนรวมระหว่างวัคซีนแบลคเลกกับวัคซีนชนิดอื่น เช่น วัคซีนรวมแบลคเลกกับเฮโมรายิกเซพติซีเมีย[3] วัคซีนรวมแบลคเลกกับแอนแทรกซ์[4] และ วัคซีนรวมโรคแบลคเลก ปากและเท้าเปื่อยและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย[5] เป็นต้น

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลกชนิดตกตะกอนด้วยอะลัม เพื่อใช้ประโยชน์ในการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียต่อไปโดยทดสอบคุณสมบัติ ความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสัตว์ทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น และเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 สเตรนท้องถิ่น ซึ่งเก็บในสภาพทำแห้ง

การเตรียมวัคซีนแบลคเลก

เตรียมจากบรอทแบคเทอริน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cl. chauvoei* ในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5 % (v/v) และนับจำนวนเชื้อทางอ้อมโดยหาค่า packed

---

[1]Blackleg vaccine®, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Iran

[2]Sponsvax®, Intervet, South Africa

[3]Bovilis®HSBQ, Intervet, India

[4]Blanthrax®, Intervet, South Africa

[5]Raksha Triovac®, Indian Immunological Limited, India

cell volume (PCV) ตามวิธีของ Alton และคณะ(1988)โดยใส่บรอทแบคเทอริน 10 มล. ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงที่มีสเกลบอกปริมาตร ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 2500 x *g* นาน 75 นาที และวัดปริมาตรของตะกอนแบคเทอริน นำมาเตรียมเป็นวัคซีน 2 ชุดๆ ละ 50 โด๊ส ให้มีจำนวนเชื้อเป็นค่า PCV ไม่น้อยกว่า 0.013/โด๊ส (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543) ซึ่งเท่ากับ $6.5x10^8$ เซลล์/โด๊ส (รังสรรค์และวิวัฒน์ 2549) โดยผสมกับโปแตชอะลัมเพื่อให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายในวัคซีนเท่ากับ 1 % (w/v) ปรับให้มีค่า pH 7.0 ± 0.3 (Misra, 1991) และมีขนาดฉีด 5 และ 2 มล.

การเตรียมวัคซีนรวมแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

นำบรอทแบคเทอรินของเชื้อ *Cl. chauvoei* ซึ่งปรับความเข้มข้นให้มีจำนวนเชื้อประมาณ $6.5x10^8$ เซลล์/มล. ปริมาตร 100 มล. ผสมกับบรอทแบคเทอรินของเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ที่มีฟอร์มาลิน 0.5% (v/v) มีปริมาณเชื้อเป็นค่าน้ำหนักแห้งไม่น้อยกว่า 2 มก./มล. (De Alwis, 1999) หรือไม่น้อยกว่า $2 x10^{10}$ เซลล์/มล. (Chandrasekaran et al., 1993) ปริมาตร 100 มล. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 25° ซ. นาน 30 นาที และเตรียมเป็นวัคซีนจำนวน 100 โด๊ส ที่มีขนาดฉีด 3 มล. โดยผสมกับโปแตชอะลัมให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย 1% (w/v) ฟอร์มาลิน 0.5% (v/v) และ pH 7.0±0.3

สัตว์ทดลอง

หนูขาว พันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 20-25 กรัม

หนูตะเภา พันธุ์ Dunkin Hartley เพศผู้ อายุ 2-4 เดือน น้ำหนัก 300-400 กรัม

แกะ พันธุ์ผสมเมอริโน คละเพศ อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนัก 29-33 กิโลกรัม ไม่มีประวัติการฉีดวัคซีนแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

1. ทดสอบการปนเปื้อนของวัคซีน โดย เพาะตัวอย่างวัคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth และ thioglycollate broth อบที่ 37°ซ. และเพาะใน Sabouraud dextrose broth และ thioglycollate broth อบที่ 22° ซ. เป็นเวลา 14 วัน จะต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อรา (ASEAN, 1998)

2. ทดสอบความปลอดภัย

2.1 วัคซีนแบลคเลก

ทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภาและแกะ ตามวิธีของ ASEAN (1998)

-ในหนูตะเภา โดยฉีดวัคซีนแต่ละชุดเข้าใต้ผิวหนัง หนูตะเภา 2 ตัวๆ ละ 2 มล. วัดอุณหภูมิร่างกายเช้า-เย็น ทุกวัน และสังเกตอาการ 10 วัน ต้องไม่พบอาการผิดปกติ

-ในแกะ โดยฉีดวัคซีนแต่ละชุดเข้าใต้ผิวหนังแกะ 2 ตัวๆ ละ 2 เท่าของโด๊สที่กำหนด วัดอุณหภูมิร่างกายเช้า-เย็น ทุกวัน และสังเกตอาการ 7 วัน ต้องไม่พบอาการผิดปกติ

