การพัฒนาวัคซีน นิวคาสเซิล เชื้อตาย โดยใช้น้ำมันปาล์ม

นาย วิษณุ วรรณแสวง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0795-7.
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF INACTIVATED NEWCASTLE DISEASE VACCINE USING PALM OIL

Mr. Wisanu Wanasawaeng

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Avian Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0795-7.

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวัคซีน นิวคาสเซิล เชื้อตาย โดยใช้น้ำมันปาล์ม
โดย	นายวิษณุ วรรณแสวง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตว์ปีก
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ประจักษ์ พุ่มวิเศษ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดวงนฤมล ประชัญคดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ประจักษ์ พุ่มวิเศษ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิษณุ วรณแสวง : การพัฒนาวัคซีน นิวคาสเซิล เชื้อตาย โดยใช้น้ำมันปาล์ม (PREPARATION OF INACTIVATED NEWCASTLE DISEASE VACCINE USING PALM OIL)
อ.ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ประจักษ์ พุ่มวิเศษ, อ.ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน ; 45หน้า. ISBN 974-03-0795-7.

ไก่ทดลองที่ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายที่เตรียมขึ้นเอง เมื่ออายุ 35 วัน โดยใช้น้ำมันปาล์มในรูปน้ำในน้ำมัน (Palm-Vacc-WO) หรือในรูปน้ำในน้ำมันในน้ำ (Palm-Vacc-WOW) พบว่า มีระดับ HI แอนติบอดี และความต้านทานต่อเชื้อพิษทับของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลสายเชื้อ *Local* ที่รุนแรง (VVNDV) ต่ำกว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายที่เตรียมขึ้นโดยใช้น้ำมันแร่ ทั้งในรูปน้ำในน้ำมัน (Min-Vacc-WO) และในรูปน้ำในน้ำมันในน้ำ (Min-Vacc-WOW) แต่ไก่ที่ได้รับ Palm-Vacc-WO และ Palm-Vacc-WOW มีความต้านทานสูงกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อให้เชื้อพิษทับด้วย VVNDV แม้ว่า ไก่ทั้งสามกลุ่มมีระดับ HI แอนติบอดีไม่ต่างกัน

ในการทดลองใช้วัคซีนเชื้อเป็น (Live) ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้ง Palm-Vacc-WO ร่วมกับวัคซีนเชื้อเป็น (Palm-Vacc-WO+Live) และ Min-Vacc-WO+Live แม้จะมีระดับ HI แอนติบอดีไม่แตกต่างจาก ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นอย่างเดียว แต่ต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน ความต้านทานโรคของไก่ที่ได้รับ Palm-Vacc-WO+Live และ Min-Vacc-WO+Live ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความต้านทานของไก่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นแต่เพียงอย่างเดียว แต่มีความต้านทานสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับความต้านทานของไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ในขณะเดียวกันไก่กลุ่มที่ได้รับ Palm-Vacc-WOW+Live และกลุ่มที่ได้รับ Min-Vacc-WOW+Live นั้นมีระดับ HI แอนติบอดีและความต้านทานต่อ VVNDV ไม่แตกต่างจากไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นแต่เพียงอย่างเดียว

เมื่อใช้วัคซีนเชื้อเป็นร่วมกับวัคซีนเชื้อตายที่มีวิตามิน อี ได้แก่ วัคซีน Min-Vacc-WO+Live, Min-Vacc-WOW+Live และ Palm-Vacc-WOW+Live พบว่าไก่ทั้ง 3 กลุ่ม มีระดับ HI แอนติบอดีสูงกว่าไก่อีก 3 กลุ่ม ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นร่วมกับวัคซีนเชื้อตายที่ไม่มีวิตามิน อี ยกเว้นไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นร่วมกับ Palm-Vacc-WO ที่เติมวิตามิน อี ซึ่งมีระดับ HI แอนติบอดีไม่แตกต่างกับระดับ HI ของไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน Palm-Vacc-WO+Live ที่ไม่มีวิตามิน อี อย่างไรก็ตามไก่กลุ่มต่างๆ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นร่วมกับวัคซีนเชื้อตายไม่ว่าจะมีวิตามิน อี หรือไม่ สามารถต้านเชื้อพิษทับ VVNDV ได้ไม่แตกต่างกัน

โดยสรุปแล้ววัคซีน ND เชื้อตายที่เตรียมจากน้ำมันปาล์มทั้งในรูป WO และ WOW (Palm-Vacc-WO and Palm-Vacc-WOW) เมื่อให้ร่วมกับวัคซีน ND เชื้อเป็นจะสามารถป้องกันต่อเชื้อพิษทับ VVNDV อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์ปีก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4175575131 : MAJOR AVIAN MEDICINE

KEYWORD: NEWCASTLE DISEASE/PALM OIL/VITAMIN E/WATER-IN-OIL-IN-WATER FORMULATION

WISANU WANASAWAENG: PREPARATION OF INACTIVATED NEWCASTLE DISEASE VACCINE USING PALM OIL. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.DR.PRACHAK POOMVISES. THESIS COADVISORS: ASSOC.PROF.DR. JIROJ SASIPREEYAJAN, ASST. PROF. ACHARA TAWATSIN, 45 pp. ISBN 974-03-0795-7.

Thirty-five days old chickens vaccinated with inactivated ND vaccine prepared with either palm oil (Palm-Vacc) in water in oil (WO) form (Palm-Vacc-WO), or in water in oil in water form (Palm-Vacc-WOW) had lower HI antibodies and less resistance to virulence viscerotropic velogenic Newcastle disease viruses (VVNDV) when compared with those vaccinated with inactivated ND vaccine prepared with mineral oil (Min-Vacc) in WO form (Min-Vacc-WO) and Min-Vacc in water in oil in water form (Min-Vacc-WOW). Although Palm-Vacc-WO and Palm-Vacc-WOW vaccinated chickens had HI antibody titres similar to those of the unvaccinated control, the Palm-Vacc-WO and Palm-Vacc-WOW vaccinated chickens were more significantly resistance to VVNDV challenge when compared to the unvaccinated control ($p \leq 0.05$).

On the other hand, chickens vaccinated with both Palm-Vacc-WO plus live ND Vaccine (Palm-Vacc-WO + Live), and Min-Vacc-WO plus live ND vaccine (Min-Vacc-WO+ Live) had higher HI antibodies than those vaccinated with only live ND vaccine and those of unvaccinated control. The resistance to VVNDV challenge of both Palm-Vacc-WO+Live and Min-Vacc-WO+Live vaccinated chickens were not significantly different from those vaccinated with Live ND vaccine alone, but significantly higher when compared with those of unvaccinated control.

HI antibody titres of Palm-Vacc-WOW+Live and Min-Vacc-WOW+Live vaccinated chicken, however were not different from those of chickens vaccinated with only live ND vaccine, nor the resistance of chickens between these three groups.

Additional of vitamin E to Min-Vacc-WO+Live, Min-Vacc-WOW+Live and Palm-Vacc-WOW+Live then given to chickens had increased their HI antibody titres when compared to those without vitamin E. Except when vitamin E was added to Palm-Vacc-WO+Live and given to chickens as they had lower HI antibody titres when compared to those given Palm-Vacc-WO+Live without vitamin E, but not significantly different. Resistance to VVNDV challenge however was similar in all groups.

In conclusion, Palm-Vacc-WO and Palm-Vacc-WOW when used in combination with live ND vaccine were effectively protected vaccinated chickens against VVNDV challenge.

Department/Program Veterinary Medicine Student's signature……

Field of study Avian Medicine Advisor's signature……

Academic year. 2001 Co- advisor's signature…….

Co- advisor's signature…….

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อ.สพ.ญ. กัลยา เจือจันทร์ และ น.สพ. กาญจน์ เชื้อศิริ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือมาจนตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณ ห้องสมุด คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้บริการเอกสารวิชาการด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด ที่ให้โอกาสและเวลา สำหรับการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณแสงแข พงษ์ธเนศ และคุณเสาวลักษณ์ อรรคนิวาส ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้วยดี ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณนิพนธ์ เจริญชน และคุณแดน บุญอยู่ ที่ช่วยเหลือในการเลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……ญ
สารบัญภาพ……ฎ

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……1
คำถามการวิจัย……2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย……2
รูปแบบการวิจัย……2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……2

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี……3
โรคนิวคาสเซิล……3
วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล……6
แอดจูแวนท์……7
การใช้น้ำมันจากธรรมชาติทดแทนน้ำมันแร่……10
การใช้วิตามิน อี……11
การปรับสูตรการเตรียมวัคซีนเชื้อตาย……13
การทดสอบระดับภูมิคุ้มกันโรค ND ด้วยวิธี Hemagglutination Inhibition Test……14

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมวัคซีน นิวคาสเซิลเชื้อตาย……16
การทดสอบความหนืด……19
การทดสอบความคงตัว……19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ……..……..19
การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี……...…19
การทดสอบความต้านทานโรค……...….20
การวิเคราะห์ผลการทดลอง…….....20
การทดลองที่ 1 การหาระดับ HI แอนติบอดีจากแม่ ในไก่เนื้อ ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 28 วัน……..……..….20
การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วย สายเชื้อของไวรัส *Local* และ *La Sota* 20
การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender…… ….21
การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และเข้ากล้ามเนื้อ….21
การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมในรูป WO และ WOW
และวิตามิน อี ……..……..……22
การทดลองที่ 6 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่ ในรูปของ WO และ WOW
และวิตามิน อี……....…..22
การทดลองที่ 7 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อเป็น ร่วมกับเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่
ในรูป WO และ WOW และวิตามิน อี..……..…..……...23

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาระดับ HI แอนติบอดีจากแม่ ในไก่เนื้อ ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 28 วัน……..……..….24
การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วย สายเชื้อของไวรัส *Local* และ *La Sota* …25
การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender.……26
การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และเข้ากล้ามเนื้อ….27
การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมในรูป WO และ WOW
และวิตามิน อี ……..……...29
การทดลองที่ 6 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่ ในรูป WO และ WOW
และวิตามิน อี……..……...31
การทดลองที่ 7 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อเป็น ร่วมกับเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่
ในรูป WO และ WOW และวิตามิน อี…..... ...…….35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย……37

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……40

รายการอ้างอิง……41

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 3.1 การเตรียมวัคซีน ND เชื้อตาย ในรูปของ WO และ WOW สูตรต่างๆ โดยมีสัดส่วนของน้ำมันแร่ น้ำมันปาล์ม และวิตามิน อี ตามสูตร 1-8 ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ……..……..……...16

ตารางที่ 4.1 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ อายุ 1 ถึง 28 วัน…….……24

ตารางที่ 4.2 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 (+B1) พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *La Sota* และ *Local* โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 9 วัน……..……...……..25

ตารางที่ 4.3 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่ผสมด้วย Homogenizer และ Blender โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน…..……...26

ตารางที่ 4.4 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน……..……27

ตารางที่ 4.5 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน……29

ตารางที่ 4.6 ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ ……31

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย เป็นเวลา 12 วัน..……...……...32

ตารางที่ 4.8 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน…….……33

ตารางที่ 4.9 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* โดยการหยอดตา พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน……..35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

แผนภาพที่ 4.1 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ อายุ 1 ถึง 28 วัน……..……..…24

แผนภาพที่ 4.2 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ B1(+IB) หยอดตา พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *La Sota* และ *Local* โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 9 วัน…….25

แผนภาพที่ 4.3 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่ผสมด้วย Homogenizer และ Blender โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน…..…….26

แผนภาพที่ 4.4 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน……..…..28

แผนภาพที่ 4.5 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน……30

แผนภาพที่ 4.6 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน…..……34

แผนภาพที่ 4.7 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* โดยการหยอดตา พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน……..……36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน การเลี้ยงไก่ในประเทศไทย มีการพัฒนาศักยภาพการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมมากขึ้น และเป็นธุรกิจสำคัญที่สามารถสร้างรายได้จากการส่งเนื้อไก่ส่งออก การที่อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่มีศักยภาพการผลิตสูงขึ้นทุกวัน เกิดจากการพัฒนาปรับปรุงพันธุกรรมไก่ให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในระบบการเลี้ยงการจัดการที่หนาแน่น แต่ขณะเดียวกัน ฝูงไก่ก็มีความไวรับต่อโรคติดเชื้อมากขึ้น เนื่องจาก ศักยภาพของระบบภูมิคุ้มกันโรคต่ำลง รวมถึง สิ่งแวดล้อม และสุขศาสตร์

โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease; ND) เป็นโรคที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ (Eidson et al., 1980; Eidson et al.,1982) รวมถึงส่งผลกระทบต่อการค้าขายสัตว์ปีกระหว่างประเทศ (Bennejean et al., 1991) แม้ว่า ประเทศที่สามารถควบคุมโรคได้แล้ว ความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ยังเกิดจาก ค่าใช้จ่ายการให้วัคซีน และ/หรือ การตรวจติดตามระบบการป้องกันโรคอย่างเข้มงวด (Alexander, 1997)

การแพร่กระจายของโรค ND ขึ้นกับนโยบาย การกำจัด และควบคุมสัตว์ป่วยของแต่ละประเทศที่แตกต่างกัน นอกเหนือจาก ลักษณะการเลี้ยงสัตว์ปีก เช่น ประเทศที่นิยมเลี้ยงไก่หลังบ้าน มักประสบปัญหามากกว่า การเลี้ยงไก่เชิงอุตสาหกรรม (Alexander, 1997; Alexander, 2000) ในประเทศกำลังพัฒนาในเอเชีย แอฟริกา อเมริกากลาง และบางส่วนของอเมริกาใต้ การเลี้ยงไก่ตามชนบท หรือการเลี้ยงไก่หลังบ้าน เป็นแหล่งอาหารโปรตีนในรูปของไข่ และเนื้อไก่ที่สำคัญมาก เนื่องจาก ปัจจัยทางสังคมและการเงิน ทำให้การควบคุมโรค ND ในไก่ตามชนบท ของประเทศกำลังพัฒนาเหล่านี้ เป็นไปได้ยากยิ่ง และปัญหานี้ ยังมีผลกระทบต่อการพัฒนาการผลิตสัตว์ปีกเชิงอุตสาหกรรม และการค้าขายสัตว์ปีกระหว่างประเทศ (Alexander, 2000) ในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ ให้ความสำคัญกับการเลี้ยงไก่เชิงอุตสาหกรรมมาก จากประกาศกระทรวงเกษตร และสหกรณ์ เรื่อง มาตรฐานฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อของประเทศไทย พ.ศ.2542 เพื่อควบคุมฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อเพื่อการค้า ที่มีจำนวนตั้งแต่ 3,000 ตัวขึ้นไป (กองสัตวรักษ์, 2542) นอกจากนี้ ภายหลังการตรวจเยี่ยมของคณะกรรมการใน กลุ่มสหภาพยุโรป เมื่อเดือนธันวาคม ค.ศ. 1999 ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ได้ให้การรับรองสถานภาพของโรค ND ในประเทศไทย ใน Directive 2001/598/EC โดยจัดให้ประเทศไทยได้รับการรับรองตาม Model A ใน Directive 94/984/EC (CEC, 2001) อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงไก่หลังบ้าน และไก่ชนเพื่อการแข่งขัน ยังเป็นที่นิยมเลี้ยงกันตามชนบท ตลอดจนประเทศเพื่อนบ้านบางประเทศ ยังไม่มีมาตรการควบคุมโรค ND อาจนำโรคระบาดสู่อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของประเทศไทยเช่นเดียวกับที่เคยเกิดขึ้นในภูมิภาคอื่นๆ ในโลก

เนื่องจากโรค ND เป็นโรคติดต่อร้ายแรง การควบคุมโดยวิธีทำลาย และการควบคุมการเคลื่อนย้ายไก่ป่วย มักไม่ประสบความสำเร็จ การระบาดของโรค ND จึงมักเป็นโรคประจำถิ่น (endemic) มาตรการการให้วัคซีนนับว่าเป็นการควบคุมที่มีประสิทธิภาพสูง (Cross, 1988) ช่วยให้บางประเทศ เช่น ประเทศอาร์เจนตินา (Berinstein et al., 1999) ญี่ปุ่น (Murakawa et al., 2000) เป็นประเทศที่ปลอดเชื้อโรคนิวคาสเซิลได้ เนื่องจาก อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ ภายในประเทศไทย ยังคงมีความเสี่ยงต่อโรคระบาดร้ายแรงนี้ นโยบายการใช้วัคซีน จึงยังมีความจำเป็น

ปัจจุบัน วัคซีน ND เชื้อตายที่มีจำหน่ายและนิยมใช้กัน มักเตรียมจาก น้ำมันแร่ (mineral oil) ซึ่งมีปัญหาปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่รุนแรง มีการตกค้างในเนื้อเยื่อไก่เป็นเวลานาน และอาจเป็นสารก่อมะเร็งตกค้างถึงผู้บริโภค ดังนั้น รายงานการวิจัยหลายคณะ กำลังพยายามศึกษาค้นคว้าน้ำมันชนิดอื่นๆเพื่อทดแทนน้ำมันแร่ (Stone and Xie, 1990; Gupta et al., 1993; Stone, 1993; Yamanaka et al., 1993; Stone, 1997)

น้ำมันปาล์ม เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายภายในประเทศ ราคาถูก และยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันธรรมชาติ ประสิทธิภาพการกระตุ้น HI แอนติบอดียังน้อยกว่า และความหนืด ยังสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ (Stone, 1993) ดังนั้น เพื่อเป็นการชดเชยข้อด้อยของน้ำมันปาล์ม ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงใช้วิตามิน อี ในรูปของ dl-α-tocopheryl acetate และลดความหนืดของวัคซีน โดยการเตรียมเป็น WOW

คำถามการวิจัย

1. น้ำมันปาล์ม สามารถใช้เตรียมวัคซีน ND เชื้อตายทดแทนน้ำมันแร่ ได้หรือไม่
2. การใช้วิตามิน อี สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ของวัคซีน ND เชื้อตายจากน้ำมันปาล์ม ได้หรือไม่
3. การปรับรูปแบบการเตรียมวัคซีน ND เชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม เป็น WOW สามารถลดความหนืดลงจากวิธีเดิม คือ WO ได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตาย ในรูปของ WOW โดยใช้น้ำมันปาล์ม ร่วมกับวิตามิน อี ทดแทนน้ำมันแร่

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ (experimental study)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางการพัฒนาวัคซีน ND เชื้อตายขึ้นใช้เองภายในประเทศ หรือเพื่อการส่งออก โดยใช้วัตถุดิบตามธรรมชาติ ซึ่งจะได้ประโยชน์ คือ

1. ช่วยลดการนำเข้าวัคซีน และวัตถุดิบ
2. ลดการคัดซากไก่ทิ้ง เนื่องจาก น้ำมันแร่ มีผลต่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ
3. เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

บทที่ 2
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิด และทฤษฎี

โรคนิวคาสเซิล

ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ให้คำจำกัดความ โรค ND ใน Directive 93/342/EEC หมายถึง โรคติดต่อของสัตว์ปีก ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส สายเชื้อใดๆ ในกลุ่ม Paramyxovius 1 ซึ่งมีค่า Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) ทดสอบในลูกไก่อายุ 1 วันมากกว่า 0.7 (CEC, 1992)

