วารสารชีวผลิตภัณฑ์ บีที่ 2 เล่มที่ 1 มีนาคม 2534

The Journal of Veterinary Biologics *Vol.2 No.1 March. 1991*

การทดลองผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธี ยูเอสดีเอ...1
ประสิทธิภาพของวัคซีนฝีดาดไก่ชนิดเชื้อเป็นเมื่อเก็บไว้ในสถานภาพต่าง ๆ.....9
เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร และที่ฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง 14
ประสิทธิภาพของวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ชนิดเชื้อเป็นเมื่อเก็บไว้ในสถานภาพต่าง ๆ.....20
พยาธิสภาพเส้นเลือดเสื่อมของสมองและไขสันหลัง.....23
Cerebral trypanosomiasis in cattle due to Natural Trypanosoma Evansi infection.....27
การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมุโนซอบเบนท์ แอสเส.....35
การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ ไอ สุกร ชนิดน้ำมัน.....41
การศึกษาแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้.....46
การควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในระดับพื้นที่.....65
การศึกษาชนิดย่อยของ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอเชียวัน.....74

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

บรรณาธิการแถลง

หนังสือวารสารชีวผลิตภัณฑ์ (The Journal of Veterinary Biologics) เป็นหนังสือเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ มีจุดประสงค์เพื่อจะให้นักวิชาการของกอง ฯ และหน่วยงานอื่น ฯ ที่เกี่ยวข้องใช้เป็นแหล่งเผยแพร่งานทางด้านวิชาการ ที่จะเป็นประโยชน์ต่อทางราชการต่อไป

นอกจากเผยแพร่งานทางด้านวิชาการแล้ว ยังประสงค์จะให้เป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับวัคซีนสำหรับสัตว์ ตลอดจนวิชาการอื่น ฯ ที่เกี่ยวกับโรคสัตว์ในแง่มุมต่าง ฯ อีกด้วย

จึงหวังว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการ เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ สัตวแพทย์ และผู้สนใจ โดยทั่วไป

บรรณาธิการ

พิมพ์ที่ : โรงพิมพ์ดีพร้อม อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับคือเดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ๆที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสพการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

1. **ต้นฉบับ** ควรพิมพ์ดีดบนกระดาษขนาด 8.5 x 11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ความยาวประมาณ 25 บรรทัดต่อหน้า มีความยาวทั้งหมด 8 หน้าพิมพ์ โดยประมาณ

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของตัวเรื่อง ควรเขียนทั้งภาษาไทยและอังกฤษ

5. **เนื้อหา (Text)** สำหรับงานวิจัย ควรประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้

5.1 *คำนำ (Introduction)* เพื่ออธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ และอาจรวมการตรวจเอกสาร (literature review) เข้าไว้ด้วยกัน

5.2 *อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)* ควรประกอบด้วย

5.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการที่ใช้ทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 *ผล (Results)* เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็น ถ้ามีตาราง กราฟหรือรูปภาพก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 *วิจารณ์ (Discussion)* เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 *เอกสารอ้างอิง (Literature cited)*

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a,b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อต้นนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินโดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น.หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิตให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกหอดหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือควรให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. **ภาพประกอบ (Illustration)**

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจริงใช้และผู้เขียนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 x 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อทำความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การทดลองผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธียูเอสดีเอ

AN EXPERIMENTAL PRODUCTION OF TUBE AGGLUTINATION BRUCELLA ANTIGEN FOLLOWING USDA METHOD

อนุติน หาญวีระพล[1] ชลลดา กาเนิดมงคล[1] วิภา รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1] องอาจ พรหมสร[1]

Anutin Hanveerapol Cholada Kamnertmongkol

Vipa Roongvechvuthivithaya Ong-ard Phromsorn

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธี ยูเอสดีเอ แล้วทดสอบกับซีรั่มโคที่มีไตเตอร์ขนาดต่าง ๆ กัน จำนวน 68 ตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธียูโรเปี้ยน ซึ่งเป็นวิธีที่กรมปศุสัตว์ผลิตใช้อยู่ในปัจจุบันและเปรียบเทียบผลกับเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลใกล้เคียงกัน

คำนำ

การทดสอบโรคบรูเซลโลซีส โดยใช้แอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว กรมปศุสัตว์ผลิตโดยวิธีของยูโรเปี้ยน โดยใช้บรูเซลล่า อบอร์ตัส สเตรน 99 และในการผลิตใช้เทคนิคการผลิตของ Central Veterinary Weybridge ประเทศอังกฤษ ซึ่งการผลิตแอนติเย่นโดยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ในการไตเตรทเพื่อหามาตรฐานของแอนติเย่นต้องใช้ Standard Serum (Standard Brucella Antiserum) ซึ่งต้องขอหรือสั่งซื้อจากประเทศอังกฤษ กรรมวิธีในการไตเตรทแอนติเย่น โดยใช้ Standard Brucella Antiserum ค่อนข้างซับซ้อนและสิ้นเปลืองเวลามาก

การผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธีของ ยูเอสดีเอ ใช้เชื้อสเตรน 1119-3 ซึ่งเป็นสเตรนเดียวกับเชื้อที่ใช้ผลิตเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ และโรสเบงกอลเพลทเทสต์ ทำให้สะดวกต่อการเตรียม Seed สำหรับการผลิตแต่ละครั้ง เนื่องจาก Seed ใช้ร่วมกันได้ และในการผลิตไม่ต้องใช้ Standard Brucella Antiserum ขบวนการผลิตไม่ยุ่งยาก ง่ายการอ่านผล สามารถอ่านผลเปรียบเทียบกับเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ได้โดยตรง เนื่องจากใช้ Seed สเตรนเดียวกันและใช้มาตรฐานการอ่านผลเดียวกัน (Alton et al, 1980)

การทดลองครั้งนี้ จึงทำการทดลองผลิตบรูเซลล่าแอนติเย่น ชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธี ยูเอสดีเอ แล้วนำมาทดสอบกับซีรั่มตัวอย่างของโคที่มีไตเตอร์ขนาดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบผลกับบรูเซลล่าแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธียูโรเปี้ยนและเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

ซีรั่มตัวอย่าง ซีรั่มโคจำนวนทั้งหมด 68 ตัวอย่าง แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้ซีรั่มจำนวน 29 ตัวอย่าง ครั้งที่ 2 จำนวน 39 ตัวอย่าง

แอนติเย่น 1. ใช้แอนติเย่นชนิดเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ ชุดที่ 2/33 หมดอายุ 30/11/33

2. ใช้แอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วโดยวิธียูโรเปี้ยน ชุดที่ 1/32 หมดอายุ 30/6/33

3. ใช้แอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธี ยูเอสดีเอ ซึ่งผลิตเพื่อใช้ในงานทดลองครั้งนี้

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

2. วิธีการ

2.1 ผลิตแอนติเซ่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธี ยู เอส

2.1.1 การเตรียม Working Seed

ใช้ Seed สเตรน 1119-3 จำนวน 1 ขวด ละลายด้วย PBS pH 6.4 เพาะลง Tryptose agar จำนวน 20 Roux flasks นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37°C. นาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาตรวจดูด้วยตาเปล่า เก็บ Roux flask ที่เชื้อขึ้นสม่ำเสมอไว้ในตู้เย็น 4°C. เมื่อต้องการใช้จึงนำออกมา ปกติจะเก็บไว้ได้นาน 2 เดือน

2.1.2 การตรวจสอบ Working Seed

นำ Seed ที่เก็บในตู้เย็นตามข้อ 2.1.1 มาตรวจสอบก่อนที่จะใช้เพาะ โดยการเติม PBS pH 6.4 ลงไป 10 ซีซี. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ล้างเชื้อออกโดยการเอียงขวดไปมาจนเชื้อหลุดจากหน้าอาหารจนหมดถ่ายใส่ในหลอดแก้ว นำเชื้อที่ได้ไปตรวจสอบ Purity, Identity และ Dissociation

2.1.3 การเพาะเชื้อ

นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาเทใส่ขวด Aspirator ที่มีน้ำยาละลายอยู่ตามต้องการ โดยคิดจากเชื้อ 1 หลอด นำไปเพาะได้ 80-100 Roux flasks แจกเชื้อจากขวด Aspirator ลงใน Roux flask ที่มี Tryptose agar อยู่ข้างใน แจก Roux flask ละ 5 ซีซี. เอียงขวดไปมาให้เชื้อกระจายทั่วหน้าอาหาร ดูดเอาน้ำเพาะเชื้อส่วนเกินทิ้ง นำขวดที่เพาะเชื้อแล้วไปเก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C.นาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาตรวจดูด้วยตาเปล่า ขวดไหนมีเชื้อปลอมปนให้นำทิ้งไป

2.1.4 การล้างเอาเชื้อออก

นำขวดที่ผ่านการตรวจตามข้อ 2.1.3 มาล้างเอาเชื้อออกโดยใส่ 0.5%Phenol saline solution ลงไปขวดละ 25 ซีซี. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เอียงขวดไปมา จนเชื้อหลุดออกจากหน้าอาหาร ดูดใส่ Erlenmeyer flask ใช้ 15 Roux flasks ต่อ 1 Erlenmeyer flask

2.1.5 การตรวจสอบเชื้อใน Erlenmeyer flask

เก็บ Erlenmeyer flask ไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C อย่างต่ำ 24 ชั่วโมง นำออกมาตรวจสอบหา Purity, Flask ไหนมีเชื้อปลอมปนนำทิ้งไป

2.1.6 การเทรวมกัน

นำ Erlenmeyer flask ที่ผ่านการตรวจสอบมาเทรวมกัน โดยเหผ่านผ้าก๊อซสองชั้น สาโลชนิดดูดซึมอยู่กลางลงไปในขวดบอลลูน

2.1.7 การปั่นล้างเชื้อและการฆ่าเชื้อ

นำเชื้อที่ได้มาปั่นล้าง แล้วเทส่วนใสทิ้ง เติม 0.5% Phenol saline solution ลงไปปั่นล้างอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นเทรวมกันใน Erlenmeyer flask แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนใน Water bath อุณหภูมิ 95°C. นาน 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C. เพื่อรอทำเป็นแอนติเซ่นต่อไป

2.1.8 การทำเป็นแอนติเซ่น

นำเชื้อที่ได้มาเทรวมกันลงในขวดบอลลูน นำไปกวนด้วย Magnetic Stirror ในห้องเย็น 4°C.ข้ามคืน จึงนำตัวอย่างจากขวดบอลลูนมา 10 ซีซี. เพื่อนำไปตรวจหาเปอร์เซนต์ของ cell โดยวิธี Packed cell volume โดยใช้ Hopkin's tube ปั่นความเร็ว 3,100 RPM (2,500 g) นาน 75 นาที ที่อุณหภูมิ 4°-6°C. เสร็จแล้ว คำนวณหาเปอร์เซนต์ cell เติม 0.5% Phenol saline solution หรือเติม cell ลงไป แล้วแต่กรณี ให้ได้ตามมาตรฐาน คือ 4.5% ของปริมาตรทั้งหมด

นำแอนติเซ่นที่เตรียมได้ไปกวนด้วย Magnetic Stirror ที่ห้องเย็น 4°C.ข้ามคืน แล้วนำตัวอย่างออกมา

20 ซีซี. เพื่อตรวจหา

- เปอร์เซนต์ของ cell ต้องได้ 4.5% ตามมาตรฐาน โดยการหา Packed cell volume อีกครั้งหนึ่ง
- Purity และ Sterility โดยการเพาะลงบน tryptose agar slant และใน Dextrose andrade's broth
- Sensitivity test น้ำซีรั่ม ที่มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1/25-1/200 มาทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเซ่นชุดก่อนในการหาครั้งนี้หาเปรียบเทียบกับ Tube Agglutination test : European Method

2.1.9 บรรจุขวด

ก่อนบรรจุขวด นำแอนติเซ่นมากวนด้วย Magnetic Stirror ที่ห้องเย็น 4°C. ข้ามคืน แล้วนำมาบรรจุลงขวด ๆ ละ 20 ซีซี.

2.1.10 การวิธีในการตรวจโรคบรูเซลโลซีส โดยใช้แอนติเซ่นชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ผลิตโดยวิธี บูเอสดีเอ(Brucella Tube Agglutination Test : USDA Method) ถ้าต้องการหา Dilution ไม่เกิน 1:400

1. เจือจางแอนติเซ่นให้เป็น 1 : 100 ด้วย 0.5% Phenol saline solution
2. เรียงหลอดแก้วใน Test tube rack ซีรั่มด้วยอย่างละ 5 หลอด
3. ใช้ไปเปตขนาด 0.2 มล. ดูดซีรั่มใส่ในหลอดที่ 1 ถึง 5 หลอดละ 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 และ 0.005 มล. ตามลำดับ
4. เติมแอนติเซ่นที่เจือจาง 1:100 ลงไปทุกหลอด ๆ ละ 2.0 มล.
5. เขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน dilution จะเป็น 1:25, 1:50,1:100, 1:200, 1:400 ตามลำดับ
6. นำเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C. นาน 48 ชั่วโมง
7. อ่านผล

Method for Tube Agglutination Test.Dilution of not greater than1:400

Tube	1	2	3	4	5
Tested Serum	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
Antigen 1:100	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Serum Dilution	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400

ถ้าต้องการหา End Titer

1. เจือจางแอนติเซ่นให้เป็น 1 : 100 ด้วย 0.5% Phenol saline solution
2. เรียงหลอดแก้วใน Test tube rack
3. ใช้ไปเปตดูดแอนติเซ่น 1:100 ใส่ลงในหลอดแก้วหลอดแรก 3.84 มล.และหลอดต่อๆไปหลอดละ2.0มล.
4. ใช้ไปเปตดูดซีรั่มที่ต้องการทดสอบมา 0.16 มล. ใส่ลงในหลอดแก้วหลอดแรก แล้วเขย่าให้ซีรั่ม และแอนติเซ่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วดูดออกมา 2.0 มล. ใส่ในหลอดที่ 2 แล้วเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทำเช่นนี้จนครบทุกหลอด ในหลอดสุดท้ายดูด 2.0 มล.ทิ้ง
5. Dilution ในหลอดจะเป็น 1:25, 1:50, 1:100, 1:200,1:400.....
6. นำเข้าตู้บ่ม 37°C. นาน 48 ชั่วโมง
7. อ่านผล

Method for Tube Agglutination Test : For determining the end titer

Tube	1	2	3	4	5	10
1:100 Antigen	3.84	2.0	2.0	2.0	2.0	20
Tested Serum	0.16					
2 Fold Dilution	2.00	2.00	2.0	2.0	2.0	20

การอ่านผล

Positive Reaction (+) : Serum-Antigen Mixture จะใส (clear) โดยมีตะกอนนอนก้นหมด

Negative Reaction (-) : Serum-Antigen Mixture จะขุ่น (No sign of clearing) ไม่มีตะกอนนอนก้น

Incomplete Reaction (I) : Serum-Antigen Mixture จะใสบางส่วน (Partial clear) และมีตะกอนนอนก้นบางส่วน

Interpreting the USDA Agglutination Test Reaction

Reaction at dilution of				Diagnosis	
1:25	1:50	1:100	1:200	Nonvaccinated Cattle	Vaccinated Cattl
-	-	-	-	Nagative	Negative
I	-	-	-	Negative	Negative
+	-	-	-	Negative	Negative
+	I	-	-	Suspicious	Negative
+	+	-	-	Suspicious	Negavive
+	+	I	-	Suspicious	Suspicious
+	+	+	-	Reactor	Suspicious
+	+	+	I	Reactor	Suspicious
+	+	+	+	Reactor	Reactor

2.2 การทดสอบกับซีรั่มด้วยย่าง

ทดสอบครั้งที่ 1

โดยวิธี เอสดีเอ - เตรียมซีรั่มโค จำนวน 29 ตัวอย่าง

- แอนติเย่นที่ตรียมโดยวิธี เอสดีเอ มาเจือจางด้วย 0.5% phenol saline solution ให้เป็น 1:100
- เตรียมหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มม. จำนวน 290 หลอด โดยใช้ 10 หลอดต่อซีรั่ม 1 ตัวอย่าง
- ดูดแอนติเย่นเจือจาง 1:100 ลงไปในหลอดแรก 3.84 มล.หลอดต่อไปหลอดละ 2.0 มล.จนครบ 10 หลอด ดูดซีรั่ม0.16มล.ใส่ในหลอดแรก ผสมหลอดแรกของแต่ละแถวด้วย Mixer แล้วดูดออกมา2.0 ซีซี.ใส่ลงในหลอดที่ 2 แล้ว Mixed ด้วย Mixer ทำ 2-fold dilution เช่นนี้ จนถึงหลอดที่ 10 ให้ดูดทิ้งไป 2.0 มล. Final Dilution จะเป็นดังนี้ 1/25,1/50, 1/100,1/200,1/400,1/800,1/1600,1/3200,1/6400,1/12800 นำเข้าตู้อบ 37°C. นาน 48 ชั่วโมง จึงนำออกมาอ่านผล

โดยวิธียูโรเบียน - ใช้ซีรั่มโคตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ในยูเอสดีเอ

- ใช้หลอดแก้วขนาด 8 x 50 มม.จำนวน 10 หลอดต่อซีรั่ม 1 ตัวอย่าง หลอดแรกของแต่ละแถวใส่ 0.5% Phenol Saline Solution จำนวน 0.8 มล. หลอดถัดไป หลอดละ 0.5 มล.

- ใส่ซีรั่มตัวอย่างลงในหลอดแรก 0.2 มล. เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำ 2- fold dilution จึงถึงหลอดสุดท้ายดูดทิ้งไป 0.5 มล. Serum dilution จะเป็น 1/5,1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560

- ใช้แอนติเย่นซึ่งผลิตโดยวิธียูโรเบียน ชุดที่ 1/32 มาเจือจางให้เป็น 1:10 แล้วใส่แอนติเย่นที่เจือจาง 1:10 ลงไปทุกหลอด ๆ ละ 0.5 มล. Final Dilution จะเป็น 1/10,1/20,1/40,1/80,1/160,1/320,1/640,1/1280,1/2560 และ 2/5120

การเตรียม Control สำหรับ European Method

- เตรียมหลอดแก้วขนาด 8 x 50 มม. จำนวน 5 หลอด ใส่ 0.5% Phenol Saline solution ลงไปในหลอดแรก 1.0 มล.และ 0.75,0.5,0.25,0.0 มล. ลงไปในหลอดถัดไปตามลำดับ แล้วใส่แอนติเย่นเจือจาง 1:20 ลงไป 0.0 มล. ในหลอดแรก และ 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 มล.ในหลอดถัดไป ตามลำดับ

- เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันทุกหลอด ทั้งซีรั่มตัวอย่าง และ Control นำเข้าตู้อบ 37°C. นาน 20± 1ชั่วโมง แล้วจึงนำมาอ่านผล

โดยวิธีเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ - ใช้ซีรั่มตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้ใน ยูเอสดีเอ และยูโรเบียนจำนวน 29 ตัวอย่าง

- ใช้แอนติเย่นเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์ชุดที่ 2/33 หมดอายุ 30/11/33 ดูดซีรั่มตัวอย่างโดยใช้ Bang's Pipette หยดลงบนแผ่นกระจก 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 มล. ตามลำดับ หยดเพลทแอกกลูติเนชั่นแอนติเย่นลงในซีรั่ม Dilution และ 1 หยด ใช้แท่งแก้วคนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

- อ่านผลโดยวางบนกล่องสีดำที่ใช้สำหรับอ่านผลของเพลทแอกกลูติเนชั่น อ่านผลเมื่อตั้งไว้ครบ 8 นาที

ทดสอบครั้งที่ 2 ใช้ซีรั่มโคจำนวน 39 ตัวอย่าง ทำการทดสอบโดยวิธี ยูเอสดีเอ,ยูโรเบียน และเพลทแอกกลูติเนชั่นเทสต์เช่นเดียวกับการทดสอบในครั้งแรก

จากตารางที่ 1 และ 2 การวินิจฉัย Negative,Suspicious,Positive ให้ผลไม่แตกต่างกันทั้งอ่านผล โดยวิธี Plate Agglutination Test, Tube Agglutination Test European และ Tube Aggultination Test USDA และการอ่านไตเตอร์ของซีรั่มตัวอย่าง จำนวน 68 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกันทั้งโดยวิธี European และ USDA จำนวน 62 ตัวอย่าง ให้ผลต่างกัน 1 dilution จำนวน 6 ตัวอย่าง

สรุป

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบโรคบรูเซลโลซิสในซีรั่มโค จำนวน 68 ตัวอย่าง โดยวิธี Plate Agglutination Test, Tube Agglutination Test ตามวิธีของยูโรเบียน และ Tube Agglutination Test ตามวิธีของ ยูเอสดีเอ พบว่าการตรวจสอบโดย Tube Agglutination Testตามวิธีของ ยูเอสดีเอ แม้จะให้ค่าซีรั่มไตเตอร์ต่างจากวิธีของยูโรเบียนเล็กน้อย คือในจำนวนซีรั่มที่นำมาทดสอบทั้งหมด 68 ตัวอย่าง จะมีเพียง 6 ตัวอย่างหรือ 8% เท่านั้น ที่ให้ค่าซีรั่มไตเตอร์ที่ต่างกัน ส่วนอีก 62 ตัวอย่าง หรือ 92% นั้น ให้ผลของซีรั่มไตเตอร์ที่เท่ากัน และค่าซีรั่มไตเตอร์ที่ต่างกัน ก็เพียง 1 dilution เนื่องจากการผลิตแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้ว โดยวิธีของ ยูเอสดีเอ เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดกว่าวิธีของยูโรเบียน ที่กรมปศุสัตว์ผลิตใช้อยู่ในปัจจุบัน เมื่อดูผลจากการทดลองครั้งนี้ ประกอบกับเอกสารอ้างอิงของ World Health Organization และเอกสารการผลิตแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วของ ยูเอสดีเอ แล้วการผลิตแอนติเย่นชนิดทดสอบแอกกลูติเนชั่นในหลอดแก้วของ ยูเอสดีเอ เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดกว่าวิธีของยูโรเบียน และให้ผลดีสามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้

ตารางที่ 1

	Plate Agg.Test		Tube Agg.Test European		Tube Agg.Test USDA	
	Reaction at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis
33	i	Negative	0	Negative	0	Negative
57	+	Negative	0	Negative	0	Negative
172	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
59	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
31	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
34	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
35	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
36	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
37	++	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
55	++	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
120	++	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
*30	++i	Suspicious	50 iu	Suspicious	25 iu	Negative
29	++i	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
23	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
341	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
60	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
24	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
27	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
22	+++i	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
*26	+++i	Positive	200 iu	Positive	100 iu	Positive
*347	++++	Positive	200 iu	Positive	100 iu	Positive
21	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
25	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
28	+++i	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
590	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
20	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
4	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
600	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
19	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive

ตารางที่ 2

	Plate Agg. Test ผล		Tube Agg.Test European ผล		Tube Agg.Test USDA ผล	
	Action at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis
49	-	Negative	0	Negative	0	Negative
48	-	Negative	0	Negative	0	Negative
45	i	Negative	0	Negative	0	Negative
42	+	Negative	0	Negative	0	Negative
38	+	Negative	0	Negative	0	Negative
37	+	Negative	0	Negative	0	Negative
36	+	Negative	0	Negative	0	Negative
35	+	Negative	0	Negative	0	Negative
34	+	Negative	0	Negative	0	Negative
32	+	Negative	0	Negative	0	Negative
31	+	Negative	25 iu	Negative	25 iu	Negative
29	++i	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
27	++i	Suspicious	50 iu	Suspicious	50 iu	Suspicious
24	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
41	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
23	+++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
2	++++	Positive	100 iu	Positive	100 iu	Positive
28	+++i	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
922	+++i	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
21	+++i	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
15	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
12	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
3	++++	Positive	200 iu	Positive	200 iu	Positive
**18	++++	Positive	800 iu	Positive	400 iu	Positive
20	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
14	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
9	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
8	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
4	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
1	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	Plate Agg. Test		ผลTube Agg.Test European		ผลTube Agg.Test USDA	
	Action at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis	Reaction at dilution of	Diagnosis
600	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
6	++++	Positive	800 iu	Positive	800 iu	Positive
7	++++	Positive	1600 iu	Positive	1600 iu	Positive
10	++++	Positive	1600 iu	Positive	1600 iu	Positive
16	++++	Positive	1600 iu	Positive	1600 iu	Positive
17	++++	Positive	1600 iu	Positive	1600 iu	Positive
**19	++++	Positive	1600 iu	Positive	1600 iu	Positive
5	++++	Positive	3200 iu	Positive	1600 iu	Positive
**13	++++	Positive	3200 iu	Positive	1600 iu	Positive

เอกสารอ้างอิง

Alton G.G., Jones.Lois. M & Pietz, D.E.(1975). Laboratory Tecniques In Brucellosis.World Organization Monograph Series No. 55:77- 86.

Pietz, D.E. Angus, R.D., Method for The Production of Brucella Abortus Strain 1119-3 Tube Agglutination test Antigen. SL Diagnosis Reagent Production guide No. R-03.

ประสิทธิภาพของวัคซีนฝีดาษไก่ชนิดเชื้อเป็น เมื่อเก็บไว้ในสภาพต่าง ๆ

KEEPING QUALITY OF FOWL POX VACCINE IN DIFFERENT TEMPERTURES

นันทนา โปษณเจริญ[1] กรรณิภา จิรจุมพล[1]

Nuntna Posanachareon Kanipa Jirachumpol

ABSTRACT

Infectivity of live fowl pox vaccine was determined after long storage at different temperature. Number of infectious virus decreased rapidly at high temperature. Storage of the fowl pox vaccine both at room temperature and in the incubator at 37°C.caused significant reduction of the infectious virus ($p < 0.001$) as well as vaccine efficiency. Less loss of efficiency and infectious virus occured when the vaccine was kept at low temperature (5°C., -20°C. and -40°C.)

บทคัดย่อ

ในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง เช่น ภายในห้องหรือตู้อบ ปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนฝีดาษไก่ชนิดเชื้อเป็น ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง) ลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณไวรัสมีชีวิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเก็บไว้นาน 21 วัน ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C.ปริมาณไวรัสมีชีวิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเก็บไว้นาน 15 วัน แต่ในสภาพอุณหภูมิต่ำถึงต่ำมากปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลงอย่างช้า ๆ ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เก็บในอุณหภูมิต่ำถึงต่ำมาก จะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเก็บน้อยกว่าในอุณหภูมิสูง กล่าวได้ว่าการเก็บวัคซีนต้องเก็บในอุณหภูมิต่ำ ซึ่งสามารถคาดคะเนอายุวัคซีนได้ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 5°C.เก็บได้นาน 3 ปี, อุณหภูมิ -20°C. นาน 7 ปี และ -40°C. นาน 15 ปี นับตั้งแต่วันเริ่มผลิตจนถึงวันหมดอายุบนฉลากบัดชาด

คำนำ

โรคฝีดาษไก่เป็นโรคระบาดที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจโรคหนึ่ง การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรค จึงเป็นสิ่งจำเป็น วัคซีนที่ใช้ต้องมีวิธีการเก็บเพื่อรักษาคุณสมบัติของไวรัสไว้ เพราะสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอุณหภูมิ สามารถทำให้จำนวนไวรัสที่มีชีวิตในวัคซีนลดลงระหว่างการเก็บ (2) ตามที่ได้กล่าวไว้เกี่ยวกับวัคซีนแห้งที่เก็บภายใต้สุญญากาศ (1)จะเก็บได้เป็นระยะเวลานาน (1) วัคซีนฝีดาษไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนแห้งภายใต้สุญญากาศเช่นกัน บรรจุขวดปริมาณ 1 ซีซี. จึงได้นำมาทดลองหาปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนแห้ง ระหว่างการเก็บในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่อุณหภูมิห้อง, ตู้อบและอุณหภูมิเย็นธรรมดาจนถึงเย็นจัดแช่แข็งพิเศษ (Biofreezer) จากข้อมูลที่ได้นำมาเขียนกราฟ และประมาณอายุวัคซีนที่เก็บอุณหภูมิต่ำได้ทำให้รู้จักวิธีการเก็บวัคซีนที่ถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนแห้งฝีดาษไก่ ใช้วัคซีนแห้งฝีดาษไก่ชุดที่ 10/29 ผลิตเมื่อ 4/6/29 ที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง ได้จากการเพาะ seed ไวรัสฝีดาษไก่บน chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ไก่ฟักอายุ 12 วัน เมื่อครบ 5 วัน จะเก็บเยื่อ CAM ที่มีการ

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา

ของ pock นำมารวมกัน และบดด้วยเครื่องบด แล้วเซนตริฟิวส์ ที่ 1000 รอบ นาน 10 นาที เก็บส่วนใสมาผสมกับสารคงสภาพหรือสเทบิไลเซอร์ (Stabilizer) ได้แก่ 0.3% PVP (Polyvinyl pyrrolidone) แจกใส่ขวด ๆ ละ 1 ซีซี. แล้วเข้าเครื่องทำแห้ง (Freeze- drying machine) นาน 27 ชั่วโมง วัคซีนแห้ง 1 ขวด มี 200 โดส

การทำวัคซีนในไก่ ผสมวัคซีนแห้ง 1 ขวด กับน้ำยาละลายวัคซีน (กลีเซอรีน + น้ำเกลือมาตรฐาน) 5 ซีซี. ใช้แหงบิกไก่ด้วยวิธี wing web stick method จะเกิดตุ่มพิษ(takes) ภายใน 7-10 วัน เมื่อครบ 14 วัน ฉีดพิษทับ (challenge) ด้วยไวรัสพีดาษไก่ ความแรง 10^5 EID_{50}/CC. และดูผลใน 10 วันต่อมา

ไก่และไข่ไก่ฟัก จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง เป็นลูกไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาวคละเพศ อายุประมาณ 2 อาทิตย์ ไม่เคยทำวัคซีนพีดาษมาก่อนนำมาทำวัคซีนพีดาษไก่ โดยวิธีแหงบิก 2 ครั้ง ด้วยเข็มรูปล้อม กลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 5 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม ไม่ได้ทำวัคซีนจำนวน 10 ตัว 1 กลุ่ม

ไข่ไก่ฟักอายุ 12 วัน เป็นไข่เชื้อกขาวจากพ่อแม่ไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาว จำนวน 1000ฟอง จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง

การเก็บวัคซีน แบ่งวัคซีนออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 100 ขวด นำวัคซีนแห้งที่ได้ทันทีจากเครื่องดูดแห้ง ไปเก็บในสภาพต่าง ๆ ดังนี้ อุณหภูมิห้อง (28°-30°C.), ตู้อบร้อน (37°C.),ตู้เย็น (5°,-20°,-40°C.) แล้วตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนแห้งดังนี้

ที่อุณหภูมิห้องและตู้อบร้อน ทำการตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนในวันที่ 0,3,7,10,14,21,30,45, 75 และ 85 วัน ตามลำดับ

ที่ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง ทำการตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิตทุก ๆ 2 เดือน ต่อครั้ง จำนวน10 ครั้ง เป็นเวลา 24 เดือน และหาประสิทธิภาพวัคซีน

การหาปริมาณไวรัสมีชีวิต นำตัวอย่างวัคซีนแห้งมาทำให้ละลายด้วยสารละลาย (Phosphate buffered saline) ไดเลดทำตัวอย่างวัคซีนแห้งโดยวิธีเจือจางเป็น10เท่าตามลำดับจากความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7} แล้วฉีดแต่ละความเจือจางใน CAM ของไข่ไก่ฟักอายุ 12 วันความเจือจางละ 6 ฟอง ๆ ละ 0.1 ซีซี. ส่องดูไข่ดายทั้งทุกวัน ในวันที่ 5 ตรวจดู pock ที่ขึ้นบน CAM โดยใช้ปากคีบ (forcep) ลอกแผ่น CAM วางบนกระดาษคาร์บอนสีดำ (ไม่ต้องนับจำนวน) ถ้าในความเจือจางน้อย จะเห็นวิการ (pock) ขึ้นติดกันจนเยื่อ CAM มีลักษณะหนา แต่ในความเจือจางมากขึ้น วิการจะเกิดน้อยลง แม้ว่าเห็น pock 1 จุด ก็นับว่า positive แล้วคำนวณหาค่า Embryo infective dose 50% (EID_{50}/ml) ตามวิธี Reed andMuench

การหาประสิทธิภาพวัคซีน ละลายวัคซีนแห้ง 1 ขวด ด้วยน้ำยาละลายกลีเซอรีน ผสมน้ำเกลือปกติ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 5 ซีซี. ใช้เข็มรูปล้อมจุ่มในวัคซีนที่ละลายแล้ว แหงบิกไก่ 2 ครั้ง (wing web stick method) ภายใน 7 วัน จะเกิดตุ่มพิษ (takes) ขึ้นบริเวณบิกพื้นหนัง และตุ่มพิจะหายภายใน 10 วัน นำไก่ที่ทำวัคซีนไปฉีดพิษทับ (Challenge)ด้วยวิธีป้ายเชื้อพิษพีดาษไก่ ความแรง 10^5 EID_{50}/CC. บนหงอนไก่ที่กรีดเป็นแผล ขณะเดียวกันฉีดพิษทับในไก่กลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนมาก่อน เรียกว่า กลุ่มควบคุม (control) เพื่อเปรียบเทียบผลภายหลังการฉีดพิษทับ 10 วัน ไก่กลุ่มที่ทำวัคซีนแล้ว จะไม่มีวิการ ตุ่ม หรือสะเก็ดพิดาษบนหงอน แต่ไก่กลุ่มควบคุม จะเกิดสะเก็ดพิดาษบนหงอน แสดงว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพให้ความคุ้มโรคหลังการทำวัคซีน2 อาทิตย์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง นำข้อมูลการหาปริมาณไวรัสมีชีวิต ที่ได้ในห้องปฏิบัติการ 2 ครั้ง ตามสภาวะแวดล้อมที่เก็บวัคซีน และการหาประสิทธิภาพ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิธี paired-t test

ผลการทดลอง

การเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิห้อง และตู้อบ 37°C.เมื่อพิจารณาการเกิดตุ่มพิภายหลังการแหงบิกและผลการฉีดพิษทับพบว่าปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้งซึ่งให้ผลคุ้มโรคดีที่สุด คือ $10^{5.76}$ EID_{50}/ml.($\bar{X}$.S.E.= $\pm$ 0.263) ปริมาณไวรัสมีชีวิตในวัคซีนแห้งลดลงอย่างรวดเร็ว ตามระยะเวลาที่เก็บนานขึ้น แต่ประสิทธิภาพวัคซีนลดลงเร็วกว่าปริมาณไวรัสซึ่งคุมผลจากไก่ป่วยภายหลังการฉีดพิษทับ

ตามปกติวัคซีนแห้งแต่ละชุดที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จะมีปริมาณไวรัสประมาณ 10^7 ถึง 10^8 EID_{50}/ml. ซึ่งมากกว่ามาตรฐานกำหนด เมื่อเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิสูงเช่นนี้ จากข้อมูลพบว่า สามารถเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิห้องนาน 75 วัน และตู้เย็นนาน 30 วัน โดยให้ผลการคุ้มโรค 100 % เมื่อมีปริมาณไวรัสมีชีวิตอย่างน้อย $10^{4.96}$ และ $10^{6.20}$ ตามลำดับ

ในอุณหภูมิต่ำถึงต่ำมาก การลดลงของจำนวนไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้ง เป็นไปอย่างช้า ๆ ปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้งที่เก็บอุณหภูมิ 5°C. ลดลงมากกว่าที่อุณหภูมิ -20°C. และ -40°C. ตามลำดับ เมื่อนำวัคซีนที่เก็บอุณหภูมิต่ำหกชุดมาแทงปีกไก่จะเกิดตุ่มพี (takes) ดี และวัคซีนให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับตลอด 24 เดือน

การเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน จะสามารถทำนายระยะเวลาการเก็บวัคซีนจากปริมาณไวรัสมีชีวิตที่ลดลงอย่างช้า ๆ จนเหลือปริมาณไวรัส 10^4 EID_{50}/ml. ตามมาตรฐาน (winter field and Hitchner;1965) จากข้อมูลบันทึกไว้นาน 24 เดือนดังนี้ ถ้า X เป็นระยะเวลาการเก็บวัคซีน (เดือน) และ Y เป็นจำนวนไวรัส (log 10 EID_{50}/ml.)

อุณหภูมิ 5°C. จะได้กราฟเส้นตรง มีสมการ $Y = 7.99 - 0.086\ X$ ($r = -0.96$; $n=11$) เมื่อแทนค่า $Y = 4$ (confidence limit) เพราะฉะนั้น $X \sim 46.4$ เดือนหรือ 3.8 ปี

อุณหภูมิ -20°C. จะได้กราฟเส้นตรงมีสมการ $Y=7.84-0.045X$ ($r=-0.94$; $n=11$) เมื่อแทนค่า $Y=4$ เพราะฉะนั้น $X \sim 85.3$ เดือน หรือ 7 ปี

อุณหภูมิ -40°C. จะได้กราฟเส้นตรงมีสมการ $Y=7.73-0.02X$ ($r=-0.98$; $n=11$) เมื่อแทนค่า $Y=4$ เพราะฉะนั้น $X \sim 186.5$ เดือน หรือ 15.5 ปี

Table 1 Keeping fowl pox vaccine in the room temperature (28°-30°C.) (*p<0.01 **p<0.001)

	Duration (days)									
	0	3	7	10	14	21	30	45	75	85
Virus titer	7.65	7.58	7.50	7.44	7.38	6.59*	6.45	5.76**	4.90	4.36
log 10EID50/ml.	±0.18	±0.03	±0.05	±0.22	±0.19	±0.25	±0.24	±0.33	±0.57	±0.14
Chickens showed "takes"after vaccination -	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	8/10
Chickens showed the lesions after challenged	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/10

* การเก็บวัคซีนผงไก่ฝีอุณหภูมิห้อง (28°C.-30°C.) ตั้งแต่วันที่ 21 และวันที่ 45 พบว่ามีการลดลงของจำนวนไวรัสมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r=-0.98$

Table 2 Keeping fowl pox vaccine in the incubator (37°C.).*p<0.01

	Duration (days)									
	0	3	7	10	14	21	30	45	75	85
Virus titer log 10EID50/ml.	7.65 ±0.18	7.51 ±0.11	7.48 ±0.02	7.40 ±0.05	6.91* ±0.08	6.33 ±0.06	6.20 ±0.05	5.57 ±0.19	4.77 ±0.18	4.23 ±0.13
Chickens showed "takes"after vaccination	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	8/10	5/10	4/10
Chickens showed the lesions after challenged	0	0	0	0	0	0	0	1/10	3/10	5/10

* ปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p<0.01) ตั้งแต่วันที่ 14 เป็นต้นไป

Table 3 Keeping Fowl pox vaccine in the low temperatures 5°C., -20°C. and -40°C.

Virus titer	Duration (months)										
	1	3	6	9	11	13	15	17	20	11	20
5°C.	7.60	7.59	7.48	7.45	7.40	6.80	6.70	6.68	6.37	6.22	5.37
-20°C.	7.62	7.62	7.62	7.59	7.56	7.53	6.98	6.90	6.85	6.82	6.79
-40°C.	7.65	7.62	7.62	7.60	7.58	7.54	7.49	7.38	7.33	7.31	7.15
Showed "takes"after vaccination	10/10										
Showed the lesions after challenged	0										

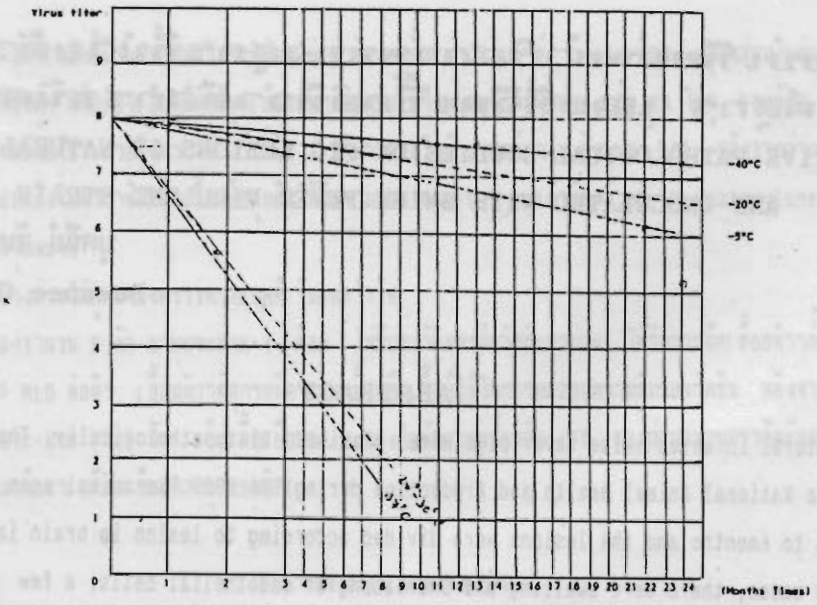


Figure 1 keeping quality of fowl pox vaccine

สรุปและวิจารณ์

การเก็บวัคซีนแห้ง (lyophilized vaccine) ผลิตไก่ที่อุณหภูมิสูงไม่เกิน 37°C.เช่นอุณหภูมิห้อง และตู้อบ (Incubator) การลดลงของจำนวนไวรัสมีชีวิตที่อุณหภูมิห้อง พบในวันที่ 21 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) และที่ตู้อบ ในวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เช่นกัน ซึ่งจำนวนไวรัสมีชีวิตในวัคซีนได้อย่างน้อย $10^{4.36}$ จึงจะมีความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับ สอดคล้องกันที่ได้มีการศึกษาความคงทน (Stability) ของวัคซีนเมื่อไปไว้ที่อุณหภูมิสูง ปริมาณไวรัสมีชีวิตจะลดลงแต่ต้องไม่ต่ำกว่า 10^4 EID_{50}/ml. วัคซีนจึงจะยังคงประสิทธิภาพ (Method for Examining, p. 132)

ส่วนการเก็บวัคซีนแห้งที่อุณหภูมิต่ำถึงต่ำมาก (5°C.,-20°C.,-40°C.) ปริมาณไวรัสมีชีวิตจะลดลงอย่างช้าๆ และเกือบไม่ลดลงในระยะเวลานาน 24 เดือน เนื่องจากความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสที่ลดลง กับระยะเวลาการเก็บวัคซีนในที่เย็น เป็นกราฟเส้นตรง ทำให้สามารถประมาณระยะเวลาการเก็บวัคซีนจนหมดประสิทธิภาพ ตามมาตรฐานกำหนด Safety margin ของวัคซีนฝีดาษไก่ มีค่า 10^4 EID_{50}/ml. เป็นอย่างน้อย (Price and Seager ;1956) เนื่องจากปริมาณไวรัสมีชีวิตในวัคซีนแห้งเริ่มต้นไม่เท่ากันทุกชุด ถ้าปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนเริ่มต้นมีค่า 10^{7-8} EID_{50}/ml.จะทำนายได้ว่า การเก็บวัคซีนแห้งที่อุณหภูมิ 5°C. ได้นานประมาณ 3 ปี, ที่ -20°C.ได้นานประมาณ 7 ปี และที่ -40°C.ได้นานประมาณ 15 ปีตามลำดับ สรุปว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาวัคซีน คือ ในอุณหภูมิต่ำ และดีที่สุดในอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-20°C. ถึง -40°C.)

เอกสารอ้างอิง

1. Hofstad ; M.S., Calnek B.W., Helmbldt C.F., Reid W.M., and Yoder H.W., Jr. 1987.Avian pox. Diseases of Poultry 7th edition : 560-609.
2. National Academy of Sciences Washington D.C., 1971, Fowl pox vaccine. Method for Examining Poultry Biologics and for Identifying and quantifying Avian Pathogens:126-133.
3. Price,R.J.and Seager,K.C.1965.Evaluation of immunity to Fowl pox.Poultry Sci.2 (35):379-384.
4. Winterfield, R.W., and S.B. Hitchner. 1965. Avian Dis. 9:237-41.
5. Reed, L.J., and H. Munch. 1938. A simple method for estinating fifty endpoints. Amer. J. Hyg. 27:493-497.

เปรียบเทียบพยาธิสภาพของสุกรที่ป่วยด้วยโรค
อหิวาต์สุกร และที่ฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแร
COMPARATIVE PATHOLOGICAL STUDIES ON PIG LESIONS IN NATURAL INFECTE
AND INOCULATED WITH SWINE FEVER VIRULENT STRAIN

บุศนีย์ จันทร์ประเสริ
Busanee Chanprase

ABSTRACT

51 Natural infected swine fever pigs were examined histopathologically. These pigs were submitted to National Animal Health and Production during1986-1989.The animal ages were ranging from 2weeks to 6months and the lesions were divided according to lesion in brain into 3 groups. Mild lesion cases, there were swelling and increasing of endothelial cells, a few perivascular cuffing were found in mild degree. Moderate lesion cases, there were typical perivascular cuffing and a few small nodular of glia cell proliferation. Severe lesion cases, 2-3 layers of perivascular cuffing and small nodular of glia cells proliferation were seen.

There were only 2 out of 40 pigs found necrotic changed in spleen compared with experimentally injected of virulent strain 10^4-10^5 MLD, all 5 pigs showed necrotic changes.

บทคัดย่อ

สุกรจำนวน 51 ตัวจากท้องที่ต่าง ๆ ที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร ระหว่างปี 2529-2932 โดยสุกรเหล่านี้ ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นอหิวาต์สุกรแล้ว ได้นำมาศึกษาปรียบเทียบวิการทางจุลพยาธิ โดยสุกรเหล่านี้มีอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ จนถึง 6 เดือน แยกตามวิการความรุนแรงที่พบที่สมองเป็น 3 แบบ คือ วิการต้านรุนแรงอย่างอ่อน ซึ่งพบการเพิ่มจำนวนเซลล์บุผิวเส้นเลือดเล็กน้อย และ glia cell proliferation มีน้อยมาก แทบไม่พบวิการความรุนแรงปานกลาง พบกรณีเพิ่มจำนวนเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือด 1-2 ชั้น และพบมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวเส้นเลือด และพบ glia cell proliferation เล็กน้อย วิการความรุนแรงมากพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบวเส้นเลือดหลายชั้นและพบ glia cell proliferation เป็นหย่อมอยู่ทั่วไปในสุกรที่มีความรุนแรงของวิการสมองพบเนื้อตายที่ม้ามจำนวน 2 ตัว ที่ต่อมน้ำเหลือง 4 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสุกรที่ฉีดเชื้อชนิดรุนแรง 10^4-10^5 MLD จำนวน 5 ตัว พบทั้ง 5 ตัว มีเนื้อตายที่ม้าม

คำนำ

ในระหว่างปี 2529-2532 พบว่าได้มีการระบาดของอหิวาต์สุกรมากในเขตภาคกลาง โดยพบว่าสุกรที่ป่วยมักเป็นสุกรเล็กสุกรใหญ่ไม่แสดงอาการ อัตราการตายไม่รุนแรง ระยะเวลาป่วยนาน และค่อย ๆ ลุกลามไปตอกใกล้เคียง สุกรที่ป่วยอาจรอดชีวิตแต่จะแคะแกรนการระบาดแตกต่างไปจากก่อนหน้านี้ซึ่งรุนแรง และอัตราการตายสูง และพบในทุกอายุของสุกร ในการศึกษาจุลพยาธิของสุกรที่ป่วยด้วยอหิวาต์สุกรครั้งนี้ได้ศึกษาวิการที่สมอง ทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง ปอด ไต กระเพาะปัสสาวะ และตับจากสุกรที่ส่งมาตรวจโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์ในระหว่าง 2529-2532 จำนวน 10 ตัว (Okaniwa 1959, Lin T.C. 1968, Vanoirschot J.T. 1980) เปรียบเทียบกับสุกรทดลองฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรง 10^4-10^5 MLD จำนวน 5 ตัว

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกรจำนวน 51 ตัว ซึ่งป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกรระหว่างปี 2529-2532 และถูกส่งมาตรวจพิสูจน์โรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์และ

---

[1]สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

ผลิตสัตว์แห่งชาติ สุกรเหล่านี้มีระยะเวลาในการบ่วยไม่เท่ากันอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ ถึง 6 เดือน สุกรส่วนใหญ่แสดงอาการมีไข้ ขนลุก อ่อนเพลีย ท้องผูก หรือท้องเสีย ที่ตัวมีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง โดยเฉพาะส่วนปลาย เช่น ขา ใบหู และท้อง หลังจากฆ่าชากตรวจด้วยตาเปล่าแล้วอวัยวะภายในต่าง ๆ ส่วนหนึ่ง ได้นำมาแช่ในน้ำยาฟอร์มาลิน บัฟเฟอร์ 10% หลังจากผ่านขบวนการแช่ในน้ำยาฟอร์มาลิน และฝังในพาราฟินแล้วเนื้อเยื่อถูกตัดให้มีความหนา 0.4-0.6 μ แล้วย้อมด้วยสี Haematoxylene และ Eosin เพื่อการศึกษาทางจุลพยาธิ

เนื้อเยื่อบางส่วนได้ถูกนำส่งตรวจทางแบคทีเรียและไวรัส

สุกรทดลองจำนวน 5 ตัว อายุประมาณ 4 เดือน ไม่มีประวัติการฉีดวัคซีนมาก่อน ได้รับการฉีดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงจำนวน 10^4-10^5 MLD ต่อตัว เชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงนี้เป็นเชื้อที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มของวัคซีน หลังจากที่สุกรป่วยและตาย ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน เก็บเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดองในน้ำยาฟอร์มาลิน 10% และผ่านขบวนการตัดย้อมเช่นเดียวกับในกลุ่มแรก แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบทางจุลพยาธิ

ผลการทดลอง

สุกรทั้ง 51 ตัวที่นำมาศึกษานี้ได้ตรวจทางไวรัสวิทยาและได้รับการยืนยันผลว่า พบไวรัสอหิวาต์สุกรทุกตัว สุกรเหล่านี้เมื่อตรวจชากดูด้วยตาเปล่าพบมีการบวมของม้าม และพบลักษณะinfarct ในบางตัว ในต้นพบการตั้งเลือด ปอดพบการตั้งเลือดและบางรายพบการบวมน้ำ(อาจพบการฉวยโอกาสของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย) ในไต พบการตั้งเลือดและพบจุดเลือดออก ต่อมน้ำเหลืองมีลักษณะบวมน้ำและพบลักษณะเลือดออกที่ Peripheral Haemorrhage ที่กระเพาะปัสสาวะพบจุดเลือดออก และการบวมน้ำด้วยในบางราย ที่ทอนซิลบางตัวพบการตั้งเลือดและเนื้อตาย

ในสุกรทดลองฉีดเชื้อ 5 ตัว พบทั้ง 5 ตัว มีลักษณะ Haemorrhagic infarct ที่ม้าม ที่ไตพบจุดเลือดออกที่ผิว ที่สมอง และเยื่อหุ้มสมองพบลักษณะการตั้งเลือด ที่ทอนซิลพบการตั้งเลือดและเนื้อตายทุกตัว ที่ปอดพบลักษณะการติดเชื้อแทรกซ้อนของเชื้อแบคทีเรีย

วิการทางจุลพยาธิของสุกรที่บ่วยด้วยอหิวาต์สุกร จำนวน 51 ตัวนั้นพบว่าที่สมองพบการตั้งเลือด และที่เส้นเลือดทั่ว ๆ ไปพบการเปลี่ยนแปลงโดยพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือดซึ่งเรียกว่า perivascular cuffing ร่วมกับการเพิ่มจำนวนขึ้นของ glia cells ในลักษณะของกลุ่มเล็ก ๆ (small nodular) หรือกระจัดกระจาย (diffuse) ซึ่งจากสุกรจำนวน 51 ตัวนี้ได้จัดความรุนแรงของวิการที่สมองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มวิการความรุนแรงอย่างอ่อน (mild lesion) พบว่า มีการบวมของเซลล์บุผนังเส้นเลือด (endothelial swelling) และพบที่ผนังเส้นเลือดจำนวนเล็กน้อย มีการเพิ่มจำนวนเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือดซึ่งพบในสุกรจำนวน 11 ตัว กลุ่มวิการความรุนแรงปานกลางพบ 16 ตัว มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวเส้นเลือด และการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือดประมาณ 1-2 ชั้น โดยพบ glia cell เพิ่มจำนวนขึ้นในลักษณะกระจัดกระจายหรือกลุ่มเล็กๆ เซลล์ที่เพิ่มจำนวนรอบ ๆ เส้นเลือดประกอบด้วย round cells, basophilic round cells และ plasma cells เล็กน้อย บางครั้งอาจพบ Eosinophilic cells กลุ่มวิการรุนแรงพบ 24 ตัว พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบๆเส้นเลือดperivascular cuffing หลายชั้น และพบทั่วไปเซลล์ประสาทบางแห่งพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะ pyknosis และการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบ ๆ เส้นเลือด ซึ่งพบทั้งในเยื่อหุ้มสมอง และ choroid plexus แต่วิการดังกล่าวพบมากในบริเวณ Brain stem

วิการที่ม้ามในแทบทุกรายที่ lymphatic tissue จะพบการลดจำนวนลงของ lymphocyte และการเพิ่มจำนวนของ Reticular cells ในสุกร 1 รายที่ม้ามพบ follicleมี lymphocyte อยู่ในลักษณะ pyknosis, karyorhexis และพบว่า Reticulum cells swelling และพบ 2 รายเส้นเลือดมีลักษณะ hyaline necrosis ตรงบริเวณที่มี Haemorrhagic infarct และเนื้อเยื่อรอบ ๆ เส้นเลือดดังกล่าวพบลักษณะ necrosis ด้วย ใน Red pulp พบว่า Reticulum cells อยู่ในภาวะ active และพบ Round cells แทรกอยู่ทั่วไป

วิการที่ต่อมน้ำเหลือง แทบทุกรายพบ decreasing of lymphatic cells ใน lymphatic tissue และบางครั้งพบ

lymphocytes ในลักษณะ pyknosis และ karyorhexis นอกจากนี้อาจพบ Reticulum cells มีลักษณะ swelling และเพิ่มจำนวนมากขึ้นด้วย ที่เส้นเลือดพบว่าเส้นเลือดมีลักษณะหนาตัวมากขึ้น และมักมีการคั่งเลือดใน 2รายพบเซลล์ผนังเส้นเลือด มีลักษณะ pyknosis วิการเลือดออก Bleeding มักพบในเนื้อเยื่อในส่วนของ cell pour substance

วิการที่ตับ ที่ Sinusoid พบมีการเพิ่มจำนวนของ Kupfer cell หรือ stellatecells และ active โดยมีลักษณะเป็น Large round cell และทำหน้าที่ phagocytes

ที่ไต พบว่ามีการคั่งเลือด และพบวิการเลือดออกด้วย พบ perivascular round cellinfiltration ที่ interstitial connective tissue ด้วยในบางราย นอกจากนี้บางตัวยังพบการติดเชื้อร่วมของ Bacteria ทำให้เกิดลักษณะของ Suppurative nephritis

ที่ปอด พบการคั่งของเส้นเลือด และพบวิการเลือดออกด้วย บางรายพบการบวมน้ำของalveoli และพบ Catarrhal inflammation 19 รายซึ่งทั้ง 19 รายนี้พบการเพิ่มจำนวนนวนของ phagocyte cells และ neutrophil จำนวนมากใน alveoli และพบว่า 17 รายมีลักษณะของ purulent bronchopneumonia ซึ่งพบ neutrophil จำนวนมาก และพบ bacteria ใน bronchiolar และ alveoli ด้วย

วิการที่ลำไส้ พบการคั่งเลือดใน mucous membrane และพบ Catarrhal changeและ edema ในหลายระยะ พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น Submucosa และแผลหลุมulcer จากสุกร 7 ราย จากลำไส้ใหญ่ของสุกร จำนวน 13 ราย

วิการสุกรทดลองที่ฉีดเชื้ออหิวาต์สุกร ชนิดรุนแรง 5 ตัว ที่สมอง พบว่าวิการอยู่ในชั้นรุนแรง 4 ตัว และอีก 1 ตัว วิการที่สมองอยู่ในระดับอ่อน ทั้ง 5 ตัวพบการคั่งของเส้นเลือดสมองสุกร 2 ตัว มีการอักเสบแบบมีหนอง (Suppurative meningoencephalitis)

ที่ปอด พบว่าสุกร 4 ตัว มีวิการ purulent bronchopneumonia

ที่ม้าม พบวิการ necrosis ทั้ง 5 ตัว ในบริเวณที่มีวิการ infarct ที่ต่อมน้ำเหลืองพบจำนวน lymphocyte ลดลง ใน lymphatic tissue และพบวิการ necrosis ของบริเวณ cell pour substance 3 ตัว ร่วมกับการมี proliferation of connectivetissue of vascular wall และพบมีการเพิ่มจำนวนของ Reticulo endothelial cells

Table 1 Degree of Lesions and Relations between Encephalitic and Meningeal Lesions

Degree of lesion	Lesions in CNS	Number of cases
Severe (24 cases)	ML stronger than EL	4
	ML and EL equivalent	20
	glia cell proliferation	19
Moderate (16 cases)	ML weaker than EL	8
	glia cell proliferation	11
Slight (11 cases)	ML stronger than EL	2
	glia cell proliferation	2

CNS: central nervous system, El : encephalitic lesions, ML : meningeal lesions

Table 2 The relation of appearance and severity of main lesion in the central nervous system

	Lesion	Necrotic lesion			Activation of reticuloendothelial system			Decrease of lymphocyte in the lymphotic tissue			Cell infiltration in kidney
		Spleen	Lymph node	Liver	Spleen	Lymph node	Liver	Spleen	Lymph node	Liver	
Severe	+++	-	2	-	-	2	2	6	5	5	1
24	++	2	1	-	5	4	3	11	-	3	3
cases	+	-	-	1	10	4	7	2	2	-	3
	±	-	-	-	3	1	1	-	-	-	-
	-	18	17	20	2	9	7	1	13	13	14
Mo-	+++	-	-	-	2	-	3	7	-	5	-
derate	++	-	-	-	-	2	2	2	-	1	-
16	+	-	-	-	5	4	4	3	3	2	2
cases	±	-	-	-	3	3	-	1	-	1	1
	-	14	10	16	4	1	7	1	7	5	10
	+++	-	1	-	-	-	-	4	-	1	2
Mild	++	-	-	-	1	-	5	2	2	3	-
11	+	-	-	-	2	2	3	-	-	1	3
cases	±	-	-	1	4	2	-	1	-	-	-
	-	10	7	8	3	4	1	3	6	4	6

Remarks : Result from 51 natural cases of swine fever (+++ Severest, ++ Severe, + Moderate, ± Slight, - Normal)

สรุปและวิจารณ์

วิการจุลพยาธิของอหิวาต์สุกรนั้นประกอบด้วยจุดใหญ่ ๆ คือ 1.วิการที่ระบบประสาทส่วนกลาง 2. ระบบน้ำเหลือง (lymphatic tissue) โดยวิการที่ประสาทส่วนกลางนั้นจะพบที่เส้นเลือด และรอบ ๆ เส้นเลือดทั้งในเนื้อสมอง เยื่อหุ้มสมอง และ choroid plexus มี perivascular cuffing นอกจากนี้ที่ผนังเส้นเลือดเองยังพบ Proliferation in Vascular Connective tissue และอาจพบการเสื่อมสลายของผนังเส้นเลือด นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มจำนวนของ glia cell ในลักษณะกระจัดกระจาย หรือเป็นกลุ่มเล็ก ๆ (Okaniwa 1959) ในสุกรที่เพิ่งเริ่มติดเชื้อ จะพบวิการอย่างอ่อนที่สมอง โดยพบลักษณะเซลล์บุผนังเส้นเลือดมีลักษณะ Swelling ม้ามและต่อมน้ำเหลืองยังไม่มีการลดจำนวนของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ในรายที่สมองมีวิการความรุนแรงมาก จะพบว่าส่วนใหญ่ในม้ามและต่อมน้ำเหลืองจำนวน lymphocytes จะลดลงและ Reticuloendothelial

system cells จะพบเพิ่มจำนวนขึ้น และอาจพบวิการเนื้อตายด้วย สำหรับการติดเชื้อแบคทีเรียนั้น เนื่องจากเชื้อหัวดุสุกรจะเข้าไปมีผลต่อระบบน้ำเหลือง lymphatic tissue ทำให้มีการลดจำนวนลงของ lymphocyte ทำให้ ระบบป้องกันของร่างกายอ่อนแอ ง่ายต่อการติดเชื้อภายนอก นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับสภาวะการเลี้ยง โรงเรือนและการถ่ายเทอากาศ ซึ่งในสุกรทดลองฉีดเชื้อชนิดรุนแรง 5 ตัว พบว่าทั้งหมดพบการติดเชื้อแบคทีเรียและพบวิการ purulent bronchopneumonia และที่รอบ ๆ เส้นเลือดสมองของสุกร 2 ตัว พบลักษณะของ Suppurative meningoencephalitis(Okaniwa 1959) ได้กล่าวถึงวิการของหัวดุสุกรที่ฉีดด้วยเชื้อหัวดุชนิดรุนแรงว่าหลังจากฉีดเชื้อ 2-3 วัน จะพบว่าที่ม้ามมีเนื้อตายที่ follicular lymphoid tissue และ parenchyma และมีการคั่งเลือดและการเพิ่มจำนวนของ Reticuloendothelial cells โดยระยะเวลายิ่งนานออกไป วิการก็จะยิ่งเด่นชัดมากขึ้น โดยพบทุกตัวมีวิการเนื้อตายที่ม้าม

ในการศึกษาครั้งนี้วิการที่ม้ามของสุกรที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ จำนวน 42 ตัว พบวิการเนื้อตายที่ม้ามเพียง 2 ตัว ส่วนสุกรทดลองฉีดเชื้อชนิดรุนแรงนั้นพบทั้ง 5 ตัว มี necrosis ที่ม้าม ในระดับรุนแรง 4 ตัว สุกรที่ติดเชื้อจากธรรมชาติทั้ง 2 ตัว ที่พบวิการเนื้อตายที่ม้ามนั้นวิการที่สมองก็อยู่ในระดับรุนแรงด้วย ส่วนวิการเพิ่มจำนวนของ Reticuloendothelial cell หรือการลดจำนวนของ lymphocyte นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของวิการสมอง

จะเห็นได้ว่าวิการของสุกรที่ติดเชื้อระหว่างปี 2529-2532 นี้ มีลักษณะเป็นวิการอย่างอ่อน (Mild lesion) วิการเนื้อตายพบน้อยมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะการติดเชื้อแบบ Chronic ซึ่งสรุปได้ว่าปัจจุบันการระบาดของหัวดุสุกรในบ้านเราเป็นการระบาดของเชื้อหัวดุสุกรแบบ Chronic ระยะเวลาการติดเชื้อยาวนานออกไป สุกรที่ป่วยก็จะพบแต่ในสุกรอายุน้อย วสุกรใหญ่มักไม่พบการป่วย แม้อยู่ในคอกใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเลี้ยง การจัดการ และการหาวัคซีน จึงต้องดูแลอย่างใกล้ชิด เพราะลักษณะการระบาดจะยืดเยื้อ สุกรบางตัวอาจติดโรค แต่แสดงออกอย่างช้า ๆ ผู้เลี้ยงจะต้องสังเกตอย่างใกล้ชิด และทำลายตัวป่วยออกอย่างเร็ว เพื่อกำจัดสาเหตุของการแพร่โรค การหาวัคซีนต้องทำสม่ำเสมอและควรพิจารณาอายุของสุกรที่หาวัคซีน โดยเฉพาะในแหล่งที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรคสูง ควรร่นอายุของสุกรให้น้อยลง และอาจต้องมีการฉีดวัคซีนซ้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มให้สูงขึ้นด้วย

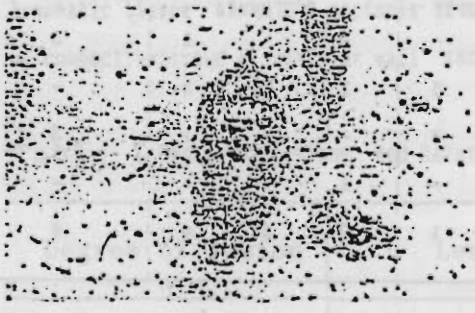


Fig 1 Severe perivascular cell infiltration

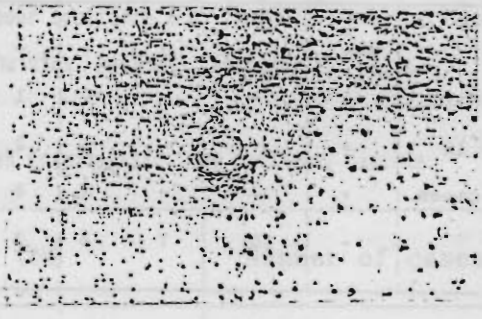


Fig 2 Perivascular cell infiltration and thickening of vascular cell.

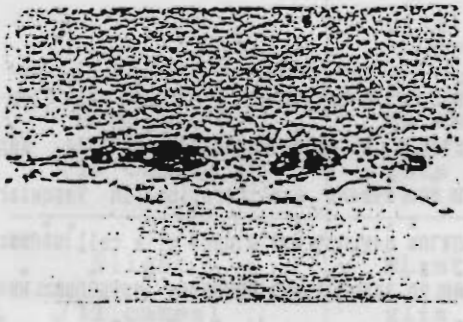


Fig 3 Meningeal cell infiltration and congestion in blood vessel.

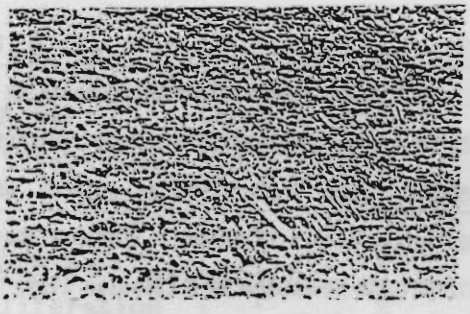


Fig 4 Glial proliferation.

Fig 5 Proliferation cell in chloroid plexus.

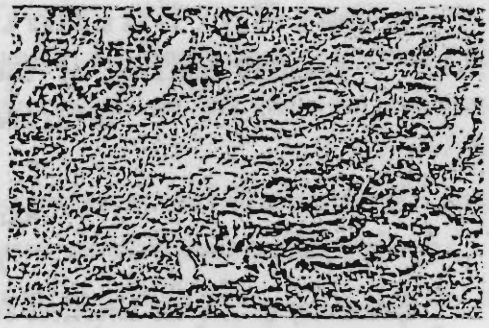


Fig 6 Perivascular cell infiltration in kidney.

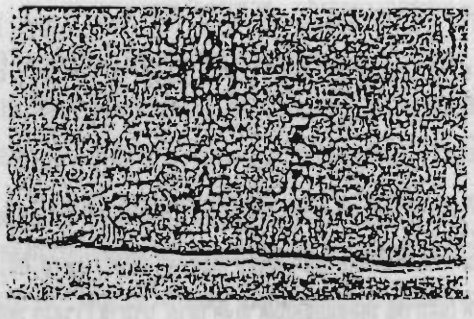


Fig 7 Bleeding of interstitial in kidney.

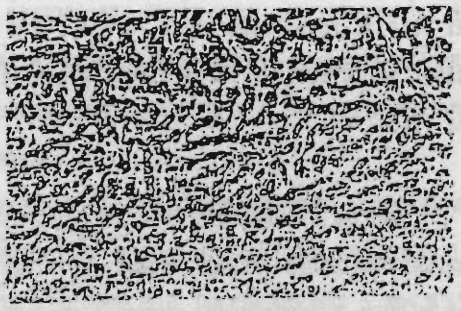


Fig 8 Swelling of kupffer's stellate cells.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. M. oriwaki, Dr. T. Kumagai, ส.พญ. กันยา สุวินทรากา, สพ.ญ. สมบูรณ์ สุธีวัฒน์, น.สพ. ประทีป เปมะโยธิน เจ้าหน้าที่และพนักงานกลุ่มงานพยาธิสถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

1. Dune, H.W. and Clark, C.D. 1968 Embryonic death, fetal mummification, still birth and neonatal death in pigs of gilts vaccinated with attenuated live-virus hog cholera vaccine. Am.J.Vet.Res., Vol.29 No.4.

2. Okaniwa, A and Ishitani, R. 1959-1960. Pathological studies on hog cholera,I,II,III,IV, V,VI. Bull.Nat. Inst.Anim.Hlth.37, 19-32 (1959):40,89-101 (1960) : 40,103-114 (1960):40, 115-125 (1960):40, 127-140 (1960):41,55-72 (1960) respectively.

3. Okaniwa, A. and Ishitani, R. 1962 Development of vascular lesions in the spleen of pigs suffering from hog cholera. Bull Nat. Inst. Anim.Hlth.Quart. 2, 37-47.

4. Okaniwa, A. 1969. Lesions in swine inoculated with attenuated hog cholera viruses. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 9, 92-103.

5. Lin, T.C.et al. 1969. Pathogenesis of hog cholera virus infection in experimentally inoculated swine. Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 9, 20-27.

ประสิทธิภาพของวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ชนิดเชื้อเป็นเมื่อเก็บไว้ในสถานภาพต่าง ๆ

Keeping quality of the Infectious Bronchitis Vaccine in different temperature

นันทนา โปษณเจริญ[1] กรรณิกา จิรจุมพล[1]

Nantana Posanachareon Kannipa Jirachumpol

ABSTRACT

Infectivity of live the Infectious Bronchitis Vaccine was determined after long storage at different temperature.Number of infectious virus decreased progressively when kept at room temperature and incubator at 37°C.It is statistically significant different($p<0.001$)when the vaccine was kept at room temperature for5days and 37°C.for3days.At the colder storage(5°C,-20°C,-40°C.), number of infectious virus slightly decrease.Vaccine efficiency is also correlated to number of the virus.

บทคัดย่อ

ในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง เช่น ภายในห้อง หรือตู้อบ ปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ชนิดเชื้อเป็นผลิตโดยศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง ลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่าในสภาวะเช่นนี้ปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.001$) เมื่อเก็บไว้นาน 5 วันที