



วารสาร

ชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 30 ฉบับที่ 1-2 (มีนาคม-กันยายน 2564)

Vol.30 No.1-2 (March-September 2021)

เปรียบเทียบ
ผลการวัดระหว่าง
ห้องปฏิบัติการของเทคนิค
Immunoperoxidase และ
Neutralizing peroxidase-linked assay
ในการตรวจหาปริมาณไวรัสและ
แอนติบอดีต่อโรคคหิวคอตสุกร

การพัฒนา
วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย
ชนิดอิมัลชัน

เปรียบเทียบการเจริญเติบโต
ของเชื้อแบคทีเรีย
Pasteurella multocida
ซีโรไทป์ B:2,5 โดยใช้เชื้อตั้งต้น
ที่ความเข้มข้น 1% และ 2%

ความคุ้มโรคข้าม
ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย
สำหรับโค กระบือและแพะ
ไทป์ O₁₈₉ ต่อเชื้อไทป์โอ
ที่ระบาดในพื้นที่

ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี
ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
ระหว่างการทดสอบโดย
วิธีลิกวิดเฟสบล็อกกิ้งอิลซ่า
และวิธีสปีดเทสต์ไลเซชัน

การเปลี่ยนแปลงของ
ระดับแอนติบอดี
หลังการได้รับ
เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
โดยการฉีดเชื้อพืชมัก

ความสัมพันธ์ทางแอนติเจน
และพันธุกรรมของ
ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
ในการคัดเลือกไวรัสสำหรับ
ผลิตวัคซีน

เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 30 ฉบับที่ 1-2 มีนาคม-กันยายน 2564

สารบัญ

- จากกองบรรณาธิการ 5
- เปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของเทคนิค Immunoperoxidase และ Neutralizing peroxidase-linked assay ในการตรวจหาปริมาณไวรัสและแอนติบอดีต่อโรคหิวาต์สุกร
ดิถี ประเสริฐสุวรรณ นลินี หงษ์ชุมพล อาริรัตน์ สุดโต ละมุล ไม้ลี 6
- การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชัน
เข็มชมพู อธิกัญญ์ภักดิ์ นันทิยา แสงเปล่า นพวรรณ บัวมีรูป ดนัย คำขวัญ 17
- เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1% และ 2%
เข็มชมพู อธิกัญญ์ภักดิ์ นันทิยา แสงเปล่า 34
- ความคุ้มโรคซ้ำของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์ O₁₈₉ ต่อเชื้อไทป์โอที่ระบาดในพื้นที่
มารุตพงศ์ พุ่มพวง ไชยา สง่าประโคน 42
- ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยระหว่างการทดสอบโดยวิธีลิควิดเฟสบล็อกกิ้งอิลโซซ่า และไวรัสนิวทริไลเซชัน
ไชยา สง่าประโคน มารุตพงศ์ พุ่มพวง 52
- การเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีหลังการได้รับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการฉีดเชื้อพิษทัพบ
ไชยา สง่าประโคน อาริรัตน์ สุภาพ 63
- ความสัมพันธ์ทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในการคัดเลือกไวรัสสำหรับผลิตวัคซีน
วิไล ลินจงสุขภักข 73

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 30 No. 1-2 March-September 2021

Contents

- The editorial 5

- Interlaboratory comparison of immunoperoxidase and neutralizing peroxidase- linked assay for virus and antibody determination to classical swine fever 6
Ditee Prasertsuwan Nalinee Hongchumpon Areerat Sutto
Lamul Molee

- Development of Haemorrhagic septicaemia emulsion vaccine 17
Khemchomphu Atikanyapak Nanthiya Sangplao
Noppawan Buamitoup Danai Khamkwan

- Comparative study of *Pasteurella multocida* serotype B:2,5 growth rate with 1% and 2% inoculum sizes under *in vitro* condition 34
Khemchomphu Atikanyapak Nanthiya Sangplao

- Cross protection of the O₁₈₉ strain of foot and mouth disease vaccine for cattle against to the serotype O field strains 42
Marutpong Pumpuang Chaiya Sangaprakhon

- The Relationship of Foot and Mouth Disease antibody titer between using the Liquid phase blocking ELISA and Virus neutralization test 52
Chaiya Sangaprakhon Marutpong Pumpuang

- Seroconversion of antibody titer after direct challenged with Foot and Mouth Disease virus 63
Chaiya Sangaprakhon Thareerat Suphap

- Antigenic and genomic relationship of foot and mouth disease virus in selecting seed virus for vaccine production 73
Wilai Linchnongsubongkoch

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

<http://biologic.dld.go.th>

วัตถุประสงค์

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

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	จาทูรนต์	พลราช	Advisory board	Jaturon	Polrach
บรรณาธิการ	ไชยา	สง่าประโคน	Editor	Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	ฐิตวัฒน์	จันทวร	Editorial board	Thitawat	Janthawon
	ร่มพฤษ	อุศล		Rompkrue	Udon
	อนันต์	ท้าวเพชร		Anan	Thaopech
	สายพิน	ชุมทรัพย์		Saipin	Khumsab
	วรพร	ปู่สูงเนิน		Woraporn	Poosungnoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	Manager	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 1165 โทรสาร 0-4431-5931	Office:	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130 Tel. 0-4431-1476 extension 1123 Fax. 0-4431-5931
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน	Publications:	Twice a year in March and September

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

- 1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัย อันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ
- 1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจน โดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน
- 1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่ง โดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
- 1.4 เรื่องอื่นๆ ที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

- 2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น
- 2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ
 - 2.2.1 ตัวพิมพ์ ใช้ตัวอักษร TH SarabunPSK แบบปกติ ขนาด 16 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 16
 - 2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวน 10-14 หน้า
 - 2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบน ด้านซ้าย ด้านขวาและด้านล่างที่ 2.54 ซม.
 - 2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3.... ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติขนาด 16
 - 2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้
 - ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านล่างของตาราง
 - รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง
 - 2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบ ทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella* spp.

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

- 3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์
- 3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง
กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 1123 โทรสาร 0-4431-5931
- 3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ
- 3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน
- 3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

- 4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี
- 4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงบรรทัด
- 4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนให้เนื้อความครอบคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะที่มา วัตถุประสงค์ วิธีการ ผล และสรุป หรืออาจแยกเป็น 4 ย่อหน้า คือ ส่วนที่มา (Backgrounds) วิธีการ (Methods) ผล (Results) และสรุป (Conclusion) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยเขียนแยกหน้า
- 4.4 คำสำคัญ (Keywords) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ
- 4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย
 - 4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ
 - 4.5.2 วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงบรรทัด
 - 4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ
 - 4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์
 - 4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่าย
 - 4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

- 1) วารสารหรือหนังสือ เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิไลและคณะ, 2532; Kumakai *et al.*, 1961) กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a, b, c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
- 2) บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Layton, R. B. and Weathers, C. C., unpublished data),for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)
- 3) เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (,) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับ ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

- 1) วารสาร ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง เช่น
 สายพิน ชุมทรัพย์ สุรพล ชุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ
 วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35
 Johnson, R. H. and Collings, D. F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.
 กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a, b, c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น
 Carter, G. R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170-174.
 Carter, G. R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61-63.
- 2) หนังสือ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุม
สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม
พูลเกษ บรรณาธิการ หลักการทำไร้อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
หน้า 141-145

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. Fowl cholera. *In* Manual
of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris,
France. p. 899.

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

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

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

จันทรา แป้นดุ่ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึงพิศ ดุลยพัชร
2541อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา
<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm> 27 มีนาคม 2541

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

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้เป็นวารสารฉบับรวมเล่ม (เล่ม 1-2 เดือนมีนาคมและกันยายน) และปีที่จัดทำวารสารเป็นปีที่ 30 แล้ว (ปีที่ 1 จัดทำเมื่อปี 2532) ซึ่งวารสารฉบับนี้จะประกอบไปด้วยเนื้อหาที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้วัคซีนที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ จำนวน 7 เรื่อง ได้แก่ 1) เปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของเทคนิค Immunoperoxidase และ Neutralizing peroxidase-linked assay ในการตรวจหาปริมาณไวรัสและแอนติบอดีต่อโรคคหิวคอตสุกร 2) การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชัน 3) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1% และ 2% 4) ความคุ้มโรคข้ามของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์ O₁₈₉ ต่อเชื้อไทป์โอที่ระบาดในพื้นที่ 5) ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยระหว่างการทดสอบโดยวิธีคิตวิดเฟสบล็อกกิ้งอิลูซ่าและไวรัสนิวทริไลเซชัน 6) การเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีหลังการได้รับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการฉีดเชื้อพิษหับ และ 7) ความสัมพันธ์ทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในการคัดเลือกไวรัสสำหรับผลิตวัคซีน โดยเฉพาะเรื่องที่ 7 โดยท่านผู้เชี่ยวชาญสัตวแพทย์หญิงวิไล ลิณจงสุขภักข (ผู้เชี่ยวชาญโรคปากและเท้าเปื่อย OIE) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้ใช่วัคซีนและผู้ผลิตวัคซีน (สทช.) ในการผลิตวัคซีนให้ตรงหรือใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในพื้นที่ เพื่อควบคุมหยุดยั้งการระบาดของเชื้อให้เร็วที่สุด ช่วยลดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

สำหรับปี 2563 ทวีโลกและประเทศไทย ประสบกับปัญหาด้านสุขภาพของประชากร (คน) ที่รุนแรงมาก คือ ปัญหาการระบาดของโรคไวรัสโคโรนา-2019 (COVID-19) ที่มีคนติดเชื้อและเสียชีวิตจำนวนมาก ถือว่าเป็นหายนะที่สำคัญของโลกในยุคโลกไร้พรมแดน สำหรับโรคในสัตว์ของประเทศไทย ปี 2563 พบกับปัญหาการระบาดของโรคคหิวคอตแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness; AHS) และปี 2564 นี้ พบกับปัญหาการระบาดของโรคล้มปี่ สกิน (Lumpy Skin Disease; LSD) ซึ่งทั้ง 2 โรค เป็นโรคอุบัติใหม่ที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทย ทำให้เกิดการตื่นตัวของนักวิชาการในสาขาต่างๆ เช่น นักวัคซีนวิทยา นักไวรัสวิทยา เพื่อพัฒนาวัคซีนชนิดใหม่ๆ ที่ใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ ได้แก่ วัคซีนชนิด mRNA วัคซีนชนิด Vector เป็นต้น

ท้ายนี้กองบรรณาธิการ ขอขอบคุณผู้อ่านที่ยังให้ความสนใจและหวังว่าวารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิชาการ วิจัย การต่อยอด การพัฒนานวัตกรรม ของนักวิชาการ นักวิจัย และเป็นข้อมูลแก่ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจ รวมทั้งขอให้แคล้วคลาดปลอดภัยจากโรคโควิด-19 ทุกๆท่าน

ขอขอบคุณ
น.สพ. ไชยา สง่าประโคน
บรรณาธิการ

เปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของเทคนิค Immunoperoxidase และ Neutralizing peroxidase-linked assay ในการตรวจหาปริมาณไวรัส และแอนติบอดีต่อโรคหิวาต์สุกร

ดิถี ประเสริฐสุวรรณ¹นลินี หงษ์ชุมพล¹อารีรัตน์ สุตโต¹ละมุล ไม้สี²

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) ในการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค Immunoperoxidase (IP) โดยใช้ตัวอย่างไวรัสหิวาต์สุกร สเตรณโซนิส ในเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 20 ตัวอย่าง และตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) โดยใช้ตัวอย่างซีรัมสุกรก่อนฉีดวัคซีนหิวาต์สุกร จำนวน 3 ตัวอย่าง และซีรัมสุกรหลังฉีดวัคซีนหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 3 ตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP ของ สทช. และ สสช. มีค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) เท่ากับ 5.90 ± 1.03 และ 6.10 ± 0.85 ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA จากตัวอย่างซีรัมสุกรก่อนฉีดวัคซีนหิวาต์สุกร จำนวน 3 ตัวอย่าง และซีรัมสุกรหลังฉีดวัคซีนหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 3 ตัวอย่าง ผลการทดสอบของ สทช. มีค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) เท่ากับ 6.28 ± 2.98 , 5.89 ± 2.01 , 4.55 ± 0.96 , 33.29 ± 11.37 , 25.10 ± 11.94 และ 26.39 ± 17.28 ตามลำดับ ผลการทดสอบของ สสช. มีค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) เท่ากับ 2.08 ± 0.71 , 3.22 ± 2.11 , 4.44 ± 2.11 , 18.67 ± 12.22 , 8.32 ± 2.84 และ 4.55 ± 0.96 ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

สรุปว่าการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP และการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. มีความสามารถในการทดสอบเทคนิคดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงถึงความพร้อมของห้องปฏิบัติการและบุคลากรของ สทช. และ สสช. ในการทดสอบคุณภาพวัคซีนหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง แทนการใช้กระต่ายในการผลิตวัคซีน

คำสำคัญ: การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ
เทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay

เทคนิค Immunoperoxidase
หิวาต์สุกร

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกร (Classical Swine Fever; CSF หรือ Hog Cholera) เป็นโรคระบาดสัตว์ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากแก่อุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรภายในประเทศ สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Classical Swine Fever อยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus (Van and Terpstra, 1989) ซึ่งอาการป่วยของสุกรขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อไวรัสและภูมิคุ้มกันโรคในสุกรแต่ละตัว การติดต่อของโรคสามารถติดต่อโดยตรงจากสุกรป่วยในเล้าเดียวกัน โดยเชื้อไวรัสจะถูกขับออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่าย เช่น น้ำมูก น้ำลาย อุจจาระ หรือปัสสาวะ เชื้อจากแม่ผ่านรกสู่ลูกสุกร หรืออาจติดต่อทางอ้อมจากคน สัตว์เลี้ยง นก หนู แมลง และยานพาหนะที่ใช้ในการขนส่งสุกรเข้าออกจากฟาร์ม โรคอหิวาต์สุกรไม่มีวิธีการรักษา สัตว์ป่วยจะถูกทำลายแล้วฝังหรือเผาซากเพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ดังนั้นการฉีดวัคซีนจึงเป็นการป้องกันความสูญเสียแต่ไม่อาจกำจัดโรคได้

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรณไซนิส ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น SK6 (Hulst *et al.*, 2000; Terpstra *et al.*, 1990) และ FS-L3 (Sakoda and Fukusho, 1996; วาสนาและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร และนอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์สุกร (Sasahara and Kumagai, 1966) เช่น BEK (เซลล์ไตโค), MARC-145 (เซลล์ไตลิง), HL (เซลล์ปอดแฮมสเตอร์) เป็นต้น ซึ่งเมื่อเซลล์มีการติดไวรัส (infected) จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect; CPE) ดังนั้นในการตรวจหาปริมาณไวรัสจึงต้องย้อมเซลล์ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี และสังเกตการติดสีของไวรัส โดยใช้เทคนิค Immunoperoxidase (IP) (NIAH, 1998) หรือเทคนิค fluorescent antibody technique (FAT) (NIAH, 1998; OIE, 2018) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) ซึ่งเป็นหน่วยงานกลางในการตรวจวินิจฉัยได้เลือกใช้เทคนิค IP ในการตรวจหาปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกร เนื่องจากเทคนิค FAT ต้องทดสอบในเซลล์หรือเนื้อเยื่อสดจึงจะทำให้เห็นขอบเขตและรายละเอียดของเซลล์ และเมื่อย้อมแล้วไม่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เนื่องจากสฟลูออเรสเซนต์จะเสื่อมเมื่อถูกแสงสว่าง รวมทั้งกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการอ่านผลเนื้อเยื่อจะต้องเป็น Fluorescent microscopy หรือ Confocal laser scanning microscopy (CLSM) เท่านั้น (Van der Loos, 1999) แต่เทคนิค IP สามารถใช้ได้ทั้งตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อสด เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในฟอร์มาลิน เป็นปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตที่จำเพาะเกิดสีขึ้น โดยสีนี้จะมีความคงทนและสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Nakane and Pierce, 1967) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเทคนิค IP สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสอื่นๆ ในสุกรได้ เช่น Africa swine fever virus โรคโรต้าไวรัสในสุกร (Rotavirus) เป็นต้น (Barman *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 1982)

สำหรับการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรนั้น สทช. และ สสช. ใช้เทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) (NIAH, 1998; OIE, 2018) ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังสุกรได้รับวัคซีน ซึ่งเทคนิค NPLA เป็นการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการกลบล้างฤทธิ์ (Neutralization) โดยอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีของซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วนเป็นลำดับ และอาศัยการย้อมติดสีของไวรัสเพื่อดูการคงเหลือของไวรัส หากในซีรัมที่เจือจางนั้นมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสในปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งไวรัสได้ ไวรัสจะไม่ติดสีเมื่อทำการย้อม นอกจากนี้เทคนิค NPLA ยังสามารถตรวจวินิจฉัยแยกระหว่างการติดเชื้อ bovine viral diarrhea virus (BVD) กับการติดเชื้อจากไวรัสอหิวาต์สุกรได้อีกด้วย (Terpstra *et al.*, 1984)

ตามข้อกำหนดของมาตรฐานว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025 การทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการถือเป็นส่วนหนึ่งในหลักประกันคุณภาพผลการทดสอบของ

ห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจสอบสมรรถนะของห้องปฏิบัติการและแสดงความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2559; ISO/IEC Guide 43-1. 1997. 4; ILAC – G 13: 2007)

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการวัดระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory Comparison; ILC) ของ สทช. และ สสช. ในการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP และการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA เพื่อทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Laboratory proficiency testing) รวมทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการและพัฒนาบุคลากรในการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง ที่มีการวิจัยและพัฒนาาร่วมกันระหว่าง สทช. และ สสช. แผนการใช้กระต่ายในการผลิตวัคซีน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส (Swine fever: Chinese strain) ที่เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ FSL3 จำนวน 20 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างจะถูกกำหนดรหัสตัวอย่างจากผู้ส่ง (ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สทช.)

ซีรัมสุกรก่อนการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร จำนวน 3 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างจะถูกกำหนดรหัสตัวอย่างจากผู้ส่ง (ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สทช.)

ซีรัมสุกรหลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับต้นแบบ (Development of classical swine fever tissue culture vaccine Chinese strain, pilot scale) จำนวน 3 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างจะถูกกำหนดรหัสตัวอย่างจากผู้ส่ง (ฝ่ายผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สทช.)

เซลล์

เซลล์ชนิด SK6 passage 25 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สสช. ปี 2560 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80°C มีจำนวนเซลล์ 2×10^6 เซลล์/หลอด

เชื้อไวรัสมาตรฐาน (standard virus)

เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง สายพันธุ์บางเขน 1950 (Classical swine fever, Bangkok 1950 strain) ที่มีปริมาณไวรัส $10^5 \text{ PID}_{50}/\text{มิลลิลิตร}$ (50% Pig Infectious dose) จากการเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 (กังวาน และดีลี, 2562)

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ SK6 (Growth medium; GM) ประกอบด้วย minimal essential medium (Eagle's MEM Nissui No1)¹, Tryptose phosphate broth² solution 1%, L-glutamine³ 1%, sodium bicarbonate⁴ 1%, antibiotic⁵ 1%, และ calf serum⁶ 5%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium; MM) ประกอบด้วย Minimal essential medium (Eagle's MEM Nissui No1)¹, Tryptose phosphate broth² solution 1%, L-glutamine³ 1%, sodium bicarbonate⁴ 1%, antibiotic⁵ 1%, และ calf serum⁶ 1%

การเตรียมเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ ในขวด Flask

นำเซลล์ SK6 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80°C มา thaw แล้วล้างเซลล์ด้วย GM ปริมาตร 5 มล. ต่อหลอด นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์⁷ ที่มีส่วนใส่ เหลือไว้แต่เซลล์ที่ก้นหลอดแล้วล้างซ้ำ

¹Nissui, Japan

²Bacto™, USA

³Merck, Germany

⁴Merck, Germany

⁵Jiangxi dongfang, China

⁶Capricorn, South America

⁷Sigma model 2K15, Germany

อีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วย GM นับเซลล์เริ่มต้นให้ได้จำนวน 3×10^5 เซลล์/มล. แบ่งใส่ขวด Flask ขนาด 75 ตร.ซม. ปริมาตร 20 มล./ขวด บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจะเต็มพื้นที่ประมาณ 80-100%

การเพาะเลี้ยงเซลล์ ใน Multiwell plate ขนาด 96 well

นำขวด Flask ที่เพาะเลี้ยงเซลล์มาดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆ ละ 5 มล. ดูด PBS ที่ยัง ย่อยเซลล์ด้วย trypsin-versene (TV)⁸ ปริมาตร 1.5 มล. บ่มที่ 37°C ประมาณ 3 นาที เคาะเบาๆ ให้เซลล์หลุดจากผิวขวด หยุดปฏิกิริยาของ TV โดยเติม GM 5 มล. ใช้ไปเปิดดูด-ปล่อย GM ให้เซลล์หลุดจากผิวขวดทั้งหมดและแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ดูดเซลล์ใส่ Centrifuge tube บ่มที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์⁷ ที่มีส่วนใส เหลือไว้แต่เซลล์ที่ก้นหลอด เติม GM 5 มล. ใช้ไปเปิดดูด - ปล่อย GM ให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว นำไปบ่มที่ความเร็ว 1,000 rpm นาน 5 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์⁷ แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วย GM นับเซลล์เริ่มต้นให้ได้จำนวน 2×10^5 เซลล์/มล. เติมเซลล์ใน Multiwell plate ขนาด 96 well (แบบ Flat bottom COSTAR[®])⁹ ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

การตรวจหาปริมาณไวรัสหัดสุกรด้วยเทคนิค Immunoperoxidase

นำตัวอย่างไวรัสมาเจือจางแบบ 10 fold dilution ด้วย MM ที่ 10^{-1} - 10^{-10} จากนั้นเติมตัวอย่างไวรัสที่เจือจางแล้วลง Multiwell plate ที่เตรียมไว้ ความเจือจางละ 4 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมบวก (positive control; เติม standard virus จำนวน 4 หลุม) กลุ่มควบคุมลบ (negative control; เติม MM จำนวน 4 หลุม) และกลุ่มควบคุมเซลล์ (cell control; เติม GM จำนวน 8 หลุม) บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 5 วัน เมื่อครบกำหนดเทอาหารเพาะเลี้ยงเก่าทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเข้มข้น¹⁰ ตรึงไวรัสและเซลล์ด้วย 4% Formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

เติม Monoclonal Mab WH 303¹¹ ที่เจือจาง 1:300 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Anti-Mouse Ig/HRP Conjugate¹² ที่เจือจาง 1:300 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Substrate ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกและคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938)

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหัดสุกรด้วยเทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay

Plate ตัวอย่าง

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ GM ลงใน Multiwell plate ขนาด 96 well ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมตัวอย่างซีรัมสุกรปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแถว A1-H1 ของ culture plate เจือจางซีรัมแบบ 2 fold dilution จำนวน 6 dilution แล้วดูดทิ้ง 50 ไมโครลิตร (ลำดับการเจือจาง 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64) จากนั้นเติมเชื้อไวรัสมาตรฐานปริมาณ 100-300 TCID₅₀ (Tissue culture infective dose) ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติมเซลล์ SK6 ที่เพาะเลี้ยงใน Multiwell plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร (2×10^5 เซลล์ต่อมล.) บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 4-5 วัน เทอาหารเพาะเลี้ยงเก่าทิ้งในภาชนะที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเข้มข้น¹⁰ ตรึงไวรัสและเซลล์ด้วย 4% Formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม Monoclonal Mab WH 303¹¹ ที่เจือจาง 1:300 ในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Anti-Mouse Ig/HRP Conjugate¹² ที่เจือจาง 1:300 ใน

⁸Lonza, USA ⁹Corning, USA ¹⁰Umonium38, Belgium ¹¹APHA Scientific, UK ¹²Dako, Denmark

ทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วเติม Substrate ทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง อ่านผลด้วย กล้องจุลทรรศน์ (อัจฉริยา และคณะ, 2545) บันทึกและคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938) ทำการทดสอบตัวอย่างซีรัมเดิมซ้ำ 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง ทั้งในส่วนของ สทช. และ สสช. จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วจึงนำมาคำนวณค่าทางสถิติ

Control plate

เตรียม positive control เพื่อทำ virus back titration โดยเจือจางเชื้อไวรัสมาตรฐานแบบ 10 fold dilution ตรวจสอบกลับว่าปริมาณไวรัสที่ได้มีค่า 30-300 TCID₅₀/50µl (OIE 2018)

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบผลการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP และการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสฮิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA ระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. โดยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 26

ผล

การตรวจหาปริมาณไวรัสฮิวาต์สุกรด้วยเทคนิค Immunoperoxidase

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสฮิวาต์สุกรระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) เท่ากับ 5.90 ± 1.03 และ 6.10 ± 0.85 TCID₅₀/ml ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Independent Sample T-test พบว่าผลการตรวจหาปริมาณไวรัสฮิวาต์สุกรระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1, รูปที่ 1)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อฮิวาต์สุกรด้วยเทคนิค Neutralizing peroxidase-linked assay

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อฮิวาต์สุกรของตัวอย่างซีรัมก่อนฉีดวัคซีนฮิวาต์สุกรระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบของ สทช. มีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) เท่ากับ 6.28 ± 2.98, 5.89 ± 2.01 และ 4.55 ± 0.96 ตามลำดับ ผลการทดสอบของ สสช. มีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) เท่ากับ 2.08 ± 0.71, 3.22 ± 2.11 และ 4.44 ± 2.11 ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Independent Sample T-test รายคู่ตัวอย่าง พบว่าทุกคู่ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อฮิวาต์สุกรของตัวอย่างซีรัมหลังฉีดวัคซีนฮิวาต์สุกร ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบของ สทช. มีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) 33.29 ± 11.37, 25.10 ± 11.94 และ 26.39 ± 17.28 ตามลำดับ ผลการทดสอบของ สสช. มีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) เท่ากับ 18.67 ± 12.22, 8.32 ± 2.84 และ 4.55 ± 0.96 ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี Independent Sample T-test รายคู่ตัวอย่าง พบว่าทุกคู่ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากผลการตรวจหาปริมาณไวรัสฮิวาต์สุกรด้วยเทคนิค IP ระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) ของความแตกต่างเท่ากับ 0.41±0.32 แต่มีเพียง 2 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 5 และ 11 ที่มีค่าความแตกต่างเท่ากับ 1.5 และ 0.83 ตามลำดับ

ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) (รูปที่ 1) โดยค่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการนำส่งตัวอย่าง ถึงแม้จะมีการควบคุมอุณหภูมิในการนำส่งด้วยกล่องเก็บความเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิ แต่ก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลต่อปริมาณไวรัส เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมขณะขนส่งควรอยู่ในช่วง 4-8°C ตลอดจนการขนส่งเพื่อให้เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่สำหรับการนำไปศึกษาต่อ (WHO, 2007) และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. โดยการคำนวณค่าทางสถิติ Independent Sample T-test พบว่าผลการวิเคราะห์ค่า P (ความน่าจะเป็น) มีค่าเท่ากับ 0.516 ซึ่งมีค่ามากกว่า α (ระดับนัยสำคัญ) = 0.05 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไวรัสฮิวส์สูกอร์ที่ตรวจด้วยเทคนิค IP ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ธานินทร์, 2548) (ตารางที่ 1)

จากผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อฮิวส์สูกอร์ด้วยเทคนิค NPLA ของตัวอย่างซีรัมก่อนฉีดวัคซีนฮิวส์สูกอร์ จำนวน 3 ตัวอย่าง และซีรัมหลังฉีดวัคซีนฮิวส์สูกอร์ ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 3 ตัวอย่างโดยแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 3 ซ้ำ พบว่าค่าที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งของแต่ละตัวอย่างของทั้งสองห้องปฏิบัติการมีค่าความเที่ยงต่ำ (low precision) หรือมี reproducibility ที่ไม่ดี ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเชื้อไวรัสมาตรฐานสำหรับการทำ neutralize ถูกกำหนดเป็นช่วงคือ 100-300 TCID₅₀/50 μ l (อัจฉริยา และคณะ, 2545) จึงทำให้ค่าที่ได้ในแต่ละครั้งของการทดสอบไม่เท่ากัน รวมถึงวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งควรได้รับการสอบเทียบ (Calibration) เพื่อลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ แต่ค่าความเที่ยงไม่ได้บอกถึงความถูกต้องของผลการวิเคราะห์แต่ชี้ว่าการวิเคราะห์นั้นมีความสม่ำเสมอในระดับใดเมื่อมีการทดสอบซ้ำหลายๆ ครั้ง (วรวิทย์, 2563) และจากการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. โดยการคำนวณค่าทางสถิติ Independent Sample T-test พบว่าผลการวิเคราะห์ ค่า P (ความน่าจะเป็น) ของทุกคู่ตัวอย่างมีค่ามากกว่า α (ระดับนัยสำคัญ) = 0.05 แสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีต่อโรคฮิวส์สูกอร์ที่ตรวจด้วยเทคนิค NPLA ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ธานินทร์, 2548) (ตารางที่ 2)

การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการมีความสำคัญในการตรวจสอบความสามารถห้องปฏิบัติการและเป็นหนึ่งในส่วนสำคัญที่หน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการนำมาใช้เพื่อพิจารณาให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ เนื่องจากผลจากการเข้าร่วมกิจกรรมดังกล่าวจะแสดงให้เห็นถึงความชำนาญของห้องปฏิบัติการในการทดสอบนั้นๆ รวมถึงช่วยพัฒนาบุคลากรของห้องปฏิบัติการให้เกิดมาตรฐานเดียวกัน นอกจากนี้การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการยังสามารถประเมินค่าความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นและระบุปัญหาที่เกิดขึ้นภายในห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปสู่การแก้ไขได้ (ภัทรภรณ์, 2555)

ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษามาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคฮิวส์สูกอร์ ห้องปฏิบัติการทั้งสองแห่งควรจัดให้มีการทดสอบเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นประจำทุกปี เพื่อติดตามความต่อเนื่องของความสามารถของห้องปฏิบัติการและนำปัญหาที่อาจเกิดขึ้นภายในห้องปฏิบัติการมาแก้ไขต่อไป

สรุป

การตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค IP และการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสฮิวส์สูกอร์ด้วยเทคนิค NPLA ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. มีความสามารถในการทดสอบเทคนิคดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงถึงความพร้อมของห้องปฏิบัติการและบุคลากรของ สทช. และ สสช. ในการทดสอบคุณภาพวัคซีนฮิวส์สูกอร์ ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง แทนการใช้กระต่ายในการผลิตวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ นายสัตวแพทย์ เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ รวมทั้งนางสาวรัตติยา แท่นแก้ว และนางสาววิชุดา โสภณ นักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายทดสอบ คุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนให้การทดลองนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2559 นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการและการประเมินความสามารถการทดสอบ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 1-14
- กังวาน จิงธีรพานิช และดิถี ประเสริฐสุวรรณ การเตรียมไวรัสอหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 28(1): 18-25
- ธานีรินทร์ ศิลป์จารุ 2548 การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS บริษัท วี อินเตอร์ พรินท์ จำกัด กรุงเทพฯ 378-382
- ภัทรภรณ์ เกตุแก่น 2555 การเตรียมตัวอย่างและการเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ แผนกทดสอบความชำนาญ ฝ่ายบริการห้องปฏิบัติการ สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม แหล่งที่มา <http://pt.nfi.or.th/DocFile/20140319100315.pdf> 16 พฤษภาคม 2562
- วรวิทย์ จันทรสุวรรณ 2563 การประเมินความน่าเชื่อถือของข้อมูล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร แหล่งที่มา <http://web.rmput.ac.th/woravith/upload/AnalChem/ppt-evaluation.pdf> 2 ตุลาคม 2563
- วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรการ สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโกคิน และฤทธิ์ลือชัย ปุสุงเนิน 2544 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนโซนิสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ไลน์ สัตวแพทยสาร 52(3): 21-30
- อัจฉริยา ไสละสุต สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโกคิน ดำเนิน จตุรวิธวงศ์ สันนิภา สรุทนต์ ประวีณา กิตติคุณ พรชลิต อัสวชีพ สุพจน์ วัฒนพันธ์ศักดิ์ สว่าง เกษแดงสกุลภูมิ สมิตรา วัฒนโนตร ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช และรชฏ ตันติเลิศเจริญ 2545 การศึกษาสถานภาพระดับภูมิคุ้มกันและการประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมการฉีดวัคซีน เพื่อป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในแม่และลูกสุกร รายงานการวิจัย: การวิจัยและพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกัน โรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย 38-87
- Barman, N. N., Nath, A. J., Neog, B. K. and Das, G. 2014. Comparative efficacy of fluorescent antibody test, immunoperoxidase test and enzyme linked immuno sorbent assay in detection of rotavirus in cell culture. Virus disease. 25(2): 239-242.
- Hulst, M. M., Van Gennip, H. P. G. and Moormann, R. J. M. 2000. Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein E^{ms}. J. Virol. 74(20): 9553-9561.
- ILAC-G 13: 2007. Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.
- ISO/IEC Guide 43-1: 1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons-Part 1: development and operation of proficiency testing schemes.