เชื้อไวรัสก่อโรค ND อยู่ในแฟมิลี Paramyxoviridae เป็นเชื้อไวรัสแบบ RNA ที่มี enveloped มีคุณสมบัติสำคัญ คือ nonsegmented, single-stranded genome และ negative polarity (Alexander, 1997) เชื้อไวรัส ND มีขั้นตอนการ assembly ของ capsid เกิดขึ้นในไซโตปลาสซึม และการสร้าง envelop เกิดขึ้นบริเวณผิวของเซลล์ที่ติดเชื้อ เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนแบบ negative contrast พบว่าอนุภาคของไวรัสมีลักษณะ pleomorphic กรณี เป็นรูป spherical มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-500 นาโนเมตร หรือกรณี เป็นรูป filamentous จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 นาโนเมตร (Jordan, 1990)

โรค ND เป็นโรคระบาดที่มีชื่อจัดกลุ่มอยู่ใน List A ของ The Office International des Epizooties (Alexander, 1998; Alexander, 2000) กล่าวคือ เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว เป็นปัญหาร้ายแรงทางเศรษฐกิจและสังคม หรือสาธารณสุข จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญที่ส่งผลต่อการค้าสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE, 1992) เป็นที่ยอมรับกันว่า ในช่วงศตวรรษที่ 20 การพัฒนาการเลี้ยงสัตว์ปีกเชิงอุตสาหกรรม และการค้าขายสัตว์ปีกระหว่างประเทศ เป็นสาเหตุที่ทำให้โรค ND เป็นโรคที่มีความสำคัญในสัตว์ปีก (Alexander, 1988)

Jordan (1990) จำแนกโรค ND ตามลักษณะการเกิดโรคที่เกิดขึ้นในไก่ทดลอง แบ่งเป็น 5 pathotypes ได้แก่

1.) Viscerotropic velogenic ND ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงมาก มีลักษณะจำเพาะ คือ รอยโรคเลือดออกตามทางเดินอาหาร
2.) Neurotropic velogenic ND มีอัตราการตายสูงมาก ภายหลังการแสดงอาการทางระบบหายใจและระบบประสาท
3.) Mesogenic ND มีอาการทางระบบหายใจ และบางครั้ง อาจมีอาการทางระบบประสาท อัตราการตายต่ำ
4.) Lentogenic respiratory ND มีอาการทางระบบหายใจน้อย หรือไม่แสดงอาการ
5.) Asymptomatic enteric ND มีการติดเชื้อตามระบบทางเดินอาหาร โดยไม่แสดงอาการ

Alexander (1988) สรุปการระบาดของโรค ND ในโลก ครั้งสำคัญ ทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้

การระบาดครั้งที่ 1 เป็นการพบโรค ND เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 และแพร่กระจายต่อไปทั่วโลก โรค ND ที่พบมักเป็นแบบรุนแรง (velogenic form) อัตราการตายในไก่อาจสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Charlton et al., 1996) ในปี ค.ศ. 1927 ประเทศอังกฤษ มีการระบาดครั้งแรกในเมือง นิวคาสเซิล (Sainsbury, 2000) ในปี ค.ศ. 1930 และ 1932 ประเทศออสเตรเลีย เกิดการระบาดของโรค ND แบบรุนแรง การใช้มาตรการกำจัดโรคด้วยการทำลายไก่ป่วย ช่วยให้ประเทศออสเตรเลียปลอดจากโรค ND เป็นเวลานาน (Westbury, 2001) ในปี ค.ศ. 1940 สหรัฐอเมริกา เริ่มพบโรค ND แบบความรุนแรงต่ำ และปานกลาง ในฟาร์มเลี้ยงไก่ และสามารถควบคุมโรคได้โดยอาศัยการให้วัคซีน และเริ่มพบโรค ND แบบความรุนแรงสูง ในปี ค.ศ. 1941, 1946 และ 1951 แต่สามารถกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็ว (Charlton et al., 1996) ลักษณะของโรค ND ที่ระบาดในสหรัฐอเมริกา เป็นแบบ Neurotropic velogenic ND จะมีความรุนแรงน้อยกว่าโรค ND ที่ระบาดในประเทศอินโดนีเซีย และอังกฤษ ซึ่งเป็นแบบ Viscerotropic velogenic ND (Shope, 1964; Hanson et al., 1973)

การระบาดครั้งที่ 2 เริ่มขึ้นช่วงปลายทศวรรษที่ 1960 บริเวณแถบตะวันออกกลาง โดยการขนย้ายของนกป่า เป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดครั้งนี้ (Alexander, 1988) และแพร่กระจายไปเกือบทุกประเทศทั่วโลกในปี ค.ศ.1973 การแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็วเกิดจากวิวัฒนาการการเลี้ยงไก่เชิงอุตสาหกรรม รวมถึง การค้าขายระหว่างประเทศ และการนำเข้านกแก้วที่เลี้ยงในกรง (Alexander, 1997) ในปี ค.ศ. 1970 ประเทศอังกฤษ มีการระบาดครั้งสำคัญที่เมือง Essex จึงให้ชื่อสายเชื้อไวรัสเป็น Essex'70 สามารถทำให้ไก่ตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Sainsbury, 2000) เดือนมีนาคม ค.ศ. 1970 โรค ND แบบ Viscerotropic velogenic ND ระบาดมาถึงสหรัฐอเมริกาครั้งแรก ผ่านนกแก้วนำเข้ามาในเมืองนิวยอร์ค (Hanson et al., 1973) ต่อมาปี ค.ศ. 1971 เกิดการระบาดครั้งสำคัญที่รัฐ แคลิฟอร์เนีย และพื้นที่ใกล้เคียง มาตรการการกำจัดโรค ต้องสูญเสียงบประมาณมหาศาลกว่า 52 ล้านเหรียญสหรัฐ และยังเกิดขึ้นต่อมาในปี ค.ศ. 1977, 1979 และ 1980 (Charlton et al., 1996) โดยหลักฐานสำคัญมากมาย ที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง การระบาดครั้งที่ 2 กับการนำเข้านกแก้ว (Alexander, 1988)

การระบาดครั้งที่ 3 เกิดจากโรค ND ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในระบบประสาท ในนกพิราบแข่ง Jordan (1990) กล่าวว่า การระบาดครั้งนี้ เริ่มขึ้นในตะวันออกกลาง ช่วงปลายทศวรรษที่ 1970 และกลางทศวรรษที่ 1980 โดยอาศัยการแข่งขันนกพิราบ การแสดง นกพิราบเนื้อ และนกพิราบป่า ในบางประเทศยังแพร่กระจายไปยังนกประเภทอื่นๆ และไก่ อีกด้วย

สถานการณ์ปัจจุบันโรค ND ช่วงต้นทศวรรษที่ 1990 มีอุบัติการโรค ND เพิ่มขึ้นในหลายประเทศแถบยุโรปตะวันตกโดยเฉพาะ ค.ศ. 1994 มีรายงานสูงที่สุดถึง 239 รายในกลุ่มประเทศเครือสหภาพยุโรป ระหว่างปี ค.ศ. 1991 ถึง 1995 การระบาดส่วนใหญ่ในกลุ่มประเทศเครือสหภาพยุโรป เกิดขึ้นในประเทศเบเนลักซ์ และ

เยอรมัน โดยเฉพาะ ในสัตว์ปีกที่เลี้ยงหลังบ้าน (Alexander, 2000) ในประเทศเยอรมัน เกิดการระบาดขึ้นหลายครั้ง ระหว่างปลายปี ค.ศ. 1992 ถึงต้นปี ค.ศ.1996 โดยสูงที่สุดในปี ค.ศ.1994 การใช้มาตรการควบคุมโรคอย่างเข้มงวด และนโยบายการให้วัคซีน ช่วยให้จำนวนครั้งของการระบาด และการแยกพบเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงลดลง จนปลายปี ค.ศ. 1996 ประเทศเยอรมัน ก็ปลอดโรค ND ชนิดรุนแรง (Werner et al., 1999) Alexander (2000) กล่าวว่า ข้อสังเกตที่น่าสนใจประการหนึ่ง เกี่ยวกับการระบาดของโรค ND ในยุโรป คือ เป็นการระบาดในประเทศที่เคยปลอดโรคมาก่อนเป็นเวลาหลายปีมาแล้ว

ประเทศออสเตรเลียมี รายงานการเกิดโรคระบาด ND แบบรุนแรงในฟาร์มไก่ รัฐ New South Wales ปี ค.ศ. 1998 1999 และ 2000 ภายหลังการปลอดโรค ND มาเป็นนาน ภาครัฐบาลจึงรณรงค์การกำจัดโรคด้วยการกำจัดสัตว์ป่วย ติดตามด้วยการให้วัคซีนในฟาร์มที่เคยกำจัดสัตว์ป่วยแล้ว แต่ยังตรวจพบเชื้อไวรัสแบบรุนแรงอีก หลังจากนั้น ไม่พบการระบาดของโรค ND แบบรุนแรงอีกนับตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2000 (Westbury, 2001)

สำหรับประเทศไทย ภายหลังการตรวจเยี่ยมของคณะกรรมการในกลุ่มสหภาพยุโรป เมื่อเดือนธันวาคม ค.ศ. 1999 ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ให้การรับรองสถานภาพของโรค ND ในประเทศไทย ใน Directive 2001/598/EC โดยจัดให้ประเทศไทยได้รับการรับรองตาม Model A ใน Directive 94/984/EC (CEC, 2001) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบัน ประเทศไทย ยังนิยมเลี้ยงไก่พื้นบ้านกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในลักษณะของการเลี้ยงไก่หลังบ้าน การเลี้ยงไก่สวยงาม หรือการเลี้ยงไก่ชนเพื่อการแข่งขัน ขณะเดียวกัน อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อ เพื่อการส่งออก ก็นับเป็นธุรกิจที่นำเงินตราเข้ามาภายในประเทศอย่างมหาศาลในแต่ละปี Awan และคณะ (1994) กล่าวถึง การเลี้ยงสัตว์ปีกตามชนบทว่า สามารถพบเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus; NDV) ได้เกือบทุกสายเชื้อ แต่สายเชื้อแบบรุนแรง พบได้บ่อยที่สุด

ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปีกที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรค ND การได้รับเชื้อไวรัส NDV แบบรุนแรง สามารถเกิดการระบาดที่รุนแรงได้ แต่การเลี้ยงสัตว์ปีกตามชนบท การเกิดโรคขึ้นกับหลายปัจจัย รวมถึง pathotype ของเชื้อไวรัส อายุไก่ สถานภาพภูมิคุ้มกันโรคของประชากร ความไวรับต่อโรค โรคแทรกซ้อน และอิทธิพลของฤดูกาล (Awan et al., 1994) จึงกล่าวได้ว่า อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในประเทศไทย มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาด ND ดังนั้น ควรมีมาตรการควบคุมโรค ND ที่มีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันความสูญเสียของไก่ในฟาร์ม หรือเกษตรกร จนถึงผลกระทบต่อการส่งออกเนื้อไก่ของประเทศต่อไป

วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล

นับตั้งแต่ การระบาดโรค ND ครั้งแรก ก็เริ่มมีการศึกษาหาแนวทางการป้องกัน และควบคุมโรคด้วยวัคซีน โดยมีแนวทางการพัฒนาวัคซีน 3 วิธีด้วยกัน คือ วัคซีน ND เชื้อเป็นที่ถูกทำให้ความรุนแรงต่ำลง วัคซีน ND เชื้อเป็นที่มีความรุนแรงต่ำตามธรรมชาติ และวัคซีน ND เชื้อตาย (Alexander, 1988)

1. วัคซีน ND เชื้อเป็น มักจำหน่ายในรูปของ freeze dried allantoic fluid ที่เตรียมจากเชื้อไวรัสที่อ่อนแรงในไข่ฟักที่มีตัวอ่อนของลูกไก่ (British Pharmacopoeia (Veterinary), 1998) ประกอบด้วย เชื้อไวรัสที่มีชีวิต นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากราคาถูก สามารถป้องกันโรคได้ดี การให้วัคซีนง่าย และสะดวก แต่ข้อเสีย คือ มีผลข้างเคียง ภายหลังการให้วัคซีน เช่น อาการทางระบบหายใจ และอัตราการไข่ลดลง (Brugh and Siegel, 1978) โดยทั่วไปแล้ว วัคซีนเชื้อเป็น ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี มักมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงยิ่งทำให้เกิดอาการข้างเคียงเพิ่มขึ้นด้วย เช่น การให้วัคซีน สายเชื้อ *La Sota* จะทำให้เกิดปัญหากับไก่อายุน้อย ที่ไวรับต่อโรค มากกว่า Hitchner-B1 แต่สายเชื้อ *La Sota* จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้มากกว่า (OIE, 1992)

วัคซีนเชื้อเป็นสามารถให้ได้ด้วยวิธีการผสมน้ำกิน การสเปรย์เป็นละอองละเอียด การหยอดจมูกหรือการหยอดตา (OIE, 1992) เนื่องจาก เชื้อไวรัส NDV มีชนิดของแอนติเจนเพียงแบบเดียว แม้ว่า เราอาจจำแนกความแตกต่างอย่างละเอียดได้โดยอาศัย โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody panel) การที่เชื้อไวรัส NDV มีชนิดของแอนติเจนเพียงแบบเดียวดังกล่าว ช่วยเอื้อประโยชน์ให้สามารถเลือกใช้วัคซีนได้ง่าย แม้ว่า ความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน อาจต้องเลือกใช้วัคซีนเชื้อเป็นที่มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันไป (Jones, 1998)

2. วัคซีน ND เชื้อตาย ประกอบด้วยส่วนของไวรัส นำมาทำให้คุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนหมดไป แต่ยังมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่ดี และส่วนที่เป็นแอดจูแวนท์ ช่วยเหนี่ยวนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดียิ่งขึ้น (Cross, 1988; Rautenschlein et al., 2001; WHO, 1976) British Pharmacopoeia (Veterinary) ฉบับปี ค.ศ. 1998 ให้คำจำกัดความ วัคซีน ND เชื้อตาย คือวัคซีนที่ประกอบด้วย อิมัลชัน หรือสารแขวนลอยของเชื้อไวรัส NDV สายเชื้อที่เหมาะสม นำมาทำให้หมดฤทธิ์ โดยยังคงคุณสมบัติ การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เชื้อไวรัส NDV ทั้งสายเชื้อรุนแรง และไม่รุนแรง สามารถใช้เป็นหัวเชื้อไวรัส (seed virus) อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนึงถึงความปลอดภัยแล้ว การใช้สายเชื้อแบบไม่รุนแรงเหมาะสมกว่า เนื่องจาก ภายหลังการให้วัคซีนแล้ว เชื้อไวรัสในวัคซีนเชื้อตาย จะไม่เพิ่มจำนวนอีกต่อไป ดังนั้น จำเป็นต้องใช้ปริมาณของเชื้อไวรัสมากกว่าวัคซีนเชื้อเป็นมาก เชื้อไวรัสสายเชื้อ Ulster2C ที่มีความรุนแรงน้อย จึงมีความเหมาะสม สำหรับการเตรียมวัคซีนเชื้อตาย (OIE, 1992) การให้วัคซีนเชื้อตาย สามารถให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ หรือเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (OIE, 1992)

วัคซีน ND เชื้อตายนั้นมีข้อดี คือ กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง สม่ำเสมอ และเป็นเวลานาน (Brugh and Sigal, 1978; Stone et al., 1978) การเก็บรักษาง่ายกว่า (Alexander, 1997) ไม่มีผลข้างเคียงเกี่ยวกับปัญหาระบบทางเดินหายใจอย่างอ่อน เช่นเดียวกับการให้วัคซีนเชื้อเป็น (Brugh and Stone, 1983) และการให้วัคซีนเชื้อตายจะไม่เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากวัคซีนติดตามมา อย่างไรก็ตาม ข้อเสีย คือ วัคซีนเชื้อตายมีราคาแพงกว่าวัคซีนเชื้อเป็น รวมถึง แรงงานการจับไก่ และการให้วัคซีนเป็นรายตัว (OIE, 1992) Stone (1980) ยังพบว่า ภายหลังการป้อนเชื้อพิษทับ อัตราการขับ และแพร่กระจายเชื้อไวรัส ND ในไก่ทดลองที่ให้วัคซีนเชื้อตาย จะสูงกว่า ไก่ทดลองที่ให้วัคซีนเชื้อเป็น

ในระยะแรก การใช้วัคซีน ND เชื้อตายมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ND ในไก่ได้ แต่มีปัญหาในการผลิต และการควบคุมให้เป็นไปตามมาตรฐาน ในกรณีที่ผลิตเป็นจำนวนมาก วัคซีน ND เชื้อตายที่มีอะลูมิเนียม ไฮดรอกไซด์ (aluminium hydroxide) นิยมใช้อย่างแพร่หลายในยุโรป แต่ได้ผลไม่ดีนัก จนเกิดการระบาดช่วงปี ค.ศ. 1970-1974 ยุโรปจึงนำวัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 และ *La Sota* นำมาใช้ (Alexander, 1988; Alexander, 1997) การระบาดครั้งนี้ ได้กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาวัคซีน ND เชื้อตายในน้ำมัน ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง และเป็นเวลานานกว่า (Box, 1975; Stone et al., 1978; Alexander, 1988) แม้ว่า วัคซีน ND เชื้อตายในน้ำมันจะมีราคาแพง เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีน ND เชื้อเป็น แต่วัคซีน ND เชื้อตายก็เป็นที่นิยม ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ โดยเฉพาะ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ (Cessi and Nardelli, 1974; Eidson et al., 1982; Stone et al., 1997) ในประเทศที่การระบาดของโรค ND เป็นโรคประจำถิ่น มักให้วัคซีน ND เชื้อเป็น ร่วมกับวัคซีน ND เชื้อตาย สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่า การให้วัคซีน ND เชื้อเป็น เพียงอย่างเดียว (Pakinyo and Sasipreeyajan, 1993) สอดคล้องกับการศึกษาของ Eidson และคณะ (1980) รายงานว่า ไก่พันธุ์ สายไก่เนื้อที่ให้วัคซีน ND เชื้อเป็น แล้วตามด้วยการให้วัคซีน ND เชื้อตาย จะมีระดับ HI แอนติบอดีที่สูงกว่า และนานกว่า ไก่ที่ได้รับวัคซีน ND เชื้อเป็นเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ ยังให้จำนวนไข่มากกว่าอีกด้วย

แอดจูแวนท์ (adjuvants)

แอดจูแวนท์ มีที่มาจากรากศัพท์ภาษาละตินว่า adjuvare หมายถึง ช่วยเหลือ ถูกใช้เรียกสารใดๆ ที่สามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนทั้งแบบ humoral และ cellular immune response (Gupta et al., 1993) เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา แอดจูแวนท์ กำลังเป็นที่สนใจมาก เนื่องจาก การพัฒนาวัคซีน แบบสับยูนิต บริสุทธิ์ (purified subunit) หรือวัคซีนสังเคราะห์โดยใช้เทคโนโลยีใหม่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ และรีคอมบิแนนท์ อย่างไรก็ตาม วัคซีนเหล่านี้ มักเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่ดี และต้องการแอดจูแวนท์ สำหรับช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Gupta et al., 1993)