2.2 วัคซีนรวมแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

ทดสอบความปลอดภัยในหนูขาว หนูตะเภา และแกะ

- ในหนูขาว โดยฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องหนูขาว 5 ตัวๆ ละ 0.5 มล. สังเกตอาการ 2 สัปดาห์ ต้องไม่พบอาการผิดปกติ ในกรณีที่มีหนูป่วย และตายต้องตรวจพิสูจน์การติดเชื้อ *P. multocida* (ASEAN,1998)

- ในหนูตะเภา ทดสอบตามวิธีเดียวกับวัคซีนแบลคเลก ในข้อ 2.1
- ในแกะ ทดสอบตามวิธีเดียวกับวัคซีนแบลคเลก ในข้อ 2.1

การทดสอบประสิทธิภาพความคุ้มโรค

1. การทดสอบประสิทธิภาพความคุ้มโรคแบลคเลก

ทดสอบวัคซีนแต่ละชุดในหนูขาว 30 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 หนูขาว 10 ตัว ไม่ฉีดวัคซีน (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ 2 หนูขาว 20 ตัว ฉีดวัคซีน เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.25 มล. 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 วัน หลังฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 10 วัน ฉีดเชื้อพิษให้หนูขาวทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยสปอร์ของเชื้อ *Cl. chauvoei* จำนวน 1000 สปอร์ ที่ผสมกับ 3% $CaCl_2$ เข้ากล้ามเนื้อ ตัวละ 0.25 มล. สังเกตอาการหนูเป็นเวลา 7 วัน

2. การทดสอบประสิทธิภาพความคุ้มโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

ทดสอบด้วยวิธี active mouse protection test โดยใช้หนูขาว 100 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 50 ตัว กลุ่มที่ 1 ไม่ฉีดวัคซีน กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.2 มล. 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 7 วัน ทำการฉีดพิษทับหนูทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะเลี้ยงใน tryptose phosphate broth นาน 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-10} เข้าช่องท้อง ความเข้มข้นละ 5 ตัวๆ ละ 0.1 มล. สังเกตอาการหนูเป็นเวลา 5 วัน คำนวณค่า LD_{50} ของหนูทั้ง 2 กลุ่มตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ค่า LD_{50} ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดวัคซีนต้องต่างกันไม่น้อยกว่า 10^4 เท่า หรือ log protection มากกว่า 4 (ASEAN, 1998)

การทดสอบความคงสภาพ

โดยการเก็บตัวอย่างวัคซีนทั้ง 3 ชุด (วัคซีนแบลคเลก 5 มล., 2 มล. และวัคซีนรวม) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วทดสอบสอบประสิทธิภาพความคุ้มโรค (OIE, 2004)

ผล

การทดสอบคุณภาพวัคซีนแบลคเลก 2 ชุด ที่มีขนาดฉีด 5 มล. และ 2 มล. ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อรา เมื่อทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภาและแกะไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย ประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 2 ชุด ให้ความคุ้มโรค 100% และการทดสอบความคงสภาพของวัคซีนหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 สัปดาห์ พบว่าวัคซีนทั้ง 2 ชุดให้ความคุ้มโรค 95% (ตารางที่ 1)

เมื่อนำวัคซีนแบลคเลกที่มีขนาดฉีด 2 มล. มาเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน พบว่า ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อรา การทดสอบความปลอดภัยในหนูขาว หนูตะเภาและแกะ ตรวจไม่พบสัตว์ป่วย หรือตาย ประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีน ในหนูขาว พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก 100% และความคุ้มโรคต่อเฮโมรายิกเซพติซีเมีย เป็นค่า log protection มากกว่า 4 การทดสอบความคงสภาพของวัคซีนหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 สัปดาห์ พบว่าวัคซีนยังให้ความคุ้มโรคต่อแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย 100% และ log protection มากกว่า 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า วัคซีนแบลคเลกที่มีขนาดฉีด 5 มล. และ 2 มล. มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน ASEAN (1998) เช่นเดียวกัน สามารถนำมาเป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนเพื่อลดขนาดฉีดในอนาคตได้ และเมื่อนำมาเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ก็ยังมีคุณภาพ ความปลอดภัย ความคุ้มโรคต่อทั้งโรคแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย และความคงสภาพตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (ASEAN, 1998)

อย่างไรก็ตามวัคซีนที่เตรียมในการทดลองนี้ใช้อะลัมเป็นแอดจูแวนท์ซึ่งให้ความคุ้มโรคระยะสั้น จึงควรมีการศึกษาทดลองโดยใช้แอดจูแวนท์ชนิดอื่นเช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล หรือแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพสูงขึ้น และให้ระยะคุ้มโรคนานยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. ดร. วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา สำหรับความเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทดลอง และจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ 2543 วัคซีนแบลคเลก ใน คู่มือการใช้วัคซีนและเอนติเจน โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 18

รังสรรค์ รักษกุลวิทยา และวิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา 2549 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ ความขุ่น น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ PCV ในแบลคเลกบรอทแบคเทอริน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 16(1): 37-44

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. 1988. Packed cell volume method in graduated tubes. *In* Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris, France. pp. 69-71.

ASEAN, 1998. ASEAN standard requirements for blackleg bacterin. *In* Manual of ASEAN standards for animal vaccines. Livestock publication series no.2A, 2nd edition, ASEAN Secretariat, Jakarta, Indonesia. pp. 71-72. Available from http://www.Aseansec.org/agr_pub/ls2.doc [Accessed 20 January 2008].

Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson, J.A. 1983. Blackleg. *In* Veterinary medicine, 6th edition. Bailliere Tindall, Bath, UK. pp. 603-605.

Chandrasekaran, S., Kennett, L., Muniandy, N., Rani, B. and Mukkur, T.K.S. 1993. Relationship between active protection in buffalo vaccinated against hemorrhagic septicemia and passive mouse protection and serological tests. *In* B.E. Patten, T.L. Spencer, R.B. Johnson, D. Hoffman and L. Lehane, eds, ACIAR Proceedings No. 43. pp 215-218.

De Alwis, M.C.L. 1999. Vaccines. *In* Hemorrhagic septicemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. p. 63.

Misra, R.P. 1991. Production of blackleg vaccine. *In* Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines. FAO animal production and health paper 87. FAO, Rome, Italy. pp. 85-93.

Office International des Epizooties. 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition. OIE. Paris, France. pp. 62, 537-548.

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

Srinivasan, V.A., Reddy, G.S., Rao, K.A. and Kihm, V. 2001. Serological response of bovine to combined vaccine containing foot and mouth disease virus, rabies virus, *Pasteurella multocida* and *Clostridium chauvoei* antigens. Vet. Arhiv. 71(1), 37-45.

ตารางที่ 1 ผลทดสอบคุณภาพวัคซีนแบลคเลก

การทดสอบ	ขนาดฉีด	
	5 มล.	2 มล.
1. การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อราของวัคซีน	ไม่พบการปนเปื้อน	ไม่พบการปนเปื้อน
2. ความปลอดภัย		
2.1 หนูตะเภา	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
2.2 แกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
3. ความคุ้มโรคในหนูขาว	100%*	100%*
4. ความคงสภาพ		
4.1 ความคุ้มโรคในหนูขาว	95%*	95%*

* มากกว่า 60% ถือว่าคุ้มโรค

ตารางที่ 2 ผลทดสอบคุณภาพวัคซีนรวมแบลคเลกและเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

การทดสอบ	ผล
1. การปนเปื้อนของวัคซีน	ไม่พบการปนเปื้อน
2. ความปลอดภัย	
2.1 หนูขาว	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
2.2 หนูตะเภา	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
2.3 แกะ	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
3. ความคุ้มโรคในหนูขาว	
3.1 ต่อแบลคเลก	100%*
3.2 ต่อเฮโมรายิกเซพติซีมีย	log protection มากกว่า 4**
4. ความคงสภาพ	
4.1 ความคุ้มโรคต่อแบลคเลก	95%*
4.2 ความคุ้มโรคต่อเฮโมรายิกเซพติซีเมีย	log protection มากกว่า 4**

* มากกว่า 60% ถือว่าคุ้มโรค

** มากกว่า 4 ถือว่าคุ้มโรค

Possibility studies on reducing the dose volume of blackleg vaccine and combination with hemorrhagic septicemia vaccine

Ratchanee Atthi[1] Nittaya Rugsri[1]

Abstract

Possibility study on reducing the dose volume of blackleg vaccine for cattle was carried out. Two batches of blackleg alum-precipitated vaccine were prepared with two different dose volumes as 5 and 2 ml. Potency test in mice showed that both vaccine preparations gave 100 % protection against challenge. Further, a combined blackleg and hemorrhagic septicemia alum-precipitated vaccine at the dose volume of 3 ml was prepared. Potency test in mice showed that the vaccine gave protection against blackleg (100 %) and hemorrhagic septicemia (log protection > 4).

However, the combined vaccine was based on alum-precipitation which could have short-term protection. Further study with other adjuvants (aluminium hydroxide gel or oil) is required to obtain a better vaccine with longer duration of protection.

Key words: blackleg vaccine, hemorrhagic septicemia vaccine, dose volume, combined vaccine

---

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