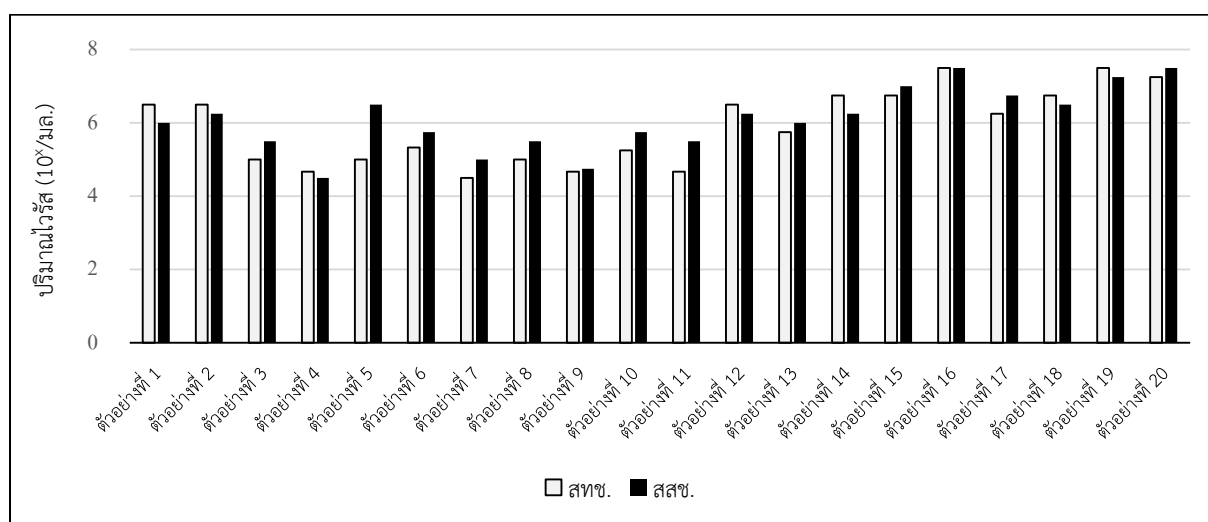
- Nakane P.K. and Pierce G.B. 1976. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 557-559.
- National institute of Animal Health. 1998. Diagnostic technology for swine fever National institute of Animal Health. February 9-March 6, 1998. p: 4-6.
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018. Chapter 3.8.3 Classical swine fever. pp. 1551-1576.
- Pan IC, Huang TS and Hess WR. 1982. New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever. *J Clin Microbiol.* 16(4): 650-5.
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* 27: 493-497.
- Sakoda, Y. and Fukusho, A. 1996. Establishment and characterization of a porcine kidney cell line, FS-L3, which forms unique multicellular domes in serum-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34: 53-57.
- Sasahara, J. and Kumagai, T. 1966. Development of tissue culture live hog cholera vaccine. *Jpn. Agr. Res. Q. (Tokyo)* 1, pp. 24-26.
- Terpstra C., Bloemraad M. and Gielkens AL. 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. 9(2): 113-20.
- Terpstra C., Woortmeyer R. and Barteling SJ. 1990. Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. 1990 Feb; 97(2): 77-79.
- Van der Loos C.M. 1999. Immunoenzyme multiple staining Techniques. *Royal Microscopy handbook*, no. 45. Oxford, UK BIOS Scientific Publishers Limited.
- Van Oirschot J.T. and Terpstra C. 1989. Hog cholera virus. In: *Virus infections of porcines*. Eisevier Science Publishers B.V., The Netherlands, p. 113-130.
- World Health Organization. 2007. Guidance on regulation for the Transport of Infectious Substances 2007-2008. 1 January 2007. 1-26.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรที่ตรวจด้วยเทคนิค IP ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. โดยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Group Statistics					
ห้องปฏิบัติการ		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ปริมาณไวรัส	สทช.	20	5.9045	1.02625	.22948
	สสช.	20	6.1000	.85224	.19057

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
ปริมาณไวรัส	Equal variances assumed	2.955	.094	-.655	38	.516	-.19550	.29829	-.79935	.40835
	Equal variances not assumed			-.655	36.760	.516	-.19550	.29829	-.80002	.40902



รูปที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกรที่ตรวจด้วยวิธี IP ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช.

ตารางที่ 2 การตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค NPLA ของห้องปฏิบัติการของ สทช. และ สสช. และเปรียบเทียบผลโดยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สุกร								Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($\alpha = 0.05$)
สทช.				สสช.				
ตัวอย่าง	ตัวอย่าง ที่	ทดสอบครั้ง ที่	xlog2	Antilog of xlog2	ทดสอบครั้ง ที่	xlog2	Antilog of xlog2	ค่าความน่าจะเป็น (P)
ซีรัมสุกรก่อน ฉีดวัคซีน อหิวาต์สุกร	1	1	0.9030	8.00	1	0.3010	2.00	0.128
		2	0.9030	8.00	2	0.1505	1.41	
		3	0.4515	2.83	3	0.4515	2.83	
		Mean $\pm$ SD	0.75 $\pm$ 0.26	6.28 $\pm$ 2.98	Mean $\pm$ SD	0.30 $\pm$ 0.15	2.08 $\pm$ 0.71	
	2	1	0.7526	5.66	1	0.7526	5.66	0.188
		2	0.9030	8.00	2	0.3010	2.00	
		3	0.6020	4.00	3	0.3010	2.00	
		Mean $\pm$ SD	0.75 $\pm$ 0.15	5.89 $\pm$ 2.01	Mean $\pm$ SD	0.45 $\pm$ 0.26	3.22 $\pm$ 2.11	
	3	1	0.6020	4.00	1	0.7526	5.66	0.937
		2	0.7526	5.66	2	0.7526	5.66	
		3	0.6020	4.00	3	0.3010	2.00	
		Mean $\pm$ SD	0.65 $\pm$ 0.09	4.55 $\pm$ 0.96	Mean $\pm$ SD	0.60 $\pm$ 0.26	4.44 $\pm$ 2.11	
ซีรัมสุกรหลัง ฉีดวัคซีน อหิวาต์สุกร ชนิดเซลล์ เพาะเลี้ยง	1	1	1.3546	22.62	1	1.2041	16.00	0.204
		2	1.6557	45.25	2	1.5051	32.00	
		3	1.5051	32.00	3	0.9030	8.00	
		Mean $\pm$ SD	1.50 $\pm$ 0.15	33.29 $\pm$ 11.37	Mean $\pm$ SD	1.20 $\pm$ 0.30	18.67 $\pm$ 12.22	
	2	1	1.0536	11.31	1	1.0536	11.31	0.129
		2	1.5051	32.00	2	0.9030	8.00	
		3	1.5051	32.00	3	0.7526	5.66	
		Mean $\pm$ SD	1.35 $\pm$ 0.26	25.10 $\pm$ 11.94	Mean $\pm$ SD	0.90 $\pm$ 0.15	8.32 $\pm$ 2.84	
	3	1	1.3546	22.62	1	0.6020	4.00	0.094
		2	1.0536	11.31	2	0.6020	4.00	
		3	1.6557	45.25	3	0.7526	5.66	
		Mean $\pm$ SD	1.35 $\pm$ 0.30	26.39 $\pm$ 17.28	Mean $\pm$ SD	0.65 $\pm$ 0.09	4.55 $\pm$ 0.96	

Interlaboratory comparison of immunoperoxidase and neutralizing peroxidase-linked assay for virus and antibody determination to classical swine fever

Ditee Prasertsuwan¹Naline Hongchumpon¹Areerat Sutto¹Lamul Molee²

Abstract

The objective of this study is an immunoperoxidase (IP) and the neutralizing peroxidase-linked assay (NPLA) techniques inter-laboratory comparison between the Bureau of Veterinary Biologics (BVB) and the National Institute of Animal Health (NIAH) laboratory. There are twenty samples of the classical swine fever virus (Chinese stain) in cell culture for the IP technique. There are three swine serum samples collected before and after vaccination for quantification of antibody level by the NPLA technique. The statistical analysis is the sample T-Test (p-value at 0.05).

The results of Mean $\pm$ SD in the quantification of the virus by the IP technique in BVB and NIAH laboratory are 5.90 ± 1.03 and 6.10 ± 0.85 , respectively, that is not statistically significant at 0.05.

The results of Mean $\pm$ SD in the quantification of antibody level before and after vaccination by the NPLA technique in the BVB laboratory are 6.28 ± 2.98 , 5.89 ± 2.01 , 4.55 ± 0.96 , 33.29 ± 11.37 , 25.10 ± 11.94 , and 26.39 ± 17.28 , respectively. The results of Mean $\pm$ SD in the quantification of antibody level by the NPLA technique in the NIAH laboratory are 2.08 ± 0.71 , 3.22 ± 2.11 , 4.44 ± 2.11 , 18.67 ± 12.22 , 8.32 ± 2.84 , and 4.55 ± 0.96 , respectively. It is not statistically significant at 0.05.

In conclusion, the inter-laboratory comparison of BVB and NIAH laboratory present that both of laboratories are available for IP and NPLA techniques for quality control of the classical swine fever vaccine instead of rabbit used in the same standard (not statistically significant at 0.05)

Keywords: interlaboratory comparison, Immunoperoxidase technique, Neutralizing peroxidase-linked assay technique, classical swine fever

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

²National Institute of Animal Health, Bangkok 10900

การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชัน

เข็มชมพู อธิกัญญ์¹ นันทิยา แสงเปล่า¹ นพวรรณ บัวมีรูป² ดนัย คำขวัญ³

บทคัดย่อ

จุดประสงค์การวิจัยนี้เพื่อพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชันโดยผสมวัคซีน 6 ตำรับ ดังนี้ ตำรับ A ใช้ Montanide™ ISA 70 VG ตำรับ B ใช้ Montanide™ ISA 61 VG ตำรับ C ใช้ Montanide™ ISA 201 VG โดยมีปริมาณเชื้อ *Pasteurella multocida* 1×10^8 cfu/dose ในขณะที่ตำรับ D ใช้ Montanide™ ISA 70 VG ตำรับ E ใช้ Montanide™ ISA 61 VG และตำรับ F ใช้ Montanide™ ISA 201 VG โดยมีปริมาณเชื้อ 0.5×10^8 cfu/dose นำวัคซีนทุกตำรับไปทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พบว่าวัคซีนทุกตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด วัคซีนตำรับ A, B, C, D, E และ F มีค่าความหนืด เท่ากับ 29.50, 23.00, 20.53, 37.23, 26.80 และ 21.20 centipoise ตามลำดับ เมื่อนำวัคซีนไปทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในหนูขาว พบว่าวัคซีนทั้ง 6 ตำรับมีความปลอดภัย และมีความคุ้มโรคในหนูขาว ค่า log protection เท่ากับ 4.50, 4.17, 4.81, 5.75, 4.00 และ 5.00 ตามลำดับ

หลังจากนั้นจึงเลือกตำรับวัคซีนที่เหมาะสมจำนวน 4 ตำรับ ได้แก่ B, C, E และ F ไปทดสอบความปลอดภัยและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคเนื้อ จำนวน 80 ตัว โดยแบ่งโคออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ฉีดวัคซีนในโคทดลอง ตัวละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อ 1 ครั้ง เก็บตัวอย่างเลือดทุกเดือน ติดต่อกันเป็นเวลา 1 ปี เพื่อตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี ELISA พบว่า กลุ่มที่ฉีดวัคซีนตำรับ B มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าตำรับอื่น (ค่า cut-off $\geq 1:320$) และให้ความคุ้มโรคสูงเป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 10 เดือน และเมื่อนำวัคซีนทั้ง 4 ตำรับไปทดสอบความปลอดภัยในโคและกระบือในพื้นที่ปศุสัตว์เขตทั้ง 9 เขต พบว่า 99.93% ไม่แสดงอาการแพ้ มีเพียงกระบือ 1 ตัว (0.07%) ที่แสดงอาการแพ้ (วัคซีนตำรับ F)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ความปลอดภัย ความคุ้มโรค ระยะเวลาความคุ้มโรค และการสำรวจความพึงพอใจการใช้วัคซีนในพื้นที่ สรุปว่าวัคซีนตำรับ B เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตเป็นวัคซีนตำรับใหม่ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีน เฮโมรายิกเซพติซีเมีย อิมัลชัน ความปลอดภัย ความคุ้มโรค

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

²สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์

³สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียหรือโรคคอบวม (Haemorrhagic septicaemia) เกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) เป็นโรคติดต่อที่สำคัญในโคและกระบือ อัตราการตายจากการติดเชื้อประมาณ 70% จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ลายสัตว์เคี้ยวเอื้อง (De Alwis, 1992; Maslog, 1998) และทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ การป้องกันโรคนี้ทำได้โดยการฉีดวัคซีน ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนผลิตจากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 และฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% โดยปริมาตร กรองบรอทแบคทีเรียด้วย cross flow filtration ขนาด 0.2 ไมครอน ผลิตเป็นวัคซีนชนิดน้ำมันหรืออิมัลชัน (water in oil adjuvant, W/O) โดยผสมกับ Montanide™ ISA 70 VG มีปริมาณเชื้อ $\geq 10^9$ cfu/dose ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้นานประมาณ 15 เดือน (รัชนิ และคณะ, 2544) แต่วัคซีนน้ำมันชนิด W/O นี้มีความหนืด ทำให้เกิดความลำบากในการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ เนื่องจากต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึก ทำให้สัตว์บางตัวอาจมีอาการแพ้วัคซีน บวม อักเสบ หรือมีไข้ได้ ทางฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย สทช. และผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ได้มีการพัฒนาสูตรการผลิตโดยปรับปริมาณเชื้อที่ $\geq 10^8$ cfu/dose เพื่อลดอาการแพ้วัคซีนและยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในระยะเวลากว้างเคียงกับสูตรเดิม (รัชนิ อรรถิ, ข้อมูลไม่เผยแพร่) และยังคงใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียโดยสทช. ในปัจจุบัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาคุณสมบัติหรือองค์ประกอบของแอดจูแวนท์ให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น มีหลากหลายรูปแบบเพื่อสะดวกในการใช้งาน และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์ได้ดี การเลือกชนิดแอดจูแวนท์สำหรับนำมาใช้เป็นสื่อในการผสมวัคซีนนั้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง แอดจูแวนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนสัตว์ ได้แก่ ชนิดน้ำมันในน้ำ (water in oil, W/O) ชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, O/W) และชนิดมัลติเฟสในน้ำมันในน้ำ (water in oil in water, W/O/W) แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและระยะเวลาการคุ้มกันโรคในสัตว์ต่างกัน ซึ่ง Montanide™ ISA 61 VG เป็นแอดจูแวนท์ที่ใช้ในการผสมวัคซีนชนิดอิมัลชันจะได้วัคซีนชนิด W/O เมื่อศึกษาการใช้ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโค เปรียบเทียบกับแอดจูแวนท์ชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล (Aluminium hydroxide gel) พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่พึ่งเซลล์ (Humoral immune response) ได้สูงกว่ากลุ่มที่ใช้แอดจูแวนท์ชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล (Khorasani *et al.*, 2016) เช่นเดียวกับ Montanide™ ISA 201 VG ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O/W มีความหนืดต่ำกว่าชนิด W/O โดยพบว่าแอดจูแวนท์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่พึ่งเซลล์ (Humoral immune response) (Li *et al.*, 2013) และแบบพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immune response) ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแอดจูแวนท์ชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลและให้ความคุ้มโรคนาน 32-38 สัปดาห์ในโค (Ibrahim *et al.*, 2015) และ 12 เดือนในการศึกษาวัคซีนป้องกัน Rift valley fever virus ในแกะ (El-Bagoury *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Montanide™ ISA 201 VG สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่พึ่งเซลล์ ชนิดแอนติบอดี IgG2 ได้ดี และมีความคุ้มโรคสูงเมื่อทำการทดลองฉีดเชื้อพิษไวรัสปากและเท้าเปื่อยทับในโคที่ได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O ผสมกับแอดจูแวนท์ Montanide™ ISA 201 VG (คุ้มโรค 100%) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสูตรผสมกับแอดจูแวนท์ Montanide™ ISA 206 VG (คุ้มโรค 66.6%) และสูตรผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันสูตรผสมเอง (คุ้มโรค 50%) (Dar *et al.*, 2013)

การศึกษารั้ครั้งนี้เพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียจากแอดจูแวนท์พร้อมผสมชนิดใหม่ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันในน้ำมันและน้ำมันในน้ำในหนูขาว และทดสอบความปลอดภัยและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคและกระบือในพื้นที่เพื่อให้ได้ตำรับวัคซีนเฮโมราจิกเซพติซีเมียชนิดใหม่ที่มีความหนืดต่ำ ฉีดง่าย และให้ความคุ้มโรคสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 (Carter:Heddlestone) สเตรนท้องถิ่นซึ่งเก็บในรูปทำแห้งใช้ในการผลิตวัคซีน เตรียมแอนติเจนสำหรับตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และใช้ฉีดเชื้อพิษทัพบในหนูขาวพันธุ์ ICR

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ ICR น้ำหนัก 20-25 กรัม จำนวน 430 ตัว โดยเลี้ยงที่อาคารทดสอบฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย แบบ conventional ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟ เลี้ยงในกรงพื้นต้น ทำจากสแตนเลส กรงขนาด 18x25x14 ซม. จำนวนสัตว์ 5 ตัว/กรง ใช้กลบเป็นวัสดุรองนอนโดยเปลี่ยนทุกวัน ให้อาหารเม็ดและน้ำดื่มในภาชนะชนิดมีจุดตลอดเวลา ใช้ในการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคเอโมรายิกเซพติซีเมีย เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำให้สัตว์ตายอย่างสงบโดยการตีคอ (AVMA, 2013) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผา

โคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 80 ตัว อายุ 7 เดือน-1 ปี โดยเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทบวงจังหวัดสระบุรี กรมปศุสัตว์ แบบ conventional ในโรงเรือนเปิด ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ อากาศถ่ายเทได้สะดวก ให้แสงสว่างตามธรรมชาติและหลอดไฟ และมีแปลงหญ้าปล่อยแทะเล็มร่วมกับการเสริมฟาง อาหารข้น และน้ำดื่มตลอดเวลา เพื่อทดสอบวัคซีนและเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันเป็นเวลา 12 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำสัตว์ไป ส่งมอบให้สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์เพื่อไปใช้ในงานต่อไป

โคและกระบือในพื้นที่ปศุสัตว์เขตทั้ง 9 เขต รวม 1,510 ตัว แบ่งเป็นโคเนื้อ จำนวน 688 ตัว โคนม จำนวน 73 ตัว กระบือ จำนวน 749 ตัว เพื่อทดสอบการแพ้หลังฉีดวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำสัตว์ไปส่งกลับยังเกษตรกรซึ่งเป็นเจ้าของเดิม

บรอกแบคทีเรียใช้ในการผสมวัคซีน

เพาะและขยายเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose starch agar (DSA)¹ ในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 30 โคโลนี แล้วนำเชื้อไปเพาะและขยายต่อในขวด starter ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว tryptose phosphate broth (TPB)² ปริมาตร 4 ลิตร อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไปตรวจหาปริมาณเชื้อ โดยวัดค่าความขุ่น ต้องมีค่า OD₅₄₀ ไม่น้อยกว่า 0.2

หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้จากขวด ไปเพาะต่อลงในถังเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 500 ลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TPB ปริมาตร 400 ลิตร เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และควบคุมรอบปั่นที่ 100-150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงทำการฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน³ 0.5% โดยปริมาตร รอให้เชื้อถูกฆ่าอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองบรอกแบคทีเรียผ่านเครื่องกรอง crossflow filtration 0.2 ไมครอน⁴ และปรับค่าความขุ่นให้ได้ค่ามาตรฐานที่ OD₅₄₀ เท่ากับ 1.2 ด้วยน้ำเกลือที่มี 0.5% ฟอร์มาลิน

วัคซีน

การเตรียมวัคซีนในระดับ Lab scale เตรียมวัคซีนจำนวน 6 ตำรับๆ ละ 200 มล. โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเชื้อและชนิดแอดจูแวนท์ตามตารางที่ 1

¹DifcoTM, France

²ALPHA BIOSCIENCES, USA

³GPO, Thailand

⁴Sartorius, Germany

วัคซีนตำรับ A

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O โดยนำ MONTANIDETM ISA 70 VG⁵ มาผสมกับบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* ที่เตรียมได้ในอัตราส่วน 70:30 (w/w) ให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 cfu/dose ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน โดยเริ่มจากการนำแอดจูแวนท์มาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน (high shear mixer)⁶ ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที แล้วจึงเติมบรอตแบคทีเรียลงไปในแอดจูแวนท์อย่างช้าๆ เมื่อเทจนหมดจึงปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที ต่ออีก 3 นาที ให้วัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C นาน 1 คืน บรรจุในขวดพลาสติกสำหรับบรรจุวัคซีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มล. (1 dose = 1 มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับ B

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O โดยนำ MONTANIDETM ISA 61 VG⁵ มาผสมกับบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* ที่เตรียมได้ในอัตราส่วน 60:40 (w/w) ให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 cfu/dose ทำการปั่นผสมวัคซีนและบรรจุขวดเช่นเดียวกับวัคซีนตำรับ A

วัคซีนตำรับ C

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O/W โดยนำ MONTANIDETM ISA 201 VG⁵ มาผสมกับบรอตแบคทีเรียของเชื้อ *P. multocida* ที่เตรียมได้ในอัตราส่วน 50:50 (w/w) ให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 cfu/dose ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน โดยเริ่มจากปรับอุณหภูมิบรอตแบคทีเรียและแอดจูแวนท์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ⁷ ให้ได้ 31°C ก่อน แล้วนำแอดจูแวนท์มาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน (low shear mixer)⁸ ที่ความเร็วรอบ 350 รอบ/นาที นาน 30 วินาที แล้วจึงเติมบรอตแบคทีเรียลงไปในแอดจูแวนท์อย่างรวดเร็ว ปั่นที่ความเร็วรอบ 350 รอบ/นาที ต่ออีก 5 นาที ให้วัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับอุณหภูมิวัคซีนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 20°C นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C นาน 1 คืน บรรจุในขวดพลาสติกสำหรับบรรจุวัคซีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มล. (1 dose = 1 มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

วัคซีนตำรับ D

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O โดยเตรียมวัคซีนเช่นเดียวกับตำรับ A แต่ใช้ปริมาณเชื้อ 0.5×10^8 cfu/dose

วัคซีนตำรับ E

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O โดยเตรียมวัคซีนเช่นเดียวกับตำรับ B แต่ใช้ปริมาณเชื้อ 0.5×10^8 cfu/dose

วัคซีนตำรับ F

เตรียมเป็นวัคซีนชนิด W/O/W โดยเตรียมวัคซีนเช่นเดียวกับตำรับ C แต่ใช้ปริมาณเชื้อ 0.5×10^8 cfu/dose

จากนั้นนำวัคซีนไปทดสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การทดสอบความหนืด (Viscosity test) การทดสอบความคงตัว (Stability test) การทดสอบชนิดอิมัลชันโดยวิธี Drop test และทดสอบความปลอดภัย ทดสอบความคุ้มโรค โดยวิธีการทดสอบในหนูขาว ทำการคัดเลือกตำรับวัคซีนจำนวน 4 ตำรับ เพื่อคัดเลือกตำรับวัคซีนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในพื้นที่ต่อไป

การเตรียมวัคซีนในระดับ Pilot scale

เตรียมวัคซีนอิมัลชัน ตัวอย่างละ 5,000 มล. เพื่อการนำไปทดสอบในโคและกระบือในพื้นที่ จากนั้นนำวัคซีนไปทดสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ เช่นเดียวกันกับการเตรียมวัคซีนในระดับ Lab scale และทดสอบความปลอดภัยในหนูขาว และตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันแบบฟังเซลล์และแบบไมฟังเซลล์ในโคทดสอบต่อไป

⁵Seppic, France⁶Ystral, Germany⁷Julabo, Germany⁸Ingenieurbüro CAT, Germany

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย⁹ ดำรับละ 3 ตัวอย่างโดยใช้เข็มวัดค่าจากตัวเครื่อง เบอร์ 1 ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก)

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดตัวอย่างใส่ลงในหลอดเซนต์ปีฟส์ซึ่งมีขีดบอกปริมาตร ปริมาตร 10 มล. ปิดฝาหลอด ตัวอย่างละ 2 หลอด ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์¹⁰ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข)

การทดสอบชนิดอิมัลชันโดยวิธี Drop test

ทดสอบชนิดอิมัลชันโดยวิธี Drop test โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 250-300 มล. ลงในปิกรเกอร์ จากนั้นใช้หลอดหยดพลาสติก (Dropper) ดูดตัวอย่างวัคซีนที่ผสมแล้วหยดลงบนผิวน้ำ ประมาณ 2-3 หยด โดยวัคซีนชนิด W/O จะลอยอยู่บนผิวน้ำ วัคซีนชนิด W/O/W ส่วนที่เป็นน้ำมันจะลอยอยู่บนผิวน้ำ และบางส่วนจะละลายน้ำ (Aucouturier et al, 2001)

การทดสอบหาระดับภูมิคุ้มกัน

การเตรียม heat extract antigen

เตรียมตามวิธีของ Heddleston et al. (1972) โดยละลายเชื้อ *P. multocida* serotype B:2,5 ที่เก็บในสภาพระเหยแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DSA ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง เลือกลูโคไลนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TPB ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณเชื้อโดยเพาะลงบน DSA ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.15M PBS, pH 7.2 ต้มใน waterbath¹¹ อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 10,000 g 25°C นาน 20 นาที เพื่อเก็บส่วนใสนำมาวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ BCATM Protein assay kit¹²

การทดสอบหาระดับภูมิคุ้มกันชนิดไม่พึ่งเซลล์ด้วยวิธี ELISA

เจาะเลือดเก็บซีรัมโคทลงทุกกลุ่มๆ ละ 20 ตัว ก่อนฉีดวัคซีน และหลังฉีดวัคซีน เพื่อติดตามระดับแอนติบอดีหลังฉีดทุกเดือน เป็นเวลา 1 ปี นำซีรัมมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียด้วยวิธี ELISA โดยใช้ heat extract antigen เป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลท โดยหยด heat extract antigen ที่เจือจางด้วย 0.05M carbonate buffer, pH 9.6 ความเข้มข้นโปรตีน 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรลงในไมโครเพลท 96 หลุมชนิดกันแบน¹³ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บในกล่องที่มีความชื้นที่ 4°C นาน 1 คืน ล้างเพลท 3 ครั้งด้วยสารละลาย 0.15M PBS, pH 7.2 ที่มี 0.05% tween20¹⁴ (PBST) เติมสารละลาย 0.5% gelatin¹⁵ ใน PBST 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทเช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วจึงเติมตัวอย่างซีรัมเจือจางแบบ serial two-fold dilution เริ่มต้นที่ dilution 1:80 ถึง 1:10,240 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทเช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วจึงเติม horseradish peroxidase rabbit anti-bovine IgG (whole molecule)¹⁶ เจือจาง 1:40,000 ด้วย 0.5% gelatin ใน PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท

⁹ Brookfield, USA ¹⁰ Centra®, USA ¹¹ Memmert, Germany ¹² Thermo Fisher Scientific, USA

¹³ Thermo Scientific, Denmark ¹⁴ Labchem, Australia ¹⁵ Bacto, India ¹⁶ Sigma, Germany

เช่นเดียวกับครั้งแรก แล้วจึงเติม tetramethyl benzidine (TMB) substrate¹⁷ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม TMB BlueSTOP™ Solution¹⁷ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm (OD₆₅₀) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์¹⁸ อ่านค่าไตเตอร์ของซีรัมเป็นความเจือจางสุดท้ายที่มีค่า OD₆₅₀ มากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่าของ OD₆₅₀ ของ ซีรัมรวมของโคที่ไม่มีความคุ้มโรค (negative control serum) แต่ละตัวอย่างทำ duplicate ในเพลทเดียวกันและการทดสอบทุกเพลทมี negative control serum และ positive control serum การแปลผล ถือว่าตัวอย่างที่มีค่า OD₆₅₀ เท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่าของ negative control serum เป็นบวก (นิตยาและรัชนี้, 2543)

การทดสอบหาระดับภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

วิธี MTT assay เป็นการตรวจสอบการเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันแบบฟิงเซลล์ โดยมีรายละเอียดดังนี้ ทำการเก็บเลือดโคทดสอบวัคซีนทั้ง 4 ตัวรับ ตัวละ 10 มล. ลงในหลอดที่ผสม Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)¹⁹ เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วนำมาทำการคัดแยกเซลล์ Peripheral blood mononuclear (PBMCs) ด้วยวิธี gradient centrifugation technique โดยใช้ Lymphoprep™²⁰ ปริมาตร 10 มล. เติมนลงในเลือดก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400 g เป็นเวลา 30 นาที เซลล์ PBMCs จะแยกชั้น ทำการดูดเก็บชั้นเซลล์ใสในหลอดทดลองสะอาดแล้วทำการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วย 1X RBC lysis buffer²¹ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย Steriled RPMI tissue culture medium (RPMI-1640)²² จำนวนสองครั้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วย RPMI-1640 ซึ่งเติม antibiotic-antimycotic²³ และ 10 % fetal calf serum²⁴ (R10 culture medium) ก่อนทำการนับความเข้มข้นของเซลล์โดยจะปรับความเข้มข้นของเซลล์ PBMCs ที่ต้องการเป็น 1×10^5 เซลล์ต่อหนึ่งหลุมเลี้ยงเซลล์ แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วย heat extract antigen ซึ่งเตรียมจากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 96 well tissue culture plate²⁵ โดยในการกระตุ้นด้วยแอนติเจนนี้จะใช้ R10 culture medium และ ConcanavalinA (ConA)²⁶ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารกระตุ้นในกลุ่มควบคุมลบและเป็นกลุ่มควบคุมบวก Mitogen ตามลำดับ หลังจากนั้นจะนำ Tissue culture plate ไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับ 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธี MTT assay โดยเติมสารละลาย 12 mM MTT²⁷ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำออกมาเติมสารละลาย 0.01M HCL with 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมและนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระดับ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหา ค่า Stimulation Index (SI) โดยใช้สูตร ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีแอนติเจน/ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่มีแอนติเจน (Negative) (Lignitto et al, 2007)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในหนูขาว

ใช้หนูขาวพันธุ์ ICR 30 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีดวัคซีนแต่ละตัวอย่างเข้ากล้ามเนื้อหนูขาว ตัวละ 0.2 มล. สังเกตอาการทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน หนูขาวต้องไม่แสดงอาการผิดปกติ ในกรณีที่หนูป่วยและตายต้องตรวจพิสูจน์การติดเชื้อ *P. multocida* (OIE, 2008)

¹⁷ Seracare, USA ¹⁸ TECAN, Switzerland

¹⁹ QRëC, New Zealand

²⁰ Stemcell Technologies Inc, Canada

²¹ eBioscience™, USA ²² Gibco, USA

²³ Gibco, USA

²⁴ Merck, Germany

²⁵ Thermo Scientific, China

²⁶ Sigma-Aldrich, USA

²⁷ Merck, Germany

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนในหนูขาว

การเตรียมเชื้อพิษทาบ

โดยละลาย seed *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ด้วย TPB ปริมาตร 2 มล. จากนั้นดูดสารละลาย seed หยดลงบน DSA และ streak เชื้อเพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ Loop เชื้อโคโลนีเดี่ยว จำนวน 2 โคโลนี จุ่มลงใน TPB ปริมาตร 10 มล. ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชั่วโมง นำมาทำ 10-fold dilution โดยเตรียม TPB ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มล. จำนวน 10 หลอด โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อ ปริมาตร 1 มล. ใส่หลอดที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน จนถึง 10^{-10} (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ค)

วิธีทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาวด้วยวิธี Active mouse protection test (AMPT)

โดยใช้หนูขาวพันธุ์ ICR 350 ตัว แบ่งเป็น 7 กลุ่มๆละ 50 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน กลุ่มที่ 2 ถึง 7 เป็นกลุ่มฉีดวัคซีน โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.2 มล. 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 5 วัน ฉีดพิษทาบหนูทั้ง 7 กลุ่มด้วยเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่เพาะเลี้ยงใน TPB นาน 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-10} เข้าช่องท้อง ความเข้มข้นละ 5 ตัวๆละ 0.1 มล. สังเกตอาการหนูเป็นเวลา 5 วัน คำนวณค่า LD₅₀ ของหนูทุกกลุ่มตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ค่า LD₅₀ ของหนูกลุ่มฉีดวัคซีนและกลุ่มไม่ฉีดวัคซีน จะต้องต่างกันไม่น้อยกว่า 10^4 เท่า หรือ log protection ไม่น้อยกว่า 4 (OIE, 2008)

วิธีทดสอบความคุ้มโรคในหนูขาวด้วยวิธี Passive mouse protection test (PMPT)

แบ่งหนูขาวพันธุ์ ICR เป็น 5 กลุ่มๆละ 5 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดตัวอย่างซีรัม 1 กลุ่ม และเป็นกลุ่มฉีดตัวอย่างซีรัม 4 กลุ่ม ฉีดตัวอย่างซีรัมโค จากการฉีดวัคซีนในสัปดาห์ที่ 7 จากโคเนื้อทดสอบวัคซีนที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทาบกวาง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี เข้าได้ผิวหนังขนาดฉีดตัวละ 0.5 มล. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงจึงฉีดพิษทาบด้วยเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ตามวิธีการเตรียมเชื้อพิษข้างต้น เข้าช่องท้องตัวละ 0.1 มล. ทุกกลุ่ม ซึ่งมีเชื้ออยู่ 100 (50% Mouse median lethal dose; MLD₅₀) สังเกตอาการหนูเป็นเวลา 3 วัน โดยหนูกลุ่มควบคุมจะต้องตายหมดทุกตัว ส่วนหนูที่ได้รับการฉีดซีรัมกลุ่มใดมีหนูรอดเพียง 1 ตัวขึ้นไป ให้ถือว่าซีรัมนั้นมีภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (จุฬารัตน์ และคณะ, 2536)

การทดสอบความปลอดภัยและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในโคและกระบือที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทาบกวาง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี (กรมปศุสัตว์)

หลังจากเตรียมวัคซีนและทดสอบคุณภาพวัคซีนแล้ว นำวัคซีนไปฉีดในโคเนื้อที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทาบกวาง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี ต่ำรับละ 20 ตัว แล้วเจาะเลือดเก็บซีรัมโคก่อนและหลังฉีดวัคซีนเป็นเวลา 12 เดือน เพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์ (CMI) ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนใน โคและกระบือในพื้นที่

ฉีดวัคซีนทดสอบในโคและกระบือพื้นที่ปศุสัตว์เขต ทั้ง 9 เขตในประเทศไทยโดยการสุ่มเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์เป็นผู้ทำการฉีดวัคซีน เพื่อศึกษาผลข้างเคียงหลังฉีดวัคซีนเป็นเวลา 10 วัน โดยสังเกตอาการที่ผิดปกติและบันทึกผลทุก 5 วัน อาการที่สังเกต เช่น ภาวะอักเสบของผิวหนัง บวม แดง บริเวณที่ฉีด แพ้ ซึม มีไข้ รายงานผลการทดสอบโดยสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ เป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูลในเอกสารแบบประเมิน (เอกสารแนบ 1)

ผล

ผลทดสอบวัคซีนในระดับ Lab scale

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียในห้องปฏิบัติการทั้ง 6 ตำรับ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง เมื่อนำวัคซีนทั้ง 6 ตำรับมาทดสอบความปลอดภัยในหนูขาวเป็นเวลา 5 วัน พบว่าสัตว์ทดลองวัคซีนทุกกลุ่มมีอาการปกติหลังฉีดวัคซีน ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบความคุ้มโรค ในหนูขาวพบว่า วัคซีนตำรับ A, B, C, D, E และ F มีค่า log protection เท่ากับ 4.50, 4.17, 4.81, 5.75, 4.00 และ 5.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ทำการคัดเลือกตำรับวัคซีน 4 ตำรับจากค่าความหนืดและความคุ้มโรค เพื่อนำไปผลิตในระดับ Pilot scale คือ วัคซีนตำรับ B, C, E และ F โดยมีค่าความหนืดตามลำดับดังนี้ 23.00, 20.53, 26.80 และ 21.20 centipoises

ผลทดสอบวัคซีนในระดับ Pilot scale

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียในห้องปฏิบัติการทั้ง 4 ตำรับ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง เมื่อนำวัคซีนทั้ง 4 ตำรับมาทดสอบความปลอดภัยในหนูขาวเป็นเวลา 5 วัน พบว่าสัตว์ทดลองวัคซีนทุกกลุ่มมีอาการปกติหลังฉีดวัคซีน ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย (ตารางที่ 3)

ฉีดวัคซีนทดสอบทั้ง 4 ตำรับในโคและกระบือพื้นที่ปศุสัตว์เขต ทั้ง 9 เขตในประเทศไทยโดยการสุ่ม เขต 1 และเขต 2 ตำรับวัคซีนที่ทดสอบคือตำรับวัคซีน B เขต 3 และเขต 4 ตำรับวัคซีนที่ทดสอบคือตำรับวัคซีน C เขต 5 และเขต 6 ตำรับวัคซีนที่ทดสอบคือตำรับวัคซีน E เขต 7 เขต 8 และเขต 9 ตำรับวัคซีนที่ทดสอบคือตำรับวัคซีน F

เมื่อนำซีรัมของโคทดลองวัคซีนที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ห้วยขวางมาวัดระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA พบว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีนตำรับ B, C, E และ F มีระดับ Antibody Titer สูงกว่าค่า Cut-off ($\geq 1:320$)

ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากฉีดวัคซีน โดยมีระดับสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 8, 8, 12 และ 4 ตามลำดับ จากนั้นกลุ่ม C และ F มีระดับ Antibody Titer ลดลงต่ำกว่าค่า Cut-off ตั้งแต่ที่สัปดาห์ที่ 16 เป็นต้นไป ในขณะที่กลุ่ม B และ E มีระดับ Antibody Titer ลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ยังคงสูงกว่าค่า Cut-off จนถึงสัปดาห์ที่ 36 ระดับ Antibody Titer ของทุกกลุ่มกลับมามีค่าสูงขึ้นพร้อมกันในสัปดาห์ที่ 40 หลังจากนั้นลดลงตามลำดับจนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการทดสอบ (สัปดาห์ที่ 48) ซึ่งระดับ Antibody Titer ของทั้ง 4 กลุ่มสูงกว่าค่า Cut-off (รูปที่ 1)

ผลการทดสอบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Cell mediated immunity, CMI) พบว่าค่าเฉลี่ย Stimulation Index (SI) ต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ทั้ง 4 กลุ่มทดลอง มีค่าต่ำกว่าค่า cut off ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กำหนดไว้ที่ 1.5 (ตามค่าเฉลี่ย positive) ตลอดการทดลอง

ผลการทดสอบ PMPT พบว่ากลุ่มทดสอบตำรับวัคซีน B มีอัตราการรอด 80% ส่วนกลุ่มทดสอบตำรับวัคซีน E, C, F และกลุ่มควบคุม มีอัตราการรอด 0% (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบวัคซีนทั้ง 4 ตำรับ ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 เขต ในประเทศไทย พบว่าวัคซีนตำรับ B เป็นตำรับที่ได้รับการทดสอบมากที่สุดคิดเป็น 46% โดยมีการฉีดวัคซีนที่กลัมน้อยส่วนคอมมากที่สุดคิดเป็น 67.68% (ตารางที่ 4) นอกจากนี้จากการสอบถามเจ้าหน้าที่ผู้ดำเนินการฉีดวัคซีนพบว่าวัคซีนตำรับ C และ E มีความง่ายในการฉีดวัคซีนมากที่สุดคิดเป็น 100% ทั้ง 2 ตำรับ สัตว์ที่พบว่าการแพ้วัคซีนในการทดสอบครั้งนี้ คือ กระบือจำนวน 1 ตัว คิดเป็น 0.07% ของสัตว์ที่ได้รับการทดสอบวัคซีนทั้งหมด โดยพบว่าภายหลังการได้รับวัคซีนเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง กระบือดังกล่าวมีอาการไข้ ยกหัวไม่ขึ้น ซึ่งได้มีการแก้ไขภาวะดังกล่าวด้วยการฉีด Chlorpheniramine เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อ

วิจารณ์

จากผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชันในระดับ Lab scale ทั้ง 6 ตำรับทางห้องปฏิบัติการ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ เมื่อพิจารณาจากค่าความหนืด วัคซีนตำรับ F และ C จะสะดวกในการฉีดมากกว่าวัคซีนตำรับ A, E, B และ D เพราะมีความหนืดน้อยกว่าเนื่องจาก MONTANIDE™ ISA 201 VG ที่เป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O/W มีลักษณะของอิมัลชันที่ปรากฏชั้นนอกสุดเป็นน้ำ จึงทำให้มีความหนืดน้อยกว่าน้ำมันและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งระยะสั้นและระยะยาวเนื่องจากแอนติเจนที่อยู่ในอิมัลชันชั้นนอกสุดในรูปน้ำจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทันทีในขณะที่แอนติเจนที่อยู่ชั้นในจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ในขณะที่ MONTANIDE™ ISA 61 VG และ MONTANIDE™ ISA 70 VG ที่เป็นแอดจูแวนท์ชนิด W/O มีลักษณะของอิมัลชันที่ปรากฏชั้นนอกสุดเป็นน้ำมัน แอนติเจนที่อยู่ชั้นในจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆจึงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงและยาวนาน (Aucouturier *et al*, 2001) เมื่อทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนทั้ง 6 ตำรับในหนูขาว พบว่าสัตว์ทดลองมีอัตราการรอด 100% ในทุกกลุ่มทดสอบ ดังนั้น วัคซีนทั้ง 6 ตำรับนี้จึงมีความปลอดภัย และผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียในหนูขาว พบว่า วัคซีนทั้ง 6 ตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐานความคุ้มโรคโดยมีค่า log protection ไม่น้อยกว่า 4 (OIE, 2018)

หลังจากนั้นจึงเลือกตำรับวัคซีน 4 ตำรับคือ ตำรับ B , ตำรับ C ,ตำรับ E และ ตำรับ F โดยตัดวัคซีนตำรับ A และ D ออกเนื่องจากมีความหนืดสูงกว่าตำรับอื่น ฉีดยากและพบรายงานการบวมบริเวณที่ฉีดหลังฉีด 3-7 วัน (วุฒิพร และคณะ, 2542) เพื่อทดสอบกับโคเนื้ออายุ 7 เดือน ถึง 1 ปี ไม่จำกัดเพศ จำนวน 80 ตัวในพื้นที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทบกวาง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี (กรมปศุสัตว์) และโค กระบือในพื้นที่ปศุสัตว์เขตทั้ง 9 เขต

ผลการทดสอบ ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีในโคของวัคซีนทั้ง 4 ตำรับที่เลือกคือ ตำรับ B, C, E และ F พบว่า กลุ่มทดสอบวัคซีนตำรับ B มีระดับแอนติบอดี สูงกว่าตำรับอื่นเมื่อใช้ระดับแอนติบอดีที่ $\geq 1:320$ เป็นค่าตัดสินว่าโคมีความคุ้มโรค (ค่า cut-off) (นิตยา และรัชณี, 2543) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ El-Bagoury *et al*. (2015) ซึ่งพบว่าวัคซีนป้องกันโรค Rift valley fever virus ตำรับผสม MONTANIDE™ ISA 61 VG และ MONTANIDE™ ISA 201 VG ให้ระดับระดับแอนติบอดีที่สูงและยาวนานกว่าอิมูเนียมไฮดรอกไซด์เจลเมื่อทดสอบในแกะ โดยที่ ตำรับที่ประกอบด้วย MONTANIDE™ ISA 61 VG สูงกว่า MONTANIDE™ ISA 201 VG ในกรณีที่ระดับ Antibody Titer ของทุกกลุ่มกลับมามีค่าสูงขึ้นพร้อมกันในสัปดาห์ที่ 40 (รูปที่ 1) หลังจากนั้นลดลงตามลำดับจนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการทดสอบ (สัปดาห์ที่ 48) ซึ่งระดับ Antibody Titer ของทั้ง 4 กลุ่มสูงกว่าค่า Cut-off เป็นไปได้ว่ามีการติดเชื้อจากสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติโดยสัตว์ที่ได้รับวัคซีนอย่างถูกต้องนั้นมีการพัฒนา memory cell ต่อเชื้อโรคนั้นไว้แล้วเป็นอย่างดี และสามารถกลับมาทำงานได้ทันทีเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ (สนธิภา, 2549) ซึ่งอาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์ในช่วงเวลานั้นได้ โดยเจ้าหน้าที่ผู้ดูแลสัตว์พบว่าสัตว์ทดลองทั้งหมดสามารถกินอาหารและดื่มน้ำได้เป็นปกติ ไม่แสดงอาการป่วยในช่วงเวลาดังกล่าว

ผลการทดสอบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Cell mediated immunity, CMI) พบว่า ค่าเฉลี่ย Stimulation Index (SI) ต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ทั้ง 4 กลุ่มทดลอง มีค่าต่ำกว่าค่า cut-off ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กำหนดไว้ที่ 1.5 (ตามค่าเฉลี่ย positive) ตลอดจนการทดลอง ซึ่งเป็นไปได้ว่าวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียเป็นวัคซีนบรอนคิโนเชนที่ตายซึ่งสามารถให้ความคุ้มโรคผ่านการกระตุ้น Humoral immunity ได้ดีกว่า Cell mediated immunity หรือเป็นไปได้ว่าการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MTT assay ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้อาจมีปัจจัยที่ไม่เหมาะสม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

เมื่อนำซีรัมของโคทดสอบทั้ง 4 กลุ่มมาทดสอบความคุ้มโรค ด้วยวิธี PMPT ในหนูขาว พบว่ากลุ่มทดสอบวัคซีนตำรับ C, E และ F มีอัตราการรอด 0% ทั้ง 3 กลุ่ม ในขณะที่ตำรับ B มีอัตราการรอดสูงสุดที่ 80 % สอดคล้องกับผลของระดับแอนติบอดี โดยระดับแอนติบอดี IgG มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความคุ้มโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้องเมื่อฉีดเชื้อพิษขั้ว (Shah *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับแอนติ บอดีของ

กลุ่มวัคซีนตำรับ E และผลการทดสอบ PMPT ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณเชื้อหรือสัดส่วนแอนติเจนยังไม่เหมาะสม จึงควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลการทดสอบการแพ้วัคซีนในโคกระบือในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 เขต ในประเทศไทย พบว่ามีอัตราการแพ้เพียง 0.07% ซึ่งพบในกระบือ 1 ตัวที่ได้รับวัคซีนทดสอบตำรับ F ซึ่งมี MONTANIDE™ ISA 201 VG เป็นแอดจูแวนท์ จากจำนวนสัตว์ทั้งหมด 1,510 ตัว แบ่งเป็นกระบือ 749 ตัว โคนม 73 ตัว และโคเนื้อ 688 ตัว พบว่า 99.93% ไม่แสดงอาการแพ้ แสดงให้เห็นว่าวัคซีนทั้ง 4 ตำรับ มีความปลอดภัยสูงสามารถนำไปใช้กับกลุ่มสัตว์เป้าหมายได้

แต่อย่างไรก็ตามการตัดสินใจเลือกชนิดของแอดจูแวนท์ที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมนอก จากพิจารณาถึงความปลอดภัยและประสิทธิภาพความคุ้มโรคแล้ว ยังต้องคำนึงถึงกระบวนการผสมวัคซีนที่มีความแตกต่างกันด้วย จึงต้องมีการออกแบบการทดลองผลิตในระดับต้นแบบก่อน เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของอุปกรณ์และเครื่องจักรในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สรุป

วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ผสม Montanide™ ISA 61 VG จำนวนเชื้อ 1×10^8 cfu/dose เป็นวัคซีนตำรับที่มีความหนืดต่ำ ฉีดง่าย มีความปลอดภัย ไม่เกิดอาการแพ้ ให้ความคุ้มโรคสูง เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 10 เดือน จึงเหมาะสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตเป็นวัคซีนตำรับใหม่ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่อนุมัติงบประมาณในการดำเนินงานโครงการวิจัย สพ.ญ.รัชณี อัตถิ อติตผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ที่ปศุสัตว์ น.สพ.เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต ผู้อำนวยการกองแผนงาน น.สพ.จาดรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ น.สพ.อนันต์ ท้าวเพชร ผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ คุณนิตยา เมตตา น.สพ.วีรชัย จิรธนาวุฒิ น.สพ.ดิถี ประเสริฐสุวรรณ น.สพ.ไชยา ส่งาประโคน น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา คุณสายพิน ชุมทรัพย์ กลุ่มวิจัยและพัฒนา คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบบคทีเรีย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทบกวาง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี กรมปศุสัตว์ และขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร.ณัฐวุฒิ สถิตเมธี น.สพ.อัมรินทร์ ฤทธิพรเลิศรักษ์ น.สพ.ศุภกิตติ ศรีกอก สพ.ญ.บุญทริกา นามบุปผา และคุณอนุชา หมั่นไธสง คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา รักศรี และรัชณี อัตถิ 2543 การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโค ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ heat extract antigen สัตวแพทยสาร 51 (1-2): 1-9
- รัชณี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา นิเทศ เลิศลิ้มขาลาลัย และวันชัย ตีระวรรณ 2544 การประเมินความคุ้มโรคของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน สัตวแพทยสาร 52 (1-2): 23-30
- วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชณี อัตถิ นิเทศ เลิศลิ้มขาลาลัย และชลลดา กำเนิดมงคล 2536 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันกับชนิดอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 4 (1): 1-8

- วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชณี อັถถิ และวันชัย ตีระฉะวรารณ 2542 การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮอร์ไพกเซพติซิเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม 3. การทดลองใช้วัคซีนในท้องที่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9 (1-2): 7-18
- สันนิภา สุรทัตต์ 2549 วิทยานิพนธ์ศึกษากันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ โรงพิมพ์ตีรณสาร กรุงเทพฯ หน้า 122
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 เรื่องการปนผสมวัคซีนเฮอร์ไพกเซพติซิเมียชนิดน้ำมัน (SOP-HS-007) หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก เรื่องการทดสอบความหนืด (Viscosity test) ของบรอกแบคเทอรินเฮอร์ไพกเซพติซิเมีย (SOP-QCB-027) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข เรื่องการทดสอบความคงตัว (Stability test) ของบรอกแบคเทอรินเฮอร์ไพกเซพติซิเมีย (SOP-QCB-028) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ค เรื่องการเตรียมเชื้อพิษสำหรับการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนเฮอร์ไพกเซพติซิเมีย (SOP-QCB-030) หน้า 1-4
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013 Edition: 48-50
- Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine. 19: 2666-2672.
- Dar, Pervaiz., Kalaivanan, R., Sied, N., Mamo, B., Kishore, S., Suryanarayana, V.V.S. and Kondabattula, G. 2013. Montanide ISATM 201 adjuvanted FMD vaccine induced improved immune responses and protection in cattle. Vaccine. 31(33): 3327-3332.
- De Alwis, M.C.L. 1992. Pasteurellosis in Production Animals: A review. ACIAR. Proceeding No. 43, Australia.
- El-Bagoury, G.F., Sharawi, S.S.A., Salama, L.S. and Hammad, M.Y. 2015. Comparative evaluation of different inactivated Rift valley fever virus vaccine adjuvanted with montanide oil ISA 61 VG, montanide oil ISA 201 VG, and aluminum hydroxide gel. Benha Veterinary Medical Journal. 29(1): 224-228
- Heddleston, K.L., Gallagher, J.E. and Rebber, P.A. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16:925-936.
- Ibrahim, E.E., Gamal, W.M., Hassan, A.I., Mahdy, S.E., Hegazy, A.Z. and Abdel-Atty, M.M. 2015. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. Veterinary world. 8(10): 1189-1198.
- Khorasani, A., Madadgar, O., Soleimanjahi, H., Keyvanfar, H. and Mahravani, H. 2016. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. IJVR. 17(1): 8-12.
- Lignitto, L., Da Dalt, L., Balzan, S., Gabai, G., Segato, S., Ricci, R. and Novelli, E. 2007 Use of bovine lymphocytes to assess the immunomodulatory effect of natural extracts. Italian Journal of Animal Science. 6(1): 440-442
- Li, Dong., Zhou, C., She, D., Li, P., Sun, P., Bai, X., Chen, Y., Xie, B. and Liu, Z. 2013. The comparison of the efficacy of swine FMD vaccine emulsified with oil adjuvant of ISA 201 VG or ISA 206 VG. Journal of Biosciences and Medicines. 1:22-25.

- Maslog, F. S. 1998. Immunity provided by Haemorrhagic Septicaemia subunit vaccine in ruminant. *Dev Biol Stand.* 92:301-307
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene.* 27: 493-497
- Shah, N. H., Shah, N. H and De Graaf, F. K. 1997. Protection against haemorrhagic septicaemia induced by vaccination of buffalo calves with an improved oil adjuvant vaccine. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:203-207.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2018. Haemorrhagic Septicaemia. *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals . Paris, France. pp. 1125-1138. Available from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.10_HAEMORRHAGIC_SEPTICAEMIA.pdf [Accessed 10 January 2019].

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการผสมวัคซีนเอโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชัน

ตำรับที่	ปริมาณเชื้อต่อโดสที่ฉีด 1 มล. โดยมีหน่วยเป็น cfu/ml	ชนิดแอดจูแวนท์	อัตราส่วน แอดจูแวนท์ : บรอนทแคทรีน โดยน้ำหนัก
A	1×10^8	Montanide TM ISA 70	70 : 30
B	1×10^8	Montanide TM ISA 61	60 : 40
C	1×10^8	Montanide TM ISA 201	50 : 50
D	0.5×10^8	Montanide TM ISA 70	70 : 30
E	0.5×10^8	Montanide TM ISA 61	60 : 40
F	0.5×10^8	Montanide TM ISA 201	50 : 50

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบวัคซีนระดับ Lab scale

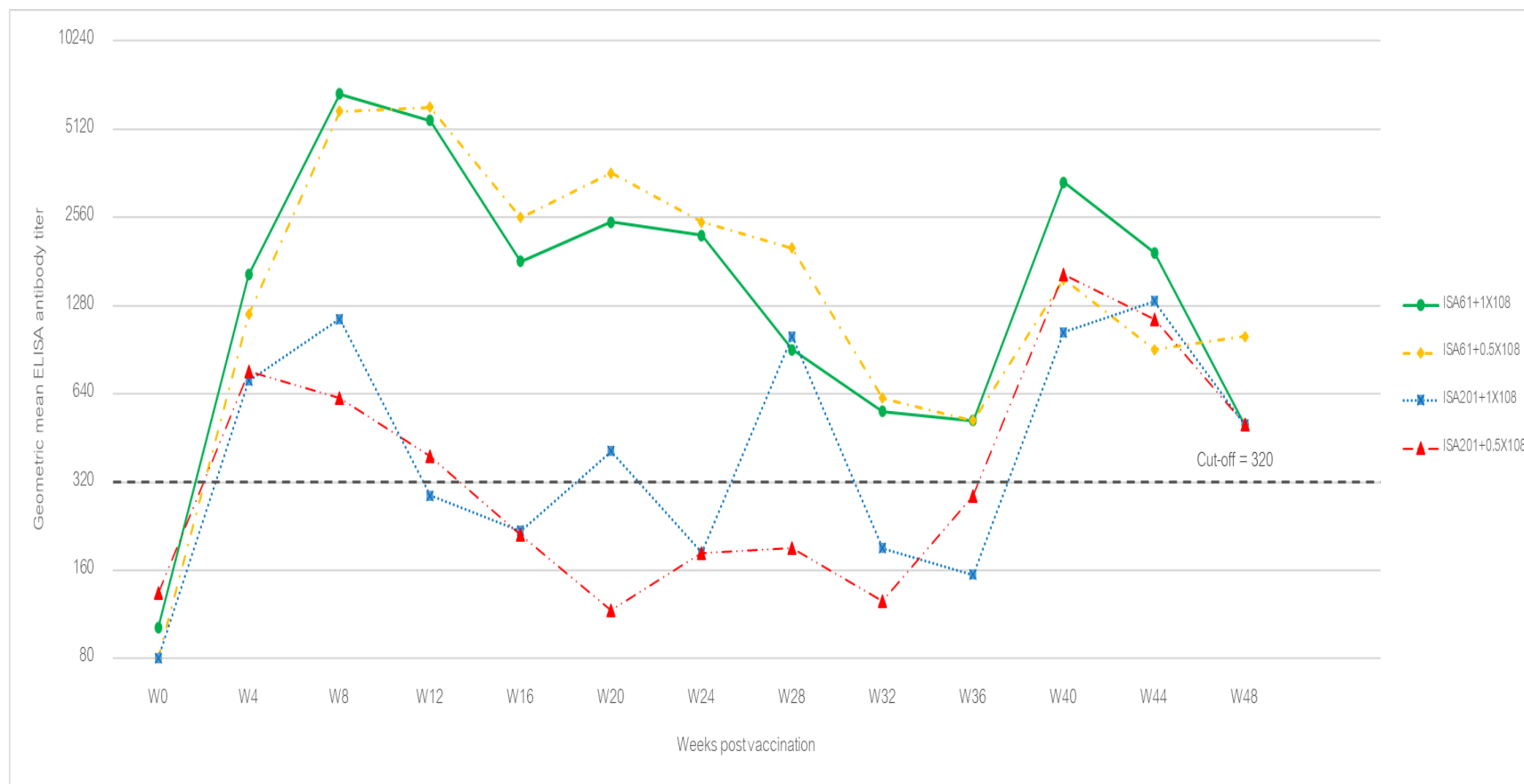
การทดสอบ	ตำรับ					
	A	B	C	D	E	F
คุณลักษณะที่ปรากฏ	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน
Drop test	w/o	w/o	w/o/w	w/o	w/o	w/o/w
Centrifugation test	2%	2%	2%	2%	2%	2%
Sterility test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
Viscosity test	29.50	23.00	20.53	37.23	26.80	21.20
ความปลอดภัยในหนูขาว	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
ความคุ้มโรคในหนูขาว AMPT (log protection)	4.50	4.17	4.81	5.75	4.00	5.00

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบวัคซีนระดับ Pilot scale

การทดสอบ	ตำรับ			
	B	C	E	F
คุณลักษณะที่ปรากฏ	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน	สีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน
Drop test	w/o	w/o/w	w/o	w/o/w
Centrifugation test	2%	2%	2%	2%
Sterility test	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
Viscosity test	21.5	23.6	28.4	21.7
ความปลอดภัยในหนูขาว	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย	ไม่พบสัตว์ป่วยหรือตาย
ความคุ้มโรคในหนูขาว PMPT (อัตราการรอด)	80%	0%	0%	0%

ตารางที่ 4 ผลการสำรวจความพึงพอใจในการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอิมัลชันในโคหรือกระบือในพื้นที่

ตำรับ วัคซีน	ชนิดสัตว์				คิดเป็น%	วิธีการฉีด		ความยาก/ง่ายในการฉีด (ฟาร์ม)						แพ้วัดขึ้น			คิด เป็น%
	กระบือ (ตัว)	โคนม (ตัว)	โคเนื้อ (ตัว)	รวม		ฉีดบริเวณ กล้ามเนื้อ สะโพก (ตัว)	ฉีดบริเวณ กล้ามเนื้อคอ (ตัว)	ง่าย	คิดเป็น %	ยาก	คิดเป็น %	ยาก มาก	คิดเป็น %	กระบือ (ตัว)	โคนม (ตัว)	โคเนื้อ (ตัว)	
B	233	73	387	693	46	268	425	34	87.18	5	12.82	-	0	-	-	-	0
C	168	0	171	339	22	134	205	78	100	-	0	-	0	-	-	-	0
E	114	0	1	115	8	34	81	11	100	-	0	-	0	-	-	-	0
F	234	0	129	363	24	52	311	6	50	3	25	3	25	1	-	-	0.07
รวม	749	73	688	1,510	100	488 (32.32%)	1,022 (67.68%)	129	-	8	-	3	-	1	0	0	0.07



รูปที่ 1 Geometric mean ELISA antibody titer of cattle immunized with difference vaccine formulation
ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตระดับแอนติบอดี (ELISA titer) ในโค-กระบือจากการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียตำรับต่างๆ

เอกสารแนบ 1

เอกสารแนบ 3

วันที่สอบถาม.....สำนักงานปศุสัตว์เขต.....

แบบสอบถามการฉีดวัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย
โครงการวิจัย การพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซปติซีเมียชนิดอิมัลชัน

Google Form

ตำแหน่งวัคซีนที่ ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

ชื่อ-นามสกุล เกษตรกร.....

บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....

พิกัด X..... Y.....เบอร์โทรศัพท์.....

รูปแบบการเลี้ยง ☐ ปล่อยากกินอิสระ ☐ ผูกยั้งโรง ☐ เลี้ยงในโรงเรือน มาตรฐานฟาร์ม ☐ GAP ☐ GFM ☐ ไม่มี

จำนวนสัตว์ในฟาร์ม: โคเนื้อ.....ตัว ไก่.....ตัว

กระบือ.....ตัว อื่นๆ (ระบุ).....จำนวน.....ตัว

1. ข้อมูลการฉีดวัคซีน

1.1 ผู้ดำเนินการฉีดวัคซีนตามโครงการฯ

☐ 1. เกษตรกรฉีดเอง ☐ 2. เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์อำเภอ ☐ 3. อาสาปศุสัตว์ ☐ 4. เจ้าหน้าที่ผสมเทียม☐ 5. อื่นๆ ระบุ.....

1.2 จำนวนสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเฮโมรายิกเซปติซีเมียชนิดอิมัลชัน

โคเนื้อจำนวน.....ตัว ไก่จำนวน.....ตัว

กระบือจำนวน.....ตัว

1.3 ตำแหน่งที่ฉีด

ฉีดบริเวณกล้ามเนื้อคอจำนวน.....ตัว ฉีดบริเวณกล้ามเนื้อสะโพกจำนวน.....ตัว

2. การแพ้วัคซีน ในระยะเวลา 10 วันภายหลังการฉีดวัคซีน

สัตว์ที่แพ้วัคซีน	จำนวน(ตัว)	อาการแพ้วัคซีน (จำนวนตัว)					ระยะเวลา ภายหลังการฉีด วัคซีน	การแก้ไข
		แพ้	ผื่นแดง	บวม อักเสบ	ตาย	อื่นๆ (ระบุ)		

3. คำถามสำหรับผู้ดำเนินการฉีดวัคซีน

3.1 ความยาก/ง่ายในการฉีดวัคซีน

☐ ง่าย (ความหนืดต่ำ) ☐ ยาก (ความหนืดสูง) ☐ ยากมาก (ความหนืดสูงมาก)

3.2 ท่านให้ความสำคัญกับปัจจัยใดในวัคซีนมากที่สุด (โปรดเรียงลำดับความสำคัญ) เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนในอนาคต

(.....) การสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน (.....) สามารถฉีดได้ง่ายไม่หนืด (.....) สามารถป้องกันโรคได้หลายโรคในครั้งเดียว

3.3 ข้อเสนอแนะ/หมายเหตุ

.....

.....

ลงชื่อ.....ผู้ฉีดวัคซีน

(.....)

ตำแหน่ง.....

หน่วยงาน.....

ลงชื่อ.....ผู้สอบถาม

(.....)

ตำแหน่ง.....

หน่วยงาน.....

Development of Haemorrhagic septicaemia emulsion vaccine

Kheemchompu Atthikanyaphak¹ Nanthiya Sangplao¹
Noppawan Buamitoup² Danai Khamkwan³

Abstract

The purpose of this study is to develop a new Haemorrhagic septicemia emulsion vaccine. Six types of oil emulsions were formulated as per describe. Formula A , B and C use MontanideTM ISA 70 VG, MontanideTM ISA 61 VG and MontanideTM ISA 201 VG, respectively formulate with *Pasteurella multocida* 1×10^8 cfu/dose. While formula D, E and F use MontanideTM ISA 70 VG, MontanideTM ISA 61 VG and MontanideTM ISA 201 VG, respectively formulate with a dosage of 0.5×10^8 cfu/dose. The viscosity of vaccines A, B, C, D, E, and F were 29.50, 23.00, 20.53, 37.23, 26.80, and 21.20 centipoises, respectively. The vaccines were tested for safety and potency in mice and found that safe and able to provide immunity against challenge test with log protection 4.50, 4.17, 4.81, 5.75, 4.00, and 5.00, respectively. All vaccines conform to the required standards in laboratory testing.

Four suitable vaccines were selected (B, C, E, and F) for testing the safety and immune response in 80 cattle, divided into four groups with 20 cattle per group. All cattle were injected 1 ml vaccine intramuscularly one time. Blood samples were collected every month continuously for one year for detecting antibody titer by ELISA. Results showed that the group vaccinated with B formula has higher antibody levels than other groups and maintain a protective level for at least ten months (cut-off value $\geq 1:320$). When four vaccines formulation were tested for safety in cattle and buffalo in field trials across the Livestock Office of nine regions in Thailand, 99.93% of animals did not show any adverse effect after injection. Only one buffalo (0.07%) showed an allergic reaction (formula F).

Therefore, considering current laboratory properties, safety, long-term potency, and local user satisfaction surveys, it is concluded that formula B is a suitable candidate for further development as a new vaccine on an industrial scale.

Keywords: Vaccine, Haemorrhagic septicaemia, emulsion, safety, potency

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

²Bureau of Disease Control and Veterinary Service; Department of Livestock Development

³Bureau of Animal Husbandry and Genetic Improvement; Department of Livestock Development

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1% และ 2%

เข็มชมพู่ อธิกัญญ์¹ นันทิยา แสงเปล่า¹

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ของตัวอย่างเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1% และ 2% โดยวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิต (Viable count) และค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Optical density; OD₅₄₀) ที่เก็บทุก 2 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิต โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่ 1% และ 2% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่ค่าความขุ่นของทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นที่ 2% สูงกว่า 1% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 และพบว่าในชั่วโมงที่ 8 เป็นชั่วโมงที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตสูงสุด โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิต $4.60\pm3.96\times10^{16}$ CFU/ml และ OD₅₄₀ เท่ากับ 0.739 ± 0.007 ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1%, $4.60\pm3.63\times10^{16}$ CFU/ml และ OD₅₄₀ เท่ากับ 1.147 ± 0.042 ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 2%

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สรุปว่า การใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นที่ 2% ดีกว่า 1% เนื่องจากได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะเวลาเท่ากัน โดยประเมินจากค่าความขุ่น (OD₅₄₀) เนื่องจากปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ใช้ค่าความขุ่นเป็นค่ามาตรฐานสำหรับนำมาคำนวณอัตราส่วนในการผสมวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับนำไปผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: *Pasteurella multocida* อัตราการเจริญเติบโต ค่าความขุ่น ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิต

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซพติซีเมีย (Haemorrhagic septicaemia) หรือโรคคอบวม เป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญทางเศรษฐกิจของโคและกระบือ สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) พบที่ระบบทางเดินหายใจของสัตว์ (De Alwis, 1992) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญและเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ลายสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Maslog, 1998) การป้องกันโรคดังกล่าวทำได้โดยการฉีดวัคซีนตามระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคเฮโมราจิกเซพติซีเมียที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ในปัจจุบันเป็นวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 เป็นวัคซีนชนิดน้ำมันหรืออิมัลชัน (water in oil adjuvant, W/O) ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันและให้ความคุ้มโรคได้เป็นระยะเวลานานเป็นที่น่าพอใจ (รัชนิและคณะ, 2544) โดยกระบวนการผลิตวัคซีนเริ่มจากการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose starch agar (DSA) เป็นเวลา 18-24 ชม. หลังจากนั้นจึงเพาะเลี้ยงในขวดเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose phosphate broth (TPB) ปริมาตร 4 ลิตร ในสภาวะมีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 400 ลิตรโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ 1% ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบใบพัด 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.3% (v/v) เพื่อให้ได้ บรอกแบคเทอริน แล้วผ่านกระบวนการกรองด้วย cross flow filtration จากนั้นนำไปผสมสารแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันและผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปต่อไป ซึ่งกระบวนการผลิตทั้งหมดใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์

Sarwar *et al.* (2013) ศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. multocida* (B:2) ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ (Casein sucrose yeast broth (CSY), Tryptose soya broth (TSB), Brain heart infusion broth (BHI) และ Nutrient broth), อุณหภูมิ (10 - 50 °C), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 3.0 - 9.8) และรอบการปั่น (50 - 600 รอบต่อนาที) พบว่าเชื้อ *P. multocida* (B:2) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน CSY ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 35 - 40 °C ที่ pH 7.0 - 8.0 และรอบการปั่น 500 รอบต่อนาที นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนปริมาณเชื้อตั้งต้นสามารถส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. multocida* (B:2) (Shahin *et al.*, 2014) เมื่อทำการทดลองในระดับ Lab scale โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่างกันตั้งแต่ 1 - 10% ปรากฏว่า เชื้อ *P. multocida* (B:2) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 8% แต่จะลดลงเมื่อใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นมากกว่า 8% เป็นต้นไปที่ระยะเวลาการเพาะเชื้อเท่ากัน และมีการศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. multocida* (A:1) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ในถังเพาะเชื้อขนาด 400 ลิตร โดยปริมาตรเชื้อตั้งต้นที่ 0.5%, 1% และ 2% (วีรชายและคณะ, 2551) ซึ่งพบว่าค่าความขุ่น (OD_{540}) ของตัวอย่างเชื้อที่มีปริมาตรเชื้อตั้งต้นสูง มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่มีปริมาตรเชื้อตั้งต้นต่ำเมื่อวัดในช่วงเวลาเดียวกันแม้จะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากการทดลองที่ผ่านมาจึงเห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายด้านที่สามารถส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. multocida* ได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษากระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงปัจจุบันเพิ่มเติม จะมีประโยชน์ในการพัฒนาปรับปรุงขั้นตอนการผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1% และ 2% ในถังเพาะเชื้อขนาด 50 ลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเชื้อแบคทีเรีย

เพาะและขยายเชื้อ *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DSA¹ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อไปเพาะและขยายต่อในขวด starter ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TPB² ปริมาตร 4 ลิตร

นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้จากขวด ไปเพาะต่อลงในถังเพาะเชื้อ³ ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TPB ปริมาตร 50 ลิตร โดยใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตรที่ 1% (0.5 ลิตร) และ 2% (1 ลิตร) ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ เพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และควบคุมรอบปั่นที่ 150 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นและวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตโดยวิธี Viable count ทำ 3 ซ้ำ ทุก 2 ชั่วโมง (12 ครั้ง) ติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจึงทำการฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน⁴ 0.3 % (v/v)

การวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตโดยวิธี Viable count

นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บทุกๆ 2 ชั่วโมงไปวัดความขุ่นและวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตโดยวิธี Viable count โดยเจือจางแบคทีเรียแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) จากนั้นหยดเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ DSA และกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าด้วยวิธีการ Spread plate บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน จึงนับจำนวนโคโลนีและคำนวณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น Colony forming unit (CFU/ml)

การวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่น

นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บทุก 2 ชั่วโมง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์⁵ และนำค่าความขุ่นที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความขุ่น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของค่าความขุ่น และจำนวนเชื้อมีชีวิตระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี Paired t-test (อรุณ, 2558)

ผล

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิต (Viable count)

เมื่อวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิต (Viable count) ของตัวอย่างเชื้อที่เก็บทุก 2 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเชื้อมีชีวิตของทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกัน (รูปที่ 1) โดยมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 8 ก่อนจะลดลงพร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 เป็นต้นไป เมื่อนำค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยใช้วิธี Paired t-test พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 1% และ 2% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 1)

ค่าความขุ่น (Absorbance at OD₅₄₀)

เมื่อวัดค่าความขุ่น (Absorbance at OD₅₄₀) ของตัวอย่างเชื้อที่เก็บทุก 2 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ทั้งกลุ่มความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1% และ 2% มีค่าความขุ่นเพิ่มอย่างช้าๆ ในชั่วโมงที่ 0 ถึง 4 หลังเพาะ ก่อนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 สำหรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และชั่วโมงที่ 14 สำหรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 2% ก่อนที่จะลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 2) และเมื่อนำค่าเฉลี่ยของค่าความขุ่นทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยใช้วิธี Paired t-test พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 1% และ 2% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 2)

¹ DifcoTM, France

² ALPHA BIOSCIENCES, USA

³ Eppendorf, Germany

⁴ GPO, Thailand

⁵ Metertech, Taiwan

วิจารณ์

จากการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. multocida* ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1% และ 2% โดยวิธี Viable count และ การวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่น พบว่า การเจริญของแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 4-8 เป็นชั่วโมงที่เชื้อแบคทีเรียนั้นเริ่มมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งในชั่วโมงที่ 8 ที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 1 และ 2) อยู่ที่ $OD_{540} = 0.739 \pm 0.007$ และ $4.60 \pm 3.96 \times 10^{16}$ CFU/ml ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1% และ $OD_{540} = 1.147 \pm 0.042$ และ $4.60 \pm 3.63 \times 10^{16}$ CFU/ml ที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 2% (log phase) โดยชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไปอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (OD_{540}) เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary Phase และชั่วโมงที่ 20 ถึงชั่วโมงที่ 24 เชื้อแบคทีเรียเริ่มมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงซึ่งเข้าสู่ระยะ Death Phase ซึ่งเป็นระยะการตายของเซลล์แบคทีเรีย (Willey *et al.*, 2011)

เมื่อนำค่าความขุ่นและปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ในแต่ละกลุ่ม พบว่าค่าความขุ่น (OD_{540}) ในทุกๆ 2 ชั่วโมง ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงในชั่วโมงที่ 14 ก่อนจะคงที่และเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ต่างจากเส้นกราฟของปริมาณเชื้อมีชีวิตโดยสังเกตได้จากชั่วโมงที่ 10 ที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการเจริญเติบโตของประชากรกลุ่มย่อยใหม่ที่สามารถทนต่อสภาวะของเสียสะสมและใช้สารอาหารที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ในประชากรกลุ่มก่อนหน้าที่ยาแล้วได้ดีขึ้น โดยมีลักษณะการเจริญเป็นระลอกคลื่น สอดคล้องกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 12 อย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 16 และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 20 ก่อนจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 22 โดยในชั่วโมงที่ 24 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มมีปริมาณลดน้อยลงซึ่งอาจจะเกิดจากปริมาณอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มมีการตายเพิ่มมากขึ้น (Willey *et al.*, 2011)

เมื่อนำค่าความขุ่นและปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 1% และ 2% มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้วิธี Paired t-test พบว่า ค่าความขุ่นของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นที่ 2% สูงกว่า 1% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไปจนจบชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีชีวิตนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในทุกช่วงเวลา ซึ่งอาจเป็นผลจากการเจริญเติบโตของประชากรกลุ่มย่อย ณ ขณะที่เก็บตัวอย่าง โดยกลุ่มหนึ่งอาจถูกเก็บตัวอย่างในช่วงที่ประชากรกลุ่มย่อยใหม่กำลังเจริญเติบโต ในขณะที่อีกกลุ่มทดลองหนึ่งอาจจะอยู่ในช่วงที่กำลังลดลง โดยที่จำนวนประชากรมีชีวิตทั้งหมดในแต่ละกลุ่มไม่เปลี่ยนแปลง ส่งผลให้มีการสะสมของเซลล์แบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในถังเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นโดยที่ปริมาณเซลล์มีชีวิตกลับคงที่หรือลดลง

วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ผลิตอยู่ในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย โดยใช้ค่าความขุ่นหลังการฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.3% (v/v) และผ่านการกรองแล้วเป็นค่ามาตรฐานสำหรับนำมาคำนวณอัตราส่วนในการผสมวัคซีนเนื่องจากสามารถอ่านผลได้อย่างรวดเร็วภายใน 5 นาที จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีน ดังนั้นปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดในบรอกแบคทีรินซึ่งประเมินได้จากค่าความขุ่น จึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตการศึกษาปัจจัยเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดโดยใช้ทรัพยากรและเวลาน้อยที่สุดจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาการผลิตวัคซีนต่อไป

สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 ที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และ 2% ในครั้งนี้ สรุปได้ว่าความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นที่ 2% ดีกว่า 1% เนื่องจากได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะเวลาเท่ากัน โดยประเมินจากค่าความขุ่น (OD₅₄₀) และควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สำหรับการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ น.สพ. อนันต์ ท้าวเพชรผู้เชี่ยวชาญด้านพัฒนาแบคทีเรียวัคซีนสำหรับสัตว์ ที่ปรึกษาโครงการ คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ น.สพ.นพคุณ มูลสิน นายศรารุณ เรือนใหม่ และนักศึกษาฝึกงานมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- รัชนี้ อตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยานิเทศ เลิศลิ้มชลาลัย และวันชัย ตีระวรรณวรรณ 2544 การประเมินความคุ้มครองของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันในโค สัตวแพทย์สาร 52(1-2): 23-30
- วีรชาย ปู่สูงเนิน และคณิดา ภาสะฐิติ 2551 การศึกษาการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในถังเพาะเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นต่างกัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 18(1-2): 25-33
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 เรื่องการตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างเชื้อในถังเฟอร์เมนเตอร์ของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมัน (SOP-HS-005) หน้า 1-5
- อรุณ จิรวัดนกุล 2558 สถิติเพื่องานทางวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อการวิจัย โรงพิมพ์วิทย์พัฒน์ กรุงเทพฯ หน้า 84-100
- De Alwis, M. C .L. 1992. Pasteurellosis in Production Animals. ACIAR. Proceeding No. 43, Australia.
- Maslog, F. S. 1998. Immunity provided by Haemorrhagic Septicaemia subunit vaccine in ruminant. Dev Biol Stand., 92: 301-307.
- Sarwar, N., Muhammad, K., Rabbani, M., Younus, M., Sarwar, M., Ali, M.A., Hanif, K. and Kamran, M. 2013. Optimization of Physico-chemical Factors Augmenting *In vitro* Biomass Production of *Pasteurella multocida*. The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(4): 1085-1088.
- Shahin, F., Habib, M., Shah, M.S., Hussain, N. and Khanum, S.A. 2014. Effect of different media compositions and physicochemical conditions on the *in vitro* growth of *Pasteurella multocida*. Sci Lett., 2: 39-42.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. 2011. Prescott's Microbiology, eighth edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York, USA. pp. 163-168.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อมีชีวิต (Viable count) ของเชื้อ *P. multocida* ที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และ 2%

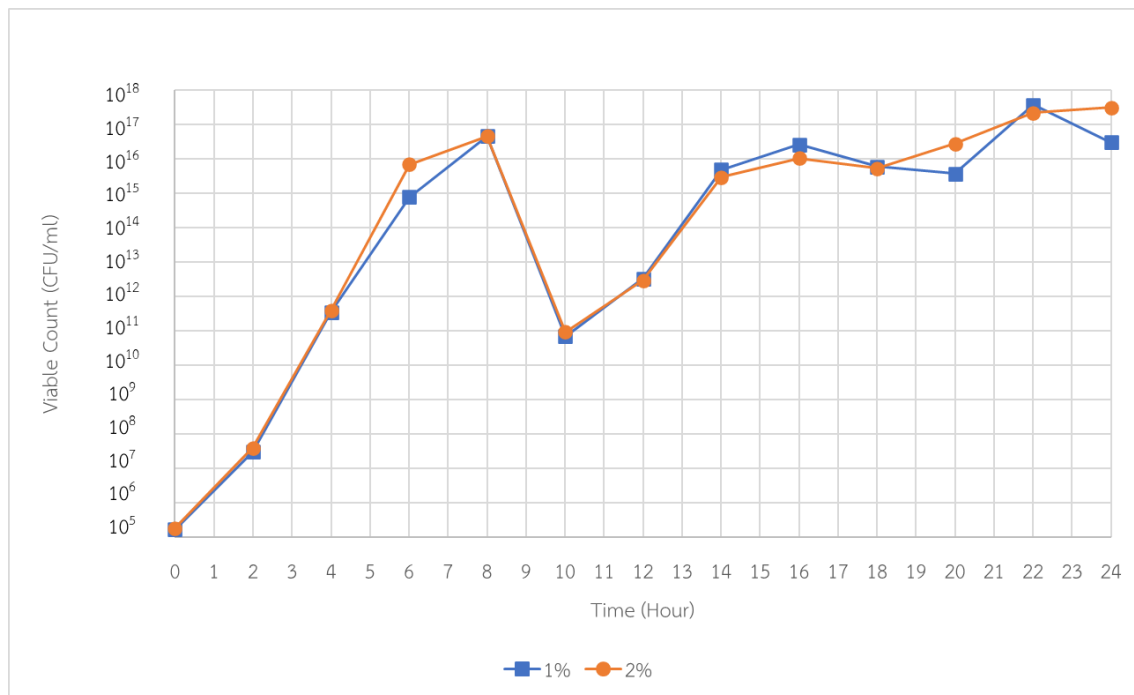
เวลาหลังเพาะ (ชั่วโมง)	จำนวนเชื้อมีชีวิต (CFU/ml)	
	ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1%	ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 2%
0	$1.62 \pm 1.19 \times 10^5$ ^a	$1.82 \pm 1.10 \times 10^5$ ^a
2	$2.98 \pm 2.33 \times 10^7$ ^a	$3.86 \pm 3.21 \times 10^7$ ^a
4	$3.53 \pm 3.10 \times 10^{11}$ ^a	$3.92 \pm 3.50 \times 10^{11}$ ^a
6	$7.99 \pm 7.09 \times 10^{14}$ ^a	$7.09 \pm 6.39 \times 10^{15}$ ^a
8	$4.60 \pm 3.96 \times 10^{16}$ ^a	$4.60 \pm 3.63 \times 10^{16}$ ^a
10	$6.90 \pm 4.55 \times 10^{10}$ ^a	$9.20 \pm 1.97 \times 10^{10}$ ^a
12	$3.29 \pm 1.38 \times 10^{12}$ ^a	$2.98 \pm 2.26 \times 10^{12}$ ^a
14	$4.94 \pm 4.22 \times 10^{15}$ ^a	$3.00 \pm 2.36 \times 10^{15}$ ^a
16	$2.65 \pm 2.01 \times 10^{16}$ ^a	$1.07 \pm 1.01 \times 10^{16}$ ^a
18	$5.99 \pm 4.68 \times 10^{15}$ ^a	$5.38 \pm 4.42 \times 10^{15}$ ^a
20	$3.80 \pm 2.62 \times 10^{15}$ ^a	$4.95 \pm 4.25 \times 10^{16}$ ^a
22	$3.80 \pm 2.51 \times 10^{17}$ ^a	$2.24 \pm 1.96 \times 10^{17}$ ^a
24	$3.09 \pm 2.25 \times 10^{16}$ ^a	$3.18 \pm 2.99 \times 10^{17}$ ^a

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของค่าความขุ่น (Absorbance at OD₅₄₀) ของเชื้อ *P. multocida* ที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และ 2%

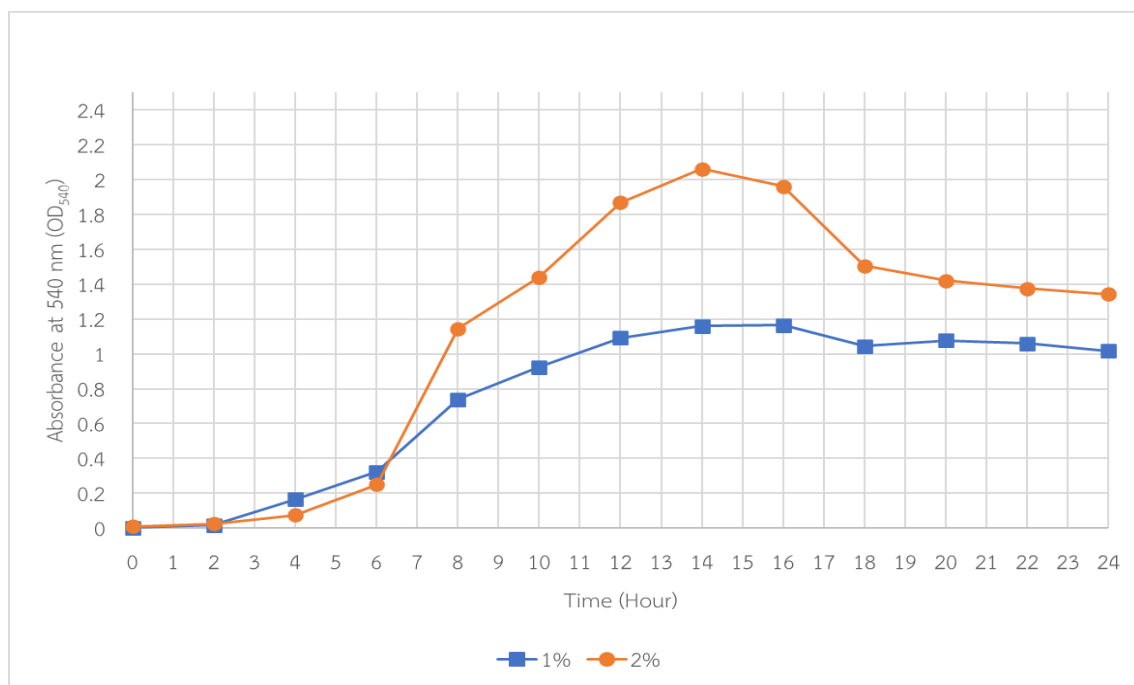
เวลาหลังเพาะ (ชั่วโมง)	ความขุ่น (OD ₅₄₀)	
	ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 1%	ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 2%
0	0.002 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^b
2	0.017 ± 0.002 ^a	0.025 ± 0.001 ^b
4	0.165 ± 0.007 ^a	0.076 ± 0.002 ^b
6	0.324 ± 0.003 ^a	0.250 ± 0.002 ^b
8	0.739 ± 0.007 ^a	1.147 ± 0.042 ^b
10	0.924 ± 0.005 ^a	1.442 ± 0.123 ^b
12	1.093 ± 0.009 ^a	1.868 ± 0.044 ^b
14	1.160 ± 0.005 ^a	2.063 ± 0.032 ^b
16	1.167 ± 0.005 ^a	1.962 ± 0.019 ^b
18	1.045 ± 0.009 ^a	1.505 ± 0.055 ^b
20	1.077 ± 0.012 ^a	1.420 ± 0.036 ^b
22	1.059 ± 0.009 ^a	1.373 ± 0.095 ^b
24	1.017 ± 0.007 ^a	1.343 ± 0.035 ^b

หมายเหตุ

1. ทำ 3 ซ้ำ mean±SD
2. ตัวอักษรยกกำลัง (a, a) เหมือนกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างกลุ่มทดลอง
3. ตัวอักษรยกกำลัง (a,b) ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างกลุ่มทดลอง



รูปที่ 1 จำนวนเชื้อมีชีวิต (Viable count) ของเชื้อ *P. multocida* ที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และ 2%



รูปที่ 2 ค่าความขุ่น (Absorbance at OD₅₄₀) ของเชื้อ *P. multocida* ที่ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น 1% และ 2%

Comparative study of *Pasteurella multocida* serotype B:2,5 growth rate with 1% and 2% inoculum sizes under *in vitro* condition

Kheemchompu Atthikanyaphak¹ Nanthiya Sangplao¹

Abstract

The growth rate of *Pasteurella multocida* serotype B:2,5 with 1% and 2% inoculum sizes was measured by viable count method and turbidity at 540 nm (Optical density; OD₅₄₀). Samples were collected from the fermenter every 2 hours consecutively for 24 hours. Results showed that the viable cell count of both groups was not significantly different ($P > 0.05$). Meanwhile, the turbidity (OD₅₄₀) of 2% inoculum size was significantly higher ($P < 0.05$) than the 1% inoculum size starting from the 8th hours onwards until the end of the 24th hours. The 8th hours also have the highest viable cell counts with the amount of live bacterial cell was $4.60 \pm 3.96 \times 10^{16}$ CFU/ml and OD₅₄₀ was 0.739 ± 0.007 at 1% inoculum size, $4.60 \pm 3.63 \times 10^{16}$ CFU/ml and OD₅₄₀ was 1.147 ± 0.042 at 2% inoculum size.

The results of this study concluded that the increased inoculum size of 2% gives better output on total bacterial cell concentration compared to 1% inoculum size given the same cultured period, which is determined by the turbidity (OD₅₄₀) as a standard value for calculating the ratio of hemorrhagic septicemia vaccine formula according to the standard practice of the Bureau of Veterinary Biologics. Further studies should be carried out to develop the bacterial cultures method for manufacturing more effective hemorrhagic septicemia vaccine at an industrial scale.

Keywords: *Pasteurella multocida*, growth rate, turbidity, viable count

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

ความคุ้มโรคข้ามของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์ O₁₈₉ ต่อเชื้อไทป์โอที่ระบาดในพื้นที่

มารุตพงศ์ พุ่มพวง¹ ไชยา สง่าประโคน¹

บทคัดย่อ

ที่มา : โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดจากเชื้อไวรัสที่ก่อความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว สร้างผลกระทบทางเศรษฐกิจอย่างมากให้กับปศุสัตว์ เช่น โคเนื้อ ไก่เนื้อ และ สุกร สำหรับประเทศไทยพบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นประจำทุกปีคือไทป์โอ และ เอ เมื่อเกิดการระบาดจะมีการเก็บเชื้อไวรัสมาทำการพิสูจน์ทราบชนิด (ไทป์) และสเตรน เพื่อจะได้นำวัคซีนไปใช้ในการควบคุม ลดการระบาดให้อยู่ในวงจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคุ้มโรคข้ามของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้แอนติเจนไวรัสไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่มีการระบาดในพื้นที่

วิธีการ : ทำการผสมวัคซีนชนิดไทป์โอเดี่ยว สเตรน O₁₈₉ ที่ใช้อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลาและซาโปนินเป็นแอดจูแวนท์ นำไปฉีดวัคซีนในโคทดลอง จำนวน 20 ตัว ตัวละ 1 โด๊ส (2 มล.) และตัวควบคุมไม่ต้องฉีดวัคซีน จำนวน 8 ตัววันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน แบ่งโคทดลองที่ฉีดวัคซีนเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว และตัวควบคุม 4 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว นำเข้าคอกทดสอบที่มีการควบคุมอากาศป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ แล้วฉีดพิษด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สเตรน O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆ และ O₁₆₋₂₀ สังเกตอาการและตรวจดูอาการ เป็นเวลา 8 วัน นำไปหาเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค ทั้งนี้มีการเจาะเลือดในวันที่ 0, 4, 7, 10, 14, 21 และ 29 วันหลังฉีดวัคซีน นำไปหาระดับแอนติบอดีและความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (r-value) โดยวิธี Virus neutralization test (VNT)

ผล : วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สเตรน O₁₈₉ ให้ความคุ้มโรค 100% ต่อไวรัสที่นำมาทดสอบทั้ง O_{chumphon}, O₂₁₆ และ O₁₆₋₂₀ โดยมีค่า r₁ เฉลี่ยเท่ากับ 0.68±0.08, 0.13±0.04 และ 0.75±0.11 ตามลำดับ และวัคซีนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ป้องกันโรคต่อไวรัสสเตรน O₁₈₉, O_{chumphon} และ O₁₆₋₂₀ ได้เร็วภายใน 7 วัน หลังฉีดวัคซีน ขณะที่ต่อไวรัสสเตรน O₂₁₆ ต้องใช้เวลา 10 วัน

สรุป : วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้แอนติเจนไวรัสไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ สามารถใช้ฉีดป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สเตรน O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆ (O_{ราชบุรี}) และ O₁₆₋₂₀ (O_{อินเดีย}) ที่มีการระบาดในพื้นที่ได้

คำสำคัญ: ความคุ้มโรคข้าม วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สเตรน O₁₈₉ เชื้อพื้นที่

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย เกิดจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Virus, FMDV) อยู่ในสกุล (Genus) Aphovirus ตระกูล (Family) Picornaviridae ซึ่งเป็น RNA virus ก่อให้เกิดโรคในสัตว์กีบที่เป็นทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า ในปัจจุบันมี 7 ชนิด (ไทป์) คือไทป์ โอ(O), เอ(A), ซี(C), แซท1(SAT1), แซท2(SAT2), แซท3(SAT3) และ เอเชีย1(Asia1) ซึ่งในแต่ละไทป์ ยังมีชนิดย่อย (subtype) อีกมากมายรวม 64 subtypes ได้แก่ ไทป์โอ มี 11 subtypes (O_1-O_{11}), ไทป์เอ มี 32 subtype (A_1-A_{32}), ไทป์ซี มี 5 subtypes (C_1-C_5), ไทป์เอเชีย 1 มี 3 subtype ($As_{1/1}-As_{1/3}$) และไทป์ แซท1, แซท2, แซท3 มี 6, 3 และ 4 subtypes ตามลำดับ โดยแต่ละซีโรไทป์ จะไม่ให้ความคุ้มโรคข้าม (cross-protection) แต่ในไทป์เดียวกันแต่ต่างสเตรนอาจให้ความคุ้มโรคข้ามได้บ้าง (Konig and Peres-Filgueira, 2011; OIE, 2021; Rweyemamau, 1978; Rweyemamu, 1984)

โรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับประเทศไทยพบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นประจำทุกปี คือ ไทป์ โอ และ เอ ส่วนไทป์เอเชีย1 ไม่พบการระบาด โดยไทป์โอ ค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) ระหว่างเชื้อไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนและเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ($r > 0.4$) (Udon and Linchongsabongkoch, 2006; Udon *et al.*, 2008) แสดงว่าวัคซีนที่ผลิตสามารถป้องกันการระบาดของโรคได้โดยส่วนใหญ่

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ได้รับข้อมูลการเกิดโรคระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในพื้นที่ประเทศไทยจากสำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ (สคบ.) และรายงานผลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศอ.) จากนั้นได้ประชุมหารือถึงการคัดเลือกสเตรนของไวรัสแต่ละซีโรไทป์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ผลิตวัคซีนสำหรับการทำวัคซีนแก่ปศุสัตว์ในพื้นที่ส่งผลให้ สทช. ต้องผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยคัดเลือกไวรัสที่มีสเตรนของซีโรไทป์ที่มีความใกล้เคียงกับสถานการณ์การระบาดของเชื้อและมีค่า r-value ที่เหมาะสมในพื้นที่ ณ ขณะนั้น เพื่อหวังผลให้วัคซีนสามารถควบคุมและป้องกันโรคได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ดังเช่นการคัดเลือกสเตรนของเชื้อซีโรไทป์โอ ที่เหมาะสมกับสถานการณ์การระบาดของโรคและการเปลี่ยนแปลงค่า r-value ในช่วงปีนั้นๆ ได้แก่ การผลิตซีโรไทป์โอ สเตรน O_{189} ใช้กับการระบาดของเชื้อในช่วงปี พ.ศ.2530-2557, การผลิตซีโรไทป์โอ สเตรน $O_{chumphon}$ ใช้กับการระบาดของเชื้อในช่วงปี พ.ศ.2558-2559, การผลิตซีโรไทป์โอ สเตรน O_{216} หรือ $O_{ราชบุรี}$ ใช้กับการระบาดของเชื้อในช่วงปี พ.ศ.2559-2560, การผลิตซีโรไทป์โอ สเตรน O_{189} ใช้กับการระบาดของเชื้อในช่วงปี พ.ศ.2560-ปัจจุบัน และการพัฒนาซีโรไทป์โอ สเตรน O_{16-20} หรือ $O_{อินเดีย}$ เพื่อการผลิตในช่วงปีถัดไป

จากที่กล่าวมาข้างต้นคือโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีซีโรไทป์ต่างกันจะไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามกัน แต่ถ้าเป็นซีโรไทป์เดียวกันแต่ต่างสเตรนกันจะมีภูมิคุ้มโรคข้ามกันได้บ้าง มีการศึกษาการใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยใช้ซีโรไทป์โอว่าสามารถให้ภูมิคุ้มกันในสเตรนที่ต่างกันได้ เช่น การศึกษาของ Nagendrakumar และคณะ(2011) ได้ศึกษาความคุ้มโรคข้ามกันของ O_1 Manisa กับ O_1 Campos โดยวัคซีนมีปริมาณแอนติเจน O_1 Manisa เท่ากับ 60, 15 และ 3.75 $\mu\text{g}/\text{dose}$ ฉีดวัคซีนให้โค แล้วฉีดพิษหัดด้วย O_1 Campos ซึ่งต่างสเตรนกัน พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 75(6/8), 50(5/8) และ 28.6(2/7)% ตามลำดับ และเมื่อผสมวัคซีน O_1 Manisa ที่มีปริมาณแอนติเจน เท่ากับ 15, 3.75 และ 0.94 $\mu\text{g}/\text{dose}$ แล้วฉีดพิษหัดด้วย O_1 Manisa ซึ่งสเตรนเดียวกัน พบว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค 100(8/8), 100(8/8) และ 87.5(7/8)% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Duque และคณะ (2016) ได้นำวัคซีนทางการค้าชนิด Bivalent ประกอบด้วย O_1 Campos และ A_{24} Cruzeiro นำไปฉีดวัคซีนให้โค แบบมีการกระตุ้น (booster) และไม่กระตุ้น แล้วฉีดพิษหัดด้วยเชื้อที่คัดเลือกจากพื้นที่ ซึ่งมีค่า r value โดยวิธี VNT ระหว่าง 0.158-0.241 ซึ่งตาม

มาตรฐาน OIE (2021) จะไม่มีความสัมพันธ์กัน (ต้อง $r_1 > 0.3$) พบว่า กลุ่มโคที่มีการกระตุ้นและไม่กระตุ้น วัคซีนจะให้ความคุ้มครอง 90 (9/10) และ 50 (5/10)% ตามลำดับ ดังนั้น แสดงว่า ถึงแม้เชื้อไวรัสจะมีความแตกต่างกันทางซีรัมวิทยาหรือต่างสเตรนกัน ก็ยังสามารถให้ความคุ้มครองข้ามสเตรนได้บ้าง แต่จะไม่ครอบคลุมทั้งหมดถ้าจะให้วัคซีนมีความคุ้มครองกับเชื้อที่ต่างสเตรนกันด้วยต้องใช้ high potency vaccine หรือถ้าใช้วัคซีนปกติที่ใช้ฉีดป้องกันโรคเป็นประจำก็ต้องมีการฉีดกระตุ้นหลังจากฉีดเข็มแรกเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มโรคให้สูงขึ้น (OIE, 2021)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความคุ้มครองข้ามสเตรนของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้แอนติเจนไวรัสไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่มีการระบาดในพื้นที่

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้โคลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง ไม่จำกัดเพศ อายุไม่น้อยกว่า 6 เดือน สุขภาพแข็งแรง จำนวน 28 ตัว เป็นโคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนและไม่เคยติดเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีโดยวิธี VNT ต่อโรคปากและเท้าเปื่อยเชื้อจากเกษตรกร นำมาเลี้ยงที่คอกโคของฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับการเลี้ยงโคฉีดวัคซีน เลี้ยงแบบปล่อยฝูงในคอกรั้วเหล็ก ขนาด 60x80 ม. จำนวน 3 คอก คอกละ 20 ตัว มีหลังคากันแดด กันฝน มีน้ำดื่มให้กินตลอดเวลา ให้ฟางแห้งทุกวัน วันละ 2-4 ฟ่อน และอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับโค ทุกเช้า ในรางอาหาร ประมาณ 1 กก./ตัว/วัน การเจาะเลือดจะใช้ช่องบังคับ สำหรับการเลี้ยงในคอกฉีดพิษหับเป็นคอกระบบปิด negative pressure มีระบบแอร์ล๊อค เลี้ยงโคโดยการผูกโซ่แยกตัว ให้อาหารเม็ดและน้ำ เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ทำให้สัตว์ตายโดยใช้ gunshot (pneumatic gun) ยิงทำลายสมอง (AVMA, 2020) แล้วทำลายซากสัตว์ด้วยเครื่องบดและทำลายซากสัตว์ (Crusher and Cooker) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558ก)

วัคซีน

ทำการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียสที่ใช้อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลและซาโปนินเป็นแอดจูแวนท์ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดโมโนวาเลนซ์ คือ ไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ ตามวิธีการของ สทช. โดยใส่ปริมาณแอนติเจน (146s antigen) เท่ากับ 7 µg/โดสวัคซีน วันผลิต 21/09/63 วันหมดอายุ 20/09/64 จำนวน 600 โดส แบ่งใส่ขวดละ 40 มล. หรือ 20 โดส เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C รอการทดสอบต่อไป

การทดสอบความคุ้มครองข้าม (cross protection)

1. แบ่งโคทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มฉีดวัคซีน จำนวน 20 ตัว กลุ่มที่ 2 ไม่ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 8 ตัว (รวม 28 ตัว) แล้วฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์กลุ่มที่ 1 ตัวละ 2 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอหน้าขาหน้า
2. เจาะเลือดโคทดลอง จำนวน 7 ครั้ง ดังนี้ วันฉีดวัคซีน (D₀) และหลังฉีดวัคซีน 4, 7, 10, 14, 21 วัน (ก่อนฉีดพิษหับ) และหลังฉีดพิษหับ 8 วัน เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี VNT
3. การฉีดพิษหับหลังฉีดวัคซีน 21 วัน แบ่งโคกลุ่มฉีดวัคซีนเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว และกลุ่มไม่ฉีดวัคซีนเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว นำเข้าคอกฉีดพิษหับ แยกคอกกัน แล้วฉีดพิษหับด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่เป็น homologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน (สเตรน O₁₈₉) และเชื้อที่เป็น heterologous strain กับไวรัสที่ใช้

ผลิตวัคซีน (สเตรน O_{chumphon} หรือ O₂₁₆ หรือ O₁₆₋₂₀) ที่มีความรุนแรง 10,000 CID₅₀ (50% cattle infectious dose/ตัว) ที่ลิ้นของโค (intradermo-lingual route) สังเกตอาการ วัตอุณหภูมิ และตรวจดูการทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558ข; OIE, 2021) สัตว์ที่มีความคุ้มโรคจะไม่เกิดอาการเช่นตุ่มน้ำใสที่กึ่งเท้าบริเวณ coronary band และพื่นกับ นำจำนวนสัตว์ที่ไม่เกิดอาการไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค

การตรวจทางซีรั่มวิทยา (Serological test)

Virus neutralization test (VNT)

ตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558ค; OIE, 2021) โดยนำซีรั่มที่ต้องการตรวจสอบหาระดับแอนติบอดีมา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัส ปริมาตรที่เท่ากับซีรั่ม คือ 50 µl ซึ่งมีความรุนแรง 100 TCID₅₀ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 5% CO₂ Incubator หลังจากนั้นเติม secondary lamb kidney cells หลุมละ 150 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คำนวณค่า log VNT titer ตามวิธีของ Karber (1931) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2021) กำหนดไว้ว่า ถ้าค่า log VNT titer <1.20 หรือ 1/16 แปลผลเป็นลบ (negative) ค่า log VNT titer ≥1.20 (1/16) – 1.50 (1/32) ให้ทดสอบซ้ำ ถ้า ≥1.20 แสดงว่า เป็นบวก (positive) และถ้าค่า log VNT titer ≥ 1.65 หรือ 1/45 แปลผลเป็นบวก

การหาความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (Vaccine matching test) โดยวิธี VNT

ทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (r-value หรือ vaccine matching test) แบบ one-way testing (r_1) โดยการคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสพื้นที่ (ต่างสเตรน) กับระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนและวิเคราะห์ผล ดังนี้ โดยใช้ซีรั่มที่จะได้จากการฉีดวัคซีนในสัตว์ทดลอง ในวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน ทั้ง 20 ตัว มารวมกัน (pool) เป็น reference serum และเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีนเป็น vaccine virus strain ส่วนเชื้อที่ไม่ตรงกับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีนเป็น field virus strain แล้วคำนวณค่าตามสมการ

$$r_1 = \frac{\text{reciprocal arithmetic titer of reference serum against field virus}}{\text{reciprocal arithmetic titer of reference serum against vaccine virus}}$$

โดยมีหลักเกณฑ์ความหมายของค่า r_1 ดังนี้

$r_1 > 0.3$ = the field virus is sufficiently similar to the vaccine strain และ

$r_1 \leq 0.3$ = the field virus is sufficiently different from the vaccine strain

ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (OIE, 2021 ; Rweyemamu, 1984)

ผล

จากการทดสอบความคุ้มโรคข้ามสเตรนของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดโมโนวาเลนซ์ ไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ต่อเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ สเตรน O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆ และ O₁₆₋₂₀ โดยการฉีดวัคซีนในโคทดลอง 1 ได้ส แล้วฉีดพิษในวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน พบว่า วัคซีนที่ผลิตโดยใช้แอนติเจนสเตรน O₁₈₉ สามารถให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสสเตรน O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆ และ O₁₆₋₂₀ เท่ากับ 100%(5/5), 100%(5/5), 100%(5/5) และ 100%(5/5) ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนไม่เกิดอาการ ขณะที่กลุ่มควบคุมเกิดอาการที่กึ่งเท้าตามมาตรฐานการทดสอบ (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบหาความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (r-value) โดยใช้

ซีรัมโคที่เจาะในวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีนมารวม (pool) กัน แล้วนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี VNT ซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า ความสัมพันธ์ของเชื้อสเตรนที่ใช้ในการผลิตวัคซีน (O_{189}) กับเชื้อสเตรน $O_{chumphon}$, O_{216} และ O_{16-20} เท่ากับ 0.68 ± 0.08 , 0.13 ± 0.04 และ 0.75 ± 0.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สำหรับผลการทดสอบหาระดับแอนติบอดีหลังจากการฉีดวัคซีน 0, 4, 7, 10, 14, 21 และวันที่ 29 หลังฉีดวัคซีนหรือหลังจากได้รับการฉีดพิษหัดแล้ว 8 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีจะสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดว่าเป็นบวกโดยมีค่า $\geq 1.2 \log$ VNT ต่อไวรัสสเตรน O_{189} , $O_{chumphon}$ และ O_{16-20} ในวันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน โดยมีค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ sd) จากโคทั้ง 20 ตัว เท่ากับ 1.92 ± 0.55 , 1.93 ± 0.52 และ $1.56 \pm 0.56 \log$ VNT ตามลำดับ ขณะที่ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสสเตรน O_{216} จะต้องใช้เวลา 10 วัน หลังฉีดวัคซีน และในวันฉีดพิษหัด (วันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน) พบว่า ระดับแอนติบอดีจะอยู่ในเกณฑ์ที่ดี โดยเฉพาะต่อไวรัสสเตรน O_{189} , $O_{chumphon}$ และ O_{16-20} โดยมีค่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ย เท่ากับ 2.00 ± 0.45 , 1.85 ± 0.47 และ $1.90 \pm 0.44 \log$ VNT ตามลำดับ ส่วนระดับแอนติบอดีต่อไวรัสสเตรน O_{216} จะเท่ากับ $1.24 \pm 0.41 \log$ VNT และระดับแอนติบอดีสูงขึ้นเล็กน้อยหลังได้รับการฉีดพิษหัด 8 วัน ขณะที่กลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและไม่มีแอนติบอดีในวันฉีดพิษหัด พบว่า หลังฉีดพิษหัดระดับแอนติบอดี จะสูงมากจากก่อนฉีดพิษหัด ประมาณ $1 \log$ VNT ในไวรัสสเตรน O_{189} , $O_{chumphon}$ และ O_{16-20} ส่วนแอนติบอดีต่อไวรัสสเตรน O_{216} จะสูงขึ้นมาประมาณ $0.5 \log$ VNT (ตารางที่ 3) และเมื่อแยกเป็นกลุ่มย่อย กลุ่มละ 5 ตัว สำหรับฉีดพิษหัดด้วยไวรัสแต่ละสเตรน พบว่า ระดับแอนติบอดีจะมีลักษณะเช่นเดียวกัน (รูปที่ 1)

วิจารณ์

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่าวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ โมโนวาเลนซ์ ไทป์โอ สเตรน O_{189} ที่ใช้ภูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลและซาโปนินเป็นแอดจูแวนท์ จะให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในพื้นที่ของประเทศไทยได้ครอบคลุม ทั้งสเตรน O_{189} , $O_{chumphon}$, O_{216} และ O_{16-20} โดยคุ้มโรค 100% ทุกสเตรน สอดคล้องกับระดับแอนติบอดีจากการทดสอบโดยวิธี VNT เฉลี่ยวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีนหรือในวันฉีดพิษหัด เฉลี่ยเท่ากับ 2.00 ± 0.45 , 1.85 ± 0.47 , 1.24 ± 0.41 และ $1.90 \pm 0.44 \log$ VNT หรือไต่อเตอร์เท่ากับ 1/100, 1/71, 1/17 และ 1/79 ตามลำดับ ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2021) กำหนดไว้ว่า ถ้าค่า $\log$ VNT ≥ 1.20 หรือ 1/16 แสดงว่า เป็นบวกและถ้าค่า $\log$ VNT titer ≥ 1.65 หรือ 1/45 แปลผลเป็นบวก มีระดับแอนติบอดีที่สามารถป้องกันโรคได้ (protective level) และวัคซีนมีคุณสมบัติที่ดีโดยสามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคหรือมีระดับแอนติบอดีสูงและเร็ว (Onset) ต่อไวรัสสเตรน O_{189} , $O_{chumphon}$ และ O_{16-20} ภายใน 7 วัน หลังฉีดวัคซีน ($\log$ VNT ≥ 1.20) ขณะที่แอนติบอดีต่อไวรัสสเตรน O_{216} จะใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1) และระดับแอนติบอดีจะไม่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับสเตรนอื่น

แต่เมื่อพิจารณาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) จากการทดสอบโดยวิธี VNT ตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดว่าไวรัสจะมีความสัมพันธ์กับไวรัสแอนติเจนที่ใช้ในการผสมวัคซีนจะต้องมีค่า $r_1 > 0.3$ และควรทำการรวม (pool) ซีรัมที่ใช้เป็น homologous serum มาใช้ในการหาความสัมพันธ์แทนการใช้เฉพาะตัว (individual serum) (OIE, 2021 ; Rweyemamu, 1984) ซึ่งจะเห็นว่าไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน คือ สเตรน O_{189} จะมีความสัมพันธ์ที่ดีหรือคล้ายกับไวรัส สเตรน $O_{chumphon}$ และ O_{16-20} โดยมีค่าความสัมพันธ์เฉลี่ย เท่ากับ 0.68 ± 0.08 และ 0.75 ± 0.11 ตามลำดับ ขณะที่ไวรัสสเตรน O_{216} จะมีความต่าง ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.16, 0.15 และ 0.08 จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Duque และคณะ (2016) ได้นำวัคซีนที่ประกอบด้วย O_1 Campos และ A_{24} Cruzeiro นำไปฉีดวัคซีนให้โค แบบมีการกระตุ้นและไม่กระตุ้น แล้วฉีดพิษหัดด้วยเชื้อที่คัดเลือกจากพื้นที่ ซึ่งมีค่า r-value โดย

วิธี VNT ระหว่าง 0.158-0.241 ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2021) จะไม่มีความสัมพันธ์กัน (ต้อง $r_1 > 0.3$) พบว่า กลุ่มโคที่มีการกระตุ้นและไม่กระตุ้น วัคซีนจะให้ความคุ้มโรค 90 และ 50% ตามลำดับ ดังนั้น แสดงว่า ถึงแม้เชื้อไวรัสจะมีความแตกต่างกันทางซีรัมวิทยาหรือต่างสเตรนกัน ก็ยังสามารถให้ความคุ้มโรคข้ามสเตรนได้บ้าง แต่จะไม่ครอบคลุมทั้งหมดถ้าจะให้วัคซีนมีความคุ้มโรคกับเชื้อที่ต่างสเตรนด้วย ต้องใช้ high potency vaccine คือ วัคซีนที่ให้ความคุ้มโรค ไม่น้อยกว่า 6PD₅₀/โดส (50% Protective Dose) หรือถ้าใช้วัคซีนปกติที่ใช้ฉีดป้องกันโรคเป็นประจำ ก็ต้องมีการฉีดกระตุ้น (booster) หลังจากฉีดเข็มแรกเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มโรคให้สูงขึ้น (OIE, 2021) ดังนั้น แสดงว่าวัคซีนที่ผสมขึ้นมาโดยใส่ปริมาณแอนติเจน 7 µg/โดส เป็นวัคซีนชนิด high potency vaccine จากผลการฉีดวัคซีนเพียงโดสเดียว ก็สามารถคุ้มโรคได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ ไชยา และคณะ (2559) โดยผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอควียส สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้ภูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลและซาโปนินเป็นแอดจูแวนท์กับแอนติเจนไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146s/โดสที่ต่างกัน พบว่า วัคซีนที่ใส่ปริมาณแอนติเจน 6, 9, 12 และ 18 µg/โดส ให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่ฉีดพิษทับสเตรน O₁₈₉ เท่ากับ 12, 24, 18 และ 12 PD₅₀/โดสตามลำดับ และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Brehm และคณะ (2008) โดยการฉีด high potency vaccine ที่ผลิตจาก A₂₂ Irak/64, A_{Iran}/96 และ A_{Iran}/99 ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กันทางซีรัมวิทยา (r -value < 0.3) แล้วฉีดพิษทับโดยใช้ homologous strain ชนิดเดียวกับที่ผลิตวัคซีนและที่ต่างจากวัคซีน (heterologous strain) พบว่า ถ้าค่า r มีความสัมพันธ์กันมากขึ้น ความคุ้มโรค (PD₅₀ value ก็เพิ่มขึ้นด้วย)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของไวรัสไทป์โอ สเตรนต่างๆในระดับโมเลกุล (Sequence) หรือ Phylogenetic tree พบว่า สเตรน O₁₈₉ เป็นสเตรนที่พบก่อนการจัดลำดับ sequence โดยจะมีความใกล้เคียงกับ O_{chumphon} และ O₂₁₆ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม O/SEA/Myanmar-98 lineage เหมือนกัน ขณะที่สเตรน O₁₆₋₂₀ จะอยู่ในกลุ่ม O/ME-SA/India-2001e lineage (ข้อมูลภายใน, ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย) ในปัจจุบันจะเรียกไวรัสไทป์โอ สเตรน O₂₁₆ ว่า O_{ราชบุรี} และสเตรน O₁₆₋₂₀ ว่า O_{อินเดีย} สำหรับการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยในปัจจุบันส่วนใหญ่ไทป์โอ จะเป็นสเตรน O_{อินเดีย} (ข้อมูลภายใน) ซึ่งวัคซีนที่ผลิตโดย สทช. สามารถป้องกันโรคที่เกิดระบาดในพื้นที่ได้

สรุป

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ใช้แอนติเจนไวรัสไทป์โอ สเตรน O₁₈₉ สามารถใช้ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สเตรน O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆ (O_{ราชบุรี}) และ O₁₆₋₂₀ (O_{อินเดีย}) ที่มีการระบาดในพื้นที่ได้

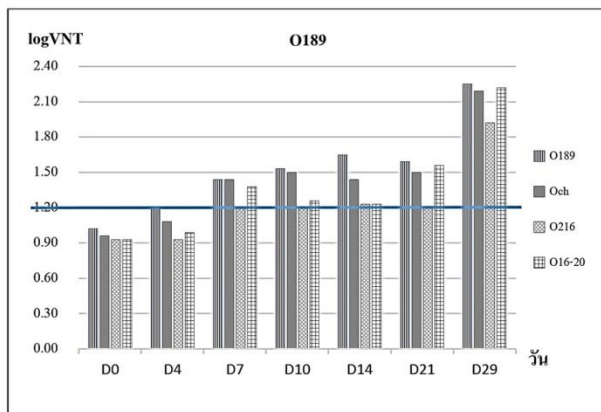
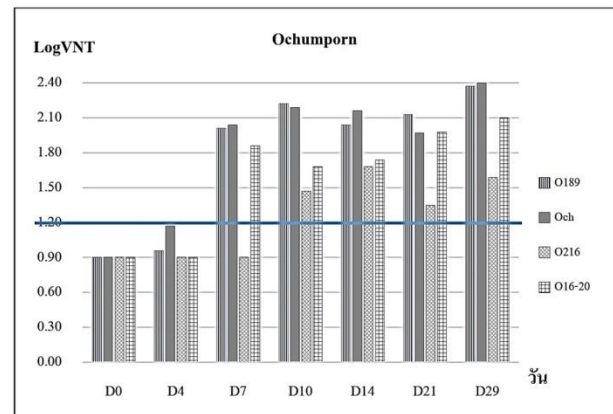
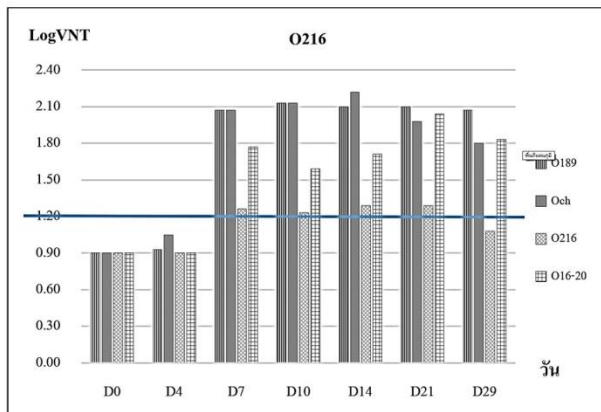
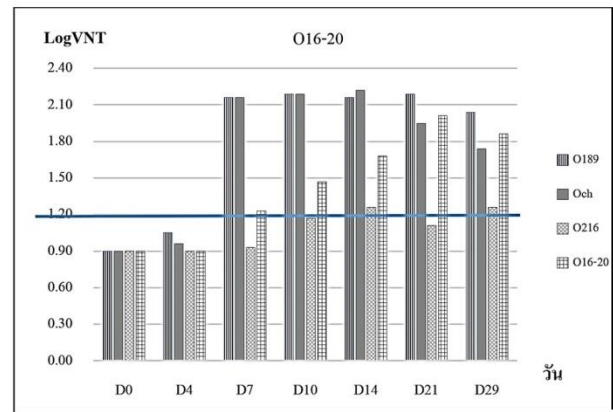
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ได้ช่วยเหลือในการทดสอบในสัตว์ทดลองและการทดสอบตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ (Virus neutralization test, VNT)

เอกสารอ้างอิง

ไชยา สง่าประโคน วรพร ปู่ สูงเนิน สุกิจ ประทุมชัย และร่วมพฤกษ์ อุดล 2559 พัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่ให้ความคุ้มโรคสูง: ความคุ้มโรคในโคภายหลังการฉีดวัคซีนที่ใส่ปริมาณแอนติเจนต่างกัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 25(1-2) : 24-38

- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2558ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทำลายซากสัตว์ (SOP-QCF-053) ฝายทดสอบ
คุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2558ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบความคุ้มโรควัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย
สำหรับโคกระบือ แพะ แกะ (Potency test of FMD vaccine for cattle), SOP-QCF-045. ฝายทดสอบ
คุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หน้า 1-5
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2558ค มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบ Virus neutralization test, SOP-QCF-038.
ฝายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หน้า 1-6
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2020. The AVMA Guideline for the euthanasia of
animal: 2020 edition. Schaumburg, American. pp. 1-121.
- Brehm, K.E., Kumar, N., Thulke, H.H. and Haas, B. 2008. High potency vaccines induce protection against
heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 26(13): 1681-1687.
- Duque, H., Naranjo, J., Carrillo, C., Burbano, A., Vargas, J., Pauszek, L., Olesen, I., Sanchez-Vazquez,
M.J., Cosivi, O. and Allende, R. M. 2016. Protection induced by a commercial bivalent vaccine
against Foot-and-mouth Disease 2010 field virus from Ecuador. *Vaccine* 34: 4140-4144.
- Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive Fur
Expermentelle Pathologie Pharmakologie*. 162: 263-272.
- Konig, G. and Peres-Filgueia, M. 2011. FMD Cross-protection, Vaccine-matching and Vaccine Banks:
Challenges and Opportunities. Buenos Aires, Argentina, June 15th-16th. 1-12.
- Nagendrakumar, S. B., Srinivasan, V. A., Madhanmohan, M., Yuvaraj, S., Parida, S., Di Nardo, A.,
Horsington, J. and Paton, D. J. 2011. Evaluation of cross-protection between O₁ Manisa and
O₁ Campos in cattle vaccinated with foot-and-mouth disease virus vaccine incorporating
different payloads of inactivated O₁ Manisa antigen. *Vaccine* 29: 1906-1912.
- Rweyemamu, M. M. 1978. The selection of vaccine strains of foot and mouth disease virus. *Br. Vet. J.*
134: 63-67.
- Rweyemamu, M. M. 1984. Antigenic variation in foot-and-mouth disease vaccines: studies base on the
virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.* 12: 323-327.
- Udon, R. and Linchongsubongkoch, W. 2006. Antigenic variation of foot and mouth disease virus field outbreak
in Thailand and South East Asia region during 2004-2005. *J. Thai. Med. Assoc.* 57(1): 15-23.
- Udon, R., Aunpromma, D. and Thongtha, P. 2008. Study on serological correlation of foot and mouth
disease virus isolated from Thailand, Cambodia, Laos PDR and Vietnam during 2006-2007.
Thai-NIAH eJornal. 3(1): 52-60.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2021. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of diagnostic
tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 1-31.

1A: ฉีดพิษหัด O₁₈₉1B : ฉีดพิษหัด O_{chumpon}1C : ฉีดพิษหัด O₂₁₆1D : ฉีดพิษหัด O₁₆₋₂₀

รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ โมโนวาเลนทไทป์ O₁₈₉ ต่อ O₁₈₉, O_{chumpon}, O₂₁₆ และ O₁₆₋₂₀ วันที่ 0, 4, 7, 10, 14, 21 และ 29 หลังฉีดวัคซีน หรือ 8 วันหลังฉีดพิษหัด (แยกตามกลุ่มฉีดพิษหัด, n=5/กลุ่ม)

Cross protection of the O₁₈₉ strain of foot and mouth disease vaccine for cattle buffalo sheep and goat against to the serotype O field strain

Marutpong Pumpuang¹

Chaiya Sangapraphon¹

Abstract

Backgrounds : Foot and mouth disease (FMD) is a highly virulent and rapidly spreading viral disease. This creates a huge economic impact on livestock such as cattle, dairy cattle and pigs. In Thailand, an outbreak of foot and mouth disease is annually of type O and A, when an outbreak occurs there will be a collection of viruses to prove the type and strain. So that the vaccine can be used for control or reduce the epidemic to be in a limited range. The objective of this research was to study the cross-protection of foot-and-mouth disease vaccine for cattle buffalo sheep and goat when using the antigen O₁₈₉ strain into the vaccine for prevention of the O field strain.

Methods : Mixing a monovalent vaccine O₁₈₉ using aluminum hydroxide gel and saponins as adjuvants. They were vaccinated in 20 cows, 1 dose (2 ml each) and 8 non-vaccinated controls. In 21 days after vaccinated, the vaccinated cows were divided into 4 groups of 5, and 2 of controls and sent them into the controlled air-controlled test pens. Challenged all cattle in any group with the fmd virus strain O₁₈₉ or O_{chumphon} or O₂₁₆ or O₁₆₋₂₀, observed symptoms and examined for 8 days to find the percentage of protection. Blood collected on 0, 4, 7, 10, 14, 21 and 29 days after vaccination. Antibody levels and serological relationships (r-value) were determined by virus neutralization test (VNT).

Results : The O₁₈₉ strain of foot and mouth disease vaccine gave 100% protection against the viruses tested for O_{chumphon}, O₂₁₆ and O₁₆₋₂₀ with mean r_1 values of 0.68 ± 0.08 , 0.13 ± 0.04 and 0.75 ± 0.11 , respectively. The vaccine was able to stimulate immunity against strains O₁₈₉, O_{chumphon} and O₁₆₋₂₀ as early as 7 days after vaccination. While the virus strains O₂₁₆ takes 10 days.

Conclusion: foot-and-mouth disease vaccine for cattle buffalo sheep and goat when using the antigen O₁₈₉ strain can be vaccinated to prevent and control the O₁₈₉, O_{chumphon}, O₂₁₆(O_{ratchaburi}) and O₁₆₋₂₀(O_{india}) field strain.

Keywords: Cross protection, Foot and mouth disease vaccine, O₁₈₉ strain, Field strain

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย
ระหว่างการทดสอบโดยวิธีลิควิดเฟสบล็อกกิ้งอีไลซ่า และไวรัสนิวทรัลไลเซชัน

ไชยา ส่งาประโคน¹ มารุตพงศ์ พุ่มพวง¹

บทคัดย่อ

ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยนำซีรัมสัตว์จากการทดสอบความปลอดภัย การทดสอบความคุ้มโรค การทดสอบหาระยะความคุ้มโรค การทดสอบหาการปนเปื้อนนอนสตรัค-เจอร์โปรตีนในวัคซีน และจากการทดสอบหาระยะภูมิคุ้มกันจากการกักและเคลื่อนย้ายสัตว์ ไปทดสอบด้วยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP-ELISA) ที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และวิธี Virus neutralization test (VNT) ที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จำนวนตัวอย่าง 915 ตัวอย่าง (โค กระบือ 480 ตัวอย่าง, สุกร 435 ตัวอย่าง) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทยโอ, เอ, เอเชีย1 และรวม 3 ไทยป์ ทั้งโค กระบือและสุกร เท่ากับ 0.9756, 0.9854, 0.9656 และ 0.9882 ตามลำดับ และถ้าแยกเฉพาะในโค กระบือ จะเท่ากับ 0.9259, 0.9770, 0.9431 และ 0.9607 ตามลำดับ ขณะที่สุกร ค่า r จะเท่ากับ 0.9586, 0.9501, 0.9586 และ 0.9893 ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าระดับแอนติบอดีโดยวิธี VN test ที่จะทำให้ความคุ้มโรคตามมาตรฐาน OIE เมื่อเทียบกับ ค่า LP-ELISA ที่ $\log ELISA = 1.90$ หรือ 1:80 ต่อไวรัสไทป์โอ, เอ ,เอเซีย1 และรวม 3 ไทป์ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้สมการเชิงเส้นตรงที่ได้ พบว่า ในโค กระบือ เท่ากับ 1.75 (1:56), 1.56 (1: 36), 1.77 (1:59) และ 1.69 (1:49) ตามลำดับ ขณะที่ ในสุกร จะเท่ากับ 0.92 (1:8), 1.30 (1:20), 1.42 (1:26) และ 1.21 (1:16) ตามลำดับ และเมื่อรวมทั้งโค กระบือ และสุกร จะเท่ากับ 1.31 (1:20), 1.42 (1:26), 1.56 (1:36) และ 1.43 (1:27) ตามลำดับ

คำสำคัญ: ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี ระดับแอนติบอดี โรคปากและเท้าเปื่อย
 ลีควิดเฟสบล็อกกิ้งอีไลซ่า การทดสอบไวรัสนิวทริลไลเซชัน

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่มีความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์กบฏ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสุกร ส่งผลให้เกิดความสูญเสียรายได้ทางเศรษฐกิจในด้านการส่งออก เนื่องจากต่างประเทศใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้าทำให้ไม่สามารถส่งสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังต่างประเทศได้ เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคคือ Aphthovirus ซึ่งอยู่ในตระกูล Picornavirus มี 7 ซีโรไทป์ คือ โอ(O), เอ(A), เอเชีย1(Asia1), ซี(C), แชนท1(SAT1), แชนท2(SAT2) และ แชนท3(SAT3) สำหรับประเทศไทยมีการระบาด 3 ซีโรไทป์ คือ โอ, เอ และ เอเชีย1 โรคปากและเท้าเปื่อยสามารถติดต่อกันได้โดยตรงจากการสัมผัสกับสัตว์ป่วยหรือสิ่งคัดหลั่งปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้นกับอุณหภูมิและสภาพอากาศ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำและความชื้นสูง (Leech F.B., 1981) สัตว์ป่วยที่เป็นโรคแล้ว จะมีสภาพเป็นตัวอมโรค (carrier) ถึง 50% ได้นานถึง 9 เดือน โดยเฉพาะโคและกระบือ (Salt J.S., 1993) ซึ่งยาวนานกว่าสัตว์ชนิดอื่น การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหรือระดับแอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละชนิดของเชื้อไวรัสไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้าม ซีโรไทป์ได้ (Sutmoller and Vieira, 1980) นอกจากนี้ยังขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สุขภาพของตัวสัตว์ การตอบสนองของระดับแอนติบอดี การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ รวมถึงชนิดของวัคซีน (Doel, 1999) เพื่อให้การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ คือ วิธีการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และปฏิบัติตามกฎระเบียบอย่างเคร่งครัด กรมปศุสัตว์จึงมีโครงการรณรงค์การฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยในโค-กระบือ ในพื้นที่ปีละ 2 ครั้ง ให้ครอบคลุมไม่น้อยกว่า 80% ของประชากรสัตว์ทั่วประเทศ สำหรับสุกร อาจมีการฉีดวัคซีนมากกว่าปีละ 2 ครั้ง โดยเฉพาะฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์และขึ้นอยู่กับการระบาดหรือความชุกของโรคในพื้นที่

การสำรวจหรือทดสอบทางซีรั่มวิทยา (serological tests) โรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อประโยชน์ในการซื้อหรือขายสัตว์ ยืนยันการเกิดโรค ลดการติดเชื้ และศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน (OIE, 2021) มี 2 แบบ คือ การหาแอนติบอดีต่อ viral structural protein (SP) และ viral non-structural protein (NSP) โดยการทดสอบแอนติบอดีต่อ SP จะมีความจำเพาะ (serotype-specific) และความไวสูง (highly sensitive) แต่ไม่สามารถใช้แยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ที่ติดเชื้ได้ ได้แก่ การทดสอบโดยวิธี virus neutralization test (VNT) หรือ serum neutralization test (SNT) ซึ่งอาศัยหลักการที่แอนติบอดีบางชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับอนุภาคไวรัส และจะทำลายคุณสมบัติ (neutralize) เกี่ยวกับ infectivity ของไวรัส ต้องมีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัสมีชีวิตในการทดสอบ และวิธี Liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay (LP-ELISA) ใช้หลักการ antigen-antibody complex โดยดัดแปลงมาจากวิธี complement-fixation test (CF) ซึ่งวิธีนี้ไม่มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัสมีชีวิตในการทดสอบ ทำให้มีการนำไปใช้ในการทำ screening หรือ monitoring การระบาดของโรคได้สะดวกกว่า VNT สำหรับการทดสอบแอนติบอดีต่อ NSP เป็นการทดสอบที่ไม่จำเพาะ (non-serotype specific) โดยปัจจุบันใช้ในการแยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจากสัตว์ที่ติดเชื้ ใช้หลักการ ELISA เช่นกัน

จากข้อจำกัดของการทดสอบโดยวิธี VNT ที่ต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงและไวรัสมีชีวิตในการทดสอบ จำเป็นต้องมีการควบคุม เพื่อไม่ให้เชื้อแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ในประเทศไทยมีการทดสอบโดยวิธีนี้ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ขณะที่การทดสอบโดยวิธี LP-ELISA มีการทดสอบที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยแห่งภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ซึ่งเป็นสมาชิกของ OIE

reference laboratories for FMD รวมทั้งศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ตามภาคต่างๆ และมหาวิทยาลัยบางแห่ง ดังนั้นเพื่อให้การทดสอบ VNT ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ได้มาตรฐาน โดยการเทียบเคียงหรืออ้างอิงค่าที่ถูกต้อง จึงต้องการเปรียบเทียบค่าแอนติบอดีที่ได้จากการทดสอบโดยวิธีนี้กับวิธี LP-ELISA ที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย แห่งภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดี (antibody titer) ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี Liquid phase blocking (LP) ELISA และ Virus neutralization test (VNT) สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหา ระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ในพื้นที่ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนการฉีดวัคซีนและควบคุมโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างซีรัม

เป็นตัวอย่างซีรัมสัตว์ ที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 915 ตัวอย่าง (โค 473 ตัวอย่าง กระบือ 7 ตัวอย่าง และสุกร 435 ตัวอย่าง) ดังนี้

1.1 ซีรัมโคและสุกรที่ได้จากการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (Safety test) โดยการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับสุกร ปริมาณ 2 เท่าของโดสปกติ หลังการฉีดวัคซีน 14 วัน จำนวน 94 ตัวอย่าง (โค 58, สุกร 36)

1.2 ซีรัมโคและสุกรที่ได้จากการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (Potency test) โดยการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ แบบลดโดส (1, 1/4 และ 1/16 เท่าของโดสปกติ) หลังฉีดวัคซีน 21 วัน และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับสุกร ในขนาดโดสปกติ หลังการฉีดวัคซีน 28 วัน จำนวน 159 ตัวอย่าง (โค 107, สุกร 52)

1.3 ซีรัมโคและสุกรที่ได้จากการทดสอบหาระยะความคุ้มโรคของวัคซีนของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (Duration of immunity) โดยการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ และ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับสุกร ปริมาณโดสปกติและมีการกระตุ้นซ้ำ จำนวน 35 ตัวอย่าง (โค 12, สุกร 23)

1.4 ซีรัมโคและสุกรที่ได้จากโครงการวิจัยการปนเปื้อนนอนสตรัคเจอร์โปรตีนในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ จำนวน 3 ชุดการผลิตและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ สำหรับสุกร จำนวน 3 ชุดการผลิต ปริมาณ 2 เท่าของโดสปกติและมีการกระตุ้นซ้ำ ในขนาด 2 เท่าของโดสปกติ ทุก 4 สัปดาห์ รวมฉีด 5 ครั้ง หรือ 10 โดส จำนวน 597 ตัวอย่าง (โค 273, สุกร 324)

1.5 ซีรัมสัตว์จากท้องที่ซึ่งได้จากการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันโรคจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จากการกัก และเคลื่อนย้าย จำนวน 30 ตัวอย่าง (โค 23, กระบือ 7)

2. การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

2.1 การตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Viral neutralization test (VNT)

ตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ, เอ, เอเชีย1 (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558; OIE, 2021) โดยนำซีรัมที่ต้องการตรวจสอบหาระดับแอนติบอดีมา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาที

แล้วนำมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัส ปริมาตรที่เท่ากับซีรัม คือ 50 μ l ซึ่งมีความรุนแรง 100TCID₅₀ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 5% CO₂ Incubator หลังจากนั้นเติม secondary lamb kidney cells หลุมละ 150 μ l อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อ่านผลพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE) คำนวณค่า logVNT titer ตามวิธีของ Karber (1931)

2.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ SP โดยวิธี LP-ELISA

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซีย 1 โดยวิธี indirect double antibody sandwich ELISA (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ, 2554; OIE, 2021) โดยการ coat Rabbit anti-FMDV ลงใน flat-bottomed microplate เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C เตรียม virus-serum mixture ใน U-shape microplate แยกแต่ละไทป์ โดยเจือจางซีรัมแบบ 2-fold dilution และเติมไวรัสที่มีความเข้มข้นคงที่ (มีค่า 50% ของ OD_{max} ที่ 450nm. มีค่า = 1.5 จากการทำ antigen titration) ในปริมาตรที่เท่ากัน คือ 50 μ l นำไปเขย่าค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C ถ่ายสารละลาย virus-serum mixture จาก U-shape microplate ไปยัง flat-bottomed microplate ซึ่ง coat Rabbit anti-FMDV และล้างด้วย PBS แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม Guinea pig anti-FMDV serum ซึ่ง block ด้วย normal bovine serum นำไปเขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS หลังจากนั้นเติม anti guinea pig IgG-HRP conjugate เขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม substrate หลุมละ 100 μ l ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของ substrate ด้วย 1M H₂SO₄ หลุมละ 50 μ l นำไปอ่านค่า Optical density(OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่าแอนติบอดีตามวิธีของ Hamblin et al. (1986)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ sd) ของระดับแอนติบอดี(antibody titer) รวมทั้งหาความสัมพันธ์ (linear regression, r) จากการทดสอบโดยวิธี LP-ELISA และ VNT ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ และ เอเซีย 1 โดยกำหนดค่า LP-ELISA เป็นตัวแปรคงที่ และค่า VNT เป็นตัวแปรตาม

ผล

จากการรวบรวมและเปรียบเทียบผลการทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี LP-ELISA และ VNT พบว่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอ เอเซีย 1 ของซีรัมโค กระบือ จำนวน 480 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ sd) จากการทดสอบโดยวิธี VNT ต่อ logLP-ELISA titer ดังตารางที่ 1 และมีค่าเฉลี่ยต่อไวรัสทั้ง 3 ไทป์ ต่อ logLP-ELISA titer (log 1.6, 1.9, 2.2, 2.5, 2.8, 3.1, 3.4, 3.7) เท่ากับ 1.09 $\pm$ 0.08, 1.77 $\pm$ 0.06, 2.04 $\pm$ 0.28, 2.43 $\pm$ 0.23, 2.75 $\pm$ 0.23, 2.85 $\pm$ 0.34, 3.02 $\pm$ 0.30 และ 3.11 $\pm$ 0.18 logVNT ตามลำดับ ขณะที่ในสุกรจำนวน 435 ตัวอย่าง จะมีค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ sd) ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอ เอเซีย 1 จากการทดสอบโดยวิธี VNT ต่อ logLP-ELISA titer (ตารางที่ 2) และมีค่าเฉลี่ยต่อไวรัสทั้ง 3 ไทป์ ต่อ logLP-ELISA titer เท่ากับ 0.79 $\pm$ 0.04, 1.24 $\pm$ 0.18, 1.55 $\pm$ 0.34, 1.87 $\pm$ 0.44, 2.02 $\pm$ 0.45, 2.20 $\pm$ 0.46, 2.45 $\pm$ 0.33 และ 2.70 $\pm$ 0.31 logVNT ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยของซีรัมโค กระบือ และสุกร จำนวน 915 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3 รวมทั้งมีค่าเฉลี่ยต่อไวรัสทั้ง 3 ไทป์ ต่อ logLP-ELISA titer เท่ากับ 0.94 $\pm$ 0.05, 1.52 $\pm$ 0.08, 1.80 $\pm$ 0.27, 2.09 $\pm$ 0.31, 2.34 $\pm$ 0.27, 2.63 $\pm$ 0.27, 2.88 $\pm$ 0.28 และ 3.06 $\pm$ 0.17 logVNT ตามลำดับ

ผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง(linear regression, r) ของระดับแอนติบอดี โดยวิธี LP-ELISA และ VNT ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ พบว่า ค่า r ของซีรัมโค กระบือ จำนวน 480 ตัวอย่าง เท่ากับ 0.9259, 0.9770, 0.9431 และ 0.9607 ตามลำดับ (รูปที่ 1 และตารางที่ 4) ขณะที่สุกร จำนวน 435 ตัวอย่าง ค่า r จะเท่ากับ 0.9586, 0.9501, 0.9586 และ 0.9893 ตามลำดับ (รูปที่ 2 และตารางที่ 4) และค่า r ของซีรัมโค กระบือและสุกร จำนวน 915 ตัวอย่าง จะมีค่าเท่ากับ 0.9756, 0.9854, 0.9656 และ 0.9882 ตามลำดับ (รูปที่ 3 และตารางที่ 4)

วิจารณ์

จากการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง(linear regression) ระหว่างระดับแอนติบอดี โดยวิธี LP-ELISA และ VNT ของซีรัมโค กระบือและสุกร จำนวน 915 ตัวอย่าง ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ จะมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์(correlation coefficient, r) ระหว่าง 0.97-0.99 และถ้าแยกเฉพาะโค กระบือ จำนวน 480 ตัวอย่าง ค่า r จะอยู่ระหว่าง 0.93-0.98 ขณะที่สุกร จำนวน 435 ตัวอย่าง ค่า r จะอยู่ระหว่าง 0.95-0.99 ซึ่งจะเห็นว่าความสัมพันธ์ในสุกรจะสูงกว่าของโค กระบือ และความสัมพันธ์รวมของทั้งโค กระบือ และสุกร จะมีความสัมพันธ์กันสูงมากกว่าการแยกรายชนิดสัตว์(ตารางที่ 4) และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีที่จะให้ความคุ้มครองตามมาตรฐาน OIE (2021) จากการทดสอบโดยวิธี VNT เทียบกับวิธี LP-ELISA ต้องมีค่า LP-ELISA ที่ $\log_{ELISA} \geq 1.90$ หรือ 1:80 จะมีค่าเฉลี่ยต่อไวรัสไทป์ โอ เอ เอเซีย 1 และ 3 ไทป์ ในโค กระบือ เท่ากับ 1.73 ± 0.79 , 1.74 ± 0.89 , 1.83 ± 1.06 และ $1.77 \pm 0.06 \log_{VNT}$ ตามลำดับ สำหรับสุกรจะมีค่าเฉลี่ยต่อไวรัสไทป์ โอ เอ เอเซีย 1 และ 3 ไทป์ เท่ากับ 1.05 ± 0.43 , 1.27 ± 0.59 , 1.41 ± 0.71 และ $1.24 \pm 0.18 \log_{VNT}$ ตามลำดับ ซึ่งตามมาตรฐาน OIE(2021) กำหนดค่าแอนติบอดีจากการทดสอบโดยวิธี VNT ต้องมีค่า $\log_{VNT} \geq 1.20$ หรือ 1:16 ขึ้นไป และถ้า $\log_{VNT} \geq 1.65$ หรือ 1:45 ถือว่ามีระดับแอนติบอดีในระดับที่ป้องกันโรคได้(protective level) จะเห็นว่าในโค กระบือ ค่าแอนติบอดีที่ได้จะให้ความคุ้มครองได้ แต่ในสุกรจะต่ำกว่ามาตรฐานกำหนด

ทั้งนี้ นพพร และคณะ (2543) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลลิงแอนติบอดีและเปอร์เซ็นต์ความคุ้มครองภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร พบว่า ระดับของแอนติบอดีที่จะให้ความคุ้มครอง 100% โดยวิธี VN test ต่อไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเซีย 1 ในโค เท่ากับ 1.83, 1.79 และ 2.16 ตามลำดับ ขณะที่ในสุกร จะเท่ากับ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ โดยมีค่า r ของทุกไทป์ มากกว่า 0.91 ขณะที่ วิไล และคณะ (2543) ได้ศึกษาระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มครองในโคและสุกรภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี LP-ELISA พบว่า ระดับของแอนติบอดีที่โตเตอร์ที่จะให้ความคุ้มครองต่อไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเซีย 1 ในโค เท่ากับ 1.982 ± 0.611 (1:96), 2.332 ± 0.464 (1:214) และ 2.00 ± 0.514 (1:100) ตามลำดับ ขณะที่ในสุกร จะเท่ากับ 1.925 ± 0.545 (1:84), 1.950 ± 0.491 (1:90) และ 1.861 ± 0.588 (1:72) ตามลำดับ และตามมาตรฐานขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (OIE, 2021) ได้กำหนดค่าระดับแอนติบอดี จากการทดสอบโดยวิธี VN test ดังนี้ ค่า $\log_{VNT} < 1.2$ หรือ 1:16 แปลผลเป็นลบ คือ ไม่มีแอนติบอดี, ค่า $\log_{VNT} \geq 1.2$ หรือ 1:16 แปลผลเป็นบวก คือ มีแอนติบอดี และค่า $\log_{VNT} \geq 1.65$ หรือ 1:45 แปลผลเป็นบวก คือ มีแอนติบอดีระดับ protective titer ขณะที่ถ้าทดสอบโดยวิธี LP-ELISA กำหนดดังนี้ ถ้าค่า $\log_{ELISA} \leq 1.60$ หรือ 1:40 แปลผลเป็นลบ คือ ไม่มีแอนติบอดี และค่า $\log_{ELISA} \geq 1.90$ หรือ 1:80 แปลผลเป็นบวก คือ มีแอนติบอดีระดับ protective titer ซึ่งกำหนดสำหรับทุกไทป์ ทั้งโคและสุกร

จะเห็นได้ว่าระดับแอนติบอดีโดยวิธี VN test ที่จะทำให้ความคุ้มโรคตามมาตรฐาน OIE เมื่อเทียบกับ ค่า LP-ELISA ที่ $\log\text{ELISA} = 1.90$ หรือ 1:80 ต่อไวรัสไทป์โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คำนวณโดยใช้สมการเชิงเส้นตรงจากตารางที่ 4 พบว่า เมื่อแทนค่า X ด้วย $\log\text{ELISA} = 1.90$ จะได้ค่า Y หรือค่า $\log\text{VNT}$ ในโค กระบือ เท่ากับ 1.75 (1:56), 1.56 (1:36), 1.77 (1:59) และ 1.69 (1:49) ตามลำดับ ขณะที่ในสุกร จะเท่ากับ 0.92 (1:8), 1.30 (1:20), 1.42 (1:26) และ 1.21 (1:16) ตามลำดับ และเมื่อรวมทั้งโค กระบือ และสุกร จะเท่ากับ 1.31 (1:20), 1.42 (1:26), 1.56 (1:36) และ 1.43 (1:27) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าที่กำหนด ทั้งนี้ทางคณะผู้ศึกษาซึ่งปฏิบัติงานเกี่ยวกับการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีโดย VN test กับความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จากการทดสอบวัคซีนปี 2551-2554 (ไม่มีการตีพิมพ์) พบว่า วัคซีนสำหรับโค-กระบือ ถ้าระดับแอนติบอดี $\log\text{VNT} < 1.2$ จะให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ และเอเซีย 1 เท่ากับ 5/24 (20.83%), 15/36 (41.67%) และ 4/6 (66.67%) ตามลำดับ และถ้าระดับแอนติบอดี $\log\text{VNT} \geq 1.2$ จะให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 26/35 (74.29%), 21/24 (87.50%) และ 43/54 (79.63%) ตามลำดับ สำหรับความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรพบว่าถ้าระดับแอนติบอดี $\log\text{VNT} < 1.2$ จะให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 44/49 (89.80%), 21/24 (87.50%) และ 14/14 (100%) ตามลำดับ และถ้าระดับแอนติบอดี $\log\text{VNT} \geq 1.2$ จะให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 4/4 (100%), 28/29 (96.55%) และ 39/39 (100%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการหาความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีจากการทดสอบโดยวิธี VN test และ LP-ELISA เท่านั้น ไม่ได้บ่งชี้หรือศึกษาถึงความสามารถในการป้องกันโรค

สรุป

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ โดยวิธี VNT และ LP-ELISA ของซีรัมโค กระบือและสุกร จะมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ทุกไทป์มากกว่า 0.92 โดยค่า r เท่ากับ 0.9756, 0.9854, 0.9656 และ 0.9882 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ามีความสัมพันธ์กันสูง และถ้าแยกเฉพาะโค กระบือ ค่า r จะเท่ากับ 0.9259, 0.9770, 0.9431 และ 0.9607 ตามลำดับ ขณะที่สุกร ค่า r จะเท่ากับ 0.9586, 0.9501, 0.9586 และ 0.9893 ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้ความช่วยเหลือในการดูแลสัตว์ทดลอง ตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี VNT และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี LP-ELISA

เอกสารอ้างอิง

- นพพร พัฒนประสิทธิ์ สมเกียรติ เพชรวานิชกุล และวิไล ลินจงสุขงกช 2543 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิงแอนติบอดีและเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2): 29-39
- วิไล ลินจงสุขงกช อนุโรจน์ ภูศิริมงคล สมเกียรติ เพชรวานิชกุล ร่มพฤกษ์ อุดล 2543 ศึกษาการระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรคในโคและสุกรภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีลิควิดเฟส บล็อกกิ้ง อีไลซ่า วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2): 41-49

- ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2554 วิธีทดสอบ การตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Measurement of antibody titer of foot and mouth disease virus) ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์.ฉบับที่ 4: 1-17
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2558 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน : การทดสอบ Virus neutralization test,SOP-QCF-038. ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หน้า 1-6
- Hamblin C., Barnett I.T.R. and Hedger R.S. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. J. Immunol. Methods, 93: 115-121.
- Karber G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive fur Expermentelle Pathologie Pharmarkologie. 162: 263-272.
- Sutmoller, P. and Vieira, A.1980. The relationship of neutralizing antibody titer for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. Biol. Cent. Panam. Fiebre Aphtosa. 57: 39-40.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2021. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 1-31.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย (mean± sd) ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเชีย1 และรวม 3 ไทป์ โดยวิธี VNT ต่อ LP-ELISA titer ของซีรัมโค กระบือ จำนวน 480 ตัวอย่าง

Type	logLP-ELISA titer (number of samples)							
	1.60 (1:40)	1.90 (1:80)	2.20 (1:160)	2.50 (1:320)	2.80 (1:640)	3.10 (1:1,280)	3.40 (1:2,560)	3.70 (1:5,120)
O	1.17±0.84 (88)	1.73±0.79 (49)	2.01±0.60 (65)	2.55±0.59 (56)	2.86±0.52 (61)	2.98±0.52 (84)	3.13±0.42 (59)	2.91±0.51 (18)
A	1.11±0.83 (96)	1.74±0.89 (68)	1.78±0.65 (74)	2.17±0.61 (55)	2.49±0.57 (68)	2.47±0.57 (63)	2.67±0.52 (33)	3.12±0.40 (23)
Asia1	1.00±0.78 (53)	1.83±1.06 (19)	2.34±0.89 (52)	2.58±0.65 (68)	2.90±0.52 (90)	3.10±0.52 (82)	3.25±0.33 (71)	3.28±0.27 (45)
O+A+Asia1	1.09±0.08 (237)	1.77±0.06 (136)	2.04±0.28 (191)	2.43±0.23 (179)	2.75±0.23 (219)	2.85±0.34 (229)	3.02±0.30 (163)	3.11±0.18 (86)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean± sd) ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเชีย1 และรวม 3 ไทป์ โดยวิธี VNT ต่อ LP-ELISA ของซีรัมสุกร จำนวน 435 ตัวอย่าง

Type	logLP-ELISA titer (number of samples)							
	1.60 (1:40)	1.90 (1:80)	2.20 (1:160)	2.50 (1:320)	2.80 (1:640)	3.10 (1:1,280)	3.40 (1:2,560)	3.70 (1:5,120)
O	0.76±0.36 (110)	1.05±0.43 (38)	1.20±0.51 (69)	1.40±0.47 (98)	1.52±0.53 (76)	1.72±0.50 (31)	2.18±0.89 (8)	2.87±0.72 (5)
A	0.84±0.48 (76)	1.27±0.59 (41)	1.59±0.62 (55)	1.93±0.60 (75)	2.13±0.52 (110)	2.23±0.52 (55)	2.36±0.57 (20)	2.34±0.62 (3)
Asia1	0.79±0.38 (67)	1.41±0.71 (31)	1.88±0.59 (56)	2.28±0.56 (68)	2.40±0.67 (97)	2.65±0.56 (64)	2.82±0.43 (46)	2.90±0.47 (6)
O+A+Asia1	0.79±0.04 (253)	1.24±0.18 (110)	1.55±0.34 (180)	1.87±0.44 (241)	2.02±0.45 (283)	2.20±0.46 (150)	2.45±0.33 (74)	2.70±0.31 (14)

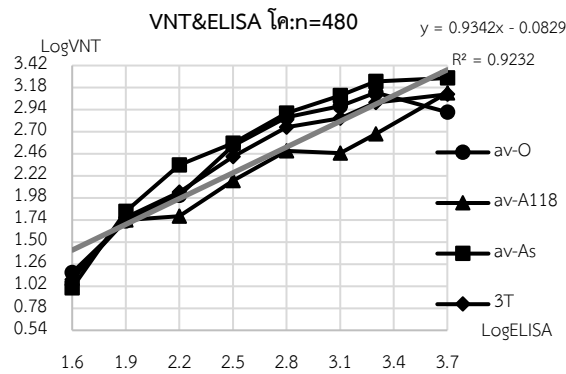
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย (mean± sd) ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเซีย1 และรวม 3 ไทป์ โดยวิธี VNT ต่อ LP-ELISA ของซีรัมโค กระบือ และสุกร จำนวน 915 ตัวอย่าง

Type	logLP-ELISA titer (number of samples)							
	1.60 (1:40)	1.90 (1:80)	2.20 (1:160)	2.50 (1:320)	2.80 (1:640)	3.10 (1:1,280)	3.40 (1:2,560)	3.70 (1:5,120)
O	0.94±0.65 (198)	1.43±0.73 (87)	1.59±0.73 (134)	1.82±0.76 (154)	2.12±0.87 (137)	2.64±0.76 (115)	3.01±0.58 (67)	2.90±0.54 (23)
A	0.99±0.70 (172)	1.56±0.81 (109)	1.70±0.65 (129)	2.03±0.63 (130)	2.27±0.58 (178)	2.36±0.56 (118)	2.56±0.55 (53)	3.03±0.49 (26)
Asia1	0.88±0.60 (120)	1.57±0.88 (50)	2.10±0.80 (108)	2.43±0.76 (136)	2.64±0.70 (187)	2.90±0.58 (146)	3.08±0.43 (117)	3.24±0.32 (51)
O+A+Asia1	0.94±0.05 (490)	1.52±0.08 (246)	1.80±0.27 (371)	2.09±0.31 (420)	2.34±0.27 (502)	2.63±0.27 (379)	2.88±0.28 (237)	3.06±0.17 (100)

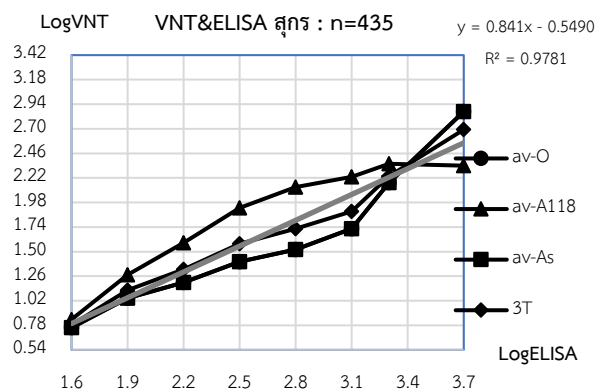
ตารางที่ 4 แสดงสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง(linear regression) และค่าสัมประสิทธิ์(correlation coefficient, r) ระหว่างค่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ, เอเซีย1 และรวม 3 ไทป์ โดยวิธี VNT และ LP-ELISA ของซีรัมโค กระบือ และสุกร

ชนิดสัตว์	ไทป์	สมการเชิงเส้นตรง linear regression, $y = bx+a$	correlation coefficient, r	จำนวน ตัวอย่าง
โค กระบือ	โอ	$Y = 0.9050X + 0.0286$	0.9259	480
	เอ	$Y = 0.8596X - 0.0741$	0.9770	
	เอเชีย1	$Y = 1.0378X - 0.2031$	0.9431	
	รวม 3 ไทป์	$Y = 0.9342X - 0.0829$	0.9607	
สุกร	โอ	$Y = 0.8961X - 0.7773$	0.9586	435
	เอ	$Y = 0.7308X - 0.0923$	0.9501	
	เอเชีย1	$Y = 0.9861X - 0.7773$	0.9586	
	รวม 3 ไทป์	$Y = 0.8410X - 0.5490$	0.9893	
โค กระบือ และสุกร	โอ	$Y = 1.0087X - 0.6043$	0.9756	915
	เอ	$Y = 0.8721X - 0.2393$	0.9854	
	เอเชีย1	$Y = 1.0789X - 0.4904$	0.9656	
	รวม 3 ไทป์	$Y = 0.9866X - 0.4447$	0.9882	

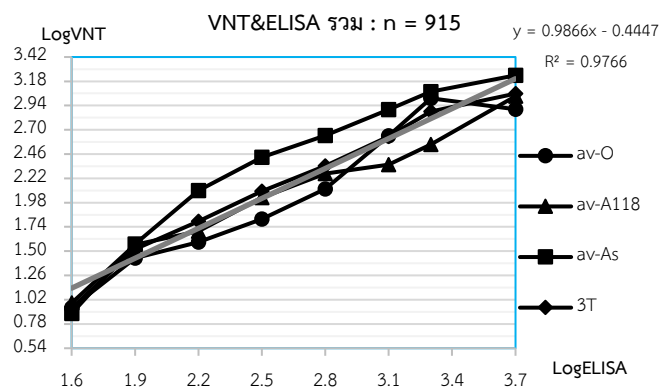
X = logELISA titer, Y = logVNT titer



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี VNT และ LP-ELISA ของซีรัมโค กระบือ จำนวน 480 ตัวอย่าง



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี VNT และ LP-ELISA ของซีรัมสุกร จำนวน 435 ตัวอย่าง



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซีย 1 และรวม 3 ไทป์ และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของทั้ง 3 ไทป์ โดยวิธี VNT และ LP-ELISA ของซีรัมโค กระบือ และสุกร จำนวน 915 ตัวอย่าง

The Relationship of Foot and Mouth Disease antibody titer between using the Liquid phase blocking ELISA and Virus neutralization test

Chaiya Sangapraphon¹

Marutphong Pumpaung¹

Abstract

Study the relationship of Foot and Mouth Disease Virus antibody titer levels to serotype O, A, Asia1 and 3 types between using the Virus neutralization test (VNT) was tested at the Bureau of Veterinary Biologics and the other used the Liquid phase blocking ELISA (LP-ELISA) at the Regional Reference Laboratory of FMD in South East Asia in 915 samples (480 cattle with buffalo and 435 pigs) from safety test, potency test, duration of immunity, non-structural protein (NSP) test of vaccine and field samples. Found that the correlation coefficient (r) was 0.9756, 0.9854, 0.9656 and 0.9882 respectively. And when we separated the animals, In cattle and buffalo 480 samples were 0.9259, 0.9770, 0.9431 and 0.9607 respectively. While pigs were 0.9586, 0.9501, 0.9586 and 0.9893 respectively.

And when were compared the neutralizing antibody titer to serotype O, A, Asia1 and 3 types between the VNT with the protective titer following the OIE standard at logELISA = 1.90 or 1:80 by using the linear regression. Found that the cattle and buffalo were 1.75 (1:56), 1.56 (1:36), 1.77 (1:59) and 1.69 (1:49) respectively. In pigs were 0.93 (1:8), 1.30 (1:20), 1.42 (1:26) and 1.21 (1:16) respectively. And all animals were 1.31 (1:20), 1.42 (1:26), 1.56 (1:36) and 1.43 (1:27) respectively.

Keywords: Relationship of antibody titer, Antibody titer, Foot and mouth disease, Liquid phase blocking ELISA, Virus neutralization test

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่มีความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์กบฏ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสุกร จัดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์กลุ่มที่ 1 หรือจัดอยู่ใน List A ขององค์การสุขภาพสัตว์แห่งโลก (World Organization of Animal Health, OIE) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อโรคที่มีความเสี่ยงระดับ 3 สาเหตุจากไวรัสชื่อ Foot and Mouth disease virus (FMDV) ซึ่งอยู่ในสกุล (genus) Aphovirus ตระกูล (family) Picornaviridae เป็น RNA virus มี 7 ซีโรไทป์ คือ O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 สำหรับประเทศไทยมีการระบาด 3 ซีโรไทป์ คือ O, A และ Asia1 เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส จะมีระยะฟักตัว (incubation period) 2-8 วัน สัตว์จะเริ่มมีไข้ ซึม เบื่ออาหาร มีน้ำลายไหล เกิดเม็ดตุ่มใส (vesicle) ที่ลิ้น กระพุ้งแก้มและเหงือก เต้านมหรือหัวนมในโค ในสุกรจะมีตุ่มใสเหนือจมูก (snout) เด่นกว่าการเกิดตุ่มที่บริเวณช่องปาก นอกจากนั้นพบที่ไรกีบหรือรอบบริเวณ coronary band ภายหลังเกิดตุ่มใสแล้ว 24 ชั่วโมง เม็ดตุ่มจะแตกออกเป็นแผล เกิดการลอกของเนื้อเยื่อลิ้น วิจารณ์ที่อุ้งเท้าและไรกีบ ทำให้สัตว์เจ็บเท้าจนเดินกระพริกหรือเลิกลดจนไม่สามารถยืนได้ (Mann and Sellers, 1990) ในสัตว์อายุน้อยอาจเกิด necrosis ของกล้ามเนื้อหัวใจที่เรียกว่า tiger heart ทำให้ตายได้

ขณะที่มีการติดเชื้อ จะมีการขับไวรัสออกมากับสิ่งขับถ่ายและสารคัดหลั่งในปริมาณที่สูงมากในระยะก่อนที่สัตว์จะแสดงอาการป่วยประมาณ 24 ชั่วโมง (Burrows, 1968; Burrows et al., 1981; Mann and Sellers, 1990) และเป็นอย่างนี้หลายวัน สุกรมีความสามารถในการขับเชื้อออกทางลมหายใจได้มากกว่าโค 30-1,000 เท่า ทำให้สุกรเป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญและเกิด airborne infection ได้ง่าย (Kitching et al., 2005) ทำให้ปริมาณไวรัสในร่างกายสัตว์ป่วยเริ่มลดลง เมื่อมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหรือระดับแอนติบอดีสูงขึ้นไปยับยั้งหรือ neutralize เชื้อไวรัส แต่สัตว์ที่ป่วยจะเป็นตัวพาหะ (carrier) แพร่เชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นได้ ในโคพบว่าสามารถเป็นตัวพาหะได้นานถึง 2.5 ปี (Hedger, 1968) ควายแอฟริกัน (African buffalo) พบนาน 3-5 ปี (Hedger et al., 1972; OIE, 2017) แกะพบได้นาน 12 เดือน (Sutmoller, 1970) แพะพบได้นาน 4 เดือน (Singh, 1977) ส่วนในสุกรไม่พบว่าเป็นตัวพาหะ (Panina et al., 1988; OIE, 2012)

การสร้างภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีที่เกิดจากแต่ละชนิดของเชื้อไวรัสไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้ามซีโรไทป์ (cross immunity) ได้ (Sutmoller and Vieira, 1980) โดยในระยะแรกประมาณ 4 วันหลังมีการติดเชื้อ ร่างกายสัตว์จะสร้างแอนติบอดี IgM ที่มีครึ่งชีวิต (half life) ประมาณ 5 วัน ซึ่งมีความสามารถทำลาย (neutralize) และจับกลุ่ม (agglutination) ไวรัสทั้งไทป์ที่เหมือนกันและไม่เหมือนกันหรือที่ไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของไวรัส (both homologous and heterologous virus) ระหว่างนี้มีการสร้างแอนติบอดี IgG ออกมา จะขึ้นสูงประมาณวันที่ 10-14 หลังติดเชื้อและขึ้นสูงสุดประมาณวันที่ 23 หรือมีครึ่งชีวิต (half life) ประมาณ 23 วัน ซึ่ง IgG นี้จะมีความจำเพาะต่อ type และ subtype (Mann and Sellers, 1990) สำหรับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ร่างกายสัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อส่วนที่เรียกว่า structural protein (SP) และ non-structural proteins (NSPs) โดยแอนติบอดีต่อ SP จะเริ่มตรวจพบได้ภายในวันที่ 4 ขึ้นสูงมากประมาณวันที่ 8-10 หลังติดเชื้อ และขึ้นสูงสุดระหว่างวันที่ 21-28 จึงเริ่มลดลง ตรวจโดยใช้วิธี Virus neutralization test (VNT) หรือ Serum neutralization (SN) test และวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP-ELISA) สำหรับแอนติบอดีต่อ NSPs เริ่มตรวจพบได้ภายในวันที่ 8-10 หลังการติดเชื้อ (Crowther, 2007; De Diego, et al., 1997) สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อ Virus infection associated (VIA) antigen โดยวิธี Agar gel immunodiffusion (VIA-AGID) test โดยวิธีนี้จะตรวจ NSPs ส่วนที่เรียกว่า 3D ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่เรียกว่า RNA-dependent-RNA-polymerase แต่วิธีนี้มีปัญหาเกิด false positive ในสัตว์ที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อไวรัสมาก่อนแต่ได้รับการฉีดวัคซีนหลายครั้ง (McVicar and Sutmoller, 1970; Pinto and Garland, 1979) จึงมีการปรับปรุงพัฒนา มาทดสอบโดยวิธี Indirect ELISA ที่ใช้หลักการตัดต่อพันธุกรรม (genetic engineering) ในส่วนของยีนที่เรียกว่า 3A, 3B,

3AB, 3ABC, 2A, 2B, 2C หรือ 3 D ซึ่งยืนยันดังกล่าวเกิดขึ้นในกระบวนการ virus replication สามารถตรวจพบได้ในสัตว์ที่ติดเชื้อ แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน ถ้าวัคซีนผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพียงพอ (highly purified) (Crowther, 2007; De Diego, et al., 1997; OIE, 2012) ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจสอบในส่วนของ 3ABC, 3AB, 3B หรือ 2B มาเป็น commercial kit ใช้แยกสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจากสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ

การทดสอบและควบคุมคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมักพบกับปัญหาและข้อคำถามเกี่ยวกับโรคปากและเท้าเปื่อย เช่น วัคซีนให้ความคุ้มโรคนานแค่ไหน ระดับแอนติบอดีจากการทำวัคซีนและจากการติดเชื้อของสัตว์เปลี่ยนแปลงอย่างไร แยกได้ไหมว่าเกิดจากการทำวัคซีนหรือมีการติดเชื้อ ทำวัคซีนไทป์โอแล้วจะคุ้มโรคไทป์อื่นด้วยไหม เป็นต้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพหรือความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีน โดยการฉีดพิษด้วยไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรค แยกแต่ละไทป์ ว่าจะมีผลต่อระดับแอนติบอดีในไทป์อื่นหรือไม่

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ, เอ และ เอเซียวัน ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพหรือความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ โดยการฉีดพิษด้วยไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรค (challenged virus) สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาชนิด (serotype) ของเชื้อที่มีการระบาดในพื้นที่ ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเพื่อการมาทดสอบหาชนิดของเชื้อได้ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนการฉีดวัคซีนและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างซีรัมที่ใช้

เป็นซีรัมโคและสุกรจากการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ ดังนี้

1.1 ซีรัมโค ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 21 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ โอ แล้ว 8 วัน จำนวน 243 ตัวอย่าง

1.2 ซีรัมโค ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 21 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ เอ แล้ว 8 วัน จำนวน 243 ตัวอย่าง

1.3 ซีรัมโค ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 21 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ เอเซียวัน แล้ว 8 วัน จำนวน 262 ตัวอย่าง

1.4 ซีรัมสุกร ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 28 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ โอ แล้ว 10 วัน จำนวน 237 ตัวอย่าง

1.5 ซีรัมสุกร ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 28 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ เอ แล้ว 10 วัน จำนวน 158 ตัวอย่าง

1.6 ซีรัมสุกร ก่อนการฉีดพิษ (ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว 28 วัน และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการฉีดวัคซีน) และหลังฉีดพิษด้วยไวรัสไทป์ เอเซียวัน แล้ว 10 วัน จำนวน 155 ตัวอย่าง

2. การทดสอบหาระดับแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธี Viral neutralization test (VNT)

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558; OIE, 2012) โดยนำซีรัมที่ต้องการตรวจสอบหาระดับแอนติบอดีมา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัส ปริมาตรที่เท่ากับซีรัม คือ $50\mu\text{l}$ ซึ่งมีความรุนแรง 100TCID_{50} ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน $5\% \text{CO}_2$ Incubator หลังจากนั้นเติม secondary lamb kidney cells หลุมละ $100\mu\text{l}$ อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อ่านผลพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE) คำนวณค่า $\log_{10}\text{VNT}$ titer ตามวิธีของ Karber (1931) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2017) กำหนดไว้ว่า ถ้าค่า $\log \text{VNT}$ titer <1.20 หรือ $1/16$ แปลผลเป็นลบ (negative) ค่า $\log \text{VNT}$ titer ≥ 1.20 ($1/16$) – 1.50 ($1/32$) ให้ทดสอบซ้ำ ถ้า ≥ 1.20 แสดงว่าเป็นบวก (positive) และค่า $\log \text{VNT}$ titer ≥ 1.65 หรือ $1/45$ แปลผล เป็นบวกในระดับ protective titer

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ sd), ความแตกต่างของระดับแอนติบอดี ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอ และ เอเชียวัน ในกลุ่มสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและกลุ่มควบคุม โดยแยกแต่ละไทป์ของการฉีดพิษ

ผล

จากการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีของโคและสุกร พบว่า โคและสุกรกลุ่มควบคุม ก่อนการฉีดพิษด้วยไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรค (challenged virus) ไทป์ โอ (O_{189}) หรือ เอ(A) หรือ เอเชียวัน(Asia1) จะมีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน $< 1.2\log_{10}\text{VNT}$ ซึ่งถือว่าไม่มีแอนติบอดีที่จะให้ความคุ้มครองต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และหลังฉีดพิษแล้ว 8 วันในโค พบว่า ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ หรือ เอ หรือ เอเชียวัน จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ เทียบกับ 1.94 , 1.89 และ $2.23 \log_{10}\text{VNT}$ ตามลำดับ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีดพิษ จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ 0.59 - $1.03 \log_{10}\text{VNT}$ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1A) สำหรับสุกรหลังฉีดพิษแล้ว 10 วัน พบว่า ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ หรือ เอ หรือ เอเชียวัน จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ เทียบกับ 1.72 , 2.11 และ $2.22 \log_{10}\text{VNT}$ ตามลำดับ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีด จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ 0.40 - $0.76 \log_{10}\text{VNT}$ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1B)

สำหรับโคและสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนชนิดรวม 3 ไทป์ พบว่า ในโค ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ หรือ เอ หรือ เอเชียวัน หลังฉีดพิษแล้ว 8 วัน สูงกว่าก่อนการฉีดพิษ เทียบกับ 1.29 , 1.58 และ $0.98 \log_{10}\text{VNT}$ ตามลำดับ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีด จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ 0.35 - $0.53 \log_{10}\text{VNT}$ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2A) สำหรับสุกรมีการฉีดวัคซีน 1 โดสปกติ (2 ml) ทุกตัว พบว่า ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ หรือ เอ หรือ เอเชียวัน หลังฉีดพิษแล้ว 10 วัน สูงกว่าก่อนการฉีดพิษ เทียบกับ 1.10 , 0.51 และ $0.97 \log_{10}\text{VNT}$ ตามลำดับ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีด จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษ 0.05 - $0.39 \log_{10}\text{VNT}$ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2B)

วิจารณ์

จากตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นได้ว่า โคและสุกรกลุ่มควบคุม ก่อนการได้รับเชื้อหรือได้รับการฉีดพิษด้วยไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรค จะมีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ, เอ และเอเชียวัน $< 1.2\log_{10}\text{VNT}$ ซึ่งถือว่าไม่มีแอนติบอดีที่จะให้ความคุ้มครองต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (OIE, 2012) และหลังฉีดพิษแล้ว 8 วันในโค และ 10 วันในสุกร ระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นมาประมาณ 2.36 - $3.01 \log_{10}\text{VNT}$ สำหรับไทป์ที่ได้รับเชื้อ ขณะที่

ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีด จะสูงขึ้นมาประมาณไม่เกิน 1.83 และ $1.38 \log_{10} \text{VNT}$ สำหรับโคและสุกร ตามลำดับ ขณะที่โคและสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย แล้ว 21 วันในโค และ 28 วัน ในสุกร ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์ โอ หรือ เอ หรือ เอเซียวัน หลังฉีดพิษทั้บแล้ว 8 วัน สูงกว่าก่อนการฉีดพิษทั้บ ประมาณ $0.98-1.29 \log_{10} \text{VNT}$ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีดพิษทั้บ จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษทั้บไม่เกิน $0.53 \log_{10} \text{VNT}$ (รูปที่ 1B) สำหรับสุกรหลังฉีดพิษทั้บ 10วัน จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษทั้บประมาณ $0.51-1.10 \log_{10} \text{VNT}$ ขณะที่ไทป์อื่นที่ไม่ใช่ไทป์ที่ฉีดพิษทั้บ จะสูงกว่าก่อนการฉีดพิษทั้บเล็กน้อยไม่เกิน $0.39 \log_{10} \text{VNT}$ (รูปที่ 2B) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน(กลุ่มควบคุม)กับกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนมาแล้วเมื่อได้รับเชื้อ ระดับแอนติบอดีในกลุ่มสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน จะขึ้นสูงมากอย่างเห็นได้ชัดทั้งในโคและสุกร(รูปที่ 1A และ 2A)

ดังที่ทราบกันแล้วว่าภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีที่เกิดจากแต่ละชนิดของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้ามซีโรไทป์(cross immunity)กันได้ (Sutmoller and Vieira, 1980) แสดงว่า neutralizing antibody ที่เกิดหรือเพิ่มสูงขึ้นหลังมีการติดเชื้อ น่าจะเป็น IgM ซึ่งมีความสามารถในการทำลาย (neutralize) และจับกลุ่ม(agglutination)ไวรัสทั้งไทป์ที่เหมือนกันและไม่เหมือนกันหรือที่ไม่มี ความจำเพาะต่อ ชนิดของไวรัส(both homologous and heterologous virus) มากกว่าแอนติบอดี IgG ซึ่ง IgG จะขึ้นสูง ประมาณวันที่ 10-14 หลังติดเชื้อและขึ้นสูงสุดประมาณวันที่ 23 มีความจำเพาะต่อ type และ subtype (Mann and Sellers,1990) สำหรับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ร่างกายสัตว์จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อส่วนที่ เรียกว่า structural protein(SP) และ non-structural proteins (NSPs) โดยแอนติบอดีต่อ SP จะเริ่มตรวจพบ ได้ภายในวันที่ 4 ขึ้นสูงมากประมาณวันที่ 8-10 หลังติดเชื้อ และขึ้นสูงสุดระหว่างวันที่ 21-28 จึงเริ่มลดลง ใน สภาวะที่สัตว์ติดเชื้อแต่ไม่เป็นตัวพาหะ(carrier) ถ้าสามารถตรวจแอนติบอดีพบ (limit of detection) ได้ถึง 8, 4-5 และ 3 เดือน หรือมีระดับแอนติบอดีในการป้องกันโรค(Protective titer) ประมาณ 6, 3 และ 2 เดือน หมายถึง สัตว์มีระดับแอนติบอดีระดับสูง (high), ปานกลาง (medium) และ ต่ำ (low) ตามลำดับ แต่ถ้าสัตว์เกิดอยู่ใน สภาวะเป็นตัวพาหะ ระดับแอนติบอดีต่อ SP จะมีรูปแบบลดลงเป็นปกติ (ระดับ limit of detection) แต่ระดับ แอนติบอดีต่อ NSP ลดลงจากระดับสูงสุดไปประมาณ 45 วัน แล้วจะคงที่จนถึงไม่น้อยกว่า 1 ปี สำหรับแอนติบอดี ต่อ NSPs เริ่มตรวจพบได้ภายในวันที่ 8-10 หลังการติดเชื้อ (Crowther, 2007; De Diego, et al.,1997)

ทั้งนี้คณะผู้ศึกษามีข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยก่อนและหลัง การฉีดพิษทั้บไทป์ เอ หรือ เอเซียวันในโค จากการตรวจโดยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP-ELISA) พบว่า 1)โคกลุ่มควบคุม($n=6$)ที่ไม่มีการฉีดวัคซีน ระดับแอนติบอดีจะ $\leq 1.6 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ หลังฉีดพิษทั้บ 8 วัน สำหรับไทป์ เอ ($n=3$) ระดับแอนติบอดีต่อไทป์ โอ, เอ และเอเซียวัน จะสูงขึ้นเฉลี่ยเป็น 3.0, 3.7 และ $3.2 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ หรือเพิ่มขึ้น 1.3, 2.1 และ $1.6 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ ตามลำดับ สำหรับไทป์ เอเซียวัน($n=3$) จะสูงขึ้นเฉลี่ยเป็น 2.6, 2.5 และ $3.5 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ หรือเพิ่มขึ้น 0.9, 0.9 และ $1.8 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ ตามลำดับ 2)โคที่ฉีดวัคซีนชนิดรวม 3 ไทป์ หลังฉีดพิษทั้บไทป์ เอ ($n=15$) ระดับแอนติบอดีต่อไทป์ โอ, เอ และเอเซียวัน จะสูงขึ้นเฉลี่ยเป็น 3.28, 3.54 และ $2.90 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ หรือเพิ่มขึ้น 0.8, 1.3 และ $0.06 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ ตามลำดับ สำหรับไทป์ เอเซียวัน($n=15$) จะสูงขึ้นเฉลี่ยเป็น 2.62, 2.44 และ $3.5 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ หรือเพิ่มขึ้น 0.18, 0.20 และ $0.48 \log_{10} \text{LP-ELISA}$ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จะคล้ายการตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี VNT

สรุป

ถ้ามีการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยใดๆ ก็จะมีผลต่อแอนติบอดีที่ไทป์อื่นด้วย โดยในสัตว์ที่ไม่เคยมีการฉีดวัคซีนมาก่อน ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์นั้นๆจะสูงขึ้นมากกว่า $2 \log_{10}$ VNT ขณะที่ไทป์อื่นๆจะสูงขึ้นไม่มากกว่า $1-1.5 \log_{10}$ VNT ขณะที่ในสัตว์ที่มีการฉีดวัคซีนหรือมีแอนติบอดีอยู่แล้ว โดยในโคเมื่อมีการติดเชื้อไทป์ใดๆ ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์นั้นๆจะสูงขึ้นประมาณ $1.2-2 \log_{10}$ VNT ขณะที่ไทป์อื่นๆจะสูงขึ้นไม่มากกว่า $1 \log_{10}$ VNT สำหรับสุกรเมื่อมีการติดเชื้อไทป์โอ หรือ เอเซียวัน ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไทป์นั้นๆจะสูงขึ้นประมาณ $1 \log_{10}$ VNT ขณะที่ไทป์อื่นๆจะสูงขึ้นไม่มากกว่า $0.4 \log_{10}$ VNT แต่สุกรเมื่อมีการติดเชื้อไทป์ เอ ระดับแอนติบอดีต่อไวรัส จะสูงขึ้นประมาณ $0.5 \log_{10}$ VNT ขณะที่ไทป์โอ และเอเซียวันจะสูงขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถนำผลการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีบอกชนิด(ไทป์)ที่มีการติดเชื้อหรือระบาดในเบื้องต้นได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจหา ระดับแอนติบอดีโดยวิธี Virus neutralization test

เอกสารอ้างอิง

- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2558 การทดสอบ Serum neutralization test(SOP-QCF-038). ฝ่ายทดสอบคุณภาพ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-6
- Burrows, R. 1968. Excretion of foot and mouth disease virus prior to development of lesion. Vet. Rec.82:387-388.
- Burrows, R.,Mann, J.A., Garland, A.J.M., Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural And simulated natural foot and mouth disease virus in cattle. J. Comp. Patho. 91:599-609.
- Crowther, J.R. 2007. The Use of Non-structural Proteins of Foot and Mouth disease Virus (FMDV) To Differentiate Between Vaccinated and Infected Animals. Review of developments in the detection of antibodies to non-structural proteins of foot and mouth disease virus. Publication Prepared under the Framework of an RCA Project with the technical Support of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear techniques in food and Agriculture. pp. 1-46.
- De Deigo, M., Brocchi, E., Mackay, D. K. J., De Simone, F. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as an diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch. Virol. 142: 2021-2033.
- Hedger,R.S. 1968. The isolation and characterization of FMDV from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg. (Camp.). 66:27-36.
- Hedger, R.S., Condy, J.B. and Golding, S.M. 1972. Infection of some species of African wild life with Foot and mouth disease virus. J. Camp. Path. 82: 455-461.
- Karber G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive fur Experimentelle Pathologie Pharmakologie. 162: 263-272.

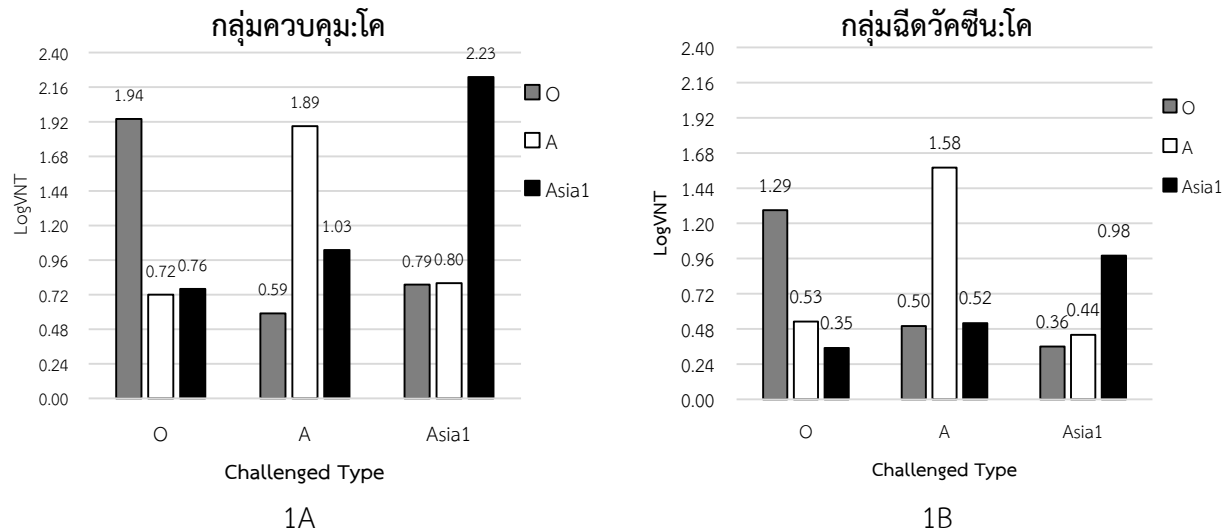
- Kitching, R. P., Hutber, A. M. and Thrusfield, M. V. 2005. A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modeling of the disease. *The Veterinary Journal*. 169(2): 197-209.
- Mann, J. J. and Sellers, R. F. 1990. Foot-and-Mouth Disease Virus. In: *Virus Infections of Vertebrates, Virus Infections of Ruminants*. edited by Dinter, Z. and Morein, B. Elsevier Science Publishers B. V. (3): pp. 503-512.
- McVicar, J.W. and Suttmoller, P. 1970. Foot and mouth : The agar gel immunodiffusion precipitation test for antibody to virus infectious associated(VIA) antigen as a tool for epizootiological surveys. *Am. J. Epidemiol.* 92: 273-278.
- Panina, G. F., Amadori, M., Massirio, I., Pavesi, M. and Perini, S. 1988. Persistence of foot and mouth disease virus(FMDV) infection in pigs. Report of the 56th General Session of OIE, Paris, Appendix X.
- Pinto, A. A. and Garland, A. J. M. 1979. Immune response to virus infection associated (VIA) antigen cattle repeatedly vaccinated with foot and mouth disease virus activated by formalin or acetyleneimine. *J. Hyg.* 82: 41-50.
- Singh, P.P. 1977. Studies on foot and mouth disease in goats with special reference to the distribution of virus and carrier status. Ph. D. Thesis, Agra University, India.
- Suttmoller, P. 1970. Persistence of foot and mouth disease virus infections. In: "Virus Affecting Man and Animals". W. H. Green Inc., St. Louis, USA. pp. 295-308.
- Suttmoller, P. and Vieira, A. 1980. The relationship of neutralizing antibody titer for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. *Biol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*. 57: 39-40.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2012. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 145-173.

ตารางที่ 1 ระดับแอนติบอดี($\log_{10}$ VNT) ก่อนและหลังการฉีดพิษหัดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซียวัน ในโคตัวควบคุมและที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์

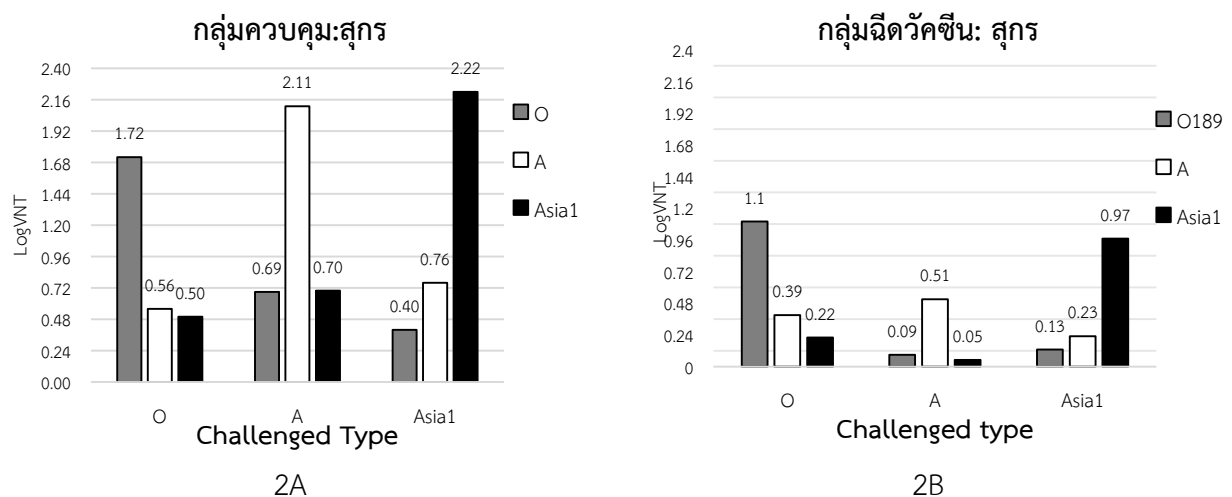
การฉีดพิษหัด	ระดับแอนติบอดี $\log_{10}$ VNT (mean $\pm$ sd)					
	ไทป์ O ₁₈₉		ไทป์ A		ไทป์ Asia1	
	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด
โคตัวควบคุม						
ไทป์ O ₁₈₉ (n= 32)	0.79 $\pm$ 0.40	2.73 $\pm$ 0.55	0.91 $\pm$ 0.62	1.63 $\pm$ 0.94	1.01 $\pm$ 0.61	1.77 $\pm$ 0.84
ไทป์ A (n= 31)	0.70 $\pm$ 0.16	1.29 $\pm$ 0.69	0.76 $\pm$ 0.29	2.65 $\pm$ 0.95	0.81 $\pm$ 0.29	1.83 $\pm$ 0.90
ไทป์ Asia1 (n=32)	0.70 $\pm$ 0.21	1.49 $\pm$ 0.86	0.74 $\pm$ 0.29	1.54 $\pm$ 0.75	0.78 $\pm$ 0.32	3.01 $\pm$ 0.51
โคฉีดวัคซีน						
ไทป์ O ₁₈₉ (n=211)	1.30 $\pm$ 0.71	2.59 $\pm$ 0.83	1.14 $\pm$ 0.79	1.67 $\pm$ 0.83	2.02 $\pm$ 0.87	2.38 $\pm$ 0.74
ไทป์ A (n=212)	1.83 $\pm$ 0.84	2.04 $\pm$ 0.83	1.11 $\pm$ 0.69	2.69 $\pm$ 0.84	2.06 $\pm$ 0.84	2.58 $\pm$ 0.79
ไทป์ Asia1 n=230)	1.39 $\pm$ 0.79	1.75 $\pm$ 0.81	1.10 $\pm$ 0.73	1.53 $\pm$ 0.83	1.96 $\pm$ 0.85	2.94 $\pm$ 0.65

ตารางที่ 2 ระดับแอนติบอดี($\log_{10}$ VNT) ก่อนและหลังการฉีดพิษหัดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ, เอ, เอเซียวัน ในสุกรตัวควบคุมและที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์

การฉีดพิษหัด	ระดับแอนติบอดี $\log_{10}$ VNT (mean $\pm$ sd)					
	ไทป์ O ₁₈₉		ไทป์ A		ไทป์ Asia1	
	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด	ก่อนฉีดพิษหัด	หลังฉีดพิษหัด
สุกรตัวควบคุม						
ไทป์ O ₁₈₉ (n= 34)	0.64 $\pm$ 0.12	2.36 $\pm$ 0.90	0.64 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.59	0.66 $\pm$ 0.25	1.16 $\pm$ 0.50
ไทป์ A (n= 18)	0.57 $\pm$ 0.08	1.25 $\pm$ 0.76	0.66 $\pm$ 0.30	2.77 $\pm$ 0.76	0.68 $\pm$ 0.35	1.38 $\pm$ 0.59
ไทป์ Asia1 (n=18)	0.55 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.44	0.56 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.67	0.57 $\pm$ 0.09	2.79 $\pm$ 0.53
สุกรฉีดวัคซีน						
ไทป์ O ₁₈₉ (n=203)	0.86 $\pm$ 0.45	1.96 $\pm$ 0.95	1.14 $\pm$ 0.48	1.53 $\pm$ 0.65	1.58 $\pm$ 0.68	1.81 $\pm$ 0.62
ไทป์ A (n=140)	0.84 $\pm$ 0.44	0.93 $\pm$ 0.57	1.12 $\pm$ 0.50	1.63 $\pm$ 0.70	1.69 $\pm$ 0.67	1.74 $\pm$ 0.79
ไทป์ Asia1 (n=137)	0.85 $\pm$ 0.48	0.98 $\pm$ 0.63	1.14 $\pm$ 0.51	1.37 $\pm$ 0.54	1.79 $\pm$ 0.68	2.76 $\pm$ 0.68



รูปที่ 1 ความแตกต่างของระดับแอนติบอดี ระหว่างก่อนและหลังการฉีดพิษหัดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ, เอ, เอเชียวัน ในโค ตัวควบคุม (1A) และที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ และ ชนิตรวม 3 ไทป์ (1B)



รูปที่ 2 ความแตกต่างของระดับแอนติบอดี ระหว่างก่อนและหลังการฉีดพิษหัดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ, เอ, เอเชียวัน ในสุกร ตัวควบคุม (2A) และที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ (2B)

Seroconversion of antibody titer after direct challenged with Foot and Mouth Disease virus

Chaiya Sangaprakhon¹Thareerat Suphap¹

Abstract

From the foot and mouth disease vaccine potency test by challenged with the virulent virus followed the OIE standard and testing the antibody titer by the Virus neutralization test (VNT) before and after challenged. Found that the non-vaccinated or control group of cattles after challenged 8 days with FMDV type O (n=32) or A (n=31) or Asia1 (n=32) had the antibody titer higher than before challenged were 1.94, 1.89 and 2.23 log₁₀VNT and after challenged 10 days in pigs had the antibody titer higher than before challenged were 1.72, 2.11 and 2.22 log₁₀VNT for the challenged with FMDV type O (n=34) or A (n=18) or Asia1 (n=18) respectively. Whereas in the other type had the higher than before challenged were about 0.40-0.76 log₁₀VNT.

For the cattle and pig who were vaccinated with trivalent FMD vaccine (O+A+Asia1) and challenged. Found that cattles after 8 days of challenged with O₁₈₉ or A or Asia1 had antibody levels to type O (n = 211) or A (n = 212) or Asia1 (n = 230) were higher than before challenged were 1.29, 1.58 and 0.98 log₁₀VNT, respectively. While the other type were higher than before challenged about 0.35-0.53 log₁₀VNT. And in pigs after 10 days inoculation with O₁₈₉ or A or Asia1 virus was found that antibody level to type O (n = 203) or A (n = 140) or Asia1 (n = 137) were higher than before challenged at 1.10, 0.51 and 0.97 log₁₀VNT, respectively, while the other non-injectable types higher than before the challenged were 0.05-0.39 log₁₀VNT.

Therefore, the seroconversion of antibody levels can be used to identify the type of the infectious or epidemic foot-and-mouth disease virus in the field.

Keywords: Antibody level, Foot and Mouth disease virus, Virus neutralization,
Direct challenged, Type

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima 30130

ความสัมพันธ์ทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในการคัดเลือกไวรัสสำหรับผลิตวัคซีน

วิไล ลินจงสุขภักข¹

บทคัดย่อ

ศึกษาความสัมพันธ์คุณลักษณะทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยรวบรวมตัวอย่างไวรัส type O, A และ Asia1 ที่ระบาดในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในช่วง 16 ปีย้อนหลัง (2003-2019) ทำการตรวจสอบ vaccine matching และ sequencing วิเคราะห์ผลเป็นค่า r-value และ phylogenetic tree พบว่า r-value ของไวรัส type O ให้ผล good matching (r-value = 1.0) ทั้งหมด แสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนไปจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน O/189/87 ในปัจจุบัน จึงไม่มีความจำเป็นในการคัดเลือกไวรัสใหม่ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง r-value และ phylogenetic tree ของ type O พบว่าไวรัสที่ระบาดในปี 2005 จัดอยู่ในกลุ่ม O/Cathay และ O/SEA/Mya98 ส่วนไวรัสในปี 2016 เป็น O/SEA/Mya98 และ O/ME-SA/Ind2001d ให้ผล good matching (r-value = 1.0) เช่นเดียวกับ type Asia1 พบว่าไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยปี 1998 และเวียดนามในปี 2006 จัดอยู่ในกลุ่ม Asia1/ASIA/Group IV ให้ผล good matching (r-value = 1.0) กับไวรัสวัคซีน Asia1/Petchburi/85 ส่วนไวรัส Asia1 ที่ระบาดในพม่าปี 2017 จัดอยู่ในกลุ่ม Asia1/ASIA/Group VIII แสดงว่าไวรัส type O และ Asia1 มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางพันธุกรรมแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน จึงไม่มีความจำเป็นต้องคัดเลือก seed virus ใหม่ กรณีไวรัส type A ที่ระบาดในช่วงปี 2003-2019 พบว่า r-value ให้ผลเป็น good matching กับไวรัสวัคซีนหลายสายพันธุ์ ซึ่งบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจนไปจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในการระบาดแต่ละครั้ง ผลของ phylogenetic tree จัดอยู่ในกลุ่ม A/ASIA/Sea-97 ทั้งหมด เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง r-value และ phylogenetic tree พบว่าไวรัสที่ระบาดในปี 2012 ให้ผล good matching (r-value = 1.0) กับไวรัสวัคซีน A/Lopburi/2012 ในขณะที่ A/Sakolnakorn/97 ให้ค่า poor matching (r-value < 0.2) ส่วนไวรัสที่ระบาดในปี 2016 ให้ผล good matching กับ A/Sakolnakorn/97 และให้ poor matching กับ A/Lopburi/2012 แสดงให้เห็นว่าไวรัส type A มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจน (antigenic variation) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genomic variation) จำเป็นต้องคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนในแต่ละช่วงของการระบาด ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้จะได้รับการบูรณาการข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจนและทางพันธุกรรมของไวรัสที่ระบาดในพื้นที่เพื่อสนับสนุนการพิจารณาการคัดเลือก seed virus ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพและทันต่อสถานการณ์การระบาดในปัจจุบัน

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วัคซีนแมทซิง ซีเค้นซิง

¹ ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

บทนำ

กรมปศุสัตว์มีนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้มาตรการการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในพื้นที่ให้ได้ไม่ต่ำกว่า 80% ของจำนวนประชากรสัตว์ภายในประเทศเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้สูงเพียงพอต่อการป้องกันโรค โดยการรณรงค์ฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในพื้นที่อย่างสม่ำเสมอปีละ 2 ครั้ง วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นชนิด 3 โทป์ (trivalent vaccine) O, A และ Asia1 มีการตรวจสอบประสิทธิภาพและประสิทธิผลของวัคซีนโดยการเจาะเลือดสัตว์ภายหลังได้รับการฉีดวัคซีนประมาณ 4 สัปดาห์ เพื่อทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 โทป์ด้วยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Hamblin *et al.*, 1997; Linchongsubongkoch and Janikit, 1994) และตรวจหาสภาวะการติดเชื้อเพื่อแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน non structure protein (NSP) ด้วยวิธี NSP- ELISA (Sorensen *et al.*, 1998) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดของวัคซีนให้ถูกต้องและตรงกับชนิดหรือสายพันธุ์ไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ให้ทันต่อสถานการณ์การระบาดเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและได้ประสิทธิผล การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำเพื่อการจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี antigen capture ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ควบคู่กับการตรวจสอบ Real time RT-PCR (real time RT-PCR (Callahan *et al.*, 2002) และ Multiplex RT- PCR (Le *et al.*, 2011) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องทำการศึกษาค้นสมบัตินด้านแอนติเจนและพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อไวรัสชนิดต่างๆที่ระบาดในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่ โดยการตรวจสอบ strain characterization ด้วยวิธี antigenic matching หรือ vaccine matching และ sequencing ตามลำดับ การตรวจ antigenic matching เป็นการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนมาน้อยเพียงใด เพื่อวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนให้ตรงกับชนิดและสายพันธุ์ที่กำลังระบาดในพื้นที่ให้มากที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้การตรวจสอบ vaccine matching และ sequencing ซึ่งวิธี sequencing (Knowles and Samuel, 2003) เป็นการตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในส่วน VP1 segment เพื่อตรวจหาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ วิธีนี้จะประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยาของโรคและสามารถใช้เป็นแนวทางในการสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดการระบาด จากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.*, (2018) ทำการ ศึกษาระบาดของวิทยาโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างพื้นที่ในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านได้แก่กัมพูชา ลาว พม่าและเวียดนาม โดยวิธี sequencing ที่ส่วนของ VP1 ยีน เพื่อหาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสที่ระบาดในภูมิภาคในช่วง 8 ปีย้อนหลัง (2004-2011) พบว่าไวรัสโทป์ O จัดอยู่ในกลุ่ม O/SEA/Mya-98 และ O/PanAsia และตรวจพบ O/Cathay ระบาดในเวียดนามและประเทศไทยในปี 2005-2006 นอกจากนี้ยังพบไวรัสโทป์ O สายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นในภูมิภาคนี้ได้แก่ O/ME-SA/Ind 2001d ในปี 2559 (Qiu *et al.*, 2017) และ O/ME-SA/Ind2001e ในปี 2016 (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) จนถึงปัจจุบัน ส่วน type Asia1 ที่ระบาดในประเทศไทยพม่าปี 2005 และเวียดนามปี 2006 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม Asia1/ASIA/Group IV (Valarcher *et al.*, 2009) และเมื่อปี 2017 พบไวรัส Asia1 ระบาดในพม่าเป็นไวรัสกลุ่มใหม่คือ Asia1/ASIA/Group VIII (Bo *et al.*, 2019) สำหรับไวรัสโทป์ A ที่ระบาดในประเทศไทยและในภูมิภาคตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีเพียงกลุ่มเดียวคือ A/ASIA/Sea-97

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยหรือ vaccine matching โดยตรวจหาความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างซีรัมไคเตอร์ที่ได้จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน (vaccine strain) และซีรัมไคเตอร์ที่ได้จากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (field strain) ด้วยวิธี LP ELISA (Kitching *et*

al., 1988) วิเคราะห์ผลเป็นค่า *r*-value จากการศึกษาพบว่าค่า *r*-value ของไวรัส type O, A และ Asia1 ที่ระบาดในพื้นที่ในอดีตตั้งแต่ปี 2003 จนถึงปัจจุบัน (Linchongsubonkoch *et al.*, 2014) พบว่า type O และ Asia1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในปัจจุบันจึงไม่มีความจำเป็นในการคัดเลือกไวรัสสายพันธุ์ใหม่สำหรับการผลิตวัคซีน O/189/87 และ Asia1/Petchaburi/85 กรณี type A พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนไปจากไวรัสที่ผลิตวัคซีนเป็นระยะๆ จึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนจำนวนหลายครั้ง ได้แก่ A/Sakolnakorn/1997 ใช้เป็น seed virus ในปลายปี 1997 ส่วน A/118/87 เป็น seed virus ในปี 2002 และ A/Lopburi/2012 ในปี 2012 เป็นต้นมาจนปัจจุบันได้มีการใช้ทั้ง A/Sakolnakorn/1997 และ A/Lopburi/2012 เป็นไวรัสหลักในการผลิตวัคซีน (Lichongsubongkoch *et al.*, 2017) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทั้งด้านแอนติเจนและพันธุกรรมบ่อยครั้ง รวมถึงข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังกล่าวยังมีน้อยมาก ซึ่งมีความเกี่ยวข้องและมีผลต่อการคัดเลือก seed virus มากน้อยเพียงใด ดังนั้นวัตถุประสงค์ครั้งนี้คือการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในพื้นที่จากอดีตจนถึงปัจจุบันระหว่างปี 2003-2019 เพื่อใช้เป็นแนวทางพิจารณาการคัดเลือก seed virus ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมสำหรับผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพความคุ้มโรคได้ตรงกับสายพันธุ์หรือชนิดที่ระบาดในพื้นที่ได้มากที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ทำการรวบรวมตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 ที่ระบาดในพื้นที่ทั้งในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ช่วงปี 2003-2019 (16 ปี) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้ผ่านการตรวจวินิจฉัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโดยวิธี ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) และทำการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี virus isolation และยืนยันผลด้วย ELISA typing นำตัวอย่างไวรัสทั้งหมดไปใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางแอนติเจนด้วยวิธี vaccine matching และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วยวิธี sequencing ต่อไป

การตรวจสอบคุณลักษณะทางแอนติเจนด้วยวิธี vaccine matching (*r*-value)

เป็นการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ การแปลผลเป็นค่า *r*-value ขั้นตอนการตรวจสอบพอสังเขปดังนี้

- นำตัวอย่างไวรัสพื้นที่ (type O, A และ Asia1) ที่ผ่านการตรวจจำแนกชนิดและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) ที่มีความรุนแรงสูงพอประมาณ นำมาใช้เป็น heterologous virus สำหรับการตรวจสอบ *r*-value ต่อไป

- เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 ที่ใช้เป็น reference vaccine strain หรือ homologous virus ชนิดต่างๆ คือ O/189/87, A/Sakolnakorn/97, A/Lopburi/2012, A/118/87 และ Asia1/Petchaburi/1985

- หาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมโดยตรวจสอบ antigen titration ด้วยวิธี ELISA เพื่อหา working dilution ของ homologous และ heterologous virus แต่ละชนิด

- เตรียม bovine immune serum จากโคทดสอบความคุ้มโรควัคซีน โดยทำการฉีดวัคซีนแต่ละชนิดในโคทดลอง เป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดและแยกซีรัม ตรวจหาระดับแอนติบอดี เบื้องต้นด้วยวิธี LP ELISA (Hamblin *et al.*, 1986) ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบ *r*-value ต่อไป

- นำไวรัสและซีรัมไปดำเนินการตรวจสอบ r-value ด้วยวิธี LP ELISA ตามวิธีการ Kitching *et al.*, (1988) และ Linchongsubongkoch *et al.*, (2000) การคำนวณหาค่า r-value ดังนี้

$$r\text{-value} = \frac{\text{serum titer against heterologous field strain}}{\text{serum titer against homologous vaccine strain}}$$

การแปลผลค่า r-value ตามวิธีการของ Samuel *et al.*, (1990)

$r = 0-0.19$ Highly significant serological variation from reference vaccine strain.

$r = 0.20-0.39$ Significant difference from the reference vaccine strain, but protection may be satisfactory if using a sufficiently potent vaccine.

$r = 0.40-1.0$ Not significantly difference from reference vaccine strain.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ตัวอย่างไวรัสพื้นที่และไวรัสวัคซีนของแต่ละชนิด นำมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol[®] LS reagent (InvitrogenTM, USA) ทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีการ Knowles and Samuel (1994) oligonucleotide primer สำหรับใช้ในขั้นตอน RT-PCR ได้แก่ type O; O-1D-ROD1/NK61, type A; 1C-612/NK61 และ type Asia1; 1C-505/NK61 (WRLFMD, UK) ตรวจสอบผลผลิตหรือ PCR product band ด้วยวิธี 1.2% agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับ 100 bp DNA standard marker (Promega, USA) จะได้ PCR product ของ type O, A และ Asia1 ที่ 720 bp, 813 bp and 914 bp ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

Sequencing and phylogenetic tree analysis

นำ PCR product ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต ขั้นตอนการทำ sequencing โดยนำ PCR product ที่บริสุทธิ์มาผสมกับน้ำยาสำเร็จรูป Big-Dye[®] terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) และ universal primer NK72 ร่วมกับ forward primer ของ type O, A และ Asia1 ตามวิธีการ Knowles and Samuel (2003) นำเข้าเครื่อง Automatic sequencer, ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ปฏิบัติ sequence จะเกิดขึ้นในส่วน of complete VP1 segment ของไวรัส โดยมีความยาว nucleotide ของ type O ที่ 639, type A ที่ 636 และ type Asia1 ที่ 633 ตามลำดับ แสดงผลการเรียงลำดับเบสหรือ alignment ของ VP1 segment โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENETYX-WIN software (software developed, Japan) วิเคราะห์ผลและสร้างแผนภูมิ phylogenetic neighboring-joining trees ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumer *et al.*, 2004)

ผล

การศึกษาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 ที่ระบาดในพื้นที่ ในช่วงปี 2003-2019 (16 ปี) โดยการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (vaccine matching) อ่านผลเป็นค่า r-value และทำการตรวจควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วยวิธี sequencing ในส่วนของ VP1 segment ของไวรัส วิเคราะห์และแสดงผลเป็น phylogenetic tree เพื่อดูความสัมพันธ์ของกลุ่มไวรัสเป็น topotype/strain ดังแสดงผลใน รูปที่ 1-4 และตารางที่ 2-5 ตามลำดับ ดังนี้

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจ vaccine matching ของ type O ที่ระบาดในช่วง 2003-2019 ให้ค่า r-value > 0.40 (good matching) พบ 100% มีเพียงปี 2014 ที่พบค่า r-value >0.40 พบ 93.75%

รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ด้านความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O ที่ระบาดในปี 2005 และ 2006 เทียบกับ seed virus O/189/87

รูปที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type A ที่ระบาดในปี 2011-2012 และ 2016-2018 โดยใช้ seed virus A/Lopburi/ 2012 และ A/Sakolnakorn/97

รูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type Asia1

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type A ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2003-2019 ที่ให้ค่า % r-value มากกว่า 0.40 (good matching) ซึ่งให้ผลระดับที่แตกต่างกันในแต่ละปีเมื่อเปรียบเทียบกับ seed vaccine strain ต่างๆ ได้แก่ A/Sakonlnakorn/97, A/118/87 และ A/Lopburi/2012

พิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O และ A ที่ระบาดในช่วง 4 ปีที่ผ่านมา (2016-2019) พบว่าไวรัสกลุ่ม O/ME-SA/Ind2001e, O/PanAsia และ O/SEA/Mya98 ให้ผลค่า r-value เป็น good matching ทั้งหมด กับไวรัสวัคซีน O/189/87 (ตารางที่ 3)

กรณี type A พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในช่วง 4 ปีที่ผ่านมา (2016-2019) พบว่าเป็นไวรัสจัดอยู่ใน toptotype เดียวกันทั้งหมด คือ A/SEA/Sea-97 ผล r-value ให้ good matching (r-value >0.40) ที่แตกต่างกันในแต่ละปี โดยเทียบกับ seed virus A/Lopburi/2012, A/Sakolnakorn/97 และ A/118/87 (ตารางที่ 4)

ข้อเสนอแนะในการพิจารณาการคัดเลือก seed virus vaccine ที่เหมาะสมในปัจจุบัน สำหรับใช้ในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ตารางที่ 5)

พิจารณารายละเอียดข้อจำกัดและข้อบ่งชี้การตรวจสอบระหว่าง vaccine matching และ sequencing ซึ่งมีวัตถุประสงค์และประโยชน์นำไปใช้ที่ต่างกัน ดังนั้นการพิจารณาการคัดเลือก seed virus ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนทั้งในกรณีฉุกเฉินหรือการผลิตปกติ (ตารางที่ 6)

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาความสัมพันธ์คุณลักษณะทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการตรวจสอบ vaccine matching และ sequencing ทำการวิเคราะห์ค่า r-value และ phylogenetic tree ผลการตรวจสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในช่วง 16 ปีที่ผ่านมา (2003-2009) พบว่า type O ให้ผล r-value > 0.40 หรือ good matching เท่ากับ 100% มีเพียงปี 2014 ที่พบค่า r-value > 0.40 เท่ากับ 93.75% แสดงว่าไวรัสจากพื้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจนไปจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนในปัจจุบัน จึงไม่มีความจำเป็นในการคัดเลือกไวรัสใหม่สำหรับการผลิตวัคซีน O/189/87 ดังแสดงในรูปที่ 1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree มีหลาย toptotype ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม O/SEA/Mya-98, O/Cathay, O/PanAsia, O/ME-SA/Ind2001d และ O/ME-SA/Ind2001e (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) ปัจจุบันไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม O/ME-SA/Ind 2001e และ PanAsia ส่วน O/SEA/Mya-98 มีพบส่วนน้อย จากรูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง r-value และ phylogenetic tree จากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.*, (2018) ตรวจสอบ sequencing พบไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยปี 2005 และเวียดนามปี 2006 จัดอยู่ในกลุ่ม O/Cathay toptotype และ O/SEA/Mya98 ส่วนไวรัสในปี 2016 จัดอยู่ในกลุ่ม O/SEA/Mya98 และ O/ME-SA/Ind2001d (Qiu *et al.*, 2017) เมื่อตรวจสอบ vaccine matching พบว่าให้ค่า r-value เท่ากับ 1.0 ทั้งหมด แสดงว่าไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสวัคซีน เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และผล phylogenetic tree ของไวรัสที่ระบาด

ในช่วงปี 2016-2019 ในตารางที่ 3 พบว่าเป็นไวรัสในกลุ่ม O/ME-SA/Ind2001e, O/PanAsia และ O/SEA/Mya98 ให้ผลค่า r-value เป็น good matching กับ O/189/87 ทั้งหมด (เอกสารไม่ตีพิมพ์) สรุปได้ว่าไวรัส type O ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนแต่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ดังนั้น seed virus O/189/87 ที่ผลิตวัคซีนในปัจจุบันยังให้ความคุ้มครองในพื้นที่ได้ จึงไม่มีความจำเป็นต้องทำการคัดเลือกไวรัสวัคซีนใหม่

กรณี type Asia1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree ในรูปที่ 4 พบว่าไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยปี 1998 และเวียดนามในปี 2006 พบไวรัสจัดอยู่ในกลุ่ม Asia1/ASIA/Group IV (Valarcher *et al.*, 2009) ให้ผล good matching (r-value = 1.0) กับ seed virus Asia1/Petchburi/85 ส่วน phylogenetic tree ของไวรัส Asia1 ที่ระบาดในพม่าปี 2017 จัดอยู่ในกลุ่ม Asia1/ASIA/Group VIII ซึ่งพบมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไวรัสต้นกำเนิดจากประเทศอินเดียและบังกลาเทศปี 2012-2013 (Bo *et al.*, 2019) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบ vaccine matching ได้เนื่องจากไวรัสไม่สามารถ adapt ใน tissue culture cell จากรายงาน OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network (เอกสารไม่ตีพิมพ์) มีการตรวจสอบค่า r-value ด้วยวิธี virus neutralization test (VNT) ในตัวอย่างไวรัสกลุ่ม Asia1/ASIA/Group VIII ที่ระบาดในประเทศบังกลาเทศและปากีสถาน พบว่าให้ผล antigenic matching ได้ดีกับ Asia1/Shamir ดังนั้นวัคซีนที่ผลิตจาก seed virus Asia1/Shamir สามารถให้ความคุ้มครองได้กับไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยพม่าปี 2017 สำหรับวัคซีน Asia1 ในประเทศไทยที่ผลิตจาก Asia1/Petchaburi/85 นั้น เมื่อเทียบกลุ่มไวรัส ปรากฏว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Asia1/Shamir ซึ่งตามหลักการน่าจะให้ความคุ้มครองได้กับ Asia1/ASIA/Group VIII เช่นกัน ปัจจุบันไม่พบการระบาดของไวรัส Asia1 ในภูมิภาคนี้ ในส่วนประเทศไทยไม่พบการระบาด Asia1 ตั้งแต่ปี 1998 จนถึงปัจจุบัน

กรณี type A จากผลค่า r-value มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนไปจากไวรัสที่ผลิตวัคซีนเป็นระยะๆ มีความจำเป็นต้องมีการคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนจำนวนหลายครั้ง ได้แก่ A/Sakolnakorn/1997 ใช้เป็น seed virus ช่วงปี 2003-2006 และ 2009-2011 ส่วน A/118/87 เป็น seed virus ในปี 2003-2009 และ A/Lopburi/2012 ในปี 2012 จนถึงปัจจุบัน ดังแสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า r-value และ phylogenetic tree พบว่าไวรัส type A ที่ระบาดในปี 2011-2012 และ 2016-2018 จัดอยู่ในกลุ่ม A/ASIA/Sea-97 ทั้งหมด ส่วนผลค่า r-value ของไวรัสที่ระบาดในปี 2012 ให้ผล good matching (r-value = 1.0) กับ seed virus A/Lopburi/2012 ในขณะที่ A/Sakolnakorn/97 ให้ค่า r-value น้อยกว่า 0.2 (poor matching) ส่วนไวรัสที่ระบาดในปี 2016 ให้ผล good matching กับ A/sakolnarn/97 และให้ poor matching กับ A/Lopburi/2012 แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน (antigenic variation) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genomic variation) จำเป็นต้องทำการคัดเลือก seed virus vaccine ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนในแต่ละช่วงของการระบาด ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่เมื่อพิจารณาการระบาดในช่วงปี 2016-2019 ในตารางที่ 4 พบว่าไวรัสที่ระบาดในปี 2016-2017 มีความสัมพันธ์ทางแอนติเจนใกล้เคียงกับ A/Sakolnakotn/97 และไวรัสที่ระบาดในปี 2018-2019 มีความสัมพันธ์ทางแอนติเจนใกล้เคียงกับ A/Lopburi/2012 ส่วนไวรัสที่ระบาดในปี 2016-2019 ทั้งหมด ไม่มีความสัมพันธ์กับไวรัสวัคซีน A/118/87 ซึ่งไม่สามารถให้ความคุ้มครองได้ ในขณะที่ผล phylogenetic tree จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมดคือ A/ASIA/Sea97

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางแอนติเจนและพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในพื้นที่ทั้งในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่าค่า r-value และ phylogenetic tree ของไวรัส type O ให้ผล antigenic matching ได้ดีเกือบทุกตัวอย่าง แต่ให้ผล genomic variation กับไวรัสที่ระบาดในแต่ละปี กรณี type A พบว่า antigenic matching มีการเปลี่ยนแปลงหลายครั้งของการระบาด แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือไม่

genomic variation พบเพียง toptotype เดียวทั้งหมดคือ A/ASIA/Sea97 ส่วน type Asia1 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงทาง antigenic variation พบเพียง genomic variation ในตัวอย่างจากพม่าปี 2017 เท่านั้น ดังนั้นการพิจารณาวิธีการคัดเลือก seed virus ที่ถูกต้องสำหรับการผลิตวัคซีน ต้องพิจารณาค่า r-value เป็นหลัก จะพิจารณาเฉพาะค่า sequencing อย่างเดียวคงไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ เนื่องจากการตรวจสอบของแต่ละวิธี มีวัตถุประสงค์และประโยชน์แตกต่างกัน คือการตรวจ sequencing จะมีประโยชน์ในเชิงระบาดวิทยาเพื่อสืบกลับถึงต้นกำเนิดของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่นั้นๆ ส่วนค่า r-value เป็นการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ระบาดในพื้นที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนมีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ ซึ่งใช้หลักการปฏิกิริยาระหว่าง antibody ที่ได้จากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่นำมาเทียบกับ antibody ที่ได้จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน วิธีนี้มีวัตถุประสงค์จำเพาะในการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีนทั้งในยามกรณีฉุกเฉินและงานประจำปกติ ในกรณีการผลิตวัคซีนภายในประเทศหรือต่างประเทศสำหรับการค้า นั้น จะมีการตรวจสอบ r-value เป็นหลัก ส่วน sequencing เป็นเพียงข้อมูลสนับสนุนทางวิชาการเท่านั้น จากข้อมูลในตารางที่ 5 เป็นข้อเสนอแนะในการคัดเลือก seed virus ที่เหมาะสมที่ใช้ในประเทศและในภูมิภาคนี้ โดยการตรวจสอบ vaccine matching ด้วยวิธี LP ELISA หรือ 2-dimension virus neutralization test (2-D VNT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของ OIE ทั้งนี้ขึ้นกับศักยภาพของห้องปฏิบัติการของแต่ละประเทศ สำหรับหลักการวิธีการตรวจสอบ ข้อจำกัดการใช้งาน วัตถุประสงค์ และประโยชน์ที่ได้รับของการตรวจสอบ vaccine matching และ sequencing นั้นมีข้อแตกต่างกัน ซึ่งบางครั้งให้ผลสอดคล้องกันหรือไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นควรพิจารณาให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของผู้ใช้เป็นหลักเพื่อให้การป้องกัน ควบคุมและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยในพื้นที่ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการรวบรวมข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย vaccine matching และ sequencing เพื่อใช้สำหรับดำเนินการวิเคราะห์ในโครงการนี้อย่างต่อเนื่องจนบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- Bachanek-Bankowska, K., Nardo, A.D., Wadsworth, J., Mioulet, V., Pazzoni, G., Grazioli, S., Brocchi, E., Kafle, S.C., Hettiarachchi, R., Kumarawadu, P., Eldaghayes, I. M., Dayhum, A. S., Meenowa, d., Sghaier, S., Madani, H., Abouchoaib, N., Houang, B.H., Vu, P.P., Dukpa, K., Gurung, R.B., Tenzin, S., Wernery, U., Pathummart, A., Linchongsabongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Scherbakov, A., King, D.P. and Knowles, N.J. 2018. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot and mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind2001 lineage. Scientific Reports (2018) 8: 14693/DOI:10.1038/s41598-018-32693-8.
- Bo, L.L., Lwin, K.S., Ungvanijban, S., Knowles, N.J., Wadsworth, J., King, D. P., Abila, R. and Qiu, Y. 2019. Foot and mouth disease outbreaks due to an exotic serotype Asia1 virus in Myanmar 2017. J. Transbound. Emerg. Dis. 1-6.

- Callahan, J.D., Brown, F., Osorio, F.A., Sur, J.H., Kramer, E., Long, G.W., Lubroth, J., Ellis . S. J., Shoulars. K.S., Gaffney, K.L. and Nelson, W.M., 2002. Use of a portable real time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot and mouth disease virus. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* 220 : 1636-1642.
- Hamblin, C., Kitching, R.P., Donaldson, A., Crowther, J.R. and Barnett, R. I. T. 1997. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against foot and mouth disease virus. *J. Immun. Methods.* 93: 122-129.
- Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. *Vaccine.* 6 (5): 403-408.
- Knowles, N.J. and Samuel, A.R. 2003. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus. *Virus Research.* 91: 65-80.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA 3. Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment, *Brief Bioinform.* 5: 150-163.
- Le, V.P., Lee, K.N., Nguyen, T., Kim, S.M., Cho, I.S., Quyen, D.V., Khang, D.D. and Park, J.H. 2011. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, and Asia 1 circulating in Vietnam. *J Virol Methods.* 175: 101-108.
- Linchongsubongkoch, W., Abila, R. and Thongtha, P. 2018. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus in Southeast Asia during 2004-2011. *J. Vet. Biol.* 27 (1-2): 28-43.
- Linchongsubongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Sripisuth, S., Samanit, J. and Petvanichakul, S. 2014. Antigenic and profiling of foot and mouth disease virus type A in Thailand during 2010-2012. *J. Thai Vet Assoc.* 65 (1-3): 41-53.
- Linchongsubongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Udon, R. and Samanit, J. 2017. Antigenic evolution of foot and mouth disease virus seed selection for vaccine production in Thailand. *Proceedings the 5th Thailand-Japan Joint Conference on Animal Health.* Bangkok. 17-19.
- Linchongsubongkoch, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibodies titer to foot and mouth disease virus by liquid phase blocking ELISA. *Proceedings on the 1st Annual Veterinary Biologics Conference.* 62-72.
- Linchongsubongkoch, W., Rumlumdoan, S., Kamolsiripichaiporn, S. and Janukit, T. 2000. Antigenic variation of foot and mouth disease viruses from field outbreak in Thailand. *Proceedings in 38th Kasetsart University Annual Conference.* 207-214.
- Qiu, U., Abila, R., Rodtian, P., King, D.P., Knowles, N.J., Ngo, L.T., Le, V.T., Khounsy, S., Bounma, S., Verin, B.C., Widder, P. 2017. Emerging of an exotic strain of serotype O foot and mouth disease virus O/ME-SA/Ind2001d in Southeast Asia in 2015. *J. Transbound Emerg. Dis.* 2017, 1-9.
- Roeder, P.L. & Le Blanc Smith, P.M. (1987). Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.,* 43: 225-232.

- Samuel, A.R., Ouldrige E. J., Arrowsmith, A.E.M., Kitching, R.P. and Knowles, N.J . 1990. Antigenic analysis of serotype O of foot and mouth disease virus isolates from the Middle East 1981- 1988. *Vaccine*. 8: 390-396.
- Sorensen, K., Hansen, C.M., Madsen, E.S. and Madsen< K,G. 1998. Blocking ELISA using non structural protein 3D, 3AB and 3ABC produced in the baculovirus expression system. *J. Clin. Sci. Epidemiol*. 20: S17-S20.
- Valarcher,J, F., Knowles, N,J., Zakharov,V., Scherbakov, A., Zhang,Z., Shang, Y., Liu, Z., Liu,X., Sanyal, A., Hemadri,D., Tosh, C., Rasool,T, J., Pattnaik, B., Schumann, K, R., Schumann, K, R., Beckham, T,R., Linchongsubongkoch,W., Ferris, N,P., Roeder,P,L. and Paton, D,J. 2009. Multiple Origins of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype Asia 1 Outbreaks, 2003–2007. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 7, July 2009 P1046-1051.

ตารางที่ 1 List of oligonucleotide primers and product bands for RT-PCR and sequencing

Primer designation	Primer sequence 5'-3'	Location	Product length(bp)
O 1C-ROD1	TGTTGAAACTACGGTGGTGA	1C	700-720
A 1C-612	TAGCGCCGGCAAAGACTTTGA	1C	813-816
Asia1 1C-505	TACACTGCTTCTGACGTGGC	1C	908-914
NK72	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	2A	Universal primer
NK61	GACATGTCCTCCTGCATCTG	2B	Universal primer

ตารางที่ 2 ผลการตรวจไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type A ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2003-2019 ที่ให้ค่า % r-value มากกว่า 0.40 (good matching) ซึ่งให้ผลระดับที่แตกต่างกันในแต่ละปีเมื่อเปรียบเทียบกับ seed vaccine strain ต่างๆ ได้แก่ A/Sakolnakorn/97, A/118/87 และ A/Lopburi/2012

Summary of FMDV type A showing only % r-value greater than 0.40 (good matching) with various reference vaccine strains A/Sakolnakorn/87, A/118/87 and A/Lopburi/2012) during 2003-2019																	
Virus type	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
A/Sa kol/97	92.2	79.2	71.4	8.3	ND	ND	90.5	100	90.5	0	0	75	76.9	100*	69.2	60	30.3
A/118/87	98.4	94.7	71.43	93.75	100	100	100	0	0	0	0	25	ND	ND	38.4	0	0
A/Lop/2012	Not Done									72*	85	95.8	100	26.7	30.7	96	93.3

* Indicated the year that new seed virus was selected ; r-value > 0.40 = good matching,

ตารางที่ 3 Result of vaccine matching and sequencing of FMDV type O during 2016-2019, indicating the percentage of r-value greater than 0.4 (good matching) to O/189/87

Sequencing topotype/strain	% r-value of type O giving good matching (r-value > 0.40)			
	2016	2017	2018	2019
O/ME-SA/Ind2001e	100% (23/23)	85.7% (6/7)	70%(14/20)	100%
O/PanAsia	0%	14.3% (1/7)	20% (4/20)	Not Done
O/SEA/Mya98	Not Done	0%	10% (2/20)	Not Done

ตารางที่ 4 Result of vaccine matching and sequencing of FMDV type A during 2016-2019, indicating the percentage of r-value greater than 0.4 (good matching)

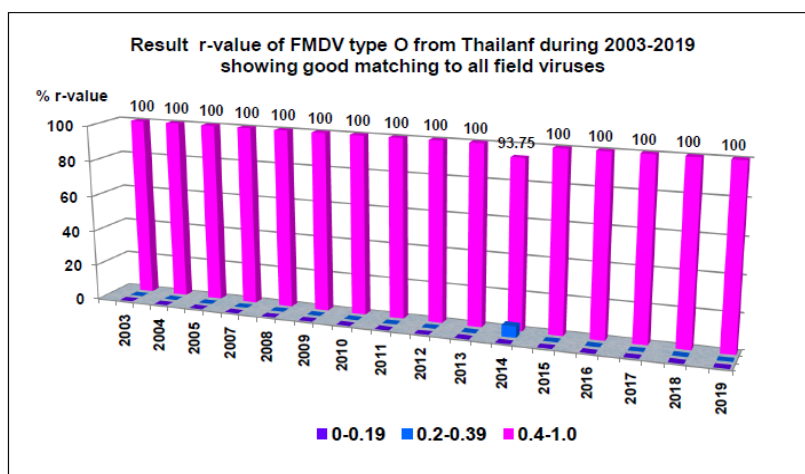
Seed vaccine	Sequencing topotype/strain	% r-value of type A giving good matching (r-value > 0.40)			
		2016	2017	2018	2019
A/lopburi/2012	A/ASIA/Sea97	26.7%(4/15)	30.7%(4/13)	96%(24/25)	93.9%(31/33)
A/Sakolnakorn/97	A/ASIA/Sea97	100%(15/15)	69.2%(9/13)	60%(15/25)	30.3%(10/33)
A/118/87	A/ASIA/Sea97	Not Done	38.4%(5/13)	0%	0%

ตารางที่ 5 Recommendation on current vaccine strains suitable for use in Thailand and SEA region

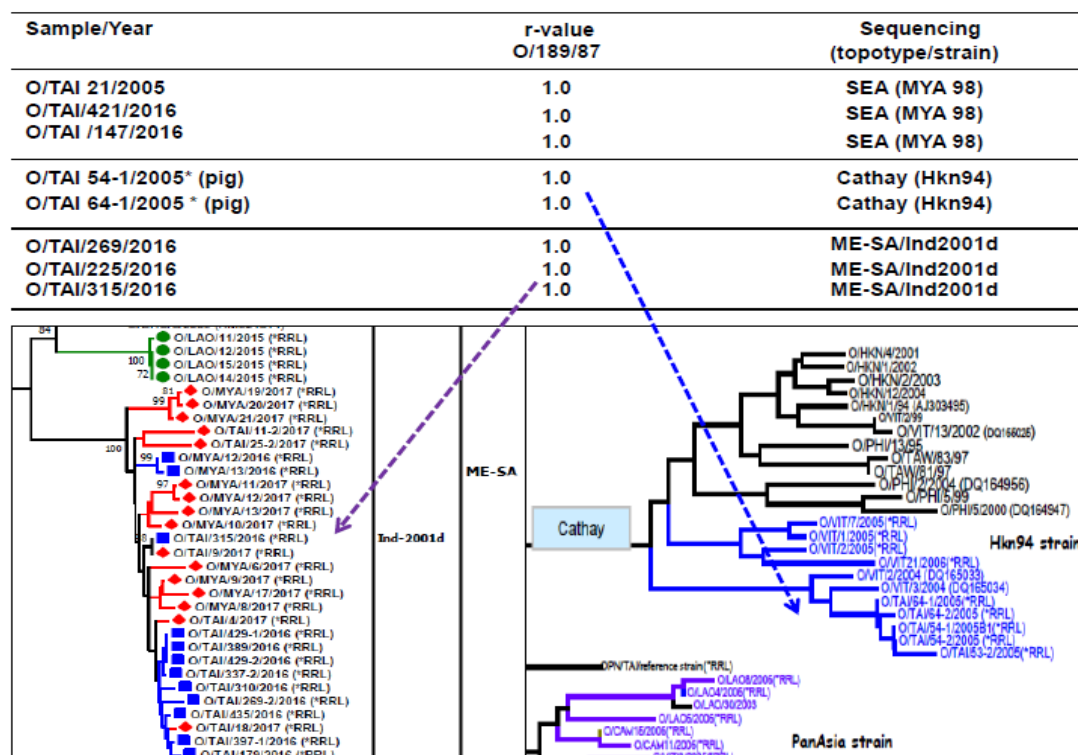
Circulating Serotype	Internationally available vaccines	Thailand /locally produced vaccines
O	O/3039	O/189/87
A	A22/Iraq/64 A/Malaysia/97	A/Lopburi/2012 A/Sakolnakorn/97
Asia1	Asia 1/Shamir	Asia1/Petchburi/85

ตารางที่ 6 รายละเอียดหลักการและวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบ vaccine matching และ sequencing เพื่อนำไปใช้พิจารณาการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีน

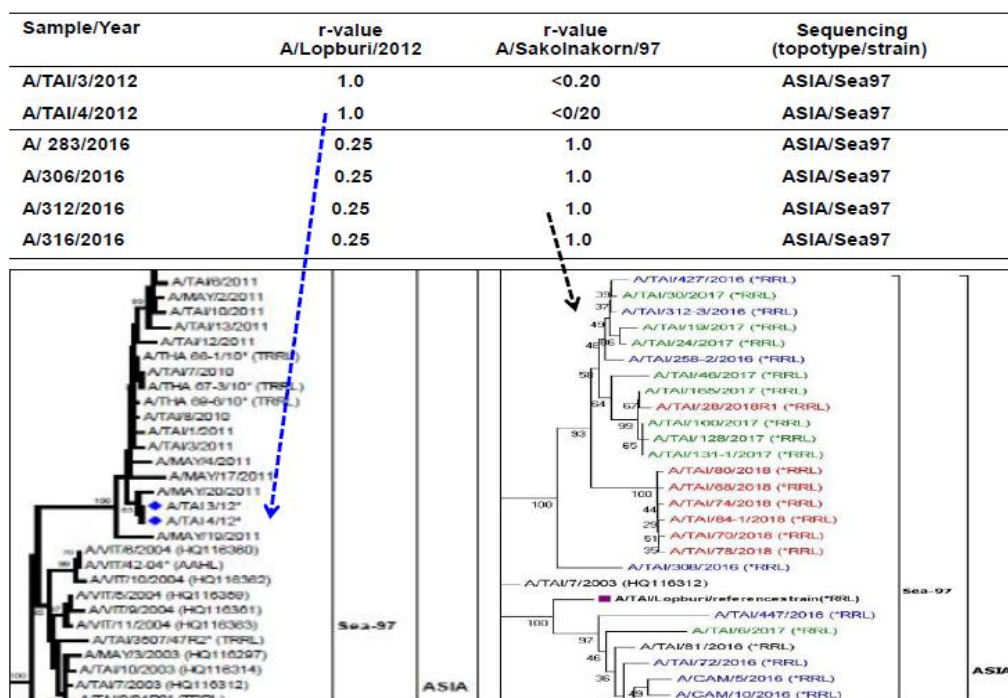
	Vaccine matching	Sequencing
1. วิธีทดสอบ/ วิเคราะห์ผล	- LP ELISA วิเคราะห์ผลค่า r-value - 2-dimension neutralization test (2-D VNT) วิเคราะห์ผลค่า r-value	sequencing ในส่วน VP1 segment ของไวรัส วิเคราะห์ผล phylogenetic tree
2. หลักการ การทดสอบ	ใช้หลักการปฏิกิริยา inhibition หรือ neutralizing activity ระหว่าง antigen และ antibody ที่จำเพาะกันจะยับยั้ง ไวรัสหรือทำให้เป็นกลาง ซึ่งไม่สามารถ infect เข้าเซลล์ ได้ virus particle หลักคือ 146S particle ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน VP1, VP2, VP3 และ VP4	ใช้หลักการเรียงลำดับเบสของไวรัสเฉพาะส่วนของ VP1 gene ที่มีความยาวเบส ประมาณ 633-639 bp เท่านั้น ไม่ได้ตรวจสอบ whole genome ดังนั้นผลที่วิเคราะห์ จึงเป็นเฉพาะส่วน VP1 gene เท่านั้น ไม่ได้วิเคราะห์ตลอดสาย virus genome ซึ่งมีความยาว ~ 8500 bp
3. วัตถุประสงค์/ ประโยชน์ที่ได้รับ	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางแอนติเจนระหว่างเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่กับไวรัสวัคซีน เพื่อการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีนได้ตรงกับชนิดและสายพันธุ์ พันธุ์ที่กำลังระบาดในพื้นที่ให้ทันกับสถานการณ์ปัจจุบัน	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เพื่อสืบกลับถึงต้นกำเนิดไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ เป็นการสนับสนุนงานระบาดวิทยา เพื่อการวางแผน ป้องกันและควบคุมโรคให้ทันเหตุการณ์ปัจจุบัน



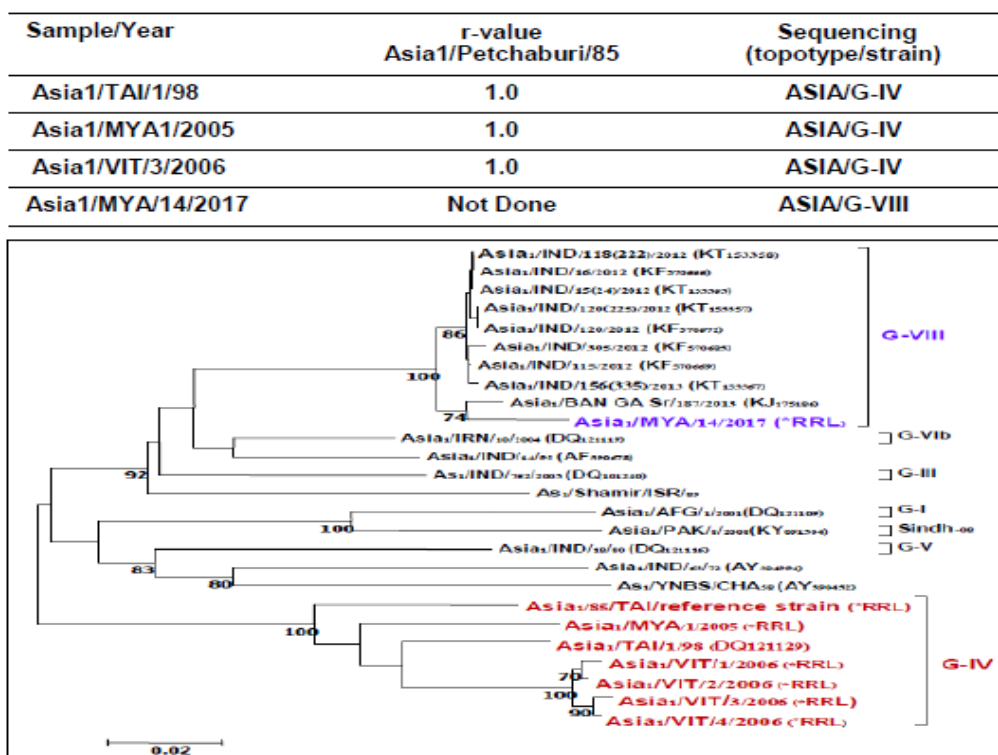
รูปที่ 1 ผลการตรวจไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2003-2019 ที่ให้ผลค่า % r-value มากกว่า 0.4 (good matching)



รูปที่ 2 Antigenic and genomic relation of type O, indicated by r-value and phylogenetic tree



รูปที่ 3 Antigenic and genomic relation of type A, indicated by r-value and phylogenetic tree



รูปที่ 4 Antigenic and genomic relation of type Asia1, indicated by r-value and phylogenetic tree

Antigenic and genomic relationship of foot and mouth disease virus in selecting seed virus for vaccine production

Wilai Linchnongsubongkoch¹

Abstract

The relationship between antigenic and genomic characteristic of foot and mouth disease virus (FMDV) type O, A and Asia1 causing outbreak in Thailand and Southeast Asia region during the past 16 years (2003-2019) were investigated. The field viruses were carried out by vaccine matching and sequencing, the results were determined as r-value and phylogenetic tree. The results found that r-value of type O were good matching (r-value = 1.0) to O/189/87 vaccine strain. This indicated that all field viruses were close related to vaccine strain. It was recommended that not necessary to change the existing seed vaccine strains of O/189/87. The relationship between r-value and phylogenetic tree were analyzed, the phylogenetic tree of viruses O in 2005 were related to O/Cathay and O/SEA/Mya98. While viruses in 2016 were related to O/SEA/Mya98 and O/ME-SA/Ind2001d, the r-value results were 1.0 to all viruses. Similarly results of type Asia1 in Thailand in 1998 and Vietnam in 2006, the r-value were good matching (r-value = 1.0) to seed virus Asia1/Petchaburi/85 and phylogenetic tree were related to Asia1/ASIA/Group IV. While the phylogenetic tree of the Asia1 in Myanmar in 2017 was related to Asia1/ASIA/Group VIII. Therefore, type O and Asia1 demonstrated the genomic variation but no antigenic variation to those viruses. For type A, the r-value results during 2003-2019 indicated the antigenic variation occurred when disease outbreak from time to time, the phylogenetic tree of them were close related to only one topotype of A/ASIA/Sea97. Consideration of r-value of type A in 2012 indicated good matching (r-value = 1.0) to A/Lopburi/2012 vaccine strain but poor matching (r-value < 0.20) to A/Sakolnakorn vaccine strain. In contrast, the r-value of type A in 2016 indicated good matching to A/Sakolnakorn but poor matching to A/Lopburi /2012. It meant that type A were found antigenic variation but no genomic variation, therefore, new strains were then selected for vaccine production. This study would be useful in supporting the technical information of antigenic and genomic characteristic of field viruses in selecting an appropriate virus strain for vaccine production of high efficacy vaccine and also in updating the virus strain in recent outbreak situation.

Keywords: Foot and mouth disease virus, Vaccine matching, Sequencing

¹ Consultant of Department of Livestock Development on foot and mouth disease, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development