วัคซีนอาจประกอบด้วย น้ำมัน หรือแอดจูแวนท์ อื่นๆ ที่เหมาะสม แอดจูแวนท์ ที่นิยมใช้ในวัคซีนสำหรับสัตว์ คือ อะลูมิเนียม ไฮดรอกไซด์ (aluminium hydroxide) เกลืออะลัม (aluminium salts) และน้ำมัน (Cross, 1988) วัคซีนที่มีการจำหน่ายทั่วไป เป็นวัคซีนเชื้อตาย น้ำ-ในน้ำมัน-ในน้ำ (water-in-oil-in-water emulsion; WOW) นิยมให้วัคซีนด้วยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง มากกว่า กล้ามเนื้อขา เนื่องจาก ทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบที่รุนแรง บริเวณตำแหน่งที่ให้วัคซีน (Fukanoki et al., 2001)

Cross (1988) แบ่งวัคซีน ND เชื้อตายที่ใช้น้ำมันเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ 1.) น้ำมัน-ในน้ำ (oil-in-water emulsion; OW) 2.) น้ำ-ในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) 3.) น้ำ-ในน้ำมัน-ในน้ำ (water-in-oil-in-water emulsion; WOW) การเตรียมวัคซีน OW และ WO ประกอบด้วย แอนติเจน ซึ่งอยู่ในส่วนของน้ำ ผสมกับส่วนของน้ำมัน ส่วน WOW เป็นอิมัลชันทวีคูณ (double emulsion) ที่ประกอบด้วย แอนติเจนอยู่ใน ส่วนของน้ำภายใน (internal aqueous phase) ส่วนของน้ำมัน (oil phase) และส่วนของน้ำภายนอก (external aqueous phase) (Stone et al., 1997) WHO (1976) กล่าวถึง การทำงานของวัคซีนรูปแบบ น้ำในน้ำมัน 3 วิธีด้วยกัน วิธีที่ 1 คือ การปล่อยแอนติเจนอย่างช้าๆ ออกจากตำแหน่งที่ให้วัคซีน วิธีที่ 2 คือ อิมัลชัน เป็นตัวนำแอนติเจนไปยังตำแหน่งต่างๆ ทั่วไปในระบบน้ำเหลืองและ วิธีที่ 3 คือ การเกิด granuloma reaction บริเวณตำแหน่งที่ให้วัคซีน และตำแหน่งต่างๆ ทั่วร่างกาย ซึ่งประกอบด้วย หยดน้ำมัน ล้อมรอบด้วยเซลล์ mononuclear cells (เซลล์ แมคโครฝาจ ลิมโฟไซต์ และพลาสมา เซลล์) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างแอนติบอดี โดยเฉพาะเซลล์ แมคโครฝาจ มีความสำคัญมาก เซลล์ แมคโครฝาจ จะเก็บกินหยดน้ำมันทั้ง บริเวณตำแหน่งที่ให้วัคซีน และตำแหน่งต่างๆ ทั่วร่างกาย กลไกการเก็บกินแบบ endocytosis และ การย่อยน้ำมัน มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกัน รวมถึง การเกิดพิษ

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ นิยมใช้วัคซีน ND เชื้อตายในรูปของ WO ประกอบด้วยแอดจูแวนท์ ได้แก่ น้ำมัน ผสมกับสารลดแรงตึงผิว (Stone, 1988) โดยที่น้ำมันเป็นส่วนประกอบสำคัญ และมีผลต่อคุณภาพของวัคซีนเป็นอย่างมาก Stone (1997) กล่าวถึง คุณลักษณะของน้ำมันที่ดี ในการเตรียมวัคซีน ND เชื้อตายได้ ดังนี้

1. มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค และการป้องกันโรคที่ดี

การประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรค ND มักทำโดยการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีในกระแสเลือด และด้วยการป้อนเชื้อพิษทับ (Stone et al., 1980; Mass et al., 1999) วัคซีน ND เชื้อตาย ชนิด WO ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดให้สูง และให้การป้องกันโรคได้เป็นเวลานาน (Cessi and Nardelli, 1974; Box, 1975) วิธีการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการควบคุมโรค นิยมใช้ผลการทดสอบทางซีโรโลยี โดยวิธีการที่นิยมที่สุด คือ hemagglutination inhibition (HI) test (Gelb and Cianci, 1987) สอดคล้องกับ Goddard และคณะ (1988) เสนอแนะให้ประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน โดยอาศัยการ

ทดสอบทางซีโรโลยี ทดแทนการทดสอบด้วยวิธีป้อนเชื้อพิษทับ โดยการป้อนเชื้อพิษทับ ให้ใช้สำหรับวัคซีนบางชุดการผลิตที่ต้องการยืนยันผลให้ชัดเจนเท่านั้นวิธีการทดสอบ HI test เป็นวิธีการที่ช่วยบ่งชี้ถึง การป้องกันโรค และการสร้างภูมิคุ้มกันโรค ที่เชื่อถือได้

British Pharmacopoeia (Veterinary) (1998) กำหนดเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ND เชื้อตาย โดยให้ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ ไก่ทดลองที่เลี้ยงแบบปลอดเชื้อ อายุ 21-28 วัน โดยใช้ขนาด 1/50 ของขนาดที่ให้ตามปรกติ ภายหลังจากนั้น 17-21 วัน ให้เก็บซีรัมไก่ทั้งกลุ่มที่ให้วัคซีน และกลุ่มควบคุม จำนวน 10 ตัวที่อายุเท่ากัน และเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี HI test วัคซีนจะผ่านการทดสอบได้หาก ค่าเฉลี่ย HI titre ของกลุ่มที่ให้วัคซีน มากกว่าหรือเท่ากับ 4 $\log_2$ โดยกลุ่มที่ไม่ให้วัคซีนมีค่าเฉลี่ย HI titre ต่ำกว่า 2 $\log_2$ หากผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ ให้ทดสอบด้วยการป้อนเชื้อพิษทับ

Mass และคณะ (1999) พบว่า ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน HI ในกระแสเลือด มีความสัมพันธ์กับการป้องกันโรค ภายหลังการป้อนเชื้อพิษทับ โดย Rweyemamu และคณะ (1986) พบว่า ค่าเฉลี่ย HI ประมาณ 1:4 (2 $\log_2$) สามารถป้องกันโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย HI มากกว่า 1:64 (6 $\log_2$) สามารถป้องกันโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ระดับแอนติบอดีของไก่ที่ได้รับวัคซีนในน้ำมันที่อายุ 3 สัปดาห์สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดที่ 4 สัปดาห์ภายหลังการให้วัคซีน (Cessi and Nardelli, 1974) ประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค และการป้องกันโรค ยังขึ้นกับพันธุกรรมไก่ด้วย ผลการทดลอง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ พบว่าไก่เนื้อ สามารถสร้าง HI แอนติบอดีได้ต่ำกว่าไก่ปลอดเชื้อ เป็น 2-5 log2 และการป้องกันโรคก็ต่ำกว่าไก่ไข่มากเช่นกัน (Mass et al., 1999)

2. มีความหนืด (viscosity) ต่ำ

การวัดความหนืด ทำโดยการจับเวลาในการไหลของของเหลวในปิเปตพลาสติก ขนาด 1.0 มิลลิลิตร จากขีดบอกปริมาตร 0.4 ไปถึง 0.0 มิลลิลิตร (Stone et al., 1978; Ston and Xie, 1990) ถึงแม้ว่าความแตกต่างของความหนืดของวัคซีน ไม่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค ND (Stone et al., 1981; Stone, 1993) แต่วัคซีนเชื้อตายที่ดี ควรมีความหนืดต่ำ เพราะช่วยให้การปฏิบัติงานในฟาร์มซึ่งมีไก่จำนวนมาก ทำได้รวดเร็วขึ้น (Stone, 1993; Stone, 1997)

3. มีความคงตัว (stability) อยู่นาน

ความคงตัวของวัคซีน คือ ระยะเวลาที่วัคซีนสามารถรักษาสถานภาพของอิมัลชันไว้ได้ จนกระทั่งเกิดการแยกของส่วนที่เป็นน้ำออกจากอิมัลชัน ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง (Cessi and Nardelli, 1974; Stone, 1991) ความคงตัวของวัคซีนเชื้อตาย ในน้ำมันขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ขนาดของอนุภาคอิมัลชัน (emulsion particles) ชนิดของสารลดแรงตึงผิว คุณสมบัติของน้ำมัน และค่า HLB (hydrophile –lipophile balance)

(Stone, 1991) ความคงตัวของวัคซีนสามารถทดสอบได้ในหลอดทดลอง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตระยะเวลาของการแยกส่วนที่เป็นน้ำ ที่ก้นหลอดทุกวัน

4. มีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ (tissue reaction) ต่ำ

น้ำมันโดยเฉพาะน้ำมันแร่ (mineral oil) ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ บริเวณที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย เป็นสาเหตุของการคัดซากไก่ทิ้งที่โรงฆ่า (WHO, 1976; Stone, 1997) แต่ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่คงอยู่เป็นเวลานาน ทำให้มีการแทรกของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะ พลาสมาเซลล์ และลิมโฟไซต์ ในตำแหน่งที่ฉีดวัคซีน มีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดให้มีระดับสูง (Yamanaka et al., 1993) ซึ่งสอดคล้องกับ Franchini และคณะ (1991) ที่รายงานว่า ถ้าปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อย จะส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันโรคลดลงได้

การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ นิยมให้วัคซีนเชื้อตายไก่ทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหน้าอก (Stone, 1993; Yamanaka et al., 1993; Stone, 1997) ลักษณะรอยโรคสำคัญ คือ ถุงน้ำสีเหลืองขุ่นตามเยื่อพังผืดระหว่างกล้ามเนื้อหน้าอก ชั้นนอก และชั้นใน และลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบถุงน้ำเล็กๆ จำนวนมาก มี fibrous capsule ชั้นบางๆ หุ้ม และการรวมกลุ่มของเซลล์ ลิมโฟไซต์ และอาจพบ granulomatous reaction ได้ (Droual et al., 1990)

การใช้น้ำมันจากธรรมชาติ ทดแทนน้ำมันแร่

ปัจจุบันวัคซีนเชื้อตายส่วนใหญ่ นิยมใช้ น้ำมันแร่ ซึ่งมีปัญหาการตกค้างในเนื้อเยื่อไก่เป็นเวลานาน ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 42 วันเพื่อให้น้ำมันแร่ถูกกำจัดออกไป ก่อนนำเข้าโรงฆ่า (Stone and Xie, 1990; Stone, 1993; Stone, 1997) ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่รุนแรง ภายหลังการฉีดวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากน้ำมันแร่ ยังทำให้ต้องปลดซากไก่ทิ้ง สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ (Stone, 1997) เช่น ซากไก่พันธุ์ และไก่ไข่ ที่โรงฆ่า การให้วัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยน้ำมันแร่เข้ากล้ามเนื้อหน้าอก อาจเกิดรอยโรคตรวจพบได้เป็นเวลานานถึง 2 ปี ภายหลังการให้วัคซีน กรณี เนื้อไก่ถูกปรุงก่อนการบริโภค น้ำมันแร่อาจถูกทำลาย หรือเปลี่ยนรูปไปจนสังเกตไม่เห็น แต่กรณี เนื้อไก่ที่ไม่ได้ถูกปรุง รอยโรคและสิ่งตกค้างที่เหลืออยู่ อาจทำให้ผู้บริโภค ไม่พึงพอใจได้ (Droual et al., 1990) ดังนั้น ผู้บริโภคบางกลุ่ม จึงไม่ต้องการให้ใช้วัคซีนที่ประกอบด้วยน้ำมันแร่ ในไก่ที่จะนำมาบริโภค (Stone, 1993)

ปัญหาของปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่รุนแรงมิได้เกิดขึ้นเฉพาะกับไก่เท่านั้น ระหว่างการปฏิบัติงานในฟาร์ม การให้วัคซีนเชื้อตาย อาจเกิดอุบัติเหตุจากการฉีดวัคซีนที่มีน้ำมันแร่ผิดพลาดเข้าตัวเอง คนงานสามารถเรียกร้องความเสียหายจากนายจ้างผู้ผลิตไก่ได้ (Stone, 1997) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า ส่วนประกอบของ น้ำมันแร่ สามารถก่อมะเร็งได้ในหนูทดลองบางสายพันธุ์ (WHO, 1976) โดยการก่อมะเร็ง และความเป็นพิษของน้ำมันแร่ เกิดจากส่วนผสมที่ซับซ้อนมากของสารไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน รวมถึง aliphatic

hydrocarbon (non-cyclic paraffin) และ cyclic hydrocarbon (napthalenes) (Gupta et al., 1993) ดังนั้น แนวทางการพัฒนาวัคซีนเชื้อตาย คือ ความพยายามในการหาน้ำมันชนิดอื่น มาทดแทนน้ำมันแร่ (Stone, 1997) โดยเฉพาะ น้ำมันจากวัตถุดิบตามธรรมชาติ (Stone and Xie, 1990) โดยต้องมีประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง ความหนืดต่ำ เก็บรักษาได้เป็นเวลานาน และมีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อย รวมถึงเอื้ออำนวยต่อการผลิตจำนวนมากๆ การผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันดี และมีความคุ้มทุน (Stone, 1997)

Yamanaka และคณะ (1993) พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันสังเคราะห์ ISA-70 มีปฏิกิริยาต่อเนื่อเยื่อน้อยกว่า วัคซีนที่เตรียมจาก น้ำมันแร่ แต่สามารถกระตุ้น HI แอนติบอดีได้ใกล้เคียงกัน Stone และ Xie (1990) พบว่า วัคซีนที่เตรียมจาก terpene oil เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ สามารถลดอุบัติการ และระยะเวลาการเกิดรอยโรคที่บริเวณกล้ามเนื้อที่ฉีดวัคซีนได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจาก terpene oil เป็นส่วนประกอบตามธรรมชาติของผิวหนัง และเนื้อเยื่อสัตว์ จึงสามารถถูกกำจัดออกจากเนื้อเยื่อ และมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อไก่ ดังนั้น Stone และ Xie (1990) มีความเห็นว่า ระยะเวลา 42 วันที่กำหนดไว้ข้างต้นสำหรับน้ำมันแร่ น่าจะสามารถผ่อนปรนลงได้ terpene oil ที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด ได้แก่ squalane และ squalene แต่ squalane จะมีความหนืดสูงกว่า และเมื่อนำมาเตรียมเป็นวัคซีนจะมีความคงตัวมากกว่า

Stone (1993) ทดลองใช้น้ำมันจากพืช สัตว์ และน้ำมันสังเคราะห์ หลายชนิด พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันปลา (orange roughy fish oil) ผสมกับขี้ผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ กระตุ้น HI แอนติบอดี ไม่แตกต่างกับวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ แต่มีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อยกว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ และเมื่อเปรียบเทียบความหนืดของน้ำมันปลา ผสมขี้ผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ กับวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันชนิดอื่น ในการทดลองเดียวกัน ยกเว้น น้ำมันแร่ พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันปลา ผสมขี้ผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์มีความหนืดต่ำที่สุด Stone (1997) ทำการทดลองซ้ำในลักษณะเดียวกัน พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันพืช สัตว์ และน้ำมันสังเคราะห์ให้ HI แอนติบอดีได้ใกล้เคียงกับน้ำมันแร่ ส่วนวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากน้ำมันชนิดอื่น มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำกว่า และมีความหนืดสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ (Stone, 1993)

การใช้วิตามิน อี

วิตามิน อี เป็นคำเรียก สารประกอบ 2 ชนิด คือ tocopherols และ tocotrienols สามารถพบได้ตามธรรมชาติใน น้ำมันจากพืช ไข่ ตับ ถั่วฝักยาว และพืชใบเขียวทั่วไป (Gore and Qureshi, 1997) วิตามิน อี ส่วนใหญ่ ที่มีการจำหน่ายมักอยู่ในรูปของ dl-α-tocopheryl acetate (Pond et al., 1995) องค์กร National Research Council (1994) กำหนดให้ สูตรอาหารสำหรับไก่เนื้อที่เลี้ยงตั้งแต่ 0 ถึง 8 สัปดาห์ ควรมีระดับวิตามิน อี ในอาหาร 10 IU ต่อกิโลกรัม ขณะที่ ไก่ไข่ พันธุ์ที่ให้ไข่สีน้ำตาล อายุ 0-6 สัปดาห์ ควรมีระดับ

วิตามิน อี ในอาหาร 9.5 IU ต่อกิโลกรัม และ อายุ 6-18 สัปดาห์ ควรมีระดับวิตามิน อี ในอาหาร 4.7 IU ต่อกิโลกรัม

การเสริมวิตามิน อี ปริมาณมาก ให้กับไก่ที่ได้รับอาหารที่มีวิตามิน อี สมดุลอยู่แล้วตามปรกติ สามารถเพิ่มการสร้างแอนติบอดี โดยเฉพาะ Immunoglobulin G (IgG) ต่อแอนติเจนได้หลายชนิด ในสัตว์หลายชนิด (Pond et al., 1995) การเสริม วิตามิน อี ในอาหาร รูปของ dl-α-tocopherol acetate ขนาด 3 ถึง 5 เท่าของสูตรอาหารปรกติเชิงพาณิชย์ ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ CD4+ CD8+ T-cells ในต่อมธัยมัส และม้าม เมื่อไก่อายุ 7 สัปดาห์ (Erf et al., 1998)

วิตามิน อี มีผลส่งเสริมภูมิคุ้มกันต่อโรคติดเชื้อ *อีเชอริเชีย โคลัย* (Tengerdy and Brown, 1977) โรคนิวคาสเซิล (Franchini et al., 1995) และโรคกัมโบโร (McIlroy et al., 1993) ในไก่

Franchini และคณะ (1991 และ 1995) ใช้วิตามิน อีในรูปของ dl-α-tocopheryl acetate อัตราส่วน 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันแร่ เป็นสารเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกัน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีให้เร็ว และสูงขึ้นกว่าเดิม Franchini และคณะ (1995) อธิบายว่า อาจเกิดจาก ผลร่วมกันระหว่างปฏิกิริยาการอักเสบจากน้ำมันแร่ และบทบาทของวิตามิน อี ต่อการทำงานของเซลล์ตามระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์ลิมโฟไซต์ เซลล์มาโครฝาจ และพลาสมา เซลล์ ที่ตำแหน่งให้วัคซีน ขณะเดียวกัน McIlroy และคณะ (1993) ยังพบว่า การเสริมวิตามิน อี ในอาหาร ช่วยให้ผลตอบแทนของฟาร์มไก่ที่ป่วยด้วยโรค IBD แบบไม่แสดงอาการ และเสริมวิตามิน อีในอาหารระดับสูง 178 IU ต่อกิโลกรัม ดีกว่า ฟาร์มไก่ที่ป่วยด้วยโรคเดียวกัน แต่เสริมวิตามิน อีระดับปรกติ 48 IU ต่อกิโลกรัม

Gore และ Qureshi (1997) ทดลองให้วิตามิน อี ขนาด 10 IU โดยการฉีดเข้าไข่ฟักของไก่เนื้อ 3 วัน ก่อนฟักเป็นตัว พบว่า อัตราการฟัก น้ำหนักตัว น้ำหนักต่อมเบอร์ซา และม้าม ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ อิมมูโนกลอบบูลิน (immunoglobulin; Ig) ทั้งหมด และอิมมูโนกลอบบูลิน เอ็ม (IgM) ต่อเม็ดเลือดแดงแกะ ภายหลังการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะเป็นเวลา 7 วัน จะสูงมาก และเมื่อให้เม็ดเลือดแดงแกะซ้ำอีกครั้งที่ 14 วันภายหลังการฉีดครั้งแรก ช่วยให้ อิมมูโนกลอบบูลิน ทั้งหมด และอิมมูโนกลอบบูลิน เอ็ม สูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ ลูกไก่เนื้อที่ได้รับวิตามิน อี ขนาด 10 IU ผ่านไข่ฟัก จะมี Sephadex-elicited abdominal exudate cells และศักยภาพของเซลล์แมคโครฝาจ (macrophage phagocytic potential) ในการเก็บกินมากขึ้น และการสร้างไนไตรท์ (Nitrite; NO) โดยเซลล์แมคโครฝาจ ยังเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม อีกด้วย นอกจากนี้ หน้าที่สำคัญของวิตามิน อี อีกประการหนึ่ง คือ การเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ภายในเซลล์ (intracellular antioxidant) โดยการป้องกันปฏิกิริยา ออกซิเดชัน ของไขมันไม่อิ่มตัว ภายในเซลล์ จึงช่วยป้องกันผนังหุ้มเซลล์จากการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยา ออกซิเดชัน (Gore and Qureshi, 1997) McIlroy (1993) แนะนำว่า ผู้ผลิตสามารถลดต้นทุนการเสริมวิตามิน อี ในอาหารได้ 3 วิธี คือ การเสริม

วิตามิน อี ในระดับต่ำตลอดอายุการเลี้ยงไก่ หรือการเสริมวิตามิน อี ในระดับสูงในบางช่วงของการเลี้ยงไก่เท่านั้น หรือสองวิธีข้างต้นร่วมกัน

ผลของวิตามิน อี ในทางตรงกันข้าม Boa-Amponsem และคณะ (2001) พบว่า การพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน ระบบการควบคุมอุณหภูมิ และระบบทางเดินอาหารเกิดขึ้นในช่วงระยะแรกของการฟักเป็นตัว การเสริมวิตามิน อี ในอาหารไก่พันธุ์ อาจมีผลขัดขวางการพัฒนาของระบบต่างๆ ข้างต้นในลูกไก่ ขณะเดียวกัน Friedman และคณะ (1998) พบว่า ผลของการเสริมวิตามิน อี ในอาหารระดับต่ำ สามารถช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชัน และช่วยให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ดีขึ้น แต่การเสริมวิตามิน อี ในอาหารระดับสูงอาจเกิดปฏิกิริยา โปรออกซิเดชันขึ้นแทน และส่งผลให้ระดับแอนติบอดีในกระแสโลหิตลดลง

การปรับสูตรการเตรียมวัคซีนเชื้อตาย

Stone และคณะ (1981) กล่าวว่า การปรับปรุงวัคซีน ด้วยการปรับสูตร อิมัลชัน ช่วยให้ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายในน้ำมันดีขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องเติมแอนติเจนเพิ่ม เป็นการประหยัดต้นทุนการผลิตลง เนื่องจาก แอนติเจนเป็นต้นทุนที่สำคัญของการผลิตวัคซีน Cajavec และคณะ (1996) เตรียมวัคซีนเชื้อตาย WOW โดยใช้แอนติเจนบางส่วนของไวรัส (virus subunit) ซึ่งได้จากการทำลายส่วนประกอบของเชื้อไวรัสทั้งหมด หรือบางส่วน (complete or partial disruption) ด้วย Tween80 พบว่า ความหนืดต่ำลง ช่วยให้การฉีดและการทำความสะอาดอุปกรณ์ฉีดวัคซีนได้ง่าย มีความคงตัวนานขึ้น และช่วยลดสัดส่วนของน้ำมันแร่ลง (Cross, 1988) Fukanoki และคณะ (2001) ยังพบว่า การเตรียมวัคซีนเชื้อตายในรูปของ WOW ดูเหมือนว่าจะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อยกว่า WO เนื่องจาก มีความเข้มข้นของ liquid paraffin น้อยลง

ปัจจุบัน เทคนิคการให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าไข่ฟัก เป็นวิธีการใหม่ในการให้วัคซีนไก่ ไก่เนื้อในสหรัฐอเมริกา มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ให้วัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์โดยการฉีดเข้าไข่ฟัก ช่วยประหยัดมากทั้งเวลา และแรงงาน โดยไม่จำเป็นต้องจับตัวสัตว์ นอกจากนั้น ยังสามารถให้ภูมิคุ้มกันได้เร็ว ภายหลังการฟักเป็นตัว (Rautenschlein et al., 2000) Stone และคณะ (1997) ให้ความเห็นว่า สามารถใช้วัคซีน ND เชื้อตายในรูปของ WOW ฉีดเข้าไข่ฟัก และกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในลูกไก่ได้ นอกจากนี้ ยังสามารถนำวัคซีนป้องกันโรค มาเร็กซ์ เชื้อเป็นใส่ในส่วนของน้ำที่อยู่ภายนอก เพิ่มขึ้นจากวัคซีน ND เชื้อตายที่มีอยู่แล้ว ในส่วนของน้ำที่อยู่ภายในแต่วัคซีนเชื้อตายในรูปของ WOW มักมีประสิทธิภาพด้อยกว่า WO (Fukanoki et al., 2001)

Fukanoki และคณะ (2001) เตรียมวัคซีนเชื้อตายในรูปของ WOW ประกอบด้วย แอนติเจนใน PBS, liquid paraffin, diglyceryl monooleate, polysorbate 80 และ PBS อัตราส่วน 30 : 25 : 10 : 5 : 2 : 28 ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบที่รุนแรง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เหมือนกับวัคซีนเชื้อตายในรูปของ WO

Gore และ Qureshi (1997) กล่าวว่า การให้วิตามิน อี โดยการฉีดเข้าไข่ฟัก ช่วยส่งเสริมคุณภาพของลูกไก่งวง และลูกไก่เนื้อ จากการเหนี่ยวนำแอนติบอดี และการตอบสนองของเซลล์แมคโครฝาจให้ดีขึ้น

การพัฒนาวัคซีนเชื้อตาย คือ ความพยายามหาน้ำมันชนิดอื่นทดแทน น้ำมันแร่ นอกเหนือจากน้ำมันที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว น้ำมันปาล์ม เป็นวัคถุดิบที่หาได้ง่ายภายในประเทศ ราคาถูก และยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันชนิดอื่น สามารถลดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อลงได้ แต่ประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดี ยังน้อยกว่า และความหนืด ยังสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ ในการทดลองของ Franchini และคณะ (1991 และ 1995) พบว่า การใช้วิตามิน อี ในรูปของ dl-α-tocopheryl acetate สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้น HI แอนติบอดีให้สูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ ที่จะใช้วิตามิน อี ผสมในวัคซีนที่จะพัฒนาขึ้นมาให้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงขึ้น และลดความหนืดลง โดยการปรับรูปแบบการเตรียมเป็น WOW ตามวิธีของ Cajavec และคณะ (1996)

การทดสอบระดับภูมิคุ้มกันโรค ND ด้วยวิธี Hemagglutination Inhibition Test

การตรวจติดตามสถานภาพทางภูมิคุ้มกันโรค ND ในฟาร์มไก่ เป็นพื้นฐานสำคัญในการจัดการโปรแกรมการให้วัคซีน ND (Brugh et al., 1978) หรือการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส (Cross, 1988)

สถานภาพทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส NDV นิยมประเมินด้วยวิธีการทดสอบทางซีโรโลยี ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี คือ Neutralisation, Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ปัจจุบัน วิธีการทดสอบ Hemaglutination Inhibiotion (HI) test เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด (Alexander, 1998; Alexander, 2000) การทดสอบ HI มี 2 วิธี คือ วิธีแรก คือ constant-virus diluted serum เรียกว่า beta method และวิธีที่สอง คือ constant-serum diluted virus เรียกว่า alpha method ปัจจุบัน วิธี beta method เป็นวิธีทดสอบที่ใช้กันแพร่หลายในประเทศต่างๆ รวมทั้งในประเทศไทย ด้วย (เชิดชัย และคณะ, 2530)

การแปลผลการทดสอบ HI ต้องระมัดระวัง เนื่องจาก ผลการทดสอบมักมีความแตกต่างกันระหว่างห้องปฏิบัติการ (Brugh et al., 1978) เชิดชัย และคณะ (2530) รายงานว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า HI titers คือ ชนิดของแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ และระยะเวลาที่ซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยเฉพาะ ปัจจัยประการหลังนี้ สอดคล้องกับ การศึกษาของ Brugh และคณะ (1978) พบว่า ค่าเฉลี่ยของไตเตอร์จะเพิ่มขึ้น $\log_2$ 2.3 (เป็น 5 เท่า) ภายหลังการทำปฏิกิริยาระหว่างซีรัม และแอนติเจน เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

ระดับ HI แอนติบอดี อาจแปลผลเป็นบวก กรณี เกิดการยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยา การจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ที่ความเจือจางของซีรัม มากกว่า 1 : 8 ต่อแอนติเจนที่ใช้ทดสอบขนาด 4 HAU (OIE, 1992) กรณีที่ไก่ ไม่เคยได้รับวัคซีน ผลการทดสอบ HI ที่เป็นบวก จะบ่งชี้ถึงการสัมผัสเชื้อไวรัส NDV อย่างแน่ชัด (Cross, 1988)

ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อเป็นเพียงครั้งเดียว ระดับ HI titer ในไก่ อาจเป็น 2^4 ถึง 2^6 และภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตายซ้ำ จะสูงขึ้นเป็น 2^9 ถึง 2^{11} (Cross, 1988) อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันจากแม่ มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน Zakay-Rones และ Levy (1972) พบว่า ลูกไก่อายุ 3-5 วัน ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ สามารถตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีสูงกว่า ลูกไก่ที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตายในน้ำมันที่มีปริมาณไวรัสเท่ากัน เข้ากล้ามเนื้อ

การคำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต ผลการทดสอบทางซีโรโลยีของซีรัมแต่ละตัวอย่าง มักแสดงเป็น ค่าความเจือจางสุดท้ายของซีรัมที่เกิดปฏิกิริยาต่อการทดสอบ โดยทั่วไป ห้องปฏิบัติการทางซีโรโลยี และไวรัสวิทยานิยมเจือจางซีรัมลงครั้งละสองเท่า (twofold dilution) อาจเริ่มจาก ระดับความเจือจางเริ่มต้นเป็น 10 หรือ 2 ก็ได้ เช่น 10, 20, 40, ….320 หรือ 2, 4, 8,…. 256 ตามลำดับ ค่าที่ได้เป็นผลการทดสอบทางเลขคณิต สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในกรณีที่แปลผลการทดสอบจากซีรัมจำนวนไม่มาก เมื่อจำนวนของซีรัมเพิ่มขึ้น การคำนวณค่าเฉลี่ยเลขคณิตใช้เวลามาก นอกจากนี้ ซีรัมส่วนน้อยที่มีระดับสูง หรือต่ำจะมีผลกระทบต่อค่าเฉลี่ยเลขคณิต ทำให้แปลผลการทดสอบผิดพลาดได้ ดังนั้น ผลการทดสอบทางซีโรโลยีส่วนใหญ่ จึงนิยมใช้ geometric mean titers(GMT) สำหรับแปลผลการทดสอบ สูตรการคำนวณค่า GMT คือ

$$GM = \sqrt[n]{X_1 X_2 X_3 \ldots X_n}$$

โดยกำหนด X คือ ค่าผลการทดสอบของตัวอย่างซีรัม

n คือ จำนวนตัวอย่าง (Villegas and Purchase, 1989)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัคซีน นิวคาสเซิล เชื้อตาย

3.1.1 การเตรียมเชื้อไวรัส

3.1.1.1 ใช้เชื้อไวรัส นิวคาสเซิล สายเชื้อท้องถิ่น (*Local*) และสายเชื้อลาโซต้า (*La Sota*) แต่ละชนิดเจือจางใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ที่ปราศจากเชื้อ อัตราส่วน 1 : 100

3.1.1.2 กรองสารละลาย ผ่านกระดาษกรอง nitrocellulose membrane ขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.1.3 ฉีดเข้าไข่ฟัก ที่มีตัวอ่อนแข็งแรง อายุ 11-12 วัน ฟองละ 0.2 มิลลิลิตร เข้า Allantoic cavity

3.1.1.4 นำไข่ฟักเข้าตู้ฟักที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้น 55-60 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.1.5 เก็บ allantoic fluid (AF) จากไข่แต่ละฟอง นำมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส

3.1.1.6 นำส่วนใสของ AF ที่แยกมาได้ 10 มิลลิลิตร ทดสอบความเข้นเชื้อไวรัสด้วยวิธี Hemagglutination test และทดสอบ 50 % embryo infective dose หรือ EID_{50}

3.1.2 ส่วนผสมของวัคซีนเชื้อตาย

ตารางที่ 3.1 การเตรียมวัคซีน ND เชื้อตาย ในรูปของ WO และ WOW สูตรต่างๆ โดยมีสัดส่วนของน้ำมันแร่ น้ำมันปาล์ม และวิตามิน อี ตามสูตร 1-8 ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

FORMULATION	TYPE	OIL PHASE (ml.)				AQUEOUS PHASE (ml.)	
		Mineral oil	Palm oil	Vit.E	Span 80	Stock Solution	Tween 80
1	*WO (mineral)*	72.0.	-	-	8.0	19.2	0.8
2	*WO (mineral)+Vit.E*	57.6	-	14.4	8.0	19.2	0.8
3	*WO (Palm)*	-	72.0	-	8.0	19.2	0.8
4	*WO (Palm) + Vit.E*	-	57.6	14.4	8.0	19.2	0.8
5	*WOW (mineral)*	30.0	-	-	3.4	63.3	3.3
6	*WOW (mineral)+Vit.E*	24.0	-	6.0	3.4	63.3	3.3
7	*WOW (palm)*	-	30.0	-	3.4	63.3	3.3
8	*WOW(palm)+Vit.E*	-	24.0	6.0	3.4	63.3	3.3
9	*Commercial Vaccine*	วัคซีนเชื้อตาย Chick-NK ของบริษัท Fort Dodge สายเชื้อ Kimber					

3.1.2.1 การเตรียมวัคซีนในรูป WO

3.1.2.1.1 การทำให้เชื้อไวรัสแต่ละชนิด ให้หมดฤทธิ์ ตามวิธีของ Stone และคณะ (1978) นำส่วนใสของน้ำ AF ที่แยกได้ตามขั้นตอนการเตรียมเชื้อไวรัส ปริมาตร 19.1มิลลิลิตร เติมฟอร์มาลิน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟอร์มาลิน เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้เป็น stock solution ปริมาตร 19.2 มิลลิลิตร

3.1.2.1.2 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 1 ตามวิธีของ Stone และคณะ (1978)

3.1.2.1.2.1 ผสม stock solution ปริมาตร 19.2 มิลลิลิตร กับ Tween 80 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น aqueous phase ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.1.2.1.2.2 ผสมน้ำมันแร่ ปริมาตร 72.0 มิลลิลิตรกับ Span 80 ปริมาตร 8.0 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นบน magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น oil phase ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

3.1.2.1.2.3 ค่อยๆ ผสม aqueous phase ปริมาตร 20 มิลลิลิตรกับ oil phase ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

3.1.2.1.2.4 ปั่นเป็นเวลา 2 นาทีด้วยเครื่องปั่น blender cups ได้เป็น วัคซีน ND เชื้อตายสูตร WO ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.1.2.1.3 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 2 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 โดยใช้น้ำมันแร่ ปริมาตร 57.6 มิลลิลิตร และวิตามิน อี หรือ (±) - α-Tocopheryl acetate บริษัท SIGMA® รหัสสารเคมี T-3376 ชุดการผลิต LOT 11K1687 ปริมาตร 14.4 มิลลิลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันแร่)ตามวิธี Stone และคณะ(1978) และ Franchini และคณะ(1995)

3.1.2.1.4 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 3 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 โดยใช้น้ำมันปาล์ม แทนน้ำมันแร่

3.1.2.1.5 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 4 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 โดยใช้น้ำมันปาล์ม แทนน้ำมันแร่ แต่ใช้น้ำมันปาล์ม ปริมาตร 57.6 มิลลิลิตร และวิตามิน อี ปริมาตร 14.4 มิลลิลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์ม)

3.1.2.2 การเตรียมในรูปของ WOW

3.1.2.2.1 การทำให้เชื้อไวรัสแต่ละชนิดให้หมดฤทธิ์ ดัดแปลงจากวิธีของ Cajavec และคณะ (1996) นำส่วนใสของน้ำ AF ที่แยกได้ในขั้นตอนการเตรียมเชื้อไวรัส ปริมาตร 17.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 35 % Tween 80 ปริมาตร 7.1 มิลลิลิตร เติมฟอร์มาลิน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟอร์มาลินเป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้เป็น stock solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.1.2.2.2 การเตรียมวัคซีน สูตรที่ 5 ดัดแปลงจากวิธี Cajavec และคณะ (1996)

3.1.2.2.2.1 นำ stock solution ปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร ผสมกับ PBS pH 7.0 ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 25.0 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น aqueous phase I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.1.2.2.2 นำ aqueous phase I ปริมาตร 16.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 5% Tween 80 ปริมาตร 16.6 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น aqueous phase II ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร

3.1.2.2.3 ผสมน้ำมันแร่ ปริมาตร 30.0 มิลลิลิตรกับ Span 80 ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น oil phase II ปริมาตร 33.4 มิลลิลิตร

3.1.2.2.4 นำ oil phase ปริมาตร 33.4 มิลลิลิตร ผสมกับ aqueous phase I ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร ปั่น 5 นาทีด้วยเครื่องปั่น blender cups ได้เป็น water in oil phase I ปริมาตร 66.7 มิลลิลิตร

3.1.2.2.5 นำ water in oil phase I ปริมาตร 66.7 มิลลิลิตรผสมกับ aqueous phase II ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร ปั่น 5 นาทีด้วยเครื่องปั่น blender cups ได้เป็น วัคซีน ND เชื้อตาย WOW ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.1.2.2.3 การเตรียมการเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 6 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำมันแร่ ปริมาตร 24.0 มิลลิลิตร และวิตามิน อี ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันแร่) ตามวิธีของ Stone และคณะ (1978) และ Franchini และคณะ (1995)

3.1.2.2.4 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 7 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำมันปาล์ม แทนน้ำมันแร่

3.1.2.2.5 การเตรียมวัคซีนของสูตรที่ 8 วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำมันปาล์ม แทนน้ำมันแร่ แต่ใช้น้ำมันปาล์ม ปริมาตร 24.0 มิลลิลิตร และวิตามิน อี ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์ม)

3.1.3 วัคซีนเชื้อตายนำเข้า *(Commercial Vaccine)* คือ Chick N-K สายเชื้อ Kimber ของบริษัท Fort Dodge® ชุดการผลิต serial no. 009/01 วันที่หมดอายุ Exp. Date MAR/03 ใช้ชุดการผลิตเดียวกันตลอดการทดลอง

3.2 การทดสอบความหนืด ตามวิธีของ Stone และคณะ (1978) และ Stone และ Xie (1990) โดยการดูดวัคซีนเชื้อตายที่ทดสอบความหนืดด้วยปิเปต พลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร และจับเวลาเป็นวินาที นับตั้งแต่ปล่อยวัคซีนมาในแนวตั้ง จากระดับ 0.4 มิลลิลิตรถึง 0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้งต่อการทดสอบ โดยใช้นาฬิกาดิจิตอล ของบริษัท CASIO ที่ความละเอียด 3 ตำแหน่ง

3.3 การทดสอบความคงตัว ดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1991) คือ ระยะเวลา (สัปดาห์) ที่วัคซีนสามารถรักษาสถานะอิมัลชันไว้ได้ จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจนของส่วนที่เป็นน้ำอยู่ใต้ชั้นของอิมัลชันในหลอดแก้วปิดสนิท ภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.4 การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ภายหลังการให้วัคซีน ND เชื้อตาย แต่ละสูตร ชนิด และรูปแบบ เป็นเวลา 12 วัน ตรวจปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อของวัคซีน โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1997) ตรวจดูรอยโรคที่กล้ามเนื้อหน้าอกในตำแหน่งที่ฉีดวัคซีน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ได้แก่ การเปลี่ยนสี การอักเสบ การบวมน้ำ การเกิดก้อน granuloma ความแข็งของกล้ามเนื้อ การมีปลอกแคปซูลหุ้มล้อมรอบ บริเวณที่ฉีดวัคซีน หรือพบวัคซีนกระจายทั่วไป ให้คะแนนรอยโรคแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับอ่อน กล้ามเนื้อสีซีดลง บริเวณที่เกิดรอยโรค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 เซนติเมตร ไม่มีวัคซีนเหลืออยู่

ระดับปานกลาง กล้ามเนื้อสีซีด ถึงแดง บริเวณที่เกิดรอยโรค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 เซนติเมตรในชั้น superficial muscle เท่านั้น พบวัคซีนเหลืออยู่เป็นเม็ดเล็กๆ

ระดับรุนแรง กล้ามเนื้อสีแดง และอักเสบ บริเวณที่เกิดรอยโรค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร ทั้งชั้น superficial และ deep muscle เมื่อตัดกล้ามเนื้อ มีวัคซีนซึมไหลออกมา

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี

3.5.1 การเก็บตัวอย่างเลือด และซีรัม เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein) ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดบรรจุเลือด แล้วปั่นแยกซีรัม ด้วยเครื่องปั่นแยกของเหลว (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที แยกซีรัมใส่ลงใน microtiter plate บรรจุหุ้มด้วยถุงพลาสติก แล้วแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจระดับแอนติบอดีขั้นตอนถัดไป

3.5.2 วิธีการทดสอบ Hemagglutination inhibition test (HI) แบบ Beta method (Beard, 1980) ใช้แอนติเจนที่เตรียมจากวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* ระยะเวลาที่ซีรัม ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป็นเวลา 30 นาที และระยะเวลาการอ่านผล ภายหลังการเติมเม็ดเลือดแดงไก่ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.6 การทดสอบ ความต้านทานโรค

ที่ 4 สัปดาห์ภายหลังการให้วัคซีน ป้อนเชื้อพิษ สายเชื้อท้องถิ่น ให้ไก่ทดลองทุกตัว บันทึก การตาย เป็นเวลา 10 วัน

3.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้โปรแกรม SPSS for Microsoft Windows version 10.01

การทดสอบทางสถิติวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ HI แอนติบอดี เวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตาย ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบทางสถิติ ความต้านทานโรค ด้วย Chi-Square test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.8 กระบวนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาระดับ HI แอนติบอดี จากแม่ในไก่เนื้อ ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 28 วัน

ไก่ทดลอง ไก่เนื้อพันธุ์ COBB500 คละเพศ เลี้ยงตั้งแต่อายุ อายุ 1 วัน จำนวน 20 ตัว ไม่ให้วัคซีน จำนวน 20 ตัว

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 และ 28 วัน
2. ทดสอบ Hemagglutination inhibition test แบบ beta method ตามข้อที่ 3.5

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วย สายเชื้อของไวรัส *Local* และ *La Sota*

ไก่ทดลอง ไก่เนื้อพันธุ์ COBB500 คละเพศ เลี้ยงตั้งแต่ อายุ 1 วัน จำนวน 16 ตัว เมื่ออายุ 9 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 และหลอดลมอักเสบติดต่อ (IB) หยอดตา ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย สูตรที่ 5 ในรูปของ *WOW (mineral)* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 โดยใช้แอนติเจน สายเชื้อท้องถิ่น *(Local)* ในการเตรียมวัคซีน ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 และหลอดลมอักเสบติดต่อ (IB) หยอดตา ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย สูตรที่ 5 ในรูปของ *WOW (mineral)* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 โดยใช้แอนติเจน สายเชื้อ ลาโซตา *(La Sota)* ในการเตรียมวัคซีน ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 7, 14, 21 และ 28 วัน
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender

ไก่ทดลอง ไก่เนื้อพันธุ์ COBB500 คละเพศ เลี้ยงตั้งแต่ อายุ 1 วัน จำนวน 15 ตัว เมื่ออายุ 28 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 1 ในรูปของ *WO(mineral)* สายเชื้อ *Local* ผสมด้วยเครื่อง homogenizer รุ่น Polytron® PT3000 ของบริษัท Kinematica AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ความเร็วรอบ 23,000 รอบต่อนาที ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 แทน blender cups ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 1 ในรูปของ *WO(mineral)* สายเชื้อ *Local* ผสมด้วยเครื่อง blender cups หรือ laboratory blender ของ WARING PRODUCTS DIVISION บริษัท DYNAMICS CORPORTION OF AMERICA. New Hartford, Connecticut ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 28, 35, 42 และ 49 วัน
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และเข้ากล้ามเนื้อ

ไก่ทดลอง ไก่เนื้อพันธุ์ COBB500 คละเพศ เลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน จำนวน 61 ตัว เมื่ออายุ 28 วัน แบ่งเป็น 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 2 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 1ในรูปของ *WO(mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 3 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 1 ในรูปของ *WO(mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อ

กลุ่มที่ 4 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 5 ในรูปของ *WOW(mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 5 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 5 ในรูปของ *WOW(mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อ

กลุ่มที่ 6 วัคซีนเชื้อตายนำเข้า *(Commercial vaccine)* ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 28, 35, 42 และ 49 วัน
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5

การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมในรูป WO และ WOW และวิตามิน อี

ไก่ทดลอง ไก่เนื้อพันธุ์ COBB500 คละเพศ เลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน จำนวน 42 ตัว เมื่ออายุ 28 วัน แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 1 ในรูปของ *WO (mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 3 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 2 ในรูปของ *WO (mineral) + Vit. E* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.1 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 4 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 5 ในรูปของ *WOW (mineral)* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 5 วัคซีนเชื้อตายสูตรที่ 6 ในรูปของ *WOW (mineral) + Vit. E* สายเชื้อ *Local* ตามขั้นตอนที่ 3.1.2.2 ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 6 วัคซีนเชื้อตายนำเข้า *(Commercial vaccine)*

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 28, 35, 42 และ 49 วัน
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5

การทดลองที่ 6 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่ ในรูปของ WO และ WOW และวิตามิน อี

ไก่ทดลอง ไก่ไข่พันธุ์ BABCOCK500 เพศผู้ เลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน จำนวน 300 ตัว เมื่ออายุ 35 วัน แบ่งเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว ให้วัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* สูตรที่ 1 ถึงสูตรที่ 9 ตามตารางที่ 3.1 ยกเว้น กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง

แต่ละกลุ่มยังแบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 จำนวน 25 ตัว สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้น HI แอนติบอดี ให้วัคซีนเชื้อตาย ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่ใต้ผิวหนังคอ และกลุ่มย่อยที่ 2 จำนวน 5 ตัว สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ให้วัคซีนเชื้อตาย ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อหน้าอก

ขั้นตอนการทดลอง

1. การทดสอบความหนืดของวัคซีน ตามข้อที่ 3.2
2. การทดสอบความคงตัวของวัคซีน ตามข้อที่ 3.3
3. การทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนที่ 3.4
4. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 35, 42, 49, 56, 63 และ 73 วัน
5. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5
6. การทดสอบความต้านทานโรค ตามขั้นตอนที่ 3.6

การทดลองที่ 7 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อเป็น ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันแร่ และวิตามิน อี ในรูปของ WO และ WOW

ไก่ทดลอง ไก่ไข่พันธุ์ BABCOCK500 เพศผู้ เลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน จำนวน 220 ตัว เมื่ออายุ 35 วัน แบ่งปีน 11 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ให้วัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* ด้วยวิธีการหยอดตา ร่วมกับวัคซีน ND เชื้อตาย สายเชื้อ *Local* สูตรที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 9 ตามตารางที่ 3.1 ยกเว้น กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง และกลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนเชื้อเป็นอย่างเดียว *(Control (NDV live vaccine only))* สายเชื้อ *La Sota* ด้วยวิธีการหยอดตา

ขั้นตอนการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างซีรัม ที่อายุ 35, 42, 49, 56, 63 และ 73 วัน
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ตามข้อที่ 3.5
3. การทดสอบความต้านทานโรค ตามขั้นตอนที่ 3.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

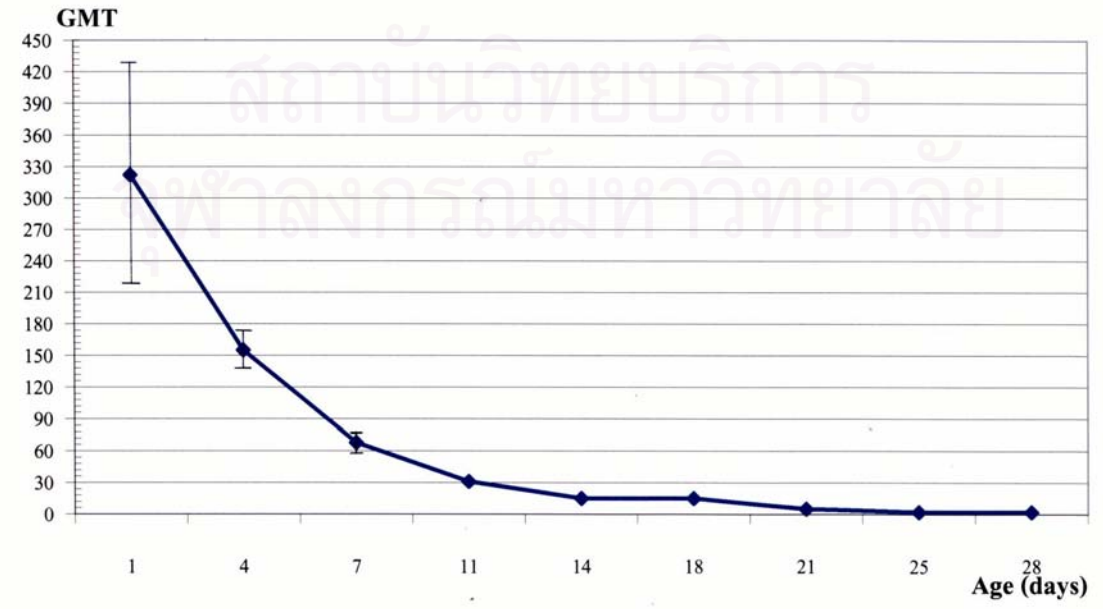
4.1 การทดลองที่ 1 การหาระดับ HI แอนติบอดีจากแม่ในไก่เนื้อ ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 28 วัน

การหาระดับ HI แอนติบอดีจากแม่ในไก่เนื้อ ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 28 วัน พบว่า ระดับ HI แอนติบอดีจากแม่ ลดลงต่ำที่สุดที่อายุ 25 และ 28 วัน เป็น 2 ± 0 โดยมีค่าครึ่งชีวิต ประมาณ 4-7 วัน

ตารางที่ 4.1 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ อายุ 1 ถึง 28 วัน

วันที่	อายุ (วัน)	GMT ± SE (n)
28/6/01	1	322 ± 103 (19)
2/7/01	4	155 ± 20 (20)
5/7/01	7	68 ± 12 (20)
9/7/01	11	31 ± 5 (20)
12/7/01	14	15 ± 3 (20)
16/7/01	18	15 ± 4 (19)
19/7/01	21	5 ± 1 (19)
23/7/01	25	2 ± 0 (19)
26/7/01	28	2 ± 0 (19)

แผนภาพที่ 4.1 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อ อายุ 1 ถึง 28 วัน



4.2 ผลการทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วย สายเชื้อของไวรัส *Local* และ *La Sota*

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

ความเข้มข้นของเชื้อไวรัส พบว่า ระดับ HA titer ของเชื้อไวรัสสายเชื้อ *Local* เป็น 2^{11} ใช้ระยะเวลาการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเชื้อไวรัสสายเชื้อ *La Sota* เป็น 2^{10} ใช้ระยะเวลาการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดี เปรียบเทียบระหว่างสายเชื้อ *La Sota* และ *Local* พบว่า ไก่ทดลองที่ให้วัคซีนสายเชื้อ *Local* ในกลุ่มที่ 2 วัคซีนในรูปของ *WOW (Local)* สามารถกระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่าสายเชื้อ *La Sota* ในกลุ่มที่ 1 วัคซีนในรูปของ *WOW (La Sota)* แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

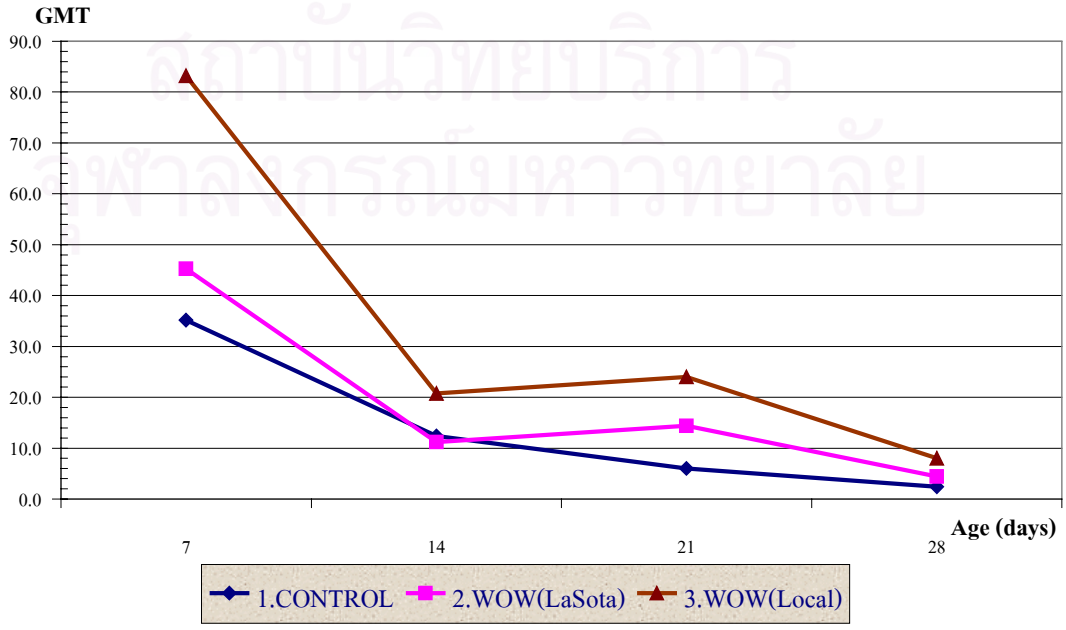
ตารางที่ 4.2 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 (+IB) หยอดตาพร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *La Sota* และ *Local* โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 9 วัน

กลุ่มที่	ชนิดวัคซีน	GMT ± SE (n)			
		อายุ 7 วัน	อายุ 14 วัน	อายุ 21 วัน	อายุ 28 วัน
1	**Control : PBS**	35 ± 8 (5)^{A}	12 ± 5 (5)^{A}	6 ± 3 (5)^{A}	2 ± 0 (5)^{A}
2	*WOW (La Sota)*	45 ± 9 (6)^{AB}	11 ± 2 (5)^{A}	14 ± 4 (5)^{AB}	4 ± 1 (5)^{AB}
3	*WOW (Local)*	83 ± 19 (5)^{B}	21 ± 11 (5)^{A}	24 ± 5 (5)^{B}	8 ± 2 (5)^{B}

หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีน ตัวละ 0.25 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

แผนภาพที่ 4. 2 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีน ND เชื้อเป็น สายเชื้อ B1 (+IB) หยอดตาพร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *La Sota* และ *Local* โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 9 วัน



4.3 ผลการทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

ความเข้มข้นของเชื้อไวรัส สายเชื้อ *Local* ที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็น 2^{10} และค่า EID_{50} เป็น $10^{10.3}$ ต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

การเปรียบเทียบวิธีการผสมวัคซีน ระหว่างการใช้เครื่องผสมแบบ Blender ปั่นที่ความเร็วรอบ 13000 rpm ปริมาตรครั้งละ 200 มิลลิลิตร และ Homogenizer ปั่นที่ความเร็วรอบ 23000 rpm ปริมาตรครั้งละ 20 มิลลิลิตร ที่อายุ 28, 35,42 และ49 วัน พบว่า กลุ่มที่ผสมวัคซีนด้วยเครื่อง Blender มีระดับ HI แอนติบอดี สูงกว่าทั้ง 2 กลุ่ม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

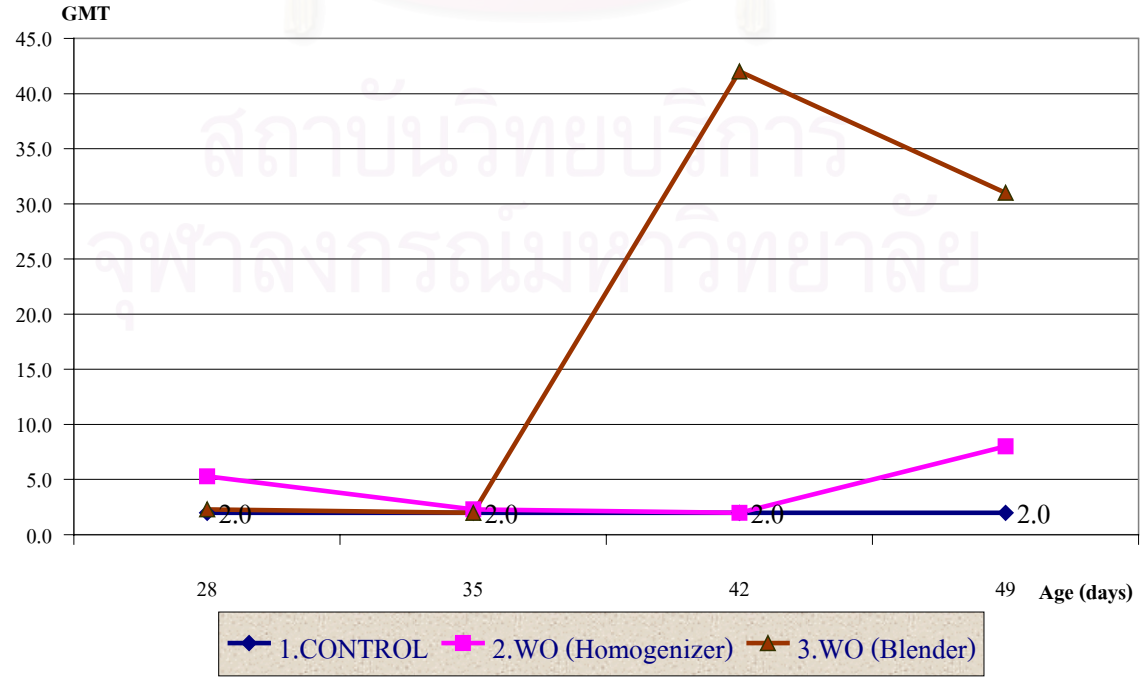
ตารางที่ 4.3 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน

กลุ่มที่	กลุ่ม	GMT ± SE (n)			
		อายุ 28 วัน	อายุ 35 วัน	อายุ 42 วัน	อายุ 49 วัน
1	Control	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$
2	*WO/Homogenizer*	$7 \pm 3\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$8 \pm 6\ (5)^{A}$
3	*WO/Blender*	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$2 \pm 0\ (5)^{A}$	$42 \pm 24\ (5)^{A}$	$31 \pm 13\ (5)^{A}$

หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

แผนภาพที่ 4.3 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่ผสมด้วยเครื่อง Homogenizer และ Blender โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน



4.4 ผลการทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่ให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และเข้ากล้ามเนื้อ

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็นชุดเดียวกับ การทดลองที่ 3

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดีของไก่ทดลองที่ให้วัคซีน ND เชื้อตาย ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และเข้ากล้ามเนื้อ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบวัคซีนที่เตรียมในรูปเดียวกัน วัคซีนที่เตรียมในรูป *WO (mineral)* การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงกว่า การให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) ขณะที่วัคซีนที่เตรียมในรูป *WOW (mineral)* การให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ก็สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงกว่า การให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อเช่นกัน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.4 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน

กลุ่มที่	ชนิดวัคซีน	GMT ± SE (n)			
		อายุ 28 วัน	อายุ 35 วัน	อายุ 42 วัน	อายุ 49 วัน
1	**Control : PBS**	2 ± 0 (13)^{A}	2 ± 0 (9)^{A}	2 ± 0 (8)^{A}	2 ± 0 (8)^{A}
2	*WO (mineral) SC*	2 ± 0 (10)^{A}	2 ± 0 (10)^{A}	60 ± 25 (10)^{B}	146 ± 32 (10)^{D}
3	*WO (mineral) IM*	2 ± 0 (8)^{A}	2 ± 0 (8)^{A}	22 ± 15 (8)^{AB}	85 ± 22 (8)^{C}
4	*WOW (mineral) SC*	2 ± 0 (10)^{A}	2 ± 0 (10)^{A}	2 ± 0 (10)^{A}	60 ± 13 (8)^{BC}
5	*WOW (mineral) IM*	2 ± 0 (10)^{A}	2 ± 0 (10)^{A}	3 ± 1 (10)^{A}	18 ± 9 (9)^{AB}
6	*Commercial Vaccine SC*	2 ± 0 (10)^{A}	2 ± 0 (9)^{A}	21 ± 7 (9)^{AB}	32 ± 10 (9)^{ABC}

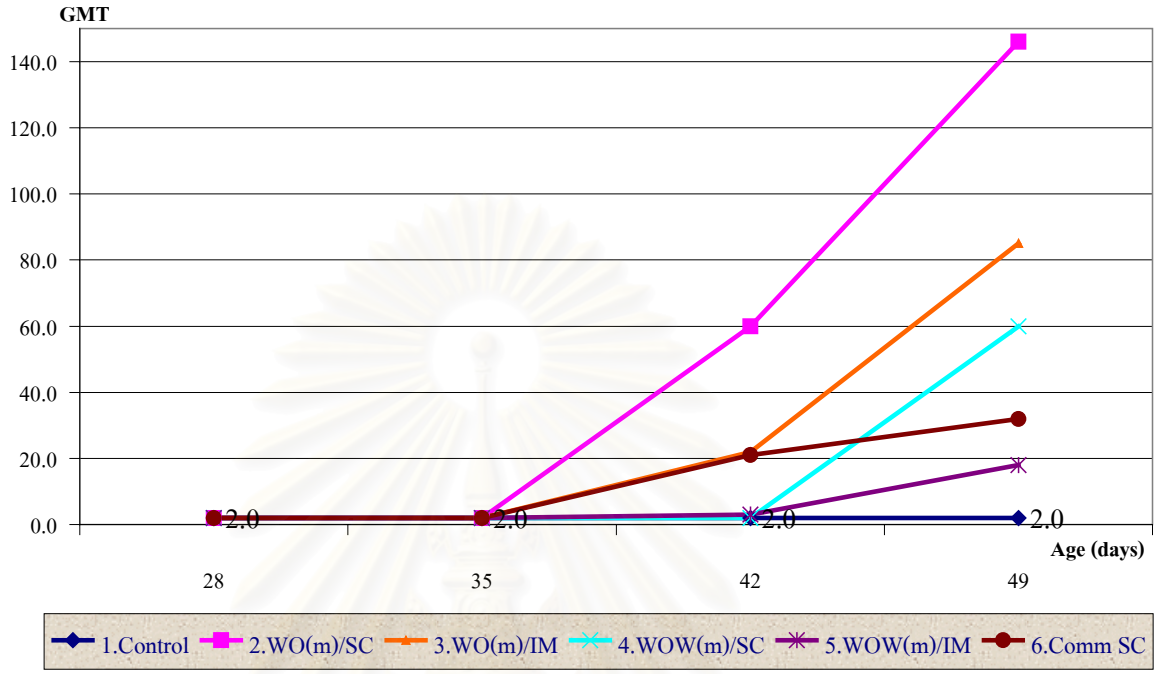
หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง หรือเข้ากล้ามเนื้อ

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวเลขกำกับในวงเล็บ หมายถึง จำนวนไก่ทดลอง

SC หมายถึง ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และ IM หมายถึง ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

แผนภาพที่ 4.4 ระดับ HI แอนติบอดีในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลการทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมในรูป WO และ WOW และวิตามิน อี

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็นชุดเดียวกับ การทดลองที่ 3

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดีของไก่ทดลองที่ให้วัคซีนที่เตรียมในรูป *WO* และ *WOW* และวิตามิน อี พบว่า ที่อายุ 28 และ 35 วัน ระดับ HI แอนติบอดีของไก่ทดลองทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ภายหลังการให้วัคซีนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (หรือที่อายุ 42 วัน) พบว่ากลุ่มที่ให้วัคซีน *WO (mineral)* กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

แต่ภายหลังการให้วัคซีนเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (หรือที่อายุ 49 วัน) พบว่า กลุ่มที่ให้วัคซีน *WO (mineral) + Vit E* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงสุด โดยวัคซีนทุกชนิด สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้ค่อนข้างสูง ขณะที่กลุ่มควบคุม ยังไม่การตอบสนองทาง HI แอนติบอดี

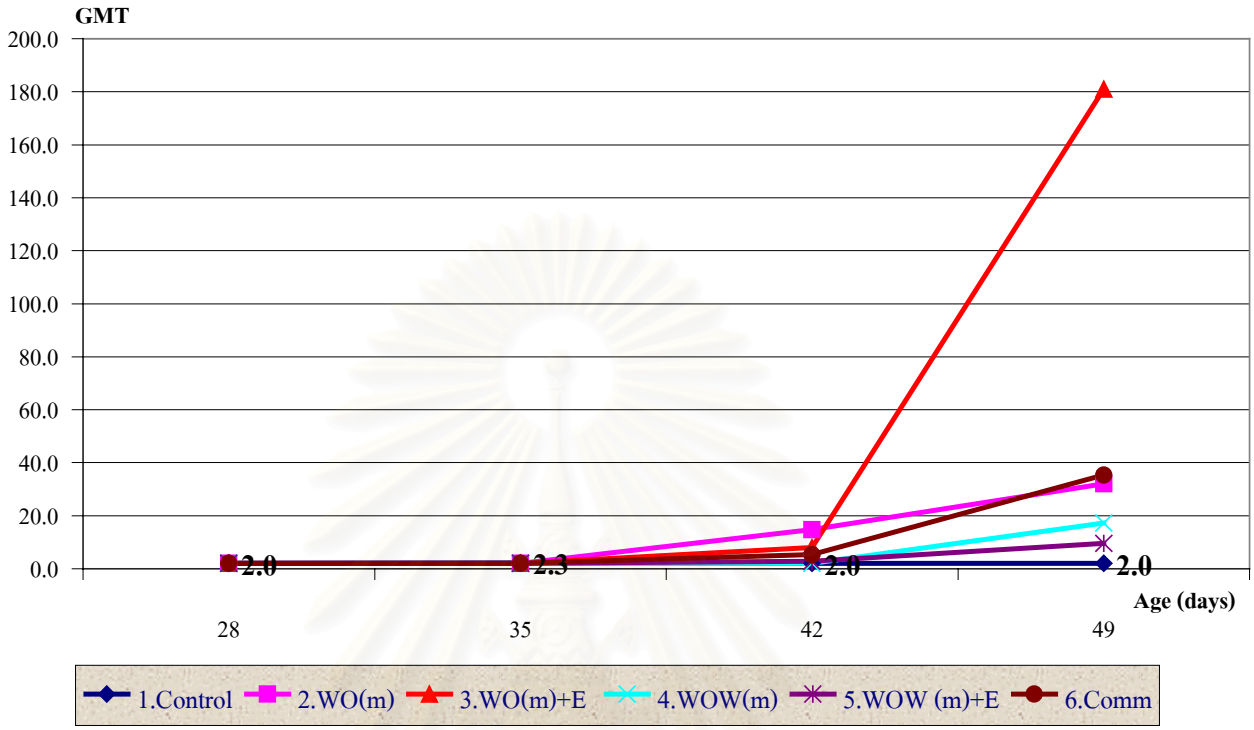
ตารางที่ 4.5 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน

กลุ่มที่	ชนิดวัคซีน	GMT ± SE (n)			
		อายุ 28 วัน	อายุ 35 วัน	อายุ 42 วัน	อายุ 49 วัน
1	**Control : PBS**	$2 \pm 0\ (14)^{A}$	$2 \pm 1\ (11)^{A}$	$2 \pm 0\ (11)^{A}$	$2 \pm 0\ (8)^{A}$
2	*WO (mineral)*	$2 \pm 0\ (8)^{A}$	$2 \pm 0\ (8)^{A}$	$27 \pm 15\ (8)^{B}$	$65 \pm 29\ (8)^{AB}$
3	*WO (mineral) + Vit E*	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$19 \pm 7\ (9)^{AB}$	$240 \pm 65\ (8)^{BC}$
4	*WOW (mineral)*	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$147 \pm 74\ (9)^{BC}$
5	*WOW (mineral) + Vit E*	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$2 \pm 0\ (9)^{A}$	$3 \pm 1\ (8)^{A}$	$11 \pm 2\ (8)^{AB}$
6	*Commercial Vaccine*	$2 \pm 0\ (7)^{A}$	$2 \pm 0\ (7)^{A}$	$7 \pm 2\ (7)^{A}$	$62 \pm 19\ (7)^{AB}$

หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

แผนภาพที่ 4.5 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 28 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลการทดลองที่ 6 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่ ในรูป WO และ WOW และวิตามิน อี

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็นชุดเดียวกับ การทดลองที่ 3

ผลการทดสอบความหนืด

ผลการทดสอบความหนืดของวัคซีนเชื้อตาย พบว่า วัคซีนที่เตรียมในรูปของ *WOW* ทั้งหมด ได้แก่ กลุ่มที่ 5 *WOW (mineral)* กลุ่มที่ 6 *WOW (mineral) + Vit E* กลุ่มที่ 7 *WOW (palm)* และกลุ่มที่ 8 *WOW (palm) + Vit E* มีความหนืดต่ำกว่าวัคซีน *Commercial Vaccine* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ขณะที่วัคซีนที่เตรียมในรูปของ *WO* ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *WO (mineral)* กลุ่มที่ 2 *WO(mineral) + Vit E* กลุ่มที่ 3 *WO (palm)* และกลุ่มที่ 4 *WO(palm) + Vit E* มีความหนืดสูงกว่าวัคซีน วัคซีน *Commercial vaccine* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะ *WO (palm)+Vit.E* มีความหนืดสูงที่สุด ในการทดลองครั้งนี้

ตารางที่ 4.6 ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ

กลุ่มที่	ชนิดวัคซีน	เวลา (วินาที)			MEAN ± SE
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
2	*WO (mineral)*	28.366	25.892	27.806	27.355 ± 0.749^{C}
3	*WO (mineral)+Vit.E*	55.656	53.146	54.486	54.429 ± 0.725^{D}
4	*WO (palm)*	54.911	50.721	56.278	53.970 ± 1.678^{D}
5	*WO (palm) + Vit.E*	115.439	142.936	139.026	132.467 ± 8.589^{E}
6	*WOW (mineral)*	3.171	2.506	2.816	2.831 ± 0.192^{A}
7	*WOW (mineral)+Vit.E*	3.746	3.826	4.006	3.860 ± 0.077^{A}
8	*WOW (palm)*	2.186	2.206	2.229	2.207 ± 0.013^{A}
9	*WOW(palm)+Vit.E*	1.622	1.419	1.587	1.543 ± 0.063^{A}
10	*Commercial vaccine*	16.336	16.092	15.776	16.068 ± 0.162^{B}

หมายเหตุ สภาวะการทดสอบ อุณหภูมิ 23.8 องศาเซลเซียส ความชื้น 43 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการทดสอบความคงตัว

ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน พบว่า ภายหลังการเตรียมวัคซีนเสร็จเรียบร้อยแล้ว วัคซีนทุกกลุ่มผสมเข้ากันได้ดีเป็นเนื้อเดียวกัน

การเก็บรักษาวัคซีน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 7 *WOW (palm)* และ 8 *WOW(palm)+Vit.E* มีความคงตัว น้อยกว่า 1 สัปดาห์ และวัคซีนกลุ่มที่ 3 *WO (palm)* และกลุ่มที่ 4 *WO (palm) + Vit E* มีความคงตัวน้อยกว่า 4 สัปดาห์

การเก็บรักษาวัคซีน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 3 *WO (palm)* และกลุ่มที่ 4 *WO(palm) + Vit E* มีความคงตัวน้อยกว่า 1 สัปดาห์ และวัคซีนกลุ่มที่ 7 *WOW (palm)* และ 8 *WOW(palm)+Vit.E* มีความคงตัว น้อยกว่า 4 สัปดาห์

ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ผลการทดสอบ ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย เป็นเวลา 12 วันพบว่า วัคซีนกลุ่มที่ 4 *WO (palm) + Vit.E* มีระดับความรุนแรงมากที่สุด รองลงมา คือ วัคซีนกลุ่มที่ 2 *WO (mineral) + Vit.E* และกลุ่มที่ 1 *WO (mineral)* วัคซีนเชื้อตาย ที่มีระดับความรุนแรงปานกลาง คือ วัคซีน กลุ่มที่ 9 *WOW(palm)+Vit.E* และ 10 *Commercial vaccine*

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบ ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย เป็นเวลา 12 วัน

กลุ่มที่	ชนิดวัคซีน	รอยโรค และ สิ่งตกค้าง ที่ตำแหน่งฉีดวัคซีน		
		ระดับอ่อน	ระดับปานกลาง	ระดับรุนแรง
1	*Control (PBS)*	5/5	0/5	0/5
2	*WO (mineral)*	1/5	1/5	3/5
3	*WO (mineral)+Vit.E*	0/5	2/5	3/5
4	*WO (palm)*	5/5	0/5	0/5
5	*WO (palm) + Vit.E*	0/5	1/5	4/5
6	*WOW (mineral)*	5/5	0/5	0/5
7	*WOW (mineral)+Vit.E*	5/5	0/5	0/5
8	*WOW (palm)*	5/5	0/5	0/5
9	*WOW(palm)+Vit.E*	2/5	2/5	1/5
10	*Commercial Vaccine*	2/5	3/5	0/5

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

ไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 *WO (mineral)* กลุ่มที่ 2 *WO (mineral)+Vit.E* กลุ่มที่ 5 *WOW (mineral)* และกลุ่มที่ 9 *Commercial Vaccine* เริ่มมีการตอบสนอง HI แอนติบอดี ตั้งแต่อายุ 49 วัน หรือ 2 สัปดาห์ภายหลังการให้วัคซีน ภายหลังจากนั้น กลุ่มที่ 1 *WO (mineral)* และกลุ่มที่ 2 *WO (mineral)+Vit.E* ระดับ HI แอนติบอดีเริ่มลดต่ำลง ขณะที่ กลุ่มที่ 9 เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ จนกระทั่ง ที่อายุ 63 วัน กลุ่มที่ 9 มีระดับ HI แอนติบอดีสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.8

ผลการทดสอบความต้านทานโรค

ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่ใช้ทดสอบการป้องกันโรค เป็น $10^{5.7}$ ELD_{50}/dose หรือ $10^{7.7}$ EID_{50}/dose โดยใช้เชื้อไวรัส สายเชื้อ *Local* ทดสอบความรุนแรงของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี intracerebral pathogenicity index (ICPI) เป็น 1.80

ผลการทดสอบความต้านทานโรคของไก่ทดลอง การพัฒนาวัคซีน นิวคาสเซิล เชื้อตาย โดยใช้น้ำมันปาล์ม พบว่า ไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 *WO (mineral)* และ 2 *WO (mineral)+Vit.E* สามารถป้องกันโรคได้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าไก่ทดลองทุกกลุ่ม ยกเว้น กลุ่มที่ 5 *WOW (mineral)* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อปรับเปลี่ยนชนิดของน้ำมัน เป็นน้ำมันปาล์ม และเตรียมวัคซีนในรูปของ WO มีความต้านทานโรคต่ำลง

ไก่ทดลองที่ให้วัคซีนในรูปของ *WOW* ยกเว้น กลุ่มที่ 7 *WOW (mineral)+Vit.E* มีความต้านทานโรคไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ 9 *Commercial Vaccine* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ไก่ทดลองทุกกลุ่ม สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่า กลุ่มควบคุม *Control (PBS)* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

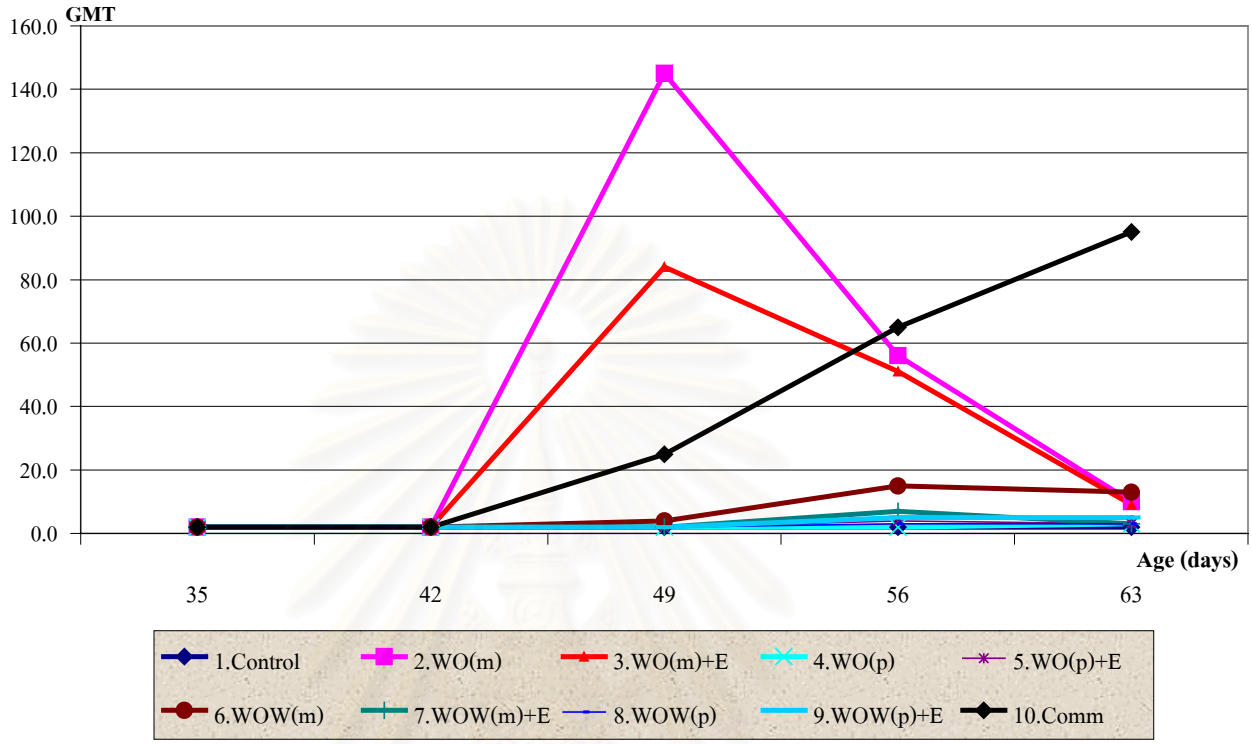
ตารางที่ 4.8 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน

กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	GMT ± SE					ความต้านทาน
		อายุ 35 วัน	อายุ 42 วัน	อายุ 49 วัน	อายุ 56 วัน	อายุ 63 วัน	
1	*Control (PBS)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	4 % (1/26)^{A}
2	*WO (mineral)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	145 ± 79^{B}	56 ± 19^{B}	10 ± 3^{A}	100 % (26/26)^{H}
3	*WO (mineral)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	84 ± 22^{A}	51 ± 8^{B}	9 ± 1^{A}	100 % (26/26)^{H}
4	*WO (palm)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	3 ± 0^{A}	35 % (9/26)^{BCD}
5	*WO (palm) + Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	4 ± 1^{A}	3 ± 0^{A}	54 % (14/26)^{BCDE}
6	*WOW (mineral)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	4 ± 1^{A}	15 ± 3^{A}	13 ± 3^{A}	88 % (23/26)^{GH}
7	*WOW (mineral)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	7 ± 1^{A}	3 ± 0^{A}	58 % (15/26)^{CDE}
8	*WOW (palm)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	3 ± 0^{A}	3 ± 0^{A}	62 % (16/26)^{DEF}
9	*WOW(palm)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	5 ± 1^{A}	5 ± 1^{A}	77 % (20/26)^{EFG}
10	*Commercial Vaccine*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	25 ± 10^{A}	65 ± 13^{B}	95 ± 40^{B}	85 % (22/26)^{FG}

หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีน ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

แผนภาพที่ 4.6 ระดับ แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลการทดลองที่ 7 การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อเป็น ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย ที่เตรียมจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันแร่ และวิตามิน อี ในรูปของ WO และ WOW

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน

แอนติเจนที่ใช้เตรียมวัคซีน เป็นชุดเดียวกับ การทดลองที่ 3

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

เมื่อให้วัคซีน ND เชื้อเป็นร่วมด้วยพบว่า ไก่ทดลองทุกกลุ่มเริ่มมีการตอบสนอง HI แอนติบอดีตั้งแต่อายุ 49 วัน หรือ 2 สัปดาห์ภายหลังการให้วัคซีน ภายหลังจากนั้น ระดับ HI แอนติบอดีของไก่ทดลองที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มการทดลอง ยกเว้น กลุ่มที่ 9 *Commercial Vaccine* มีแนวโน้มต่ำลง ขณะที่กลุ่มที่ 9 *Commercial Vaccine* มีการตอบสนอง HI แอนติบอดีสูงขึ้นตามลำดับ ที่อายุ 63 วัน กลุ่มที่ 9 มีระดับ HI แอนติบอดีสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.11 อย่างไรก็ตาม ที่อายุ 63 วัน ไก่ทดลองที่ให้วัคซีน ND เชื้อตายร่วมกับวัคซีน ND เชื้อเป็น ทุกกลุ่มการทดลอง กระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่าไก่กลุ่มควบคุม ที่ให้วัคซีนเชื้อเป็น อย่างเดียว

ตารางที่ 4.9 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* โดยการหยอดตา พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน

กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	GMT ± SE					ความต้านทาน
		อายุ 35 วัน	อายุ 42วัน	อายุ 49 วัน	อายุ 56 วัน	อายุ63 วัน	
1	*Control (PBS)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	0 % (0/20) ^{A}
2	*ND live vaccine only*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	127 ± 101^{AB}	40 ± 25^{AB}	29 ± 13^{AB}	100 % (20/20) ^{B}
3	*WO (mineral)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	266 ± 107^{AB}	100 ± 27^{ABC}	107 ± 25^{BC}	95 % (19/20) ^{B}
4	*WO (mineral)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	358 ± 148^{B}	208 ± 68^{D}	127 ± 28^{C}	100 % (20/20) ^{B}
5	*WO (palm)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	141 ± 55^{AB}	100 ± 36^{ABC}	44 ± 17^{ABC}	100 % (20/20) ^{B}
6	*WO (palm) + Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	107 ± 25^{AB}	82 ± 26^{ABC}	48 ± 14^{ABC}	100 % (20/20) ^{B}
7	*WOW (mineral)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	131 ± 53^{AB}	56 ± 13^{ABC}	95 ± 18^{BC}	100 % (20/20) ^{B}
8	*WOW (mineral)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	201 ± 101^{AB}	69 ± 17^{AB}	127 ± 35^{C}	100 % (20/20) ^{B}
9	*WOW (palm)*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	87 ± 50^{AB}	29 ± 7^{BCD}	44 ± 8^{ABC}	95 % (19/20) ^{B}
10	*WOW(palm)+Vit.E*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	346 ± 114^{B}	125 ± 51^{CD}	93 ± 29^{BC}	100 % (20/20) ^{B}
11	*Commercial Vaccine*	2 ± 0^{A}	2 ± 0^{A}	153 ± 56^{AB}	156 ± 35^{A}	266 ± 53^{D}	100 % (20/20) ^{B}

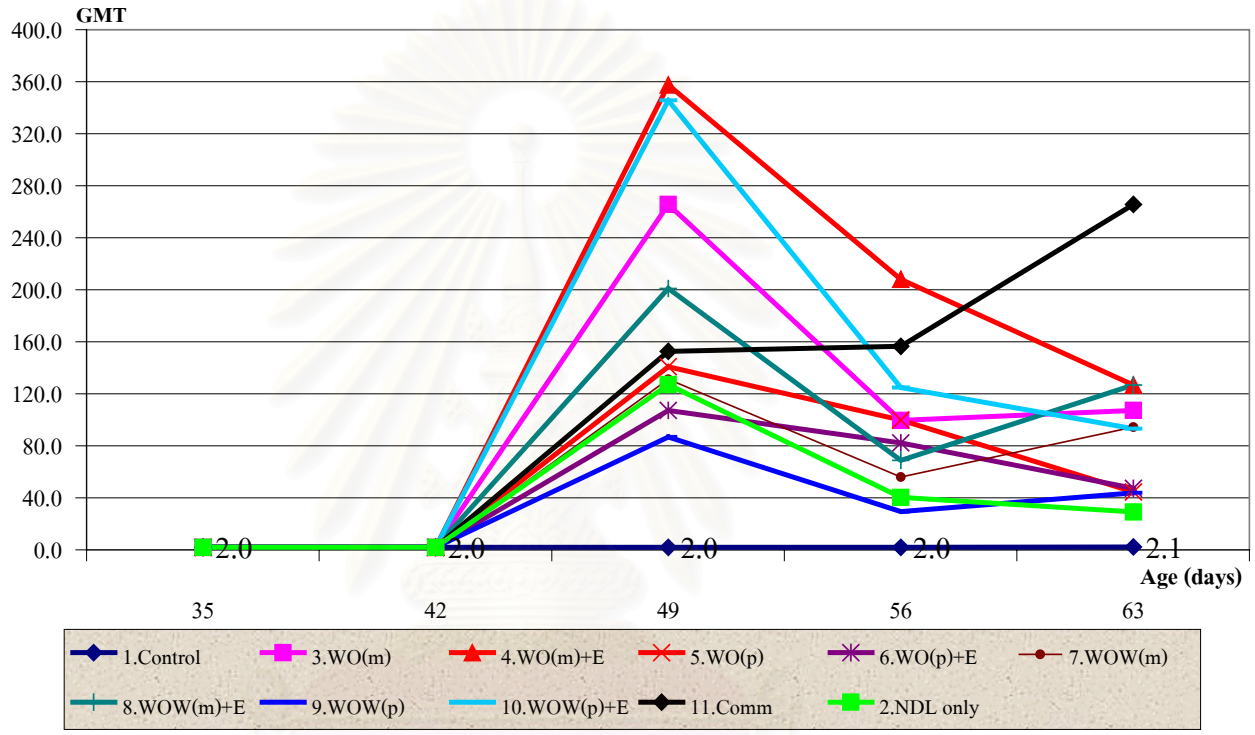
หมายเหตุ วิธีการให้วัคซีนเชื้อตาย ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนัง และวิธีการให้วัคซีนเชื้อเป็น หยอดตา

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการทดสอบความต้านทานโรค

ปริมาณของเชื้อไวรัสที่ใช้ทดสอบการป้องกันโรค เป็นชุดเดียวกับการทดลองที่ 7 ผลการทดสอบความต้านทานโรค พบว่า ไก่ทดลองที่ให้วัคซีนทุกกลุ่ม สามารถต้านทานโรค ND ได้

แผนภาพที่ 4.7 ระดับ HI แอนติบอดี ในไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น สายเชื้อ *La Sota* โดยการหยอดตา พร้อมกับวัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อ *Local* ที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เมื่ออายุ 35 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาระดับ HI แอนติบอดี ในไก่เนื้อ อายุ 1 ถึง 28 วัน เพื่อศึกษาลักษณะการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ พบว่า ระดับ HI แอนติบอดีจากแม่มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 4-7 วัน และลดลงต่ำที่สุดที่อายุ 28 วัน สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mass และคณะ (1999) แนะนำให้ยืดอายุการให้วัคซีนไปจนกว่าจะตรวจไม่พบแอนติบอดีในซีรัม ที่อายุ 4 สัปดาห์ทั้งไก่เนื้อ และไก่ไข่ เพื่อหลีกเลี่ยงอิทธิพลของภูมิคุ้มกันจากแม่ ต่อประสิทธิภาพของวัคซีน

การเปรียบเทียบสายเชื้อ ของเชื้อไวรัส ระหว่างสายเชื้อ *La Sota* และ *Local* ต่อประสิทธิภาพการกระตุ้น HI แอนติบอดี พบว่า ไก่ทดลองที่ให้วัคซีนสายเชื้อ *Local* ที่มีความรุนแรง กระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่าสายเชื้อ *La Sota* ที่มีความอ่อนแรง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับ สมศักดิ์ และคณะ (2539) ทดลองเปรียบเทียบ วัคซีนเชื้อตาย สายเชื้อที่มีความรุนแรงปานกลาง จำนวนไวรัสน้อย มีระดับ HI แอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนเชื้อตายที่ไม่รุนแรง การผลิตวัคซีนเชื้อตายแตกต่างจากวัคซีนเชื้อเป็น คือ เชื้อไวรัสถูกฆ่าให้ตายแล้ว ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีก (OIE, 1992) Cross (1988) กล่าวว่า วัคซีนเชื้อตาย ต้องการปริมาณของแอนติเจนมากๆ ทำให้ต้องใช้สัดส่วนของหัวเชื้อไวรัสมาก ดังนั้น ควรพิจารณาเลือกสายเชื้อที่มีการเจริญเติบโตให้ค่า EID_{50} ได้ในระดับสูง สายเชื้อ *La Sota* ให้ปริมาณของเชื้อไวรัสไม่ดีนัก อาจจำเป็นต้องทำให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นขึ้นกว่าเดิม จากผลการทดลองครั้งนี้ ได้เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธี HA (hemagglutination test) พบว่า ระดับ HA ของสายเชื้อ *La Sota* ต่ำกว่า *Local* เป็น 1 $\log_2$ ทั้งที่ใช้เวลาการบ่มมากกว่า ขณะเดียวกัน Brugh และ Siegel (1977) พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อไวรัส ตรวจวัดด้วยวิธี HA มีผลต่อระดับแอนติบอดีที่ 2, 3, 4 และ 6 สัปดาห์ภายหลังการให้วัคซีน ดังนั้น จึงอาจเป็นเหตุผลอีกประการหนึ่งสำหรับอธิบายได้ว่า การทดลองครั้งนี้ สายเชื้อ *Local* สามารถกระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่าสายเชื้อ *La Sota*

การเปรียบเทียบวิธีการผสมวัคซีน ต่อประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี ระหว่างการใช้เครื่องผสม แบบ blender ปั่นที่ความเร็วรอบ 13000 rpm และ homogenizer ปั่นที่ความเร็วรอบ 23000 rpm พบว่า ที่อายุ 28, 35,42 และ49 วัน กลุ่มที่ผสมวัคซีนด้วย blender มีระดับ HI แอนติบอดี สูงกว่ากลุ่มที่ผสมด้วย homogenizer แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ Stone (1993) รายงานผลการผสมวัคซีน ND เชื้อตายด้วย blender สำหรับเตรียมวัคซีนที่ใช้น้ำมันถั่วลิสงผสมกับขี้ผึ้ง 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไก่มีการตอบสนอง HI แอนติบอดีต่ำกว่าการผสมด้วยมือ (manual) และ homogenizer อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเตรียมวัคซีนที่ใช้น้ำมันถั่วลิสงผสมกับขี้ผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำมันปลา (orange roughy fish oil) แล้ว การผสมทั้ง 3 วิธีข้างต้น ไม่มีผลต่อการตอบสนอง HI แอนติบอดี จากผลการ

ทดลองครั้งนี้ การใช้ homogenizer ไม่สามารถกระตุ้น HI แอนติบอดีได้ดีกว่า Blender อาจเนื่องจาก วิธีการผสมด้วยเครื่อง homogenizer รุ่น Polytron® PT3000 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พิมพร (2540) จัดเป็นเครื่องผสมแบบ homogenizing mixer ชนิดหนึ่ง อาศัยแกนปั่นความเร็วสูงเท่านั้นไม่ได้ใช้ความดันร่วมด้วย ขณะที่เครื่อง homogenizer สำหรับการผลิตวัคซีนเชิงอุตสาหกรรมจะอาศัยความดันในการผลักอิมัลชันให้ผ่านรูเล็กๆที่กำหนดขนาดอนุภาคของอิมัลชันให้สม่ำเสมอ และเล็กละเอียดขึ้น อิมัลชันจึงมีความหนืด และความคงตัวมาก และผลการทดลองครั้งนี้ ยังพบว่า เครื่อง homogenizer ที่ใช้ผสมเตรียมวัคซีนได้ครั้งละปริมาณน้อยๆ แกนปั่นไม่สามารถปั่นได้ลึกถึงก้นหลอดแก้ว อาจไม่สามารถปั่นเนื้อของเหลวที่ก้นหลอดได้

การเปรียบเทียบวิธีการให้วัคซีน พบว่า เมื่อเปรียบเทียบวัคซีนที่เตรียมในรูปเดียวกัน วัคซีนในรูปของ *WO (mineral)* การให้วัคซีนด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงกว่า การให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ขณะที่ วัคซีนในรูปของ *WOW (mineral)* การให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนังก็สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงกว่าการให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อเช่นกัน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่า วัคซีนเชื้อตาย สามารถให้ได้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ หรือเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (OIE, 1992) ปัจจุบัน วัคซีนเชิงพาณิชย์ทั่วไป ก็นิยมให้วัคซีนด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังคอ มากกว่ากล้ามเนื้อขา เนื่องจาก การฉีดเข้ากล้ามเนื้อขา ทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบที่รุนแรงบริเวณตำแหน่งให้วัคซีน (Fukanoki et al., 2001) จากการทดลองครั้งนี้ จึงสนับสนุนเพิ่มเติมอีกว่า การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงกว่าการให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้ออีกด้วย

การใช้น้ำมันจากธรรมชาติทดแทนน้ำมันแร่ คือ น้ำมันปาล์ม พบว่า การให้วัคซีนเชื้อตายที่ใช้น้ำมันปาล์ม พบว่า ระดับ HI แอนติบอดีต่ำกว่า วัคซีนเชื้อตายที่ใช้น้ำมันแร่ และความหนืดสูงกว่า วัคซีนเชื้อตายที่ใช้น้ำมันแร่ สอดคล้องกับ Stone (1993) รายงานว่า วัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันพืช สัตว์ ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำกว่า และมีความหนืดสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความต้านทานโรค พบว่า เมื่อป้อนเชื้อพิษทับ ไก่ทดลองทุกกลุ่มที่ให้วัคซีนเชื้อตายที่ใช้น้ำมันปาล์ม สามารถต้านทานโรคได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อให้วัคซีนเชื้อเป็น ร่วมกับวัคซีนเชื้อตาย ที่ใช้น้ำมันปาล์ม และน้ำมันแร่ พบว่า ระดับ HI แอนติบอดีสูงกว่า การให้วัคซีนเชื้อเป็นอย่างเดียว แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และยังมีความต้านทานโรคสูงถึง 95-100 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกัน ผลการทดสอบ ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย เป็นเวลา 12 วันพบว่า รอยโรคและสิ่งตกค้างของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยน้ำมันปาล์ม กรณีที่ไม่เติมวิตามิน อี มีระดับอ่อน และลักษณะกลมกลืนกับเนื้อเยื่อของไก่จนแทบสังเกตไม่เห็น สอดคล้องกับ Stone (1993) และ Stone (1997) รายงานว่า ปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อของวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันจากสัตว์ และพืชจะน้อยกว่า น้ำมันแร่ และเมื่อเติมวิตามิน อี ในวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยน้ำมันปาล์ม สังเกตว่า รอยโรคและสิ่งตกค้าง มีระดับความรุนแรงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงที่เพิ่มขึ้น เกิด

จากการตรวจพบสิ่งตกค้างลักษณะคล้ายกับวิตามิน อี มากกว่าเป็นรอยโรคจากการอักเสบเช่นเดียวกับวัคซีนที่มีส่วนผสมของน้ำมันแร่ แต่วัคซีนทุกชนิดเตรียมด้วยน้ำมันปาล์ม ยังมีอายุการเก็บรักษาไม่ถึง 4 สัปดาห์ ดังนั้น ผลการทดลองครั้งนี้ จึงสรุปได้ว่า น้ำมันปาล์ม สามารถใช้เตรียมวัคซีน ND เชื้อตายทดแทนน้ำมันแร่ได้ แต่ควรปรับปรุงวิธีการผสมวัคซีนให้มีความคงตัวดีขึ้นกว่าเดิม

การปรับสูตรการเตรียมวัคซีนเชื้อตาย พบว่า การเตรียมวัคซีนเชื้อตายในรูปของ *WOW* การตอบสนองของ HI แอนติบอดีต่ำกว่า *WO* สอดคล้องกับที่ Fukanoki และคณะ (2001) กล่าวไว้ว่า วัคซีนเชื้อตายในรูปของ *WOW* มักมีประสิทธิภาพด้อยกว่า *WO* อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองครั้งนี้ ระดับ HI แอนติบอดี และความต้านทานโรคของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมในรูป *WOW* ก็อยู่ในเกณฑ์ที่ดี นอกจากนั้นยังพบว่า วัคซีนเชื้อตายในรูป *WOW* มีความหนืดต่ำกว่า และมีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่น้อยกว่า *WO* สอดคล้องกับการทดลองของ Fukanoki และคณะ (2001) ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่า ปฏิกิริยาการอักเสบจากวัคซีนที่เตรียมในรูปของ *WOW* ที่ลดลง น่าจะเป็นผลมาจาก สัดส่วนของน้ำมันแร่ที่ลดลง ขณะเดียวกันปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อที่ลดลง อาจมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยดังที่ Franchini และคณะ (1991) อธิบายไว้ว่า ถ้าปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อย จะส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันโรคลดลงได้

ผลของวิตามิน อี ต่อการส่งเสริมภูมิคุ้มกัน กรณี การให้วัคซีนเชื้อตาย โดยไม่ให้วัคซีนเชื้อเป็นด้วย เมื่อเปรียบเทียบ วัคซีนเชื้อตายที่เติมวิตามิน อี และไม่เติมวิตามิน อี ที่เตรียมในรูปแบบเดียวกันแล้ว ยังให้ผลการส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี และความต้านทานโรคไม่แน่นอน แต่ เมื่อให้วัคซีนเชื้อเป็นด้วย พบว่า ที่อายุ 63 วัน ก่อนการป้อนเชื้อพิษทับ วัคซีนเชื้อตายที่เติมวิตามิน อี มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้ดีกว่า วัคซีนเชื้อตายที่ไม่เติมวิตามิน อี แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) สอดคล้องกับ Franchini และคณะ (1995) พบว่า การเติมวิตามิน อี ในวัคซีนเชื้อตายทดแทนน้ำมันแร่ ในสัดส่วน 20 หรือ 30 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเหนี่ยวนำให้มีการตอบสนองของแอนติบอดีเร็ว และสูงกว่า วัคซีนที่ไม่ได้เติมวิตามินอี

การให้วัคซีนเชื้อเป็น พร้อมกับการให้วัคซีนเชื้อตาย พบว่า เมื่อเปรียบเทียบ ผลการทดลองที่ 6 และ 7 สังเกตว่า การให้วัคซีนเชื้อเป็นร่วมกับวัคซีนเชื้อตายในการทดลองที่ 7 สามารถส่งเสริมการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดีได้สูงขึ้นกว่าการให้วัคซีนเชื้อตายเพียงอย่างเดียวในการทดลองที่ 6 สอดคล้องกับ Pakinyo and Sasipreeyajan (1993) รายงานว่า วัคซีน ND เชื้อเป็น พร้อมกับวัคซีน ND เชื้อตาย สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่า การให้วัคซีน ND เชื้อเป็น เพียงอย่างเดียว Folitse และคณะ (1998) อธิบายสาเหตุที่ทำให้วัคซีนเชื้อตายในน้ำมันที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง พร้อมกับวัคซีนเชื้อเป็น ด้วยวิธีการหยอดตา พร้อมกัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง เนื่องจาก เชื้อไวรัสที่มีชีวิตสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วบนเยื่อเมือกของหนังตา และจมูก เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบปฐมภูมิ ต่อมาแอนติเจนของเชื้อไวรัสที่ถูกฆ่า ในสื่อน้ำมันจะค่อยๆ ปล่อยออกมาช้าๆ อย่างต่อเนื่อง เป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ

ลักษณะการตอบสนองของวัคซีนที่เตรียมขึ้นเองในการทดลองครั้งนี้ แตกต่างจากวัคซีน *Commercial* คือ ระดับ HI แอนติบอดีจะสูงที่สุด ภายหลังการให้วัคซีน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ในวัคซีนที่

เตรียมในรูป *WO* และ 3 สัปดาห์ ในวัคซีนที่เตรียมในรูป *WOW* ภายหลังจากนั้น จะค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ขณะที่ วัคซีน *Commercial vaccine* เริ่มมีการตอบสนอง HI แอนติบอดี ภายหลังการให้วัคซีน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันป้อนเชื้อพิษ การที่วัคซีน *Commercial* vaccine มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่า วัคซีนที่เตรียมขึ้นเอง อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สำหรับวัคซีน *WO* เป็น $7.7x10^{7.3}$ ELD_{50} ต่อตัว และ *WOW* เป็น $7.1x10^{7.3}$ ELD_{50} ต่อตัว ต่ำกว่า การผลิตวัคซีนเชื้อตาย ที่กำหนดไว้อย่างน้อย $10^{8.4}$ ELD_{50} ต่อตัว (Peleg et al., 1993) รวมถึง สูตรการเตรียมวัคซีน *Commercial vaccine* ที่บริษัทไม่เปิดเผย และวิธีการผสมด้วยเครื่องมือที่ดีกว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นเองมาก หาก วัคซีนที่เตรียมขึ้นเอง ได้รับการปรับปรุงสูตรการเตรียม วิธีการผสม และเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อไวรัสมากขึ้น น่าจะช่วยให้ วัคซีนเชื้อตายที่เตรียมขึ้นเอง มีประสิทธิภาพได้เช่นเดียวกับ วัคซีน *Commercial vaccine* ได้ ในราคาที่ถูกกว่า

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปได้ว่า น้ำมันปาล์ม สามารถใช้เตรียมวัคซีน ND เชื้อตายทดแทนน้ำมันแร่ได้ ซึ่งเกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตไก่ คือ มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ลดการคัดซากไก่ทิ้ง เนื่องจาก ผลของน้ำมันแร่ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อไก่ที่รุนแรง นอกจากนี้ การผลิตวัคซีนเชื้อตายขึ้นใช้เองภายในประเทศ หรือเพื่อการส่งออก โดยใช้วัตถุดิบตามธรรมชาตินี้ ยังช่วยลดการนำเข้าวัคซีน รวมถึง วัตถุดิบสำหรับการผลิตวัคซีนได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม การเตรียมวัคซีนเชื้อตายโดยใช้น้ำมันปาล์ม ควรมีการปรับปรุงวิธีการผสมวัคซีน หรือสัดส่วนของ สารลดแรงตึงผิว เพื่อให้มีความคงตัวดีขึ้นกว่าเดิม

การให้วิตามิน อี ผสมกับวัคซีนเชื้อตาย ร่วมกับวัคซีนเชื้อเป็น สามารถกระตุ้น HI แอนติบอดีได้สูงกว่าการให้วัคซีนเชื้อตาย ที่ไม่ผสมวิตามิน อี ร่วมกับวัคซีนเชื้อเป็น

การเตรียมวัคซีนในรูปของ WOW สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน HI แอนติบอดี และความต้านทานโรคได้ดี โดยวัคซีนมีความหนืดต่ำ ช่วยให้การให้วัคซีนไก่ง่าย และสะดวกกว่าเดิม นอกจากนี้ ยังเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อยอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองสัตวรักษ์ 2542 (1999) ประกาศ กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทย พ.ศ. 2542

เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล พรทิพย์ ศิริวรรณ์ และรื่นฤดี บุญยะโหตระ 2530 (1987) การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดสอบฮีแมกกลูติเนชัน อินฮิบิชันสำหรับโรคนิวคาสเซิล สัตวแพทยสาร 38(1): 13-25

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ 2540 (1997) อิมัลชัน ทางเครื่องสำอาง สำนักพิมพ์ โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์ กรุงเทพมหานคร หน้าที่ 1 ถึง 238

สมศักดิ์ ภัคภิญโญ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย 2539 (1996) รายงานผลการวิจัยทุนรัชดาภิเษกสมโภช เรื่อง การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลชนิดเชื้อตายจากไวรัสสเตรนต่างๆ หน้าที่ 1 ถึง 43

ภาษาอังกฤษ

Alexander, D.J. 1988. History aspects. In: Newcastle disease. Edited by D.J.Alexander. Kluwer Academic Publishers, Beston. p.1-10.

Alexander, D.J. 1997. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Disease of poultry. Tenth edition. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, USA. p.541-569.

Alexander, D.J. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Fourth edition. Edited by D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson and W.M. Reed. The American Association of Avian Pathologists. p. 156-163.

Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev. Sci. Off. Int. Epiz. 19 (2): 443-462.

Awan, M.A., Otle, M.J. and James, A.D. 1994. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. Avian Pathology. 23: 405-423.

Beard, C.W. 1989. Serological procedures. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Third edition. Edited by H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth and J.E. Pearson. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa, USA. p.192-200.

Bennejean, G. 1988. Newcastle disease : control policies. In: Newcasle disease. Edited by D.J.Alexander. Kluwer Academic Publishers, Boston. p.302-315.

Berinstein, A., Seal, B., Zanetti, F., Kaloghlian, A., Segade, G. and Carrillo, E. 1999. Newcastle disease virus surveillance in Argentina: use of reverse transcription-polymerase chain reaction and sequencing for molecular typification. Avian Diseases. 43: 792-797.

Boa-Amponsem, K., Price, S.E., Geraert, P.A., Picard, M. and Siegel, P.B. 2001. Antibody responses of hens fed vitamin E and passively acquired antibodies of their chicks. Avian Diseases. 45: 122-127.

Box, B.G. 1975. Newcastle disease antibody levels in chickens after vaccination with oil emulsion adjuvant killed vaccine. The Vetrinary Record. 96: 108-111.

British Pharmacopoeia (Veterinary), 1998. British Pharmacopoeia (Veterinary). Her Majesty's Stationary Office and the Queen's Printer of Acts of Parliament, London. p.178-180.

Brugh, M., Beard, C.W. and Wilkes, W.J. 1977. The influence of test conditions on Newcastle disease hemagglutinaion inhibition titers. Avian Diseases. 22(2): 320-328.

Brugh, M. Jr. and Siegel, H.S. 1978. Inactivated Newcastle disease vaccines : influence of virus concentration on primary immune response. Poultry Sciences. 57: 892-896.

Brugh, M. and Stone, H.D. 1993. Comparison of inactivated Newcastle disease viral vaccine containing different emulsion adjuvants. American Journal of Veterinary Research. 44(1): 72-75.

Cajavec, S., Birdin, Z., Sladic, D., Pokric, B. 1996. Tween 80-solubilized Newcastle disease virus prepared as a water-in-oil-in-water vaccine. Avian Diseases. 40: 193-201.

CEC, 1992. Council Directive 93/342/EEC of 12 12 May 1993 laying down the criteria for classifying third countries with regard to avian influenza and Newcastle disease in relation to imports of live poultry and hatching eggs. Official Journal of the European Communities. L 137. 24-29.

CEC, 2001. Council Directive 2001/598/EC of 11 July 2001 amending Decision 94/984/EC laying down animal health conditions and veterinary certificates for the importation of fresh poultry meat from third countries and repealing Decision 96/181/EC, 96/387/EC, 96/712/EC and 97/593/EC. Official Journal of the European Communities. L 210. 37-44.

Cessi, D. and Nardelli, L. 1974. Vaccination against Newcastle disease : efficacy of an oil emulsion vaccine. Avian Pathology. 3(4) : 247-253.

Charlton, B.R., Bermudez, A.J., Boulianne, M., Eckroade, R.J., Jeffrey, J.S., Newman, L.J., Sander, J.E. and Wakenell, P.S. Newcastle disease (Newcastle: Avian Pneumoencephalitis). In: Whiteman and Bickford's Avian Disease Manual. Forth edition. American Association of Avian Pathologist. p.60-64.

Cross, G.M. 1988. Newcastle disease-vaccine production. In: Newcastle disease. Edited by D.J.Alexander. Kluwer Academic Publishers, Beston. p.333-346.

Droual, R., Bickford, A.A., Charlton, B.R. and Kunny, D.R. 1990. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens. Avian Diseases. 34: 473-478.

Eidson, C.S., Thayer, S.G., Villegas, P. and Kleven, S.H. 1982. Further studies with an inactivated oil emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders. Poultry Sciences. 61: 1309-1313.

Eidson, C.S., Villegas, P. and Kleven, S.H. 1980. Field trial with and oil emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders. Poultry Sciences. 59: 702-707.

Elf, G.F., Botte, W.G., Bersi, T.K., Headrick, M.D. and Fritts, C.A. 1998. Effect of dietary vitamin E on the immune systems in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. Poultry Sciences. 77: 529-537.

Folitse, R., Halvorson, D.A. and Sivanandan, V. 1998. Efficacy of combined killed-in-oil emulsion and live Newcastle disease vaccines in chickens. Avian Diseases. 42: 173-178.

Franchini, A., Bertuzzi, S., Tosarelli, C. and Manfreda, G. 1995. Vitamin E in viral inactivated vaccines. Poultry Sciences. 74: 666-671.

Franchini, A., Canti, M., Manfreda, G. and Bertuzzi, S. 1991. Vitamin E as adjuvant in emulsified vaccine for chicks. Poultry Sciences. 70: 1709-1715.

Friedman, A., Bartov, I. And Sklan, D. 1998. Humoral immune response inpairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. Poultry Science. 77: 956-962.

Fukanoki, S., Iwakura, T., Iwaki, S., Matsumoto, K., Takeda, R., Ikeda, K., Shi, Z. and Mori, H. 2001. Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutination-meuraminidase glycoprotein. Avian Pathology. 30: 509-516.

Gelb, J. Jr. and Cianci, C.G. 1987. Detergent-treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitation test antigen. Poultry Science. 66: 845-853.

Gelb, J.Jr., King, D.J., Winer, W.A. and Ruggeri, P.A. 1996. Attenuation of lentogenic Newcaslte disease virus strain B-1 by cold adaptation. Avian Diseases. 40: 605-612.

Goddard, R.D., Nicholas, R.A.J. and Luff, P.R. 1988. Serology-based potency test for inactivated Newcastle disease vaccines. Vaccine. 6: 530-532.

Gore, A.B. and Qureshi, M.A. 1997. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. Poultry Science. 76: 984-991.

Gupta, R.K., Reyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C.K. 1993. Adjuvants -a balanced between toxicity and adjuvancity. Vaccine. 11(3): 293-306.

Hanson, R.P., Spalatin, J. and Jacobsin, G.S. 1973. The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus. Avian Diseases. 17: 354-361.

Jones, R.C. 1998. Respiratory diseases. In: Forth Asia pacific poultry health conference. The Australian Veterinary Poultry Association. p.75-84.

Jordan, F.T.W. 1990. Paramyxoviridae (Newcastle disease and others). In: Poultry diseases. The University Press, Cambridge. p.121-136.

Mass, R.A., Oei, H.L., Venema-Kemper, .S, Koch, G. and Bongers, J. 1999. Dose-response effects of inactivated Newcastle disease vaccines: influence of serological assay, time after vaccination and type of chickens. Avian Diseases. 43: 670-677.

McIlroy, S.G., Goodall, E.A., Rice, D.A., McNulty, M.S. and Kennedy, D.G. 1993. Improved performance in commercial broiler flocks with subclinical infectious bursal disease when fed diets containing increased concentrations of vitamin E. Avian Pathology. 22: 81-94.

Murakawa, Y., Takase, K., Sakamoto, K., Suesoshi, M. and Nakatomo, H. 2000. Characterization of lentogenic Newcastle diseae virus isolated from broiler chickens in Japan. Avian Diseases. 44: 686-690.

National Research Council, 1994. Nutrient requirements of poultry. Ninth edition. National Academy Press, Washington, D.C. p.1-57.

OIE, 1992. Newcastle disease. In: OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Second edition. Office international des epizooties, Paris, France. p.130-141.

Pakinyo, S. and Sasipreeyajan, J. 1993. Efficacy of live LaSota Newcastle disease vaccines simultaneously vaccinated with various types of inactivated vaccine.Thai Journal of Veterinary Medicine. 23(1): 35-47.

Peleg, B.A., Samina, I. And Brenner, J. 1993. Immunization of chickens with live Newcastle disease vaccine adjuvanted with oil. Vaccine. 11(10): 1074-1076.

Pond, W.G., Church, D.C. and Pond, K.R. 1995.Chapter 12 Fat-soluble vitamins. In: Basic animal nutrition and feeding. 4th edition. John Wiley &Sons, New York, USA. p.236-241.

Rautenschlein, S., Sharma, J.M., Winslow, B.J., McMillen, J., Junker, S. and Cochvan, M. 2000. Embryo vaccination of turkey against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containint interferon as adjuvants. Vaccines. 18: 426-433.

Rweyemamu, M.M., Baltazar, M.C. 1986. Efficacy of avridine as an adjuvant for Newcastle disease virus antigen in chickens. American Journal of Veterinary Researches. 47(6): 1243-1248.

Sainsbury, D. 2000. The health of poultry. In: Poultry health and management: chicken, turkeys, ducks, geese and quail. 4th edition. Black Science, UK. p.111-150.

Shope, R.E. 1964. Introduction: The birth of a new disease. In: Newcastle disease. Edited by R.P. Hanson. p.3-22.

Stone, H.D. 1988. Optimization of hydrophile-lipophile balance for improved efficacy of Newcastle disease and Avian influenza oil-emulsion vaccines. Avian Diseases. 32: 68-73.

Stone, H.D. 1991. The preparation and efficacy of manually emulsified Newcastle disease oil emulsion vaccines. Avian Diseases. 35: 8-16.

Stone, H.D. 1993. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and Avian influenza. Avian Diseases. 37:399-405.

Stone, H.D. 1997. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal, vegetable and synthetic oils. Avian Diseases. 41: 591-597.

Stone, H.D., Brugh, M. and Beard, C.W. 1981. Comparison of three experimental inactivated oil emusion Newcastle disease vaccines. Avian Diseases. 25(4): 1070-1076.

Stone, H.D., Brugh, M., Ericson, G.A. and Beard, C.W. 1980. Evaluation of inactivated Newcastle disease oil-emulsion vaccines. Avian Diseases. 24(1): 99-111.

Stone, H.D., Brugh, M., Hopskin, S.R., Yoder, H.W. and Beard, C.W. 1978. Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. Avian Diseases. 22(4): 666-674.

Stone, H.D. and Xie, Z. 1990. Efficacy of experimental Newcastle disease water-in-oil emulsion vaccines formulated from squalane and squalene. Avian Diseases. 34: 979-983.

Stone, H.D., Hitchell, B. and Brugh, M. 1997. In ovo vaccination of chichen embryos with experimental Newcastle disease and Avian influenza oil-emulsion vaccines. Avian Diseases. 4: 856-863.

Tengerdy, R.P. and Brown, J.C. 1977. Effect of vitamin E and A on humoral immunity and phagocytosis in *E. coli* infected chicken. Poultry Sciences. 56: 957-963.

Villegas, P. and Purchase, H.G. 1989. Titration of biological suspensions. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Third edition. Edited by H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth and J.E. Pearson. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa, USA. p.186-191.

Yamanaka, M., Okabe, T., Nakai, M. and Goto, N. 1993. Local pathological reaction and immune response of chickens to ISA-70 and other adjuvants containing Newcastle disease virus antigen. Avian Diseases. 37: 459-466.

Werner, O., Romer-Oberdorfer, A., Kollner, B., Manvell, R.J. and Alexander, D.J. 1999. Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. Avian Pathology. 28: 79-88.

Westbury, H. 2001. Newcastle disease virus: an evolving pathogen? Avian Pathology. 30: 5-11.

WHO Scientific Group, 1976. Immunological adjuvants. In: World Health Organization Technical Report Series No. 595. Jenewa, Switzerland. p. 1-40.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล	วิษณุ วรรณแสวง
วันเดือนปีเกิด	16 ธันวาคม 2514
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท สหฟาร์ม จำกัด
ประวัติการศึกษา	ปี พ.ศ. 2538 สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประวัติการทำงาน	ปี พ.ศ. 2538-ปัจจุบัน นายสัตวแพทย์ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ฝ่ายวิเคราะห์ วิจัย บริษัท สหฟาร์ม จำกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย