วารสาร
ชีวผลิตภัณฑ์
The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 23 ฉบับที่ 1-2 มี.ค.-ก.ย. 2557 Vol.23 No.1-2 Mar-Sep 2014

- ประสิทธิภาพของวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในโคและแพะ
- การประกันคุณภาพการทดสอบสำหรับเครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย
- การเก็บ การบรรจุหีบห่อ และการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างปลอดภัยตามหลัก biosafety และ biosecurity
- วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน : การทำเป็นอีมัลชั่นและความคุ้มโรคตาม OIE

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 23 ฉบับที่ 1–2 มี.ค. - ก.ย. 2557

สารบัญ

- **จากกองบรรณาธิการ** **6**
- **ประสิทธิภาพของวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในโคและแพะ** **7**
  รัชนี อัตถิ วันชัย ตีรถะวรวรรณ วีรชาย ปู่สูงเนิน อารีรัตน์ แพงเพ็ง
- **การประกันคุณภาพการทดสอบสำหรับเครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย** **16**
  วิไล ลินจงสุบงกช ดิลก อ้วนพรมมา กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย
  โสภา สิงคลีบุตร จรรยา สมานิตย์ ปิยภรณ์ เจริญผล
- **การเก็บ การบรรจุหีบห่อ และการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย อย่างปลอดภัยตามหลัก biosafety และ biosecurity** **29**
  วิไล ลินจงสุบงกช
- **วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน: การทำเป็นอีมัลชั่นและความคุ้มโรคตาม OIE** **37**
  นริศ ว่องวัฒนากูล

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 23 No. 1-2 Mar-Sep 2014

Contents

- **The editorial** 6

- **Efficacy of reduced dose volume blackleg vaccine in cattle and goats** 7

  Ratchanee Atthi Wanchai Teerathavorawan Weerachai Poosungnoen Areerat Pangpeng

- **Quality assurance of testing for foot and mouth disease laboratories network** 16

  Wilai Linchongsubongkoch Dilok Aunpomma Kingkarn Boonsuya Seeyo

  Sopha Sinkleebuth Janya Samanit Piyaporn Chareonpol

- **Collection, packaging and transportation of specimens to foot and mouth disease diagnostic laboratory under the biosafety and biosecurity principles** 29

  Wilai Linchongsubongkoch

- **Foot and mouth disease oil adjuvant vaccine for pig: Emulsification and its potency based on OIE standard** 37

  Narit Wongwattanakul

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

---

http://biologic.dld.go.th

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านชีวผลิตภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ชีวผลิตภัณฑ์
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	นิเทศ	เลิศลิมชลาลัย	**Advisory board**	Niteth	Lertlimchalalai
บรรณาธิการ	รัชนี	อัตถิ	**Editor**	Ratchanee	Atthi
หัวหน้ากองบรรณาธิการ	สหวัชร์	อึ้งวนิชบรรณ	**Editorial director**	Sahawatchara	Ungvanijban
กองบรรณาธิการ	วิไล	ลินจงสุบงกช	**Editorial board**	Wilai	Linchongsubongkoch
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	นพพร	พัฒนประสิทธิ์		Nopporn	Patanaprasit
	กมลทิพย์	ธัญพิมล		Kamonthip	Thunpimon
	วรพร	อ่ำเงิน		Woraporn	Amngoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	**Manager**	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 123
โทรสาร. 0-4427-9794

กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน

Office: Bureau of Veterinary Biologics,
Pakchong, Nakhonratchasima,
Thailand 30130
Tel. 0-4431-1476 extension 123
Fax. 0-4427-9794

Publications: Twice a year in March and September

จัดพิมพ์โดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัยอันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ

1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจนโดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์ วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน

1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น

1.4 เรื่องอื่น ๆที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น

2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

2.2.1 **ตัวพิมพ์** ใช้ตัวอักษร Angsana New แบบปกติ ขนาด 15 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น **ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และ เอกสารอ้างอิง** ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 17 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น **คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ** เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 15

2.2.2 **กระดาษที่ใช้พิมพ์** ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวนไม่เกิน 10 หน้า

2.2.3 **การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ** ด้านบนที่ 6.5 ซม. และด้านซ้ายที่ 4.5 ซม. ส่วนด้านขวาและล่างที่ 1.5 ซม.

2.2.4 **การลำดับหน้า** ใช้หมายเลข 1,2,3….. ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติ ขนาด 15

2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
- รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง

2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella spp.*

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์

3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง

กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122, 123 โทรสาร 0-4431-5931

3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ

3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน

3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงอรรถ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) สั้นได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองความยาวไม่ควรเกิน 15 บรรทัด ภาษาไทยและภาษาอังกฤษเขียนแยกหน้า

4.4 คำสำคัญ (Key words) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งควรมีการทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงอรรถ

4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมืออุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

1. <u>วารสารหรือหนังสือ</u> เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิไลและคณะ, 2532; Kumakai *et al*., 1961) กรณี อ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
2. <u>บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน</u> ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น .....similar results (Layton, R. B. and

Weathers, C. C., unpublished data), ...for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)

3. <u>เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ</u> ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (,) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

1) <u>วารสาร</u> ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง เช่น

สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35

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

กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น

Carter, G.R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170–174.

Carter, G.R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61–63.

2) <u>หนังสือ</u> ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

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

Office International des Epizooties. 2000. Principles of Veterinary Vaccine Production. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 42.

Dutta, S. K., Shankarappa, B. and Mattingly-Napier, B. 1991. Antigenic analysis of *Ehrlichia risticii* isolates. *In* Plowright, W., Rossdale, P. D., Wade, J. F. (ed.), Equine Infectious Diseases VI Proceedings of the Sixth International Conference 7-11 July 1991. R&W Publication (Newmarket) Limited. Suffolk, UK. pp. 61-65.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. *In* Leman, A. D. (ed.), Diseases of Swine, 6th ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

3) เว็บไซต์ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ (ถ้ามี) แหล่งที่มาและวันที่เข้าถึง เช่น

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

Boscos, C. M. 2004. Canine TVT: Clinical findings, Diagnosis and Treatment. The 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association. 6-9 October 2004. Rhodes, Greece. Available from http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx [Accessed 10 January 2006].

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ยังคงออกล่าช้ากว่ากำหนดซึ่งกองบรรณาธิการต้องขออภัยอีกครั้ง และเราจะปรับปรุงเรื่องของเวลาในฉบับต่อๆไป แต่อย่างไรก็ตามจะต้องตีพิมพ์วารสารให้ได้ปีละ 2 ฉบับ ตามวัตถุประสงค์ค่ะ

สำหรับเนื้อหาในวารสารฉบับนี้เป็นผลงานวิชาการ 2 เรื่อง ได้แก่ เรื่องของการทดลองวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในสัตว์ทดลอง เพื่อจะใช้เป็นข้อมูลที่จำเป็นในการปรับเปลี่ยนการผลิตวัคซีนต่อไป งานทดลองนี้จึงเป็นประโยชน์ในส่วนของทั้งผู้ผลิตวัคซีน คือสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และผู้ใช้วัคซีน ส่วนผลงานวิชาการอีกเรื่องหนึ่งคือ การประกันคุณภาพการทดสอบสำหรับเครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นเรื่องเกี่ยวกับระบบที่ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในวิธีการและผลการทดสอบโรคปากและเท้าเปื่อยแม้จะทำในห้องปฏิบัติการต่างสถานที่กัน บทความวิชาการ 2 เรื่องในฉบับนี้เป็นการถ่ายทอดความรู้อันเกิดจากประสบการณ์การทำงานประกอบกับการค้นคว้าจากเอกสารวิชาการที่ผู้เขียนมีความตั้งใจรวบรวมมาเพื่อให้ผู้อ่านได้รับความรู้ที่เป็นประโยชน์ในการทำงานด้านวัคซีนชนิดอิมัลชัน รวมทั้งความรู้ในเรื่องของวิธีการที่ถูกต้องในการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อการวินิจฉัยโรค

กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้อ่านและนักวิชาการที่สนใจและให้การสนับสนุนงานด้านวิชาการด้วยการส่งผลงานและบทความทางวิชาการที่เป็นประโยชน์มาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ และขอเชิญชวนให้ส่งผลงานวิชาการเข้ามามากๆ วารสารฉบับหน้าและฉบับต่อๆไปจะได้ตีพิมพ์ตรงตามกำหนดไม่ล่าช้าเช่นที่เป็นอยู่

ขอขอบคุณ
สพ.ญ. รัชนี อัตถิ
บรรณาธิการ

ประสิทธิภาพของวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในโคและแพะ

รัชนี อัตถิ[1] วันชัย ตีรถะวรวรรณ[1]
วีรชาย ปู่สูงเนิน[1] อารีรัตน์ แพงเพ็ง[1]

บทคัดย่อ

ประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดในโคและแพะ โดยวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธีอิไลซาหลังฉีดวัคซีนทุก 4 สัปดาห์ นาน 28 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างโค และ แพะ กลุ่มที่ฉีดวัคซีนหนึ่งครั้ง ฉีดสองครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน ผลการศึกษา พบว่า โคและแพะทุกตัวที่ฉีดวัคซีนมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก 4 สัปดาห์ และระดับแอนติบอดีของสัตว์กลุ่มที่ฉีดวัคซีนสองครั้งสูงกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนหนึ่งครั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และระดับแอนติบอดีสูงขึ้นไม่น้อยกว่า 28 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนครั้งแรก เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนโดยทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนเป็นระยะ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ 37°ซ และที่อุณหภูมิห้องนาน 24 เดือน พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคตลอดการทดลอง ดังนั้น สันนิษฐานได้ว่าวัคซีนมีอายุการเก็บรักษาไม่น้อยกว่า 24 เดือน

คำสำคัญ: วัคซีนแบลคเลก ลดปริมาตรฉีด ระดับแอนติบอดี อายุการเก็บรักษา โคและแพะ

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

แบลคเลกเป็นโรคติดต่อร้ายแรงในโค กระบือ แพะและแกะ สัตว์ทุกอายุเป็นโรคได้ แต่โคอายุระหว่าง 6 เดือน ถึง 2 ปี มีความไวรับต่อโรคมากที่สุด อาการที่สำคัญของโรคคือ กล้ามเนื้ออักเสบ บวม โดยเฉพาะกล้ามเนื้อมัดใหญ่เช่น ขาหลัง ไหล่ อก เป็นต้น อาการของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว สัตว์ป่วยมีไข้สูง 39-41°ซ ลุกไม่ขึ้น หายใจลำบาก และตายภายใน 12 -36 ชั่วโมง หลังแสดงอาการ เนื่องจากพิษของเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต สัตว์ป่วยมีอัตราการตายสูง สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญแบบไม่ใช้อากาศ สามารถสร้างสปอร์ในสภาวะที่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีชีวิตอยู่ในดินได้เป็นเวลานานหลายปี สัตว์เป็นโรคได้ในทุกฤดูกาล และมักเกิดโรคซ้ำในจุดที่เคยเกิดโรคอยู่เสมอ (Blood *et al*., 1983) การควบคุมโรคด้วยการฉีดวัคซีนจึงมีความจำเป็นโดยเฉพาะในท้องที่ที่เคยเกิดโรค

วัคซีนป้องกันโรคแบลคเลกที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ผลิตเป็นวัคซีนเดี่ยวชนิด formalinized whole cell เตรียมจากเชื้อ *Clostridium chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ตกตะกอนด้วยอะลัม ใช้ฉีดใต้ผิวหนัง โค กระบือ ตัวละ 5 มล. ปัจจุบันมีกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อได้เข้มข้นทำให้สามารถปรับปรุงการผลิตวัคซีนให้มีปริมาตรฉีดตัวละ 2 มล. เช่นเดียวกับวัคซีนส่วนใหญ่ในท้องตลาด ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บและการขนส่งวัคซีน ผลการศึกษาของรัชนี และนิตยา (2551) รายงานว่าวัคซีนแบลคเลกที่มีปริมาตรฉีดตัวละ 5 มล. และ 2 มล. มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน ASEAN (1998) ในหนูไมซ์เช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีการทดสอบในสัตว์เป้าหมาย

การศึกษานี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโดยการฉีดวัคซีนโค และแพะ แล้วตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมเป็นระยะนาน 28 สัปดาห์ และศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนโดยทดสอบความปลอดภัยและคุณภาพของวัคซีนตามมาตรฐาน ASEAN (1998) หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ 37°ซ และที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะนาน 24 เดือน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการปรับปรุงการผลิตวัคซีนแบลคเลกที่ลดขนาดฉีดและนำออกใช้ทดแทนวัคซีนที่มีขนาดฉีด 5 มล.

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อ *Cl. chauvoei* สเตรนท้องถิ่น ซึ่งเก็บในรูปของสปอร์ทำแห้ง

สัตว์ทดลอง

1) หนูไมซ์ พันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 20-25 กรัม จำนวน 380 ตัว

2) หนูตะเภา พันธุ์ Dunkin Hartley เพศผู้ อายุ 2-4 เดือน น้ำหนัก 300-400 กรัม จำนวน 32 ตัว

3) โคพื้นเมือง พันธุ์ผสม ไม่จำกัดเพศ อายุประมาณ 1 ปี ไม่เคยฉีดวัคซีนแบลคเลกและไม่มีแอนติบอดีต่อแบลคเลกเมื่อทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยซื้อจากเกษตรกร จำนวน 15 ตัว

4) แพะ พันธุ์ผสม ไม่จำกัดเพศ อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนักไม่น้อยกว่า 20 กิโลกรัม ไม่เคยฉีดวัคซีนแบลคเลกและไม่มีแอนติบอดีต่อแบลคเลกเมื่อทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยซื้อจากเกษตรกร จำนวน 47 ตัว

การเตรียมวัคซีนแบลคเลก

เตรียมบรอทแบคเทอริน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cl. chauvoei* ในถังเพาะเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5 % (v/v) และนับจำนวนเชื้อทางอ้อมด้วยการหาค่า packed cell volume (PCV) ตามวิธีของ Alton และคณะ(1988)โดยใส่บรอทแบคเทอริน 10 มล.ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงที่มีขีดบอกปริมาตร ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 2500 x *g* เวลา 75 นาที นำบรอทแบคเทอรินมาผสมให้ได้วัคซีน 2 ลิตร มีค่า PCV ไม่น้อยกว่า 0.65 % หรือ มีจำนวนเชื้อไม่น้อยกว่า $6.5x10^8$ เซลล์/โด๊ส (2 มล.) โดยผสมกับโปแตชอะลัมเพื่อให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายในวัคซีนเท่ากับ 1 % (w/v) ปรับให้มีค่า pH 7.0 ± 0.3 (Misra, 1991) ทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีน ความปลอดภัยในหนูตะเภาและแพะ และทดสอบประสิทธิภาพในหนูไมซ์ ตามวิธีของ ASEAN (1998) ก่อนบรรจุขวดวัคซีน ขวดละ 40 มล. หลังบรรจุขวดนำมาทดสอบการปนเปื้อนอีกครั้ง ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคและแพะ และศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีนต่อไป

การทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีน

ทดสอบการปนเปื้อนในวัคซีนก่อนและหลังการบรรจุขวด โดยเพาะวัคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth และ thioglycollate broth อบที่ 37°ซ และเพาะใน Sabouraud dextrose broth และ thioglycollate broth อบที่ 22°ซ เป็นเวลา 14 วันจะต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อรา (ASEAN,1998)

การทดสอบความปลอดภัย ในหนูตะเภาและแพะตามวิธีของ ASEAN (1998)

ในหนูตะเภา ฉีดวัคซีนหนูตะเภา จำนวน 2 ตัว ตัวละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง สังเกตอาการ 10 วัน หนูตะเภาต้องไม่แสดงอาการผิดปกติ

ในแพะ ฉีดวัคซีนแพะไม่จำกัดเพศ อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนักไม่น้อยกว่า 20 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว ตัวละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง วัดอุณหภูมิร่างกายเช้า-เย็น ทุกวัน สังเกตอาการ 7 วัน ต้องไม่พบอาการผิดปกติ

การทดสอบประสิทธิภาพความคุ้มโรคในหนูไมซ์ ตามวิธีของ ASEAN (1998)

ทดสอบวัคซีนแต่ละตัวอย่างโดยใช้หนูไมซ์ 30 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 หนูไมซ์ 10 ตัว ไม่ฉีดวัคซีน (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ 2 หนูไมซ์ 20 ตัว ฉีดวัคซีน เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.25 มล. 4 ครั้งห่างกันครั้งละ 2 วัน หลังฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 10 วัน ฉีดเชื้อพิษหนูไมซ์ทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยสปอร์ของเชื้อ *Cl. chauvoei* จำนวนประมาณตัวละ 60 สปอร์ ที่ผสมกับ 3% $CaCl_2$ เข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.25 มล. สังเกตอาการหนูไมซ์เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ฉีดวัคซีนควรมีชีวิตรอดไม่น้อยกว่า 60% ขณะที่หนูกลุ่มไม่ฉีดวัคซีนตายมากกว่า 80% ถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค

ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคและแพะโดยตรวจระดับแอนติบอดีในซีรัมหลังฉีดวัคซีน

นำวัคซีนที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพความคุ้มโรคในหนูไมซ์แล้ว มาทดสอบประสิทธิภาพในโคและแพะ โดยแบ่งโคและแพะ ออกเป็นชนิดละ 3 กลุ่มๆละ 5 ตัว ทดสอบดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนครั้งเดียว เข้าใต้ผิวหนัง 2 มล. สำหรับโค และ 1 มล. สำหรับแพะ

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง เข้าใต้ผิวหนัง 2 มล. สำหรับโค และ 1 มล. สำหรับแพะ ห่างกัน 4 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 ไม่ฉีดวัคซีน เป็นกลุ่มควบคุม

ตรวจระดับแอนติบอดีในซีรัมด้วยวิธี ELISA โดยเจาะเลือดโคและแพะทั้งหมดก่อนฉีดและหลังฉีดวัคซีนทุก 4 สัปดาห์ต่อเนื่องนาน 28 สัปดาห์ นำซีรัมมาตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีของ Crichton และคณะ (1990) โดยเคลือบ ELISA plate ด้วย sonicated extract antigen ของเชื้อ *Cl. chauvoei* ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองทำ checkerboard titration กับ negative และ positive control serum โคและแพะ โดยใช้ HRP-conjugate anti-bovine IgG สำหรับตรวจซีรัมโค และ HRP-conjugate anti-goat IgG สำหรับตรวจซีรัมแพะ จากนั้นดูการเกิดปฏิกิริยาด้วย TMB substrate และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M H_2SO_4 และอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เกณฑ์ตัดสินปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อค่า OD เท่ากับหรือมากกว่า OD เฉลี่ยของ negative control serum บวก 3 standard deviations และคำนวณค่าไตเตอร์ตามวิธีของ Srinivasan และคณะ(2001) โดยใช้ค่าไดลูชันแฟคเตอร์สูงสุดของซีรัมที่ให้ OD เป็นบวกคูณด้วย ค่า OD ที่อ่านได้

ศึกษาอายุการเก็บรักษาวัคซีน

แบ่งตัวอย่างวัคซีนจำนวน 30 ขวดเป็น 3 กลุ่มๆละ 10 ขวดเก็บในอุณหภูมิ 4°ซ 37°ซ และอุณหภูมิห้องโดยใส่ในตู้ทึบแสง หลังจากเก็บเป็นเวลา 4, 12, 16, 20 และ 24 เดือน นำตัวอย่างวัคซีน 2 ขวดจากแต่ละกลุ่ม มาทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภาและแพะ และความคุ้มโรคในหนูไมซ์ โดยผสมวัคซีนทั้งสองขวดเข้าด้วยกันก่อนการทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

หาค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในซีรัมโคและแพะแต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างช่วงเวลาหลังฉีด และความแตกต่างการฉีด 1 และ 2 ครั้ง ด้วย T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

การทดสอบคุณภาพวัคซีนแบลคเลกที่เตรียมได้ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อราเมื่อทดสอบความปลอดภัยในหนูตะเภาและแพะไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย และวัคซีนให้ความคุ้มโรคในหนูไมซ์ 100% จากการฉีดพิษทับ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคหลังฉีดวัคซีนพบว่า ระดับแอนติบอดีในซีรัมโคทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลองคือสัปดาห์ที่ 28 และระดับแอนติบอดีของโคกลุ่มฉีดวัคซีน 1 ครั้ง และ 2 ครั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 1) ส่วนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในแพะหลังฉีดวัคซีน พบว่าระดับแอนติบอดีในซีรัมแพะทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ตั้งแต่หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ โดยแพะกลุ่มที่ได้รับวัคซีน 1 ครั้งมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 20 หลังจากนั้นค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ขณะที่แพะกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง มีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นตั้งแต่หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลองคือสัปดาห์ที่ 28 และระดับแอนติบอดีแตกต่างจากแพะกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 16 (ตารางที่ 2)

ความคงตัวจากการเก็บรักษาวัคซีน

การทดสอบความปลอดภัยพบว่าหลังจากการเก็บรักษาวัคซีนที่อุณหภูมิ 4°ซ, 37°ซ และที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ) พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยเมื่อทดสอบในหนูตะเภาและแพะ

การทดสอบประสิทธิภาพในหนูไมซ์ พบว่าวัคซีนยังคงมีความคุ้มโรคผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (60%) ตลอดการทดลอง นาน 24 เดือน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในซีรัมโคที่ได้รับวัคซีนแบลคเลก 1 ครั้งและ 2 ครั้งกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม

สัปดาห์ที่	ระดับแอนติบอดีในโค (ค่าเฉลี่ย OD)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน 1 ครั้ง	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน 2 ครั้ง
0	0.232 [a]	0.245 [a]	0.273 [a]
4	0.202 [a]	0.778 [b]	0.888 [b]
8	0.139 [a]	0.414 [b]	0.759 [c]
12	0.225 [a]	0.314 [b]	0.620 [c]
16	0.149 [a]	0.361 [b]	0.696 [c]
24	0.149 [a]	0.345 [b]	0.701 [c]
28	0.149 [a]	0.353 [b]	0.607 [c]

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, และ c ในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในซีรัมแพะที่ได้รับวัคซีนแบลคเลค 1 ครั้งและ 2 ครั้งกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม

สัปดาห์ที่	ระดับแอนติบอดีในแพะ (ค่าเฉลี่ย OD)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน 1 ครั้ง	กลุ่มที่ได้รับวัคซีน 2 ครั้ง
0	0.110 [a]	0.127 [a]	0.126 [a]
4	0.121 [a]	0.656 [b]	0.835 [b]
8	0.115 [a]	0.620 [b]	0.664 [b]
12	0.093 [a]	0.386 [b]	0.353 [b]
16	0.095 [a]	0.381 [b]	0.666 [c]
20	0.090 [a]	0.157 [b]	0.477 [c]
24	0.094 [a]	0.158 [a]	0.455 [c]
28	0.096 [a]	0.130 [a]	0.379 [c]

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, และ c ในแถวเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$)

ตารางที่ 3 ความคุ้มโรคของวัคซีนแบลคเลกตรวจโดยการฉีดพิษทับในหนูไมซ์ หลังเก็บรักษาวัคซีนที่อุณหภูมิ 4°ซ 37°ซ และอุณหภูมิห้อง ระยะเวลาต่างๆ

อุณหภูมิที่เก็บ	% ความคุ้มโรคหลังเก็บเดือนที่					
	0	4	12	16	20	24
4°ซ	100	100	95	95	95	100
37°ซ	100	100	95	90	95	80
อุณหภูมิห้อง	100	100	85	95	100	90

วิจารณ์

การฉีดวัคซีนป้องกันโรคโดยเฉพาะวัคซีนชนิดเชื้อตายแก่สัตว์เป็นครั้งแรกโดยสัตว์ไม่มีแอนติบอดีต่อวัคซีนหรือโรคนั้นมาก่อน ควรมีการฉีดกระตุ้นโดยฉีดวัคซีนห่างจากครั้งแรก 2 -4 สัปดาห์ (Clem, 2011) เพื่อให้การสร้างภูมิคุ้มกันดีขึ้นและภูมิคุ้มกันอยู่ได้นาน จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่า การฉีดวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีด (2 มล.สำหรับโค และ 1 มล. สำหรับแพะ) ให้โค 2 ครั้ง วัคซีนยังสามารถกระตุ้นการ

ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยมีค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีซึ่งสูงกว่า การฉีดวัคซีน 1 ครั้ง เช่นเดียวกันการฉีดวัคซีนในแพะ 2 ครั้ง วัคซีนจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าและระดับแอนติบอดีสูงนานกว่าการฉีดวัคซีน 1 ครั้ง ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้จึงควรจะฉีดวัคซีนกระตุ้นให้โคและแพะเมื่อรับการฉีดวัคซีนครั้งแรกในชีวิต

สำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีในการศึกษาครั้งนี้ใช้ sonicated extract antigen ของเชื้อ *Cl. chauvoei* ที่มีส่วนประกอบของทั้ง cellular และ soluble antigens ในการตรวจ ตามวิธีของ Crichton *et al.* (1990) ซึ่งพบว่าอิไลซาไตเตอร์ในกระต่ายมีความสัมพันธ์กับความคุ้มโรคของวัคซีนแบลคเลกเมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบในหนูตะเภา และเหมาะสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนจากเชื้อ *Cl. chauvoei* ประกอบกับมีผลการศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Cl. chauvoei* ที่พบว่าส่วนใหญ่เป็นภูมิคุ้มกันต่อ cellular, somatic และ flagella antigen (Chandler and Gulasekharam, 1974; Tanaka *et al*., 1994) รวมทั้ง extracellular antigen (Mattar *et al*., 2007) ดังนั้น การทดลองครั้งนี้แม้ว่าจะไม่มีการทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีดเชื้อพิษทับหลังฉีดวัคซีนเป็นระยะ และยังไม่มีค่าของระดับแอนติบอดีที่ป้องกันโรคได้ในโคและแพะ ก็สามารถประเมินผลเบื้องต้นได้ว่าวัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีดยังคงกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคในโคและแพะ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันระยะคุ้มโรคในสัตว์เป้าหมายโดยการทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีดพิษทับโดยตรงหรือการทดสอบทางอ้อมเช่น passive mouse protection เป็นต้น

สรุป

วัคซีนแบลคเลกที่ลดปริมาตรฉีด (โคโต๊ะละ 2 มล. และ แพะโต๊ะละ 1 มล.) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี หลังฉีดวัคซีนโคและแพะ 2 ครั้งดีกว่าการฉีด 1 ครั้ง โดยมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นนานอย่างน้อย 28 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีน และวัคซีนมีอายุการเก็บรักษานาน 24 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในการสนับสนุนงบประมาณการดำเนินงานทดลอง คุณนิตยา เมตตา และคุณจันทร์ทิพย์ แสงทอง ที่ช่วยเหลือด้านการทดสอบความคุ้มโรคในหนูไมซ์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายที่มีส่วนร่วมในการดำเนินงานให้การทดลองครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

รัชนี อัตถิ และ นิตยา รักศรี 2551 ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดขนาดฉีดของวัคซีนแบลคเลกและการเตรียมเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 18(1-2): 35-42

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 foranimal vaccines. Livestock publication series no.2A, 2nd edition, ASEAN Secretariat, Jakarta, Indonesis. pp. 71-72. Available from http://www.Aseansec.org/agr_pub/ls2.doc. [Accessed January 20, 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.

Chandler, H.M. and Gulasekharam, J. 1974. The protective antigen of a highly immunogenic strain of *Clostridium chauvoei* including an evaluation of its flagella as a protective antigen. J. Gen. Microbiol. 84 (1): 128-134.

Clem, A.S. 2011. Fundamentals of vaccine immunology. J. Glob. Infect. Dis. 3(1): 73-78.

Crichton, R., Solomon, J. and Barton, A.M., 1990. The development of an enzyme- linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens. Biologicals. 18: 49-54.

Mattar, M.A., Cortinas, T. I. and Atefanini, A.M. 2007. Extracellular proteins of *Clostridium chauvoei* are protective in a mouse model. Acta Veterinaria Hungarica 55(2): 159-170.

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.

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. Archive. 71(1): 37-45.

Tanaka, M., Tamura, Y., Suzuki, S., Nagamine, N. and Nakamura, M. 1994. Antigenic mimicry of *Clostridium chauvoei* flagella by polyclonal anti-idiotypic antibodies. J. Med. Microbiol. 40(1): 70-75.

Efficacy of reduced dose volume blackleg vaccine in cattle and goats

Ratchanee Atthi[1] Wanchai Teerathavorawan[1]
Weerachai Poosungnoen[1] Areerat Pangpeng[1]

Abstract

The efficacy of a reduced dose volume blackleg vaccine was evaluated in cattle and goats by measuring antibody titers by an ELISA every 4 weeks after vaccination for 28 weeks. Groups of cattle and goats which received one and two vaccinations at a 4- week interval and unvaccinated groups of the either animals were compared. A rise in antibody levels was observed in all vaccinated animals at 4 weeks after first vaccination. In addition, animals vaccinated two times had significantly higher antibody levels than the animals vaccinated one time ($P<0.05$) and the antibody could last at least 28 weeks after first vaccination. For shelf life study, the safety and potency of the vaccine were intermittently tested during storage at 4°C, 37°C and at room temperature for 24 months. The vaccine was shown to be safe and retain its potency throughout the experiment, thus the vaccine shelf life was assumed to be at least 24 months.

Key words: Blackleg vaccine, reduced dose volume, antibody titer, shelf life, cattle and goats

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

การประกันคุณภาพการทดสอบสำหรับเครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย

วิไล ลินจงสุบงกช[1] ดิลก อ้วนพรมมา[2] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[3]
โสภา สิงคลีบุตร[3] จรรยา สมานิตย์[3] ปิยภรณ์ เจริญผล[3]

บทคัดย่อ

การประกันคุณภาพการทดสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยภายใต้เครือข่ายห้องปฏิบัติการในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia Foot and Mouth Disease Laboratory Network) โดยการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งในและต่างประเทศรวมทั้งสิ้น 16 แห่ง ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการภายในประเทศจำนวน 9 แห่งได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ทั้ง 7 ศูนย์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ห้องปฏิบัติการต่างประเทศ จำนวน 7 แห่งได้แก่ประเทศกัมพูชา ลาว ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า และเวียดนาม 2 แห่ง (Hanoi และ Ho Chi Minh) โดยจัดส่งตัวอย่างเชื้อสำหรับการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธี ELISA typing จำนวน 10 ตัวอย่างและตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่างสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O, A และ Asia1 ด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (NSP test) พร้อมแบบสอบถามรายละเอียดด้านศักยภาพห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ทำการวิเคราะห์ผลในรูป internal quality control (IQC) ของกลุ่มควบคุม (control panel), modified youden plot ของค่า PI และค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และAsia1 สรุปผลโดยภาพรวมห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการให้ผลการทดสอบค่อนข้างสอดคล้องกันและอยู่ในเกณฑ์กำหนด พบว่าทุกหน่วยงานมีขีดความสามารถในการทดสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งด้าน antigen detection ด้วยวิธี ELISA typing และด้าน antibody detection ด้วยวิธี LP ELISA และ NSP test การดำเนินงานครั้งนี้ยังเป็นการทดสอบความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน เพื่อให้มั่นใจว่าได้ผลการทดสอบคงที่ ถูกต้องตามหลักวิชาการและเป็นการยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการให้ได้รับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005

คำสำคัญ: การประกันคุณภาพ โรคปากและเท้าเปื่อย เครือข่ายห้องปฏิบัติการ

---

[1] ผู้เชี่ยวชาญโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ สถาบันสุขภาพแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ ขอนแก่น
[3] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ นครราชสีมา

บทนำ

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นหน่วยงานที่ได้รับการรับรองเป็น OIE Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease มีบทบาทและภารกิจในการบริการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างทั้งในและต่างประเทศ ด้วยระบบบริหารงานที่มีคุณภาพได้มาตรฐานสากล ตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2005 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการทดสอบ ที่ได้ผลคงที่สม่ำเสมอเป็นไปตามหลักวิชาการและเกิดความพึงพอใจต่อผู้รับบริการด้วยระดับการบริการที่ได้มาตรฐานสูงสุด นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการจัดตั้งระบบประกันคุณภาพการทดสอบทางห้องปฏิบัติการให้กับหน่วยงานในประเทศและประเทศสมาชิก OIE เพื่อยกระดับมาตรฐานการทดสอบให้เป็นที่ยอมรับระดับสากล ดังนั้นการจัดทำโครงการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อยให้กับหน่วยงานกรมปศุสัตว์และหน่วยงานต่างประเทศ ได้แก่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 แห่ง สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และประเทศสมาชิก OIE ซึ่งการดำเนินการครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงาน OIE Sub Regional Representative (OIE-SRR) และหน่วยงาน OIE Regional Coordination Unit (OIE-RCU) ภายใต้โครงการ Foot and Mouth Disease Control Campaign in Southeast Asia and China (SEACFMD) ซึ่งประกอบด้วยประเทศ กัมพูชา ลาว มาเลเซีย พม่า จีน ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และไทย ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์และมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อหน่วยงานและเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานให้มีความชำนาญการ และเป็นการเพิ่มขีดความสามารถห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับระดับสากลโดยมีการพัฒนาและปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการประกันคุณภาพผลการทดสอบนี้เป็นส่วนหนึ่งของข้อกำหนดการจัดตั้งระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ทั้งนี้ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทำหน้าที่เป็นผู้จัดทำ (provider) โครงการนี้เริ่มดำเนินการแจกจ่ายชุดสารตรวจสอบและตัวอย่างให้กับทุกหน่วยงานตั้งแต่เดือนมีนาคม 2554 ถึงเดือนสิงหาคม 2554 ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมได้จัดส่งผลการทดสอบกลับมายังศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ จำนวน 16 แห่ง และได้รับตอบกลับ questionnaire จำนวน 13 แห่ง ไม่ได้ตอบกลับจำนวน 3 แห่ง

วัตถุประสงค์

เพื่อเทียบผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาของโรคปากและเท้าเปื่อยระหว่างห้องปฏิบัติการเครือข่ายที่เข้าร่วมโครงการ และเป็นการทดสอบความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการทดสอบที่ให้ผลคงที่ มีความถูกต้องตามหลักวิชาการ ผู้รับบริการเกิดความมั่นใจและความพึงพอใจ

ในผลการทดสอบและยังเป็นส่วนหนึ่งของข้อกำหนดการจัดตั้งระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005

อุปกรณ์และวิธีการ

ชุดสารตรวจสอบและตัวอย่าง unknown antigen และ unknown serum

ชุดสารตรวจสอบ ตัวอย่างเชื้อ (unknown antigen) และซีรัม (unknown serum) จัดเตรียมโดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งทำหน้าที่เป็น provider ในการแจกจ่ายให้กับหน่วยงานที่เข้าร่วมโครงการ สารตรวจสอบและตัวอย่างเชื้อและซีรัมเหล่านี้ได้ผ่านการทดสอบซ้ำจำนวน 5-7 ครั้ง และได้ค่าเฉลี่ยอ้างอิง (reference data) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ตัวอย่างเชื้อจะทำการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี ELISA typing และตัวอย่างซีรัมจะทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) และ ตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและได้รับการติดเชื้อ ด้วยวิธี NSP test ชุดตรวจสอบประกอบด้วย

1. Questionnaire จำนวน 1 ชุด
2. Unknown antigen จำนวน 10 ตัวอย่าง
3. Unknown serum จำนวน 5 ตัวอย่าง
4. สารตรวจสอบ LP ELISA type O, A and Asia1 ซึ่งประกอบด้วย
   4.1 Rabbit anti FMDV type O, A, Asia1
   4.2 Guinea pig anti FMDV type O, A, Asia1
   4.3 Concentrated inactivated FMD antigen type O, A, Asia1
5. Tracing sheet และแบบฟอร์มการตอบผล data sheet
6. คู่มือวิธีการทดสอบ ELISA typing (RRL-T-001), LP ELISA (RRL-T-002)
   3B NSP test (RRL-T-003) และ 3ABC NSP test (RRL-T-004)

การตรวจสอบตัวอย่าง unknown antigen และ unknown serum ต้องทำการตรวจสอบอย่างน้อย 2 ซ้ำของแต่ละตัวอย่าง ทำการตอบผลและบันทึกลงในแบบฟอร์มตอบผล data sheet และ tracing sheet ส่งผลกลับไปยัง provider ตามระยะเวลาที่กำหนด

การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (ELISA typing)

เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพเพื่อตรวจหาและจำแนกชนิดของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธี indirect double antibody sandwich ELISA (Roeder and Le Blance Smith, 1987) โดยมีหลักการเกิดปฏิกิริยา binding reaction ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะกัน ในเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการตรวจหาปริมาณไวรัสที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแต่ละไทป์ ด้วยวิธี enzyme immunoassay ตามคู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย RRL-T-001 (2554)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Liquid phase blocking ELISA หรือ LP ELISA)

เป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณด้านวิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธี indirect double antibody sandwich ELISA (Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) โดยมีหลักการเกิดปฏิกิริยา neutralize หรือ blocking ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะกัน โดยการเจือจางซีรัมแบบ 2 fold serial dilution และทำปฏิกิริยากับไวรัสในปริมาณคงที่ ในเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการตรวจสอบปริมาณไวรัสที่หลงเหลือหรือถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ ด้วยวิธี enzyme immunoassay ตามคู่มือวิธีการทดสอบการระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย RRL-T-002 (2554)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3B non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (UBI® FMDV NS EIA)

เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปผลิตจากหน่วยงาน United Biochemical Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3B ของ non structure protein FMDV โดยวิธี indirect ELISA วิธีนี้เป็นการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน (differentiate infection from vaccination animal or DIVA) (Linchongsubongkoch *et al*., 2004) ขั้นตอนและวิธีการทดสอบตามคู่มือของผู้ผลิตและคู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3B non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย RRL-T-003 (2554)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Pronic® FMDV NS)

เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปผลิตจากหน่วยงาน Prionic Diagnostic B.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC ของ non structure protein ของ FMDV โดยวิธี blocking ELISA วิธีนี้เป็นการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน (differentiate infection from vaccination animal or DIVA) (Linchongsubongkoch *et al*., 2004) ขั้นตอนและวิธีการทดสอบตามคู่มือของผู้ผลิตและคู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย RRL-T-004 (2554)

การวิเคราะห์ผล

1. ทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบตัวอย่างเชื้อจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing อ่านผลเป็น positive ของแต่ละไทป์ หรือ negative อ่านค่า optical density (OD) ที่ wave length 450 nm การแปรผลโดยอ่านค่า cut off ที่ OD 0.20

OD มากกว่า 0.20 อ่านผลเป็น positive ในไทป์ที่ตรงกับกลุ่มควบคุม

OD น้อยกว่า 0.20 อ่านผลเป็น negative หรือ no virus detected (NVD)

2. ทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง ด้วยวิธี LP ELISA วิเคราะห์ผลแสดงในรูปแผนภูมิของกลุ่มควบคุมหรือ control panel ในแต่ละเพลทของแต่ละไทป์ (O, A และ Asia1) ได้แก่ค่า OD antigen control (Ca), percent inhibition (PI) ของ strong positive (C++), weak positive (C+) และ negative (C-) control serum ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Lab) ตามวิธีการของ Axel Colling (1998)

3. ทำการวิเคราะห์ผลในรูปแผนภูมิ modified youden plot ของไทป์ O, A และ Asia1 โดยแสดงค่า PI ระหว่างซีรัม 2 ตัวอย่าง ของแต่ละ Lab และค่า reference data (REF data) ตามวิธีการของ Axel Colling (1998)

4. ทำการวิเคราะห์ผลค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ของไทป์ O, A และ Asia1 และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein (NSP test) ของตัวอย่างซีรัมเบอร์ 1-5 ที่ได้จากการทดสอบของแต่ละ Lab

ผล

1. การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (ELISA typing)

ผลการทดสอบ ELISA typing จากตัวอย่าง unknown sample ทั้งหมด 10 ตัวอย่างของแต่ละ Lab ซึ่งมีเพียงจำนวน 7 Lab เท่านั้นที่ขอเข้าร่วมทดสอบ ELISA typing ได้แก่ Lab 1, Lab 2, Lab 10, Lab 11, Lab 12, Lab 13, Lab 16 และเมื่อเทียบผลกับค่า REF data พบว่าส่วนใหญ่ให้ผลสอดคล้องกัน มีเพียง Lab 16 ซึ่งผลการทดสอบตัวอย่างเชื้อเบอร์ 6, 8 และ10 พบว่าได้ค่า OD ต่ำกว่าค่า cut off อ่านผลเป็นลบหรือ no virus detected (NVD) ซึ่งความเป็นจริงควรได้ผลเป็นผลบวก ดังแสดงในตารางที่ 1 และ รูปแผนภูมิที่ 1

2. การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (LP ELISA)

ทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง แสดงในรูปแผนภูมิของกลุ่มควบคุมหรือ control panel ในแต่ละเพลทของแต่ละไทป์ (O, A และ Asia1) ได้แก่ค่า OD antigen control (Ca), percent

inhibition (PI) ของ strong positive (C++), weak positive (C+) และ negative (C-) control serum ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

ค่า OD ของ antigen control ในแต่ละ Lab นำเสนอเป็นแผนภูมิค่า Mean ± 1 SD โดยภาพรวมพบว่าส่วนใหญ่ ค่าเฉลี่ย OD ของ antigen control จัดอยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับ คือมีค่าระหว่าง OD 0.9 -1.5 พบว่า Lab 3 และ Lab 4 ค่า OD สูงกว่าเกณฑ์กำหนด ส่วนค่า PI ของ C++, C+ และ C- พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์กำหนด มีเพียงบาง Lab เช่น Lab 13 ให้ค่า PI ของ C++ สูงกว่าเกณฑ์กำหนด (90 -100 %) และ Lab 12 ให้ค่า PI ของ C+ สูงกว่าเกณฑ์กำหนด (50-90%) ส่วนค่า PI ของ C- ทุก Lab อยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปแผนภูมิที่ 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์ modified youden plot

การวิเคราะห์ผลซีรัมโดยแสดงค่า PI ระหว่างซีรัม 2 ตัวอย่าง นำมา plot ค่าจุดตัดระหว่างแกน X และ แกน Y และหาพื้นที่ mean ± 1SD ที่ได้จาก Lab ต่างๆ และค่า reference data (REF data) ของไทป์ O, A และ Asia1 ดังแสดงในรูปแผนภูมิ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยและ NSP test

ผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O, A และ Asia1 โดยวิธี LP ELISA และการตรวจหาแอนตอบอดีต่อ non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3B NSP (UBI® FMDV NS EIA) และ 3ABC NSP (Pronic® FMDV NS) ผลเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์ O, A และ Asia1 และ ผล NSP test ของตัวอย่างซีรัม เบอร์ 1-5 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

สรุปและวิจารณ์

การประกันคุณภาพการทดสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยภายใต้เครือข่ายห้องปฏิบัติการในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia Foot and Mouth Disease Laboratories Network) โดยการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย ช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนกรฎาคม 2554 มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมโครงการจากภายในและต่างประเทศ รวมทั้งสิ้น 16 แห่ง ซึ่งได้ดำเนินการตรวจตัวอย่างเชื้อ unknown antigen จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing เพื่อจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และตรวจตัวอย่าง unknown serum จำนวน 5 ตัวอย่าง ด้วยวิธี LP ELISA เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein ต่อส่วน 3ABC NSP (PrioCheck) และ 3B NSP test (UBI) การวิเคราะห์ผลโดย

ภาพรวมในการตรวจ ELISA typing ผลปรากฏว่าทุกหน่วยงานให้ผลสอดคล้องและตรงกับ Reference data (REF data) จากตารางที่ 1 และรูปแผนภูมิที่ 1 มีเพียง Lab 16 ซึ่งผลการทดสอบตัวอย่างเชื้อเบอร์ 1-10 พบว่ามีบางตัวอย่างได้ค่า OD ต่ำกว่าค่า cut off (OD cut off = 0.20) อ่านผลเป็นลบหรือ no virus detected (NVD) ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วตัวอย่างเชื้อเบอร์ 6, 8 และ 10 ควรจะได้ผลเป็นผลบวก ทั้งนี้อาจเกิดจาก weak reaction ในกระบวนการทดสอบ เสนอแนะให้ทวนสอบกระบวนการทดสอบอย่างละเอียด เช่น วัดสภาวะ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ หรือทวนสอบอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบเช่น micropipette, incubator หรือ ELISA reader ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิด systematic error ได้ เป็นต้น

การควบคุมคุณภาพการทดสอบตัวอย่างซีรัม เบอร์ 1-5 ด้วยวิธี LP ELISA โดยทำการวิเคราะห์ผลกลุ่มควบคุมหรือ control panel ในแต่ละเพลทของแต่ละไทป์ (O, A และ Asia1) ว่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดหรือไม่ ดังแสดงในตารางที่ 2 ได้แก่ ค่า OD antigen control (Ca), percent inhibition (PI) ของ strong positive (C++), weak positive (C+) และ negative (C-) control serum ของแต่ละห้องปฏิบัติการ โดยภาพรวมพบว่าส่วนใหญ่ ค่า OD ของ antigen control จัดอยู่ในช่วงที่เกณฑ์กำหนด คือมีค่าระหว่าง OD 0.9 -1.5 จากรูปแผนภูมิที่ 3, 4, 5 และ 6 พบว่า Lab 4 ค่า OD ของ ไทป์ O และAsia1 สูงเกินค่าเกณฑ์กำหนด ส่วนไทป์ A มีแนวโน้ม OD จะสูง อาจเนื่องมาจากมีการปรับค่า working dilution โดยไม่ได้ทำ titration เสนอแนะให้ทำ antigen titration ก่อนนำมาใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับ Lab 13 และ Lab 16 มีค่า OD ของไทป์ Asia1และไทป์ O อยู่สูงกว่าเกณฑ์กำหนดเพียงเล็กน้อยแต่ยังไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบ

การวิเคราะห์ผล modified youden plot ของไทป์ O, A และ Asia1 โดยแสดงค่า PI ระหว่างซีรัม 2 ตัวอย่างจากทุก Lab นำมา plot ค่าจุดตัดระหว่างแกน X และ แกน Y และหาพื้นที่ค่า mean ± 1SD เทียบกับค่า Reference (REF) data สรุปโดยภาพรวมในรูปแผนภูมิที่ 7 แสดงค่า modified youden plot ค่า PI ของตัวอย่างเบอร์ 3 และเบอร์ 5 ของไทป์ O ของแต่ละ Lab และค่า ของ REF data พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย ยกเว้น Lab 11, Lab 12 และ Lab 16 เป็นที่น่าสังเกตว่า Lab 7 มีการค่า PI เบี่ยงเบนไปจากค่าเกณฑ์เฉลี่ยมาก เมื่อตรวจดูรายละเอียดในแบบสอบถามและบันทึกแบบฟอร์มตอบผลการทดสอบ พบว่ามี systematic error ของกระบวนการทดสอบ ทำให้ผลการทดสอบไม่เป็นไปตามที่กำหนด คือ พบว่าค่า LP ELISA titer ต่ากว่า Lab อื่นๆ และต่ำกว่าค่าอ้างอิง จากรูปแผนภูมิที่ 8 แสดงค่า modified youden plot ค่า PI ของตัวอย่างซีรัมเบอร์ 4 และเบอร์ 2 ของไทป์ A พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย ยกเว้น Lab 2, Lab 4, Lab 11, Lab 12 และ Lab 16 จากรูปแผนภูมิที่ 9 แสดงค่า modified youden plot ค่า PI ของตัวอย่างซีรัมเบอร์ 2 และเบอร์ 4 ของไทป์ Asia1 ค่า PI ของแต่ละ Lab ยังมีการกระจายของ Lab 2, Lab 4 ,Lab 6 และ Lab 10 อยู่นอกเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย (mean ± 1SD)

ผลเฉลี่ยการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1และ ผล NSP test ของตัวอย่างซีรัม เบอร์ 1-5 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2 ผลการตรวจ NSP test ปรากฏว่าทุกหน่วยงานใช้ NS reagent kit ของ 3ABC NS reagent kit (PrioCheck) Blocking ELISA เป็นหลัก ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด คือ ซีรัมเบอร์ 3 ได้ผลบวก (positive) ซึ่งเป็นซีรัมจากสัตว์ที่ได้รับการ challenge ด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O ส่วนตัวอย่างซีรัมอื่นๆ เช่น เบอร์ 2, 4, 5 ให้ผลลบ เนื่องจากเป็นซีรัมจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน trivalent ส่วนตัวอย่างซีรัมเบอร์ 1 ให้ผลเป็นลบเช่นกัน เพราะเป็นตัวอย่าง negative serum ในการทดสอบครั้งนี้ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ได้มีการทดสอบ NSP test โดยใช้ 3B NSP (UBI) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผล 3 ABC NSP (PrioCheck) เช่นกัน ส่วน Lab อื่นๆ ไม่มีการใช้ 3B NSP (UBI)

ข้อสรุปจากแบบสอบถามเกี่ยวกับศักยภาพห้องปฏิบัติการ(laboratory capacity) ของหน่วยงานต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่ การดูแลเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีผลกระทบต่อการทดสอบ ระบบผลิตน้ำกลั่นหรือน้ำ deionized water ระบบกระแสไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศ เครื่อง standby generator การเก็บรักษาตัวอย่างและสารตรวจสอบ การสอบเทียบเครื่องมือหลักที่มีผลกระทบต่อการทดสอบได้แก่ incubator, micropipette และ ELISA Reader เหล่านี้เป็นต้น พบว่าศักยภาพห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีขีดความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทาง serology test โดยวิธี LP ELISA และ NSPs test เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O, A และ Asia1 และตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อและสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนตามลำดับ ส่วนการตรวจจำแนกชนิดไวรัสจะใช้วิธี ELISA typing เป็นหลัก ชุดสารตรวจสอบที่ใช้มีแหล่งผลิตอยู่ 2 แหล่งคือ หน่วยงาน World Reference Laboratory (WRL), Pirbright ประเทศอังกฤษและหน่วยงานศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ ซึ่งวิธีการทดสอบดังกล่าวได้ผ่านการยอมรับในด้าน harmonization test method มาแล้วในการประชุมเครือข่ายห้องปฏิบัติการระดับภูมิภาคของ SEACFMD Lab network และระดับนานาชาติของ OIE FMD Reference Lab network ส่วนด้านการสอบเทียบเครื่องมือหลักและการทวนสอบ micropipette นั้น ส่วนใหญ่ห้องปฏิบัติการในประเทศไทยทั้งหมดได้ดำเนินการสอบเทียบประจำทุกปีและได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025:2005 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ส่วนห้องปฏิบัติการต่างประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยังอยู่ระหว่างการดำเนินงานซึ่งยังไม่แล้วเสร็จ สรุปผลการประกันคุณภาพการทดสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยภายใต้เครือข่ายห้องปฏิบัติการ SEACFMD Lab network พบว่าทุกหน่วยงานมีขีดความสามารถในการทดสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้งด้าน antigen detection ด้วยวิธี ELISA typing test และด้าน antibody detection ด้วยวิธี LP ELISA และ NSP test นอกจากนี้ยังเป็นการทดสอบความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานเพื่อให้มั่นใจว่าได้ผลการทดสอบคงที่ ถูกต้องตามหลักวิชาการและยังเป็นการยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการให้ได้รับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำโครงการขอขอบคุณ Dr. Ronello Abila, OIE-SRR และ OIE-RCU ในการสนับสนุนงบประมาณค่าใช้จ่ายในการเตรียมชุดสารตรวจสอบ ตัวอย่าง unknown antigen และ unknown serum ให้กับห้องปฏิบัติการในโครงการ SEACFMD Control Campaign ครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการจัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์และสารตรวจสอบในโครงการให้สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 ศูนย์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและเจ้าหน้าที่ SEACFMD National Laboratory ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมทดสอบตัวอย่างภายใต้โครงการดังกล่าว จนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection and typing of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-001 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 7-14

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Measurement of antibody titer of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-002 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 6-15

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3B non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection of antibody to 3B non structure protein of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-003 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 5-9

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structure proteinของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection of antibody to 3ABC non structure protein of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-004 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 5-12

Axel Colling (1998). The External Quality Assurance Programme for use with the FAO/IAEA FMD LPB-Antibody ELISA, Animal production and Health Section. FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seiberdoft, Austria

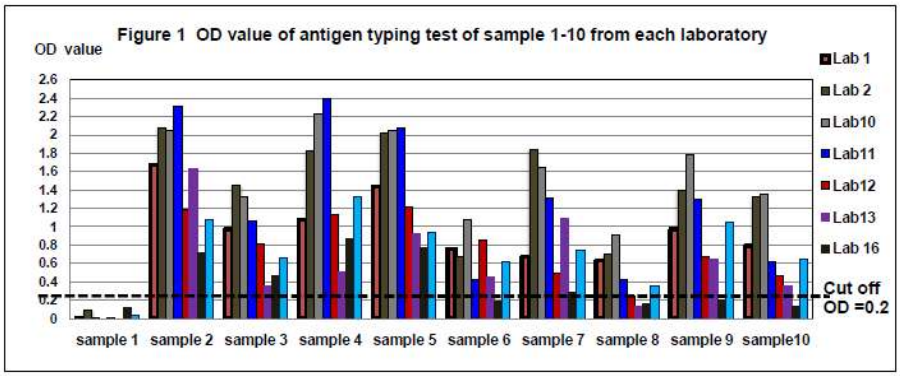
Linchongsubongkoch, W. and Janukit,T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference. pp. 62-72.

Linchongsubongkoch, W., Ounpomma, D. and Thongtha, P. 2004. The use of various non structural protein kits to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus. J. Thai Vet. Med. Assoc. 55(2): 21-30.

Roder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

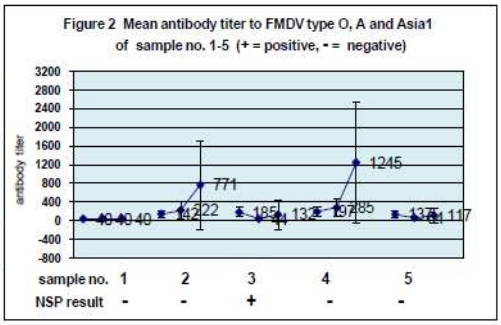
ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจ ELISA typing จากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมเครือข่าย เพื่อตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจาก unknown sample จำนวน 10 ตัวอย่าง การแปรผลอ่านเป็นบวกต่อไทป์ O, A, Asia1 และ no virus detected (NVD)

ELISA typing result (cut off OD = 0.2, defined as positive)		
Sample 1 = No virus detected (NVD)	Sample 5 = A positive	Sample 9 = Asia 1 positive
Sample 2 = O positive	Sample 6 = A positive	Sample 10 = O positive
Sample 3 = A positive	Sample 7 = Asia1 positive	
Sample 4 = Asia1 positive	Sample 8 = O positive	



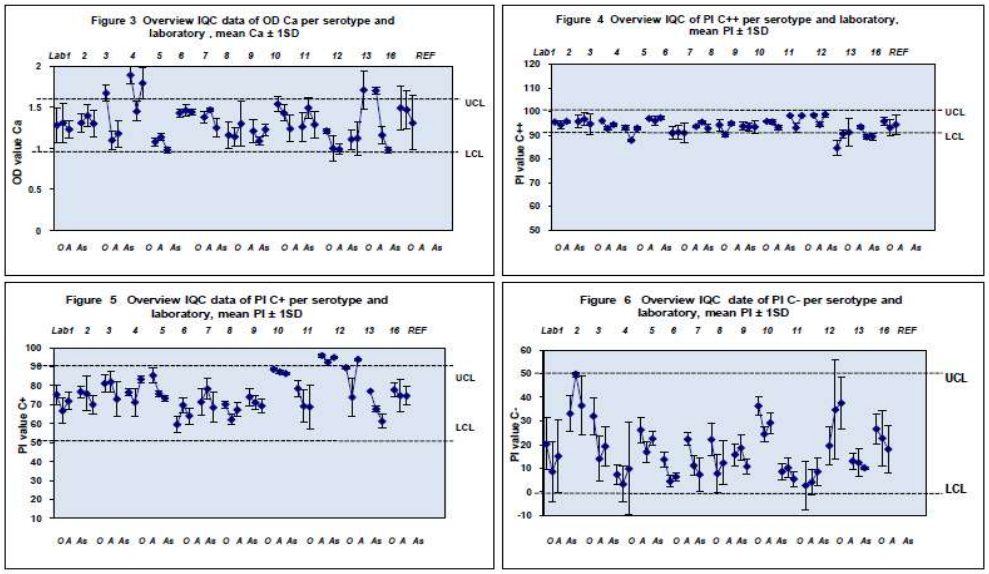
รูปภาพที่ 1 แสดงค่า optical density (OD) ELISA typing ของ unknown sample จำนวน 10 ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมเครือข่าย ค่า cut off ที่ OD = 0.2 (OD>0.2 อ่านผล positive)

Table 2 Acceptance limit for IQC value of the control panel in LP ELSA test		
	Lower control limit (LCL)	Upper control limit (UCL)
Ca (OD)	0.9	1.5
PI, C++	90	100
PI, C+	50	89
PI ,C-	0	49

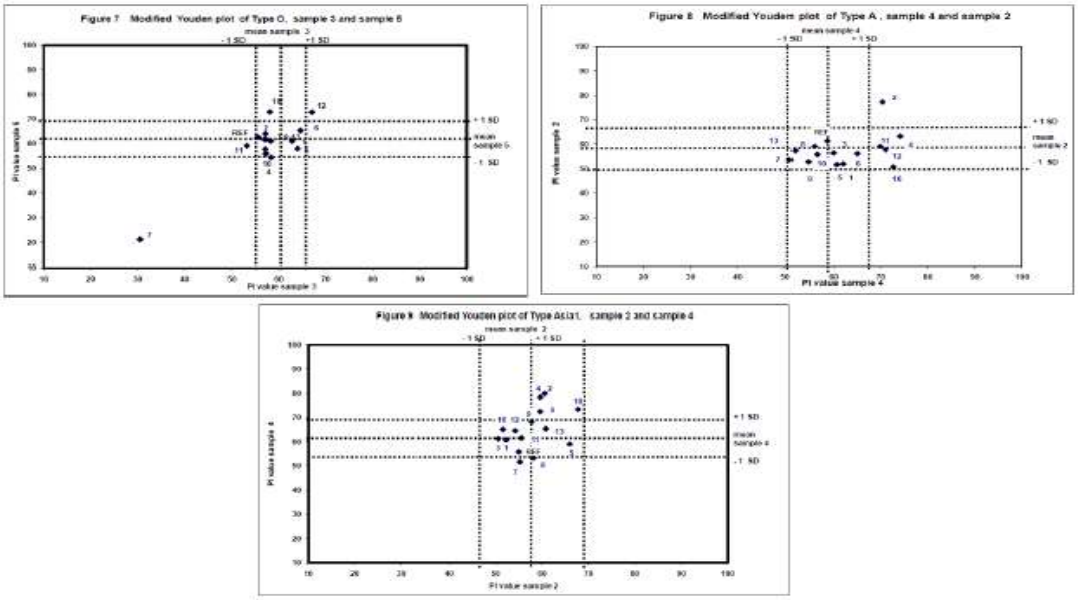


ตารางที่ 2 แสดงค่าเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับของ control panel: OD antigen control, percent inhibition (PI) ของ strong positive, weak positive และ negative control serum

รูปแผนภูมิที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยระดับแอนตบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี LP ELISA และ NSP test ของตัวอย่างซีรัมเบอร์ 1-5 ซึ่งทดสอบโดยห้องปฏิบัติการทั้งหมด



รูปภาพที่ 3, 4, 5 และ 6 แสดงค่า internal quality control (IQC) ของ control panel ได้แก่ antigen control (Ca) PI ของ strong positive, weak positive และ negative serum ในการตรวจ LP ELISA ต่อ ไทป์ O, A และ Asia1 ตามลำดับ



รูปภาพที่ 7, 8 และ 9 แสดงค่า modified youden plot ของค่า PI ระหว่าง 2 ตัวอย่างของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O, A และ Asia1 จากห้องปฏิบัติการเครือข่าย

Quality assurance of testing for foot and mouth disease laboratories network

Wilai Linchongsubongkoch[1] Dilok Aunpomma[2] Kingkarn Boonsuya Seeyo[3]
Sopha Sinkleebuth[3] Janya Samanit[3] Piyaporn Chareonpol[3]

Abstract

The quality assurance of testing for foot and mouth disease laboratories network in Southeast Asia (SEA) region were conducted by organizing an interlaboratory comparison exercise programme of foot and mouth disease (FMD) testing. Total 16 FMD laboratories were participated consisting of 9 laboratories within Thailand such as seven regional Veterinary Research and Development Centers, National Institute of Animal Health and Regional Reference Laboratory for FMD in SEA and seven foreign laboratories from Cambodia, Lao PDR, Philippines, Malaysia, Myanmar and Vietnam (Hanoi and Ho Chi Minh). The complete set of samples and materials which consist of 10 unknown antigen, 5 unknown serum, reagent kits, and questionnaires for recording of test result, equipment, materials, buffers and others were distributed to all participating laboratories. The test methods used in this exercise programme were ELISA typing test for FMDV detection, the liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) for detection of antibody to FMDV type O, A and Asia1 and the non structural protein (NSP) test for detection of antibody to NSP of FMDV. The analysis of test results would be demonstrated as the internal quality control (IQC) chart of the control panels, modified youden plot of percent inhibition (PI) and the mean of antibody titer to FMDV type O, A and Asia1. In general conclusion, the outcome of analysis results from participating laboratories were indicated the similar results and within the acceptance limits. All laboratories had competence in testing of foot and mouth disease virus both antigen detection by ELISA typing and antibody detection by LP ELISA and NSP. Furthermore, this exercise programme would be useful for proficiency testing of the laboratory technician to ensure that the test had been performed correctly and was in technically valid. This exercise would be enhance the capability and upgrade the laboratory quality standard to meet the ISO/IEC 17025:2005.

Key words: Quality assurance, foot and mouth disease, laboratory network

[1] FMD Expert, Consultant of Department of Livestock Development, National Institute of Animal Health, Bangkok

[2] Veterinary Research and Development Center (Upper Northeastern Region), Department of Livestock Development, Khonkaen

[3] Regional Reference Laboratory for FMD in Southeast Asia, Department of Livestock Development, Nakhonratchasima

การเก็บ การบรรจุหีบห่อ และการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย อย่างปลอดภัยตามหลัก biosafety และ biosecurity

(Collection, packaging and transportation of specimens to foot and mouth disease diagnostic laboratory under the biosafety and biosecurity principles)

วิไล ลินจงสุบงกช[1]

หลักการและเหตุผล

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อง่ายและรวดเร็วในสัตว์กีบคู่ ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร อูฐ ช้าง และกวางเป็นต้น ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษกิจในด้านอุสาหกรรมปศุสัตว์อย่างมหาศาล สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) มีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ โอ (O) เอ (A) ซี (C) เอเชียวัน (Asia1) แซททวัน (SAT1) แซททู (SAT2) และ แซททรี (SAT3) ประเทศไทยพบระบาดอยู่ 3 ชนิดคือ โอ เอ และ เอเชียวัน ไวรัสแต่ละชนิดไม่ทำให้เกิดความคุ้มโรคข้ามซึ่งกันและกัน (cross immunity) การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยสังเกตจากอาการอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ เราไม่สามารถบ่งบอกหรือจำแนกชนิดไวรัสได้ จำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจจำแนกหรือบ่งบอกชนิดของไวรัสได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ปัจจุบันการตรวจหาไวรัสและจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing และการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยวิธี LP ELISA และ non structure protein (NSP) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบที่ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง ดังนั้นการเก็บตัวอย่างที่ดีและมีคุณภาพรวมถึงขั้นตอนการบรรจุหีบห่อและการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการอย่างถูกต้องและปลอดภัยตามหลัก biosafety and biosecurity จึงเป็นสิ่งสำคัญและควรปฏิบัติ เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ การควบคุมและกำจัดโรคในพื้นที่ให้บรรลุผลสำเร็จ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่ไม่ให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสในขณะเก็บตัวอย่างหรือสัมผัสสัตว์ป่วยและยังต้องคำนึงถึงมาตรการการป้องกันไม่ให้เกิดโอกาสเสี่ยงต่อการรั่วไหลของไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมในขณะขนส่งหีบห่อบรรจุตัวอย่างจากต้นทางไปสู่ปลายทางเช่นกัน

---

[1]ผู้เชี่ยวชาญโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

วัตถุประสงค์

เพื่อรักษาคุณภาพตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อเยื่อจากรอยโรค (tissue lesion) ซีรัม (serum) หรือน้ำเหลืองจากตุ่ม (vesicular fluid) และหีบห่อตัวอย่างให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ขณะขนส่งตั้งแต่ต้นทางจนถึงปลายทางได้อย่างปลอดภัยและถูกต้องตามหลักการ biosafety และ biosecurity เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดโอกาสเสี่ยงต่อการรั่วไหลของเชื้อไปสู่บริเวณใกล้เคียงหรือสิ่งแวดล้อม

ขอบข่าย

เป็นวิธีการจัดเตรียมตัวอย่างที่เป็นชนิด infectious substance และ non infectious substance ให้ถูกต้องตามหลักการ biosafety และ biosecurity ทั้งนี้ครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ การบรรจุหีบห่อหรือภาชนะที่ปลอดภัยและขั้นตอนการขนส่งจากต้นทางถึงปลายทาง

นิยาม

- Infectious substance หมายถึง สารหรือจุลลินทรีย์ก่อโรคหรือสิ่งของที่มีเชื้อโรคปะปนอยู่ และยังคงมีคุณสมบัติหรือความรุนแรงซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคได้ และมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตเช่นคนและสัตว์
- Non infectious substance หมายถึง สารหรือจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสิ่งของที่มีเชื้อโรคปะปนแต่ไม่มีความรุนแรงและหมดคุณสมบัติในการก่อโรคและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตเช่น คนและสัตว์

รูปภาพที่ 1 แสดงอาการของสัตว์ที่ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย ลักษณะรอยโรคและบริเวณที่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

วิธีและขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการตรวจวินิจฉัยและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ให้ความจำเพาะ ความไวและความแม่นยำสูงที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ คือการตรวจตัวอย่างที่เก็บจากเนื้อเยื่อ

จากรอยโรค (lesion) ที่บริเวณเยื่อลิ้นและอุ้งกีบจากสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่สงสัยว่าป่วย กรณีที่สัตว์ป่วยที่อายุน้อยอาจตายอย่างเฉียบพลัน สามารถเก็บตัวอย่างจากกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งมีลักษณะเป็น tiger heart รวมถึงการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยกซีรัม มีดังนี้

1. <u>วิธีเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ (epithelium) และ vesicular fluid</u>

1.1 บริเวณที่สามารถเก็บเชื้อได้คือ ตุ่มหรือแผลที่ลิ้น เยื่อบุภายในช่องปาก แผลที่กีบ ไรกีบ ซอกกีบ หรืออุ้งกีบ โดยทำความสะอาดบริเวณนั้นด้วยน้ำสะอาดก่อน

1.2. ขนาดของเนื้อเยื่อควรเก็บเชื้อไม่น้อยกว่า 1 กรัม ถ้าเห็นว่าเก็บเนื้อเยื่อจากสัตว์ตัวหนึ่งๆได้น้อยก็ควรเก็บจากตัวอื่นเพิ่มด้วย และแยกขวดเป็นตัวๆไป

1.3. เก็บเนื้อเยื่อบรรจุลงในขวดที่มีน้ำยา 50% กลีเซอรีนบัพเฟอร์ ใส่ให้น้ำยาให้ท่วมเนื้อเยื่อ ปิดจุกให้แน่น ปิดทับด้วยเทปกันน้ำยารั่วไหล ทำเครื่องหมายขวดให้ชัดเจน

1.4 ทำความสะอาดขวดและฆ่าเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนรอบผิวขวดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เช่น 0.25% speedyne, 0.5% glutaraldehyde หรือ 4% Na_2CO_3 (พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์และคณะ, 2543)

1.5 หากพบตุ่มใสที่ลิ้น, อุ้งเท้า, ไรกีบ ของโคและสุกร ซึ่งมักพบในสัตว์ที่เพิ่งเป็นโรคใหม่ๆ หากสามารถเก็บน้ำเหลืองจากตุ่มใสที่แผลโดยตรงส่งไปได้ก็จะเป็นการดียิ่ง ควรเก็บก่อนที่ตุ่มใสจะแตกโดยใช้เข็มและไซริงค์ดูด และเก็บในขวดที่สะอาด แช่ในกระติกน้ำแข็งที่มี ice pack เพื่อรักษาความเย็นแล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

รูปภาพที่ 2 แสดงการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีคุณภาพ บรรจุลงในขวดที่มี 50% glycerine buffer แช่ให้ท่วมเนื้อเยื่อ

1.6 ขวดบรรจุตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือ vesicular fluid (primary container) ให้ห่อทับด้วยกระดาษหลายๆชั้นบรรจุในขวดที่มีฝาเกลียวปิดสนิทอีกชั้น (secondary container) เพื่อป้องกันการรั่วไหลหรือกันขวดแตก แล้วบรรจุกล่องหรือภาชนะที่แข็งแรงไม่แตกง่าย พร้อมเอกสารบันทึกประวัติสัตว์ป่วย **<u>รีบนำส่งทันที</u>** หรือในกรณีจำเป็นต้องเก็บไว้ก่อนควรเก็บในตู้เย็น วิธีนำส่งที่ดีที่สุดคือนำส่งในสภาพแช่เย็นโดย

บรรจุ ice pack เพียงพอจนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการ หรือกรณีจัดส่งทางไปษณีย์โดยใส่ขวดที่มีตัวอย่างใส่ลงในขวดโลหะหรือขวดพลาสติกอีกชั้นและห่อหุ้มด้วยกระดาษซับเพื่อป้องกันการรั่วไหลและกันกระแทก บรรจุภาชนะลงในกล่องโฟมหรือกล่องพัสดุที่แข็งแรง เพื่อป้องกันกล่องเกิดการชำรุดหรือเสียหายในขณะขนส่ง

1.7 ให้เช็ดทำความสะอาดบริเวณรอบนอกกล่องบรรจุด้วยน้ำยาฆ่าเชื้ออีกครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อไวรัสและและให้มั่นใจว่าการบรรจุตัวอย่างและการขนส่งหีบห่อมีความปลอดภัยตามหลัก biosafety and biosecurity

รูปภาพที่ 3 แสดงภาชนะบรรจุตัวอย่างหรือ primary container และ secondary container สำหรับใส่ขวดที่มีตัวอย่างเนื้อเยื่อ ก่อนใส่ลงในหีบห่อภายนอกหรือกล่องที่แข็งแรง

รูปภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ไม่มีคุณภาพ การบรรจุหีบห่อหรือภาชนะที่ไม่แข็งแรงซึ่งไม่ถูกต้องและไม่มีความปลอดภัยทาง biosafety and biosecurity

หมายเหตุ

- การเก็บตัวอย่างเชื้อควรเก็บจากแผลหรือเนื้อเยื่อจากสัตว์ที่เพิ่งเป็นโรคใหม่ๆเพราะจะมีปริมาณไวรัสมากเพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค

- ห้ามใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น ทิงเจอร์ หรือ gentian ทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่จะส่งไปตรวจเพราะจะทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้

- ภายหลังการเก็บตัวอย่างเชื้อใส่ขวดเรียบร้อยแล้วควรทำความสะอาดภายนอกขวดและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนมือผู้เก็บตัวอย่างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแพร่กระจายหรือระบาดไปสู่ที่อื่นหรือสิ่งแวดล้อม เพราะอาจทำให้เกิดโรคระบาดได้

2. <u>วิธีเก็บตัวอย่างซีรัม</u>

กรณีการเก็บตัวอย่างซีรัมหรือน้ำเหลือง ไม่สามารถใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อจำแนกชนิดไวรัส (ELISA typing) ได้ จะใช้เพื่อจุดประสงค์สำหรับตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันและตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อเท่านั้น วิธีปฏิบัติดังนี้

2.1 ให้ใช้ไซริงค์และหลอดเก็บเลือดที่แห้งและสะอาด ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 เจาะเลือดเสร็จแล้วให้วางหลอดในแนวเอียง เพื่อให้การแยกซีรัมได้ดีขึ้น

2.3 ควรวางในอุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง เพื่อให้การแยกซีรัมจากเกล็ดเลือดได้มากขึ้น ไม่ควรนำหลอดเลือดที่เพิ่งเจาะมาใหม่เข้าตู้เย็นทันทีเพราะทำให้ซีรัมไม่แยกชั้นหรือแยกได้น้อย ห้ามปั่นหลอดเลือดที่ยังไม่ได้ทำการถ่ายซีรัมออก เพราะจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเกิด hemolysis จะมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัย

2.4 แยกซีรัมแล้ว ถ่ายใส่หลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียว ปิดฝาให้สนิทกันการรั่วไหล กรณีไม่สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการได้ทันที ให้เก็บในตู้แช่แข็ง -20 ^{o}C ทั้งนี้เป็นการเก็บรักษาคุณภาพซีรัมให้มี ความคงทนและป้องกันการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในซีรัม หากต้องเก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์

รูปภาพที่ 5 แสดงการเก็บตัวอย่างซีรัมและการบรรจุตัวอย่างลงในภาชนะที่แข็งแรงได้มาตรฐานหรือเทียบเท่า

การบรรจุหีบห่อและการขนส่ง

เมื่อต้องการนำหีบห่อตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการให้ดำเนินการดังนี้

1. รวบรวมหลอดตัวอย่างทั้งหมดลงในถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่นกันการรั่วไหล บรรจุลงในกระป๋องหรือภาชนะที่มีฝาปิด ปิดฝากระป๋องให้สนิท

2. เช็ดทำความสะอาดและฆ่าเชื้อไวรัสที่อาจปนเปื้อนมากับหลอดหรือด้านนอกกระป๋องด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เช่น 0.25% speedyne 0.5% glutaraldehyde หรือ 4% Na_2CO_3

3. นำภาชนะบรรจุตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงในกล่องโฟมที่แข็งแรงหรือ standard container หรือเทียบเท่า ที่มี ice pack เพียงพอเพื่อรักษาความเย็นได้ตลอดการขนส่ง

4. ต้องมีเอกสารประกอบการจัดส่งแนบมาทุกครั้ง ซึ่งประกอบด้วย หนังสือ/บันทึกจากหน่วยงานโดยมีลายเซ็นของหัวหน้าหน่วยงานหรือรักษาการแทน ประวัติตัวอย่างและเอกสารที่เกี่ยวข้องพร้อมที่อยู่ผู้ส่ง ให้ใส่ลงข้างกล่องเพื่อสะดวกในการตอบผลกลับ

5. เช็ดบริเวณรอบนอกกล่อง หรือ standard container อีกครั้งด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อมั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนหรือการรั่วไหลของเชื้อไวรัสจากกล่องหรือภาชนะในขณะขนส่งและมีความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลัก biosecurity

6. รีบนำส่งห้องปฏิบัติการ ไม่ควรแวะไปที่หน่วยงานอื่นระหว่างนำส่ง เพื่อป้องกันการหกหล่นหรือการแพร่เชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อมต่าง ๆ กรณีตัวอย่างซีรัมให้นำส่งห้องปฏิบัติการด้วยตนเองเท่านั้น โดยนำส่งในสภาพเย็นโดยมี ice pack บรรจุอยู่ หากยังไม่สามารถนำส่งทันทีให้เก็บในช่องแช่แข็ง -20 °C ห้ามส่งตัวอย่างซีรัมทางไปรษณีย์หรือรถขนส่งต่างๆ โดยเด็ดขาด ยกเว้นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่ใน 50% glycerine buffer สามารถจัดส่งทางไปรษณีย์ได้

รูปภาพที่ 6 แสดงการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาที่มีประสิทธิภาพ บริเวณรอบถุงพลาสติกและภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง ภายหลังการบรรจุเรียบร้อยแล้ว เพื่อมั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไปสู่ภายนอก

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค

เมื่อหีบห่อหรือภาชนะบรรจุตัวอย่างถูกส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ มีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

1. เจ้าหน้าที่รับตัวอย่างจะดำเนินการรับตัวอย่างและลงเลขที่รับของศูนย์ ตรวจสอบสภาพหีบห่อหรือภาชนะที่บรรจุตัวอย่าง พร้อมเอกสารที่แนบมากับหีบห่อในเบื้องต้นก่อน จากนั้นส่งต่อเข้าห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องโดยการตรวจสอบเอกสาร ประวัติและพิจารณาคำร้องขอจากความต้องการของลูกค้าและพิจารณาจากชนิดของตัวอย่างและชนิดของการทดสอบ ซึ่งจะดำเนินการทดสอบทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน 17025 : 2005 ได้แก่

2. ELISA typing เป็นวิธีการตรวจหาไวรัสและจำแนกชนิดไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือจาก vesicular fluid จะดำเนินการทดสอบตามคู่มือวิธีทดสอบ (test method) RRL-T-001 ของเอกสารในระบบคุณภาพ

3. Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) เป็นการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างซีรัม จะดำเนินการทดสอบตามคู่มือวิธีทดสอบ (test method) RRL-T-002 ของเอกสารในระบบคุณภาพ

4. ตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein (NSP) test ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งวิธีนี้เป็นการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน (differentiate infection from vaccination animal or DIVA) จะดำเนินตามคู่มือวิธีทดสอบ (test method) RRL-T-003 และ RRL-T-004 ของเอกสารในระบบคุณภาพ

5. การรายงานผลการตรวจสอบ จะดำเนินการจัดส่งทางจดหมายอีเล็กทรอนิกส์ โทรสาร หรือทางไปรษณีย์

6. หน่วยงานที่ต้องจัดส่งรายงานคือ สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ (สคบ.) เจ้าของพื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง สำนักงานปศุสัตว์เขต และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection and typing of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-001 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 7-14

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Measurement of antibody titer of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-002 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 6-15

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3B non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection of antibody to 3B non structure protein of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-003 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 5-9

คู่มือวิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structure protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Detection of antibody to 3ABC non structure protein of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ RRL-T-004 ฉบับที่ 3 แก้ไขครั้งที่ 0 ลงวันที่ 12 มกราคม 2554 หน้า 5-12

พยนต์ สินสุวงค์วัฒน์ วิไล ลินจงสุบงกช ธนรัตน์ จานุกิจ และสุนันท์ ร่มลำดวน 2543 ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆในการฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 หน้า 85-93

Kitching, R.P and Donaldson, A.L. 1987. Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 6(1): 263-272.

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน : การทำเป็นอีมัลชั่นและความคุ้มโรคตาม OIE

(Foot and mouth disease oil adjuvant vaccine for pig: Emulsification and its potency based on OIE standard)

นริศ ว่องวัฒนากูล[1]

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดรุนแรงในสัตว์กีบคู่ จัดอยู่ในกลุ่มโรคประเภท A โดย Office International des Epizooties, OIE หรือ World Organization for Animal Health (องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD virus) ที่มีสายพันธุกรรมชนิด RNA จัดอยู่ใน Family Picornaviridae, Genus Apthovirus ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดทั่วโลกมี 7 ชนิด (serotype) คือ Type O, A, C, Asia1, South African Territories1 (SAT1), SAT2, SAT3 ส่วนประเทศไทยพบมีการระบาด 3 serotype คือ O_{189}, A (3 subtype คือ A_{118}, $A_{สกล}$, $A_{ลพบุรี}$), Asia1

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์นั้น เป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน อยู่ในรูปน้ำมันในน้ำ (oil in water, O/W) ที่อุณหภูมิเก็บรักษา 4°C ซึ่งวัคซีนรูปแบบนี้มีข้อดี คือ มี Oily phase เป็นตัวจับแอนติเจน แล้วค่อย ๆ ปล่อยออกมากระตุ้นร่างกายให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนั้น โดยไปกระตุ้น T – lymphocyte และ lymphocyte ใน lymph node ร่วมกันสร้าง antibody ได้ยาวนานขึ้น (พยนต์, 2547) และมีความหนืดต่ำ ฉีดง่าย ความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 ปี โดยไม่แยกชั้น

เทคนิคการผสมวัคซีนชนิดน้ำมัน ต้องอาศัยความเหมาะสมของสัดส่วน เช่น ตัวทำอีมัลชั่น (emulsifier) เทคนิคการผสม อุณหภูมิ เวลา และอัตราเร็วที่ใช้ในการผสมเป็นสำคัญ ผู้ปฏิบัติควรมีความรู้เกี่ยวกับการทำอีมัลชั่นเป็นอย่างดี

กำเนิดตึก F (วัชรี, 2553)

ปี พ.ศ.2499 ขุนพิจิตรพาหนการ อธิบดีกรมปศุสัตว์ และ Dr. R.P. Jones ที่ปรึกษาสัตวแพทย์ ตั้งงบประมาณสถานปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย ที่บ้านหนองสาหร่าย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

ปี พ.ศ.2501 เริ่มผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดโมโนวาเลนท์ออกใช้ชุดแรกราวปลายเดือนธันวาคม โดยวิธี Frenkel's จากเยื่อลิ้นวัว จึงถือวันที่ 22 ธันวาคม 2501 เป็นวันคล้ายวันสถาปนาตึก F ซึ่งในระยะแรก ๆ เป็นแผนกหนึ่งในสังกัดสถานวิทยาศาสตร์ปากช่อง

[1]นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

ปี พ.ศ.2516 ได้มีพระราชกฤษฎีกาแบ่งส่วนราชการกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ขึ้นใหม่ เปลี่ยนชื่อกองวัคซีนและเซรุ่มเป็น “กองผลิตชีวภัณฑ์” ที่ประกอบด้วย สถานวิทยาศาสตร์ปากช่องที่เปลี่ยนชื่อเป็น “ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์” และแผนกผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยยกฐานะขึ้นเป็น “ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย” (ชื่อย่อเรียกว่า ตึก F) ซึ่งทั้ง 2 ศูนย์ขึ้นตรงต่อกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีหน้าที่ ตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากเชื้อในท้องที่ที่ระบาดทั่วประเทศและผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี Frenkel’s จากเยื่อลิ้นวัว และผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบไทป์เดียว (Monovalent Vaccine) โดยวิธี Stationary Monolayer Cell Culture Method in Roux Flask

ปี พ.ศ.2518 รัฐบาลญี่ปุ่นได้ให้ความช่วยเหลือแบบให้เปล่าด้วยเงินประมาณ 199 ล้านเยน (133 ล้านบาท) ก่อสร้างอาคาร (ยังเรียกว่า ตึก F; หลังปี พ.ศ.2533 เรียก ตึก F1) และให้เครื่องมืออุปกรณ์ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบ Suspension Cell Culture และแบบ Stationary Monolayer Cell Culture แบบ Roller Bottle โดยผลิตวัคซีนแบบ Monovalent ไทป์ O, ไทป์ A และไทป์ Asia1 เพราะการใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมีความต้องการสูง ทำให้วัคซีนไม่เพียงพอต่อการฉีดป้องกันโรค

ปี พ.ศ.2530 ความต้องการวัคซีนเพิ่มมากขึ้น มีการเลี้ยงโค กระบือ สุกรเพิ่มมากขึ้น การผลิตวัคซีนไม่เพียงพอ วัคซีนฉีดยาก เพราะต้องฉีดทีละไทป์ ทำให้ไม่สะดวกในการใช้งาน รัฐบาลจึงได้จัดทำ **“โครงการขยายการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย”** (ตึก F2) โดยซื้อ Know How จากบริษัท Rhone Merieux ประเทศฝรั่งเศส และสร้างเสร็จปี พ.ศ.2533 ใช้งบประมาณประมาณ 800 ล้านบาท (ไม่รวมภาษีต่าง ๆ)

ปี พ.ศ.2533 ตึก F2 ทำการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโคกระบือชนิดน้ำ (Aqueous Vaccine) แบบไทป์เดียว หรือ Monovalent Vaccine, แบบรวม 2 ไทป์ หรือ Bivalent Vaccine และแบบรวม 3 ไทป์ หรือ Trivalent Vaccine และผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมันแบบไทป์เดียว, แบบรวม 2 ไทป์ และแบบรวม 3 ไทป์ การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) ได้ใช้ Know How ของบริษัท Rhone Merieux วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 60% ขึ้นไป

ปี พ.ศ.2544 คำสั่งภายในกรมปศุสัตว์ ได้ตั้งศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยเป็น “กองโรคปากและเท้าเปื่อย” ตามคำสั่งกรมปศุสัตว์ที่ 638/2544 ลงวันที่ 28 กันยายน 2544

ปี พ.ศ.2545 มีการปรับโครงสร้างระบบราชการทั่วประเทศ ซึ่งได้มีการปรับโครงสร้างกรมปศุสัตว์ใหม่ มีการยุบกองโรคปากและเท้าเปื่อย เปลี่ยนเป็นฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย และเปลี่ยนกองผลิตชีวภัณฑ์เป็น “สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์” (วัชรี, 2553)

ก่อนที่จะกล่าวถึงการผลิต และการทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน ผู้เขียนขอกล่าวหลักการที่เกี่ยวกับอีมัลชั่น

หลักการวิธีทำอีมัลชั่นของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอีมัลชั่น (พิมพร, 2534; มัณฑนา, 2552)

อีมัลชั่น (Emulsion) หมายถึง ผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่ง ที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ถูกนำมาผสมผสานให้เข้ากันได้โดยตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier)

ส่วนประกอบหลักที่สำคัญ 3 ส่วน คือ

1. วัตภาคภายใน (Internal หรือ Dispersed Phase) อาจเป็นวัตภาคน้ำ (Water หรือ Aqueous Phase) หรือ วัตภาคน้ำมัน (Oily Phase) ซึ่งเป็นหยดเล็ก ๆ ของของเหลวชนิดหนึ่งที่กระจายตัวแทรกอยู่ภายใน

2. วัตภาคภายนอก (External หรือ Continuous Phase) อาจเป็นวัตภาคน้ำ (Water หรือ Aqueous Phase) หรือ วัตภาคน้ำมัน (Oily Phase) ซึ่งเป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่ง

3. ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ที่ทำให้ทั้ง 2 วัตภาคมาผสมผสานให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ มีหลายชนิด ชนิดที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน คือ สารลดแรงตึงผิว

การแบ่งชนิดของอีมัลชั่น

เช่น แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัตภาคภายในและวัตภาคภายนอก ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O Emulsion) วัตภาคภายในเป็นน้ำ วัตภาคภายนอกเป็นน้ำมัน

2. อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W Emulsion) วัตภาคภายในเป็นน้ำมัน วัตภาคภายนอกเป็นน้ำ

3. อีมัลชั่นเชิงซ้อน (Multiple Emulsion) วัตภาคภายในซ้อนกันอยู่ เช่น W/O/W (วัตภาคภายในเป็นน้ำในน้ำมัน และภายนอกเป็นน้ำ) หรือ O/W/O (วัตภาคภายในเป็นน้ำมันในน้ำ และภายนอกเป็นน้ำมัน)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชนิดของอีมัลชั่น

1. ชนิดของตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier)

ตัวทำอีมัลชั่นจะกำหนดชนิดของอีมัลชั่นได้จากค่าการละลาย โดยยึดหลักว่า ตัวทำอีมัลชั่น ละลายดีในวัตภาคใด วัตภาคนั้นจะเป็นวัตภาคภายนอก โดยหลักนี้จะต้องสัมพันธ์สอดคล้องกับปัจจัยในข้อ 2 คือ อัตราส่วนของวัตภาคน้ำกับน้ำมันที่มีในสูตรตำรับ และปัจจัยข้อ 3 คือ ลำดับการผสม เช่น สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) เป็นสารที่ชอบน้ำและชอบน้ำมัน การละลายทราบได้จากค่า HLB number ค่านี้ถูกกำหนดขึ้นจากการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Non – ionic Surfactant) ในการกระจายตัวในน้ำ

ค่า HLB สูง คือ 8 – 18 จะละลายน้ำได้ ทำให้เกิดอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W)

ค่า HLB ต่ำ คือ 4 – 6 จะละลายน้ำไม่ดี ทำให้เกิดอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O)

2. อัตราส่วนโดยปริมาตรของวัตภาคน้ำกับน้ำมัน (Phase Volume Ratio)

ตัวทำอีมัลชั่นที่ละลายดีในน้ำ จะทำให้เกิดอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) หลักนี้เป็นจริงได้เมื่อวัตภาคน้ำมัน (ภายใน) มีไม่เกิน 74% ถ้ามีปริมาณมากกว่านี้ จะเกิดการกลับวัตภาค (Phase Inversion) ทันทีกลายเป็นอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) และไม่คงสภาพเนื่องจากตัวทำอีมัลชั่นละลายดีในน้ำ

ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ที่ละลายดีในน้ำมัน จะทำให้เกิดอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O)

3. ลำดับการผสม (Order of Mixing)

โดยทั่วไปการผสม มักเติมของเหลวที่จะเป็นวัตภาคภายใน ลงไปในของเหลวอีกชนิด เช่น เติมน้ำลงในน้ำมันพร้อมกับผสมไปด้วย จึงได้อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) (โดยที่วัตภาคน้ำไม่เกิน 40%) แต่ถ้าเติมวัตภาคทั้งสองลงไปพร้อมกันแล้วคนผสมกัน จะได้อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) แทน (แม้มีอัตราส่วนของวัตภาคน้ำแค่ 20 – 30%) ในทำนองเดียวกันถ้าต้องการเตรียมอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ควรจะเติมวัตภาคน้ำมันลงในวัตภาคน้ำพร้อมกับผสมไปด้วย

<u>การใช้เทคนิคการกลับวัตภาค</u> (Phase Inversion Technique)

ใช้ได้เป็นผลดีในการเตรียมอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) และใช้ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ชนิดไม่มีประจุ (โดยเฉพาะกลุ่ม Polyoxyethylene) พบว่า การใช้เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) กลับเป็นผลดี กล่าวคือ ได้อีมัลชั่นเนื้อละเอียด (ขนาดหยดน้ำมันเล็กมาก) และมีความคงตัวดีกว่าการใช้เทคนิคผสมแบบธรรมดา ซึ่งจะต้องทราบค่า PIT (Phase Inversion Temperature) ของตัวทำอีมัลชั่นด้วย (โดยทั่วไปมีค่าประมาณ 65 - 80^{O}C)

เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) ทำได้โดยเติมวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันพร้อมกับผสมตลอดเวลา ณ ที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า PIT ขั้นแรกจะได้อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) ก่อน เพราะตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ละลายน้ำน้อยลง แต่ละลายน้ำมันเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิระหว่างการผสมลดลงมาต่ำกว่าค่า PIT ตัวทำอีมัลชั่นจะกลับมาละลายน้ำได้มากขึ้น และละลายน้ำมันลดลง อีมัลชั่นจะกลับวัตภาคกลายเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งมีหยดน้ำมันเล็กมากและคงตัวมากกว่าการเติมน้ำมันลงในน้ำแต่แรก

การเก็บรักษาอีมัลชั่นที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ชนิดไม่มีประจุนี้ จะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า PIT คือประมาณ 20 – 65^{O}C จะทำให้อีมัลชั่นคงตัว เพราะสารลดแรงตึงผิวยังคงละลายน้ำได้ดี

4. ความหนืด (Viscosity) ของแต่ละวัตภาค

การเพิ่มความหนืดให้แก่วัตภาคใด วัตภาคนั้นมีแนวโน้มที่จะเป็นวัตภาคภายนอก

การทดสอบชนิดของอีมัลชั่น

1. Dilution Test อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) เมื่อหยดลงในน้ำ จะกระจายตัวได้ดี แต่ถ้าเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) จะคงเป็นหยดบนผิวน้ำ แต่กระจายตัวดีในน้ำมัน ถ้าเป็นครีมหนืด จะต้องคนช่วย ถ้ากระจายขุ่นมัวในน้ำ จะเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) แต่ถ้าแลดูเป็นเงา และลอยเหนือผิวน้ำ จะเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O)

2. Dye Test ทดสอบโดยเติมสีชนิดละลายน้ำ เช่น methylene blue ลงในอีมัลชั่นและคน ถ้าสีละลายได้ดี จะเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) แต่ถ้าสียังคงเป็นเม็ด ๆ ไม่ละลาย จะเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) อาจใช้กล้องจุลทรรศน์ช่วย จะดูง่ายขึ้น ถ้าเห็นหยดน้ำมันใส ๆ กระจายในสี แสดงว่าเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) วิธีนี้ควรระวัง ถ้าสีมีประจุตรงข้ามกับตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) จะตกตะกอนและแยกได้

3. Conductivity Test เป็นการทดสอบความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ ถ้าเป็นอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งวัตภาคภายนอกเป็นน้ำ จะนำไฟฟ้าได้ดี วิธีนี้ใช้ได้ดีกับตัวทำอีมัลชั่นชนิดมีประจุ ถ้าเป็นตัวทำอีมัลชั่นชนิดไม่มีประจุ อาจไม่ได้ผล

4. Filter Paper Wetting Test อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) เมื่อหยดลงบนกระดาษกรอง จะเปียกได้อย่างรวดเร็ว

5. $CoCl_2$ / Filter Paper Test อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) เมื่อหยดลงบนกระดาษกรองที่ชุบด้วย $CoCl_2$ จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู แต่อีมัลชั่นที่ไวต่ออีเลคโตรไลท์ จะทดสอบโดยวิธีนี้ไม่ได้

6. Fluorescence Test อาศัยคุณสมบัติในการเรืองแสง UV ของหยดน้ำมัน ถ้าเป็นอีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) จะเกิดการเรืองแสงเป็นจุด ๆ แต่ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) จะเรืองแสงทั่วไปหมด

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความคงตัวของอีมัลชั่น

อีมัลชั่นที่มีความคงตัว หมายถึง อีมัลชั่นที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่เกิดการแยกชั้น หรือเปลี่ยนไปจากเดิมแม้ภายหลังการผลิตนานเป็นปี

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของอีมัลชั่น มีดังนี้

1. ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) การคัดเลือกใช้สารชนิดใดเพื่อเป็นตัวทำอีมัลชั่น จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติและปริมาณที่ใช้ เพราะมีผลต่อความแข็งแรงของฟิล์มที่ห่อหุ้มรอบหยดวัตภาคภายใน ซึ่งทำให้อีมัลชั่นคงตัวอยู่ได้

ก. ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W)

อีมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ฟิล์มที่เกิดรอบหยดน้ำมัน จะต้องมีประจุไฟฟ้า และปริมาณโมเลกุลประจุต้องมากพอ เพื่อให้เกิดการผลักกันของหยดน้ำมันที่ถูกหุ้มไว้ ส่วนที่ไม่มีประจุของตัวทำอีมัลชั่น จะต้องจับกันด้วยแรงที่มากพอ เพื่อให้ฟิล์มเกิดความแข็งแรง แรงที่จับกันนี้ จะมากน้อยขึ้นกับโครงสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเป็นแกนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

ถ้าเป็นไขมันอิ่มตัวแกนตรง (Saturated Straight Chain) จะเกิดฟิล์มที่แข็งแรง ได้อีมัลชั่นมีความหนืดสูงและคงตัวดี

ถ้าเป็นไขมันไม่อิ่มตัวแบบทรานส์ (Trans - unsaturated Chain) จะได้อีมัลชั่นที่คงตัว แต่ความหนืดลดลง

แต่ถ้าเป็นไขมันไม่อิ่มตัวแกนหักงอแบบซิส (Cis- unsaturated Chain) จะได้อีมัลชั่นที่ไม่คงสภาพ เพราะแรงจับกันระหว่างโมเลกุลของไขมันเหล่านี้ ไม่แข็งแรงพอ และการเรียงตัวไม่ใกล้ชิดหนาแน่น ทำให้ฟิล์มไม่คงสภาพ

การละลายของตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ก็มีผลต่อความคงตัวของอีมัลชั่นได้ ตัวทำอีมัลชั่นที่ดีควรละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมันอย่างสมดุลย์กัน ถ้าละลายในน้ำได้มากเกินไป จะทำให้เกิดไมเซล (micelle) ในน้ำ ดังนั้นจะไม่มีกันชน (protective film) หุ้มรอบหยดน้ำมัน ซึ่งจะทำให้หยดน้ำมันรวมตัวกันและอีมัลชั่นแยกตัวได้ นอกจากนี้ถ้าตัวทำอีมัลชั่น ละลายในน้ำและน้ำมันได้เท่ากัน ก็ทำให้อีมัลชั่นไม่คงตัว เพราะจะเกิดไมเซลในแต่ละวัตภาค จึงไม่มีกันชนมาหุ้มรอบหยดวัตภาคภายใน

ข. ตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O)

อีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) นี้ ฟิล์มที่เกิดรอบหยดน้ำ ไม่จำเป็นต้องมีประจุไฟฟ้า แต่ตัวทำอีมัลชั่นจะต้องมีอำนาจในการลดความตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมันได้มาก และละลายดีในน้ำมัน จึงจะได้อีมัลชั่นที่คงสภาพ

ปริมาณของตัวทำอีมัลชั่นจะต้องเพียงพอในการทำให้เกิดฟิล์มหุ้มรอบวัตภาคภายในได้หมด ยิ่งถ้าต้องการให้หยดวัตภาคภายในมีขนาดเล็กมาก ยิ่งต้องใช้ตัวทำอีมัลชั่นที่มีความเข้มข้นสูง โดยทั่วไปถ้าใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำอีมัลชั่น อาจใช้ปริมาณตั้งแต่ 1 – 10% ของตำรับ (นิยมใช้ 2% และไม่เกิน 5%)

การเพิ่มความคงตัวให้กับอีมัลชั่นนั้น พบว่า การใช้ตัวทำอีมัลชั่นหลายชนิดร่วมกัน จะทำให้ได้อีมัลชั่นที่คงตัวกว่าการใช้ชนิดเดียวเดี่ยว ๆ เพราะจะสร้างฟิล์มที่หนาแน่นแข็งแรงโดยอาจเกิดจากการเกิดสารเชิงซ้อน หรือการเรียงตัวของโมเลกุลอย่างใกล้ชิดที่ผิวประจัน คู่ตัวทำอีมัลชั่นอาจเป็นสารลดแรงตึงผิวทั้งคู่ เช่น Tweens กับ Spans, Sodium Stearate กับ Cholesterol เป็นต้น ถ้าเป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ชนิดไม่มีประจุ มักเป็นชนิดที่ชอบน้ำ (HLB สูง) และชนิดชอบน้ำมัน (HLB ต่ำ) ร่วมกัน หรืออาจใช้ตัวช่วยทำอีมัลชั่นร่วมกับตัวทำอีมัลชั่น

2. การตั้งสูตรตำรับ ส่วนผสมของสารอื่นในสูตร จะต้องเหมาะสมและไม่กระทบกระเทือนต่อคุณสมบัติของตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) สภาวะความเป็นกรด ด่าง หรือ อีเลคโตรไลท์ ในตำรับ จะมีผลกระทบต่อความคงสภาพของตัวทำอีมัลชั่น

3. เทคนิคการผสม เครื่องมือที่ใช้ผสม มีผลต่อรูปแบบการไหล (flow pattern) ของของเหลว ถ้าเครื่องผสมทำให้เกิดการไหลวน (turbulent flow) จะทำให้การผสมเข้ากันดีที่สุด ส่งผลให้อีมัลชั่น มีความคงตัว เพราะตัวทำอีมัลชั่นมีโอกาสสัมผัสกับผิวประจันของน้ำกับน้ำมันมากที่สุด นอกจากนี้อัตราเร็วในการผสมก็มีความสำคัญ ถ้าใช้อัตราเร็วสูงเท่ากับเป็นการเพิ่มพลังงานมากขึ้น หยดวัตภาคภายในเกิดการกระจายตัวละเอียดเล็กมาก ทำให้อีมัลชั่นคงตัว

4. อุณหภูมิที่ใช้ผสม ทั้งสองวัตภาคควรมีอุณหภูมิเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตอีมัลชั่นอยู่ประมาณ 70 – 75^{O}C การใช้อุณหภูมิต่ำกว่านี้ วัตภาคน้ำมันอาจจะหลอมเหลวไม่หยุด การใช้อุณหภูมิสูงเกินไป เช่น สูงกว่า 85^{O}C อาจทำให้ตัวทำอีมัลชั่นบางชนิดเกิดไฮโดรไลซิส หรือเปลี่ยนสีได้

5. เวลาที่ใช้ในการผสม เวลาที่ใช้ผสม จะต้องมากพอที่จะทำให้สารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในทั้งสองวัตภาคอยู่ในสภาพสมดุล ซึ่งจะทำให้อีมัลชั่นคงตัวมากขึ้น ถ้าใช้เวลาผสมน้อยไป อาจทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการเคลื่อนย้ายจากวัตภาคหนึ่งไปอีกวัตภาคหนึ่ง ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพ และความคงตัวของอีมัลชั่นเปลี่ยนไป

6. อัตราเร็วที่ใช้ในการทำให้เย็นตัว ถ้าทำให้อีมัลชั่นเย็นตัวลงเร็วไป จะเกิดการตกผลึกของสารพวกขี้ผึ้ง (wax) และไขมัน (fat) ทั้งหลาย ทำให้อีมัลชั่นที่ได้เนื้อหยาบและความหนืดเปลี่ยนไปได้

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้เริ่มทำการผลิตอีมัลชั่นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันตามมาตรฐานวิธีการผลิต และวิธีการพิจารณาของ Rhone Merieux, (1988) และ “วิธีการพิจารณาอัตราส่วนของตัวทำอีมัลชั่นที่เป็นสารลดแรงตึงผิว”

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันได้เริ่มทำการผลิตเป็นอีมัลชั่นวัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) เป็นวัคซีนแบบไทป์เดียว (monovalent vaccine) และแบบรวม 2 ไทป์ (bivalent vaccine) ต่อมามีการผลิตวัคซีนแบบรวม 3 ไทป์ (trivalent vaccine) ขึ้นมา เพื่อตอบสนองความต้องการของเกษตรกรที่จะใช้วัคซีนที่มีความสะดวก ประหยัด ปลอดภัย และป้องกันการระบาดของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรทั้ง 3 ไทป์ได้ โดยวิธีการผลิตเป็นอีมัลชั่นใช้ เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) ที่ให้ความคงตัวที่ 4°C ดีกว่าการใช้วิธีการผสมแบบเดิม (พิมพร, 2534; มัณฑนา, 2552)

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน แบบน้ำมันในน้ำ

ก.) การเตรียมวัคซีนสำเร็จรูป แบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก คือ

1. ส่วนวัตภาคน้ำ (Aqueous Phase)

ประกอบด้วยแอนติเจนไวรัสบริสุทธิ์ 3 ไทป์ ได้แก่ Type O, Type A, Type Asia1 เป็นหลัก โดยไวรัสจะผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ และทำให้หมดฤทธิ์ในการก่อโรค (Inactivated Virus) ด้วย BEI Solution ซึ่งไวรัสที่หมดฤทธิ์ในการก่อโรคนี้ จะเรียกว่า “แอนติเจนไวรัส” โดยแอนติเจนไวรัสแต่ละไทป์ จะนำไปหาค่าน้ำหนัก 146S µg/ml. และคำนวณเป็นปริมาณความเข้มข้นแอนติเจนไวรัส (w/v) แอนติเจนดังกล่าวจะถูกผสมกับ Concentrate Reconstitution Medium ในที่นี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (Chloroformed Van Bekkum Medium) โดยมีสัดส่วนเป็น 50% (v/v)

2. ส่วนวัตภาคน้ำมัน (Oily Phase)

มีสัดส่วนเท่ากับ 50% ของวัคซีนสำเร็จรูป ซึ่งประกอบด้วยสารน้ำมันและตัวทำอีมัลชั่น ดังนี้

2.1) Marcol 82 (หน่วย v/v)

เป็นน้ำมันที่มีองค์ประกอบเป็น Purified Mixture of Saturated Liquid Hydrocarbon obtained from Petrolium, Specific Gravity (หรือ Density) ที่ 15°C = 0.837 – 0.856

2.2) Montanide 80 (หน่วย w/v) (Seppic, 1987) หรือ Arlacel A (หน่วย w/v)

เป็นสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำอีมัลชั่น (Emulsifier) คุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด ไม่มีประจุ (non – ionic surfactant) สามารถผลิตอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) เป็นตัวทำอีมัลชั่นชนิดชอบน้ำมัน (Lypophilic Type Emulsifier) และกระตุ้นภูมิต้านทาน (immunity additive) องค์ประกอบเป็น Mannitol oleate ประกอบด้วย พื้นฐานของ Oleic esters of mono – anhydro – mannitol และยังมี Oleic mono – ester of dianhydromannitol, Practically no free Oleic acid, Mannitol และ น้ำ, ความหนืด (Viscosity) ที่ 25°C = 275 – 350 Centipoises

Montanide 80 มีค่า HLB number (คุณสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว) ในบางชุด มีค่า 2.6 ในบางชุดมีค่า 2.8 และในบางชุดมีค่า 3.0 ส่วน Arlacel A มีค่า HLB number เท่ากับ 4.3

ดังนั้นวัคซีนที่มีส่วนผสมของ Montanide 80 และ Arlacel A จึงสามารถผลิตอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) เท่านั้น แต่ในการผสมวัคซีนที่ใช้เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) จำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดน้ำมันในน้ำ (W/O) อีกชนิดหนึ่ง นำมาผสมรวมกัน ทั้งนี้ควรระวังเรื่องสัดส่วนปริมาณของตัวทำอีมัลชั่นเป็นสำคัญ แต่การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารลดแรงตึงผิว จะมีผลต่อคุณสมบัติความชอบน้ำชอบน้ำมัน (HLB Number) ของอีมัลชั่นแตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อการเกิดการแยกชั้นของวัคซีนสำเร็จรูปได้ง่าย เมื่อเก็บที่ 4°C (ตารางที่ 1)

2.3) Eumulgin M8 (หน่วย w/v) (Henkel, 1997)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ องค์ประกอบเป็น Mixture ของ Palmitic และ Oleic Spirit Polycondensed โดย 7 – 8 mol. ของ Ethylene Oxide และ Water 80% ค่าชอบน้ำชอบน้ำมัน คือ HLB number 9 – 11 ความหนาแน่นที่ 25°C: 1 ความหนืดที่ 25°C: Paste

2.4) Triethanolamine (TEA) ชนิด AR Grade (หน่วย w/v)

สูตรเคมี $N(CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH)_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 149 ทำละลายได้ใน Chloroform ละลายได้เล็กน้อยใน Benzene และสามารถผสมรวมกับน้ำและแอลกอฮอล์ได้

2.5) Benzyl Alcohol (หน่วย v/v)

สูตรเคมี $C_6H_5CH_2OH$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 108 สามารถละลายน้ำได้ และสามารถผสมรวมกับแอลกอฮอล์, Ether และ Chloroform ได้

ข.) การผสมวัคซีนสำเร็จรูป (Vaccine Formulation Mixing) โดยใช้เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) (พิมพร, 2534; มัณฑนา, 2552; Rhone Merieux, 1988 Section 1, Section 5, Section 6)

ถ่ายวัตภาคน้ำที่ทำอุณหภูมิได้ 25°C มาปั่นผสมกับวัตภาคน้ำมันที่ทำอุณหภูมิได้ 25°C โดยต้องถ่ายสารให้หมดในเวลาที่กำหนด และปั่นผสมตามเวลาที่กำหนด จะเกิดเป็นอีมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) จากนั้นปรับลดอุณหภูมิลงให้ได้ 4°C อุณหภูมิที่ลดลง จะทำให้อีมัลชั่นกลับวัตภาคจากวัคซีนชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) เป็นวัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ที่ 4°C เรียกวิธีนี้ว่า เทคนิคการกลับวัตภาค จากนั้นทำการบรรจุวัคซีนลงขวด และปิดฉลาก ภายใต้การควบคุมการปลอดเชื้อ โดยวัคซีนที่ผลิตในรูปแบบ O/W นี้จะมี

ความหนืดต่ำ ฉีดง่าย มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 ปี โดยไม่แยกชั้น วัคซีนก่อนนำสู่ผู้ใช้ จะต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) ความคุ้มโรค (Potency Test)

ตารางที่ 1 Phase Inversion Temperature (PIT), Emulsion Characteristics of Arlacel A (HLB Number 4.3) กับ 4% of Eumulgin M8 (HLB Number 9 - 11) (สหวัชร์ และอารีย์, 2548) และ Montanide 80 (HLB Number 2.6) กับ 4% of Eumulgin M8 (HLB Number 9 - 11) (นริศ และคณะ, 2543)

Vaccine No.	Arlacel A (% w/v)	Phase Inversion Temperature (^{o}C)	Montanide 80 (% w/v)	Phase Inversion Temperature (^{o}C)	Emulsion Characteristics	
					Dilution Test	Centrifugation Test
1	4.4	ND (Not Done)	3.8	NO	No Emulsion Formed	Separation
2	4.6	24	4.0	25	O/W	No Separation
3	4.8	24	4.2	24.5	O/W	No Separation
4	5.0	24	4.4	24	O/W	No Separation
5	5.2	24	4.6	24	O/W	No Separation
6	5.4	24	4.8	24	O/W	No Separation
7	5.6	23	5.0	23.5	O/W	No Separation
8	5.8	23	5.2	23.5	O/W	No Separation
9	6.0	23	5.4	22.5	O/W	No Separation
10	6.2	22	5.6	21	O/W	No Separation
11	6.4	22	5.8	19	O/W	No Separation
12	6.6	20	6.0	18	O/W	No Separation
13	**6.8**	**18**	**6.2**	**17**	O/W	No Separation
14	7.0	15	6.4	15	O/W	No Separation
15	7.2	14	6.6	12	O/W	No Separation
16	7.4	13	6.8	9	O/W	No Separation
17	7.6	11	7.0	8	O/W	No Separation
18	7.8	8	7.2	8	O/W	No Separation

19	8.0 : **O/W**	5	7.4 : **W/O**	NO	--	No Separation
20	8.2	ND (Not Done)	7.6	NO	W/O	No Separation
21	8.4	ND (Not Done)	7.8	NO	W/O	No Separation

การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน

1. ตาม Technical Report at Rhone Merieux, Lyon, France

ใช้ลูกสุกรอายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักอย่างน้อย 20 กก. ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย จากการตรวจระดับ antibody ใน serum โดยวิธี Liquid phase (LP) ELISA (วิไล และ ธนรัตน์, 2537) และ Serum Neutralization (SN) Test (Nopporn, 1989)

สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรค จะต้องไม่เกิดวิการที่เท้า ยกเว้นที่จุดฉีดเชื้อพิษ วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 60% ขึ้นไป ตามมาตรฐานศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

1.1 <u>การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) in Pig</u> (ตาม Rhone Merieux)

Sample Batch Vaccine 1 ชุด ใช้ลูกสุกร 4 ตัว ตารางที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

1) ลูกสุกร 2 ตัว เป็น Contact Control (ไม่ฉีดวัคซีน)

2) ลูกสุกร 2 ตัว ฉีด Intradermo-coronary band 2 จุด จุดละ 0.5 ml. ใน Left Foreleg และ ฉีด I/M เข้ากล้ามเนื้อคอหลังหูซ้าย (ฉีด 2 เท่าของโด๊สปกติ)

เลี้ยงรวมกันไว้ทั้ง 4 ตัว สังเกตอาการในเวลา 14 วัน สุกรต้องไม่แสดงอาการแพ้ หรือเกิดโรค แล้วเจาะเลือดตรวจตามวิธีการ

2.2 <u>การทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) in Pig</u> (ตาม Rhone Merieux)

Sample Batch Vaccine ที่เป็นวัคซีนแบบไทป์เดียว (Monovalent Vaccine) หรือ แบบรวม 2 ไทป์ (Bivalent Vaccine) หรือ แบบรวม 3 ไทป์ (Trivalent Vaccine) ใช้ลูกสุกรทดสอบทั้งหมด 7 ตัวต่อ 1 ไทป์ ตารางที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

1) กลุ่ม control 2 ตัว (Controlled Pigs) ไม่ฉีดวัคซีน

2) กลุ่มฉีดวัคซีน 5 ตัว (Vaccinated Pigs) ฉีดโด๊สปกติ (2 มล.) เข้ากล้ามเนื้อ (IM)

หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เจาะเลือดตรวจหาระดับ Titer ด้วยวิธี LP ELISA และ SN Test แล้วฉีดพิษทับด้วยไวรัสแต่ละไทป์ ขนาดความรุนแรง 100 PID_{50}/ml เข้า Intradermo - coronary band ที่เท้าหลังซ้าย จำนวน 1 มล. อ่านผลวันที่ 5 และ 7 หลังฉีดพิษทับ

สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรค จะต้องไม่เกิดวิการที่เท้า ยกเว้นที่จุดฉีดเชื้อพิษ วัคซีนต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 60% ขึ้นไป ตามมาตรฐาน Rhone Merieux, 1988 Section 6

2. ตามระเบียบปฏิบัติ OIE (Office International des Epizooties หรือ World Organization for Animal Health) (OIE Terrestrial Manual, 2004)

ปี พ.ศ.2549 ได้เริ่มทำการทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) ของวัคซีนตามระเบียบปฏิบัติ OIE โดยใช้ลูกสุกรทดลองเพิ่มจำนวนมากขึ้นตาม OIE

ใช้ลูกสุกรอายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักอย่างน้อย 20 กก. ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย จากการตรวจระดับ antibody ใน serum โดยวิธี Liquid phase (LP) ELISA และ SN Test

สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรค จะต้องไม่เกิดวิการที่เท้า ยกเว้นที่จุดฉีดเชื้อพิษ วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 75% ขึ้นไป ตาม OIE (OIE Terrestril Manual, 2004)

2.1 <u>การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) in Pig</u> (OIE Terrestrial Manual, 2004)

Sample Batch Vaccine 1 ชุด ใช้สุกร 2 ตัว ตารางที่ 2 ฉีดวัคซีนขนาด 2 มล. (1 โด๊ส) เข้า Intradermo-coronary band ที่ขาหลังซ้าย และฉีดเข้าแผงกล้ามเนื้อคอขนาด 4 มล. (2 โด๊ส) สังเกตอาการในเวลา 14 วัน โดยสุกรต้องไม่แสดงอาการแพ้ หรือเกิดโรค แล้วเจาะเลือดตรวจตามวิธีการ

2.2 <u>การทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) in Pig</u> (OIE Terrestrial Manual, 2004)

Sample Batch Vaccine 1 ชุด ใช้ลูกสุกรทดสอบ 18 ตัว ตารางที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

1) กลุ่ม Control (Controlled Pigs) 2 ตัว ไม่ฉีดวัคซีน

2) กลุ่มฉีดวัคซีน (Vaccinated Pigs) 16 ตัว/1 ไทป์ โด๊สปกติ (2 มล.) เข้ากล้ามเนื้อ (IM)

หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ เจาะเลือดตรวจหาระดับ titer ด้วยวิธี LP ELISA และ SN Test แล้วฉีดพิษทับด้วยไวรัสแต่ละไทป์ ขนาดความรุนแรง 100 $TCID_{50}$/ml เข้า Intradermo - coronary band เท้าหลังซ้าย จำนวน 1 มล. อ่านผลวันที่ 5 และ 7 หลังฉีดพิษทับ

สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนที่มีความคุ้มโรค จะต้องไม่เกิดวิการที่เท้า ยกเว้นที่จุดฉีดเชื้อพิษ วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 75% ขึ้นไป (ตาม OIE)

ผลการทดสอบ: ความคุ้มโรคตาม OIE ของอีมัลชั่นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ในประเทศไทย

ปี พ.ศ.2549 เป็นต้นมา ได้ทำการทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน 5 ชุดตามระเบียบปฏิบัติของ OIE (Office International des Epizooties หรือ World Organization for Animal Health) โดยได้ใช้ลูกสุกรทดลองเพิ่มจำนวนมากขึ้นตาม OIE และแอนติเจนทุกไทป์ ทุก Subtype ของวัคซีนทั้ง 5 ชุด ได้ให้ความคุ้มโรคเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ 75% ขึ้นไปตาม OIE (OIE Terrestrial Manual, 2004) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 จำนวนลูกสุกร และ % ความคุ้มโรค ในการทดสอบความปลอดภัยและการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน 1 ชุด ตาม Rhone Merieux, (Rhone Merieux, 1988 Section 6) และตาม OIE (OIE Terrestrial Manual, 2004)

รายการ ต่อ วัคซีน 1 ชุด	**Safety Test ต่อ วัคซีน 1 ชุด**	**จำนวนลูกสุก ใน Potency Test ต่อ วัคซีน 1 ชุด**			**ยอดรวมจำนวนลูกสุกร ใน Safety Test และ Potency Test ต่อ วัคซีน 1 ชุด**		
		Monovalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)	Bivalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)	Trivalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)	Monovalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)	Bivalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)	Trivalent Vaccine (ลูกสุกร...ตัว)
จำนวนลูกสุกร Rhone Merieux	จำนวนลูกสุกร 4 ตัว	= 7 ตัว	7 + 7 = 14 ตัว	7 + 7 + 7 = 21 ตัว	4 + 7 = 11 ตัว	4 + 14 = 18 ตัว	4 + 21 = 25 ตัว
% ความคุ้มโรค **Rhone Merieux**	--	**> 60 %**	**> 60 %**	**> 60 %**	--	--	--
จำนวนลูกสุกร ตาม **OIE 2004**	จำนวนลูกสุกร 2 ตัว	= 18 ตัว	18 +18 = 36 ตัว	18+ 18+18 = 56 ตัว	2 + 18 = 20 ตัว	2 + 36 = 38 ตัว	2 + 56 = 58 ตัว
% ความคุ้มโรค ตาม **OIE 2004**	--	**> 75 %**	**> 75 %**	**> 75 %**	--	--	--

ตารางที่ 3 Safety Test and OIE Potency Test of Swine Trivalent Foot and Mouth Disease Oil Emulsion Vaccine in Thailand

No.	Sample Batch Vaccine	วันผลิต	วันหมดอายุ	Surfactants		SAFETY TEST	POTENCY TEST		
				HLB number 2.6, 2.8, 3.0 (ระดับต่ำ)	HLB number 9 - 11 (ระดับสูง)		Type O_{189}	Type A_{118}	Type Asia1
				Montanide 80 % w/v	Eumulgin M8 % w/v				
1	SBHT49	10/11/2548	09/11/2549	5.90 %	4.00 %	PASSED	100 %	80 %	100 %
2	SB1HT50.51	04/05/2550	03/05/2551	5.95 %	4.00 %	PASSED	100 %	100 %	80 %
3	SB1HT51.52	11/08/2551	10/08/2552	6.00 %	4.00 %	PASSED	81.25 %	87.50 %	100 %
4	SB1HT54	15/07/2553	14/07/2554	6.00 %	4.00 %	PASSED	100 %	93.75 %	100 %
5	SBHT55	20/09/2554	19/09/2555	6.00 %	4.00 %	PASSED	81.30 %	100 %	100 %

บทสรุป

ปี พ.ศ.2533 ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ได้เริ่มทำการผลิตอีมัลชั่นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันเป็นมาตรฐานตาม Rhone Merieux, Lyon, France (Rhone Merieux, 1988 Section 1 – 9) โดยผลิตให้เป็นอีมัลชั่นวัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ที่ 4°C ความหนืดต่ำ ฉีดง่าย มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 ปี โดยไม่แยกชั้นแบบ creaming, flocculation, หรือ coalescence เป็นวัคซีนแบบไทป์เดียว (monovalent vaccine) แบบรวม 2 ไทป์ (bivalent vaccine) แบบรวม 3 ไทป์ (trivalent vaccine)

ตาม Know How ของ Rhone Merieux คือ หลังจากผสมวัคซีนใน Mixer ที่ 25°C แล้วให้ความเย็น 4°C อีมัลชั่นจะเกิดการกลับวัตภาค (Phase Inversion Technique) ที่ให้ความคงตัวที่ 4°C ดีกว่าการใช้วิธีการผสมแบบเดิม โดยในสูตรวัตภาคน้ำมัน (oily phase) ใช้สารทำอีมัลชั่น (Emulsifier) ที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ชนิดไม่มีประจุ 2 ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ Montanide 80 ที่มีค่า hydrophilic – lipophilic balance number (HLB number) ระดับต่ำ คือ 2.6, 2.8 และ 3.0 นำไปใช้ในปริมาณ 5.90, 5.95, 6.0% w/v ตามลำดับ และ Eumulgin M8 ซึ่งมี HLB number ระดับสูง คือ 9 – 11

แต่เมื่อ Montanide 80 Lot. ใหม่เข้ามา มีค่า HLB Number เปลี่ยนไปจากค่า 2.6, 2.8, 3.0 ควรทำเอกสารวิชาการใช้อีมัลชั่นที่ถูกต้อง ให้มีความคงตัวที่ 4°C อีมัลชั่นไม่แยกชั้นง่าย

ปี พ.ศ.2533 การทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) เป็นมาตรฐานตาม Rhone Merieux และ Laboratory Tests, May 1988 ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ได้เริ่มทำการทดสอบตาม Know How นี้ วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 60% ขึ้นไป ตามมาตรฐาน Rhone Merieux

ปี พ.ศ.2549 ได้เริ่มทำการทดสอบความปลอดภัย และการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนตามระเบียบปฏิบัติ OIE (Office International des Epizooties หรือ World Organization for Animal Health) โดยใช้ลูกสุกรทดลองเพิ่มจำนวนมากขึ้นตาม OIE วัคซีนจะต้องให้ความคุ้มโรคเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 75% ขึ้นไปเสมอ (OIE Terrestrial Manual, 2004)

บรรณานุกรม

นริศ ว่องวัฒนากูล สินสมุทร นิลฉวี และสหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ 2543 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1 - 2): 51 – 60

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 55

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ 2534 อีมัลชั่นทางเครื่องสำอางค์ (cosmetic emulsion) ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 1 - 208

มัณฑนา ภาณุมาภรณ์ 2552 อีมัลชั่น และ ยาเหน็บ กลุ่มวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ หน้า 1 – 198

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ 2553 วิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทย ตำราทางวิชาการ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1 – 75

วิไล ลินจงสุบงกช และ ธนรัตน์ จานุกิจ 2537 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ลิควิด เฟส อีไลซ่า ประมวลเรื่องประชุมวิชาการกองผลิตชีวภัณฑ์ หน้า 63 – 72

สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ และอารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์ 2548 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคกับปริมาณความเข้มข้นของ Arlacel A ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 15 (1): 47 - 55

Henkel Thai Ltd. 1997. Eumulgin M8.

Nopporn Patanaprasith 1989. Safety and Potency Test of Vaccine in Animal (Cattle and Pig): Technical Report “Training in the method of the quality control of Foot and Mouth Disease vaccine. Rhone Merieux, Lyon, France. pp. 52 – 55.

OIE Terrestril Manual. 2004. Chapter 2.1.5 – Foot and Mouth Disease: Final Product Batch Tests. pp. 18 – 19.

Rhone Merieux. 1988. Section 1: Culture Media (May 1988), Determination of Surfactant Ratios. FMD Vaccine Production Center (contact No. 27/1986). Technique for Production of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. pp. 32 – 42.

Rhone Merieux. 1988. Section 5: Vaccine Preparation (May 1988). FMD Vaccine Production Center (contact No. 27/1986). Technique for Production of Foot-and-Mouth Disease Vaccine, 4. Preparation of a Sample Vaccine for Pigs, 5. Preparation of Industrial Vaccine for Pigs. pp. 31 – 42.

Rhone Merieux. 1988. Section 6: Laboratory Tests (May 1988). FMD Vaccine Production Center (contact No. 27/1986). Technique for Production of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. pp. 1 – 114.

Rhone Merieux. 1988. Section 1 – 9: FMD Vaccine Production Center (contact No. 27/1986). Technique for Production of Foot-and-Mouth Disease Vaccine.

Seppic.1987. Division Cosmetique - Phamacie, Paris Cedex 07, France. Montanide 80, Monograph, Toxicity and Uses. Vac.14: 1 – 4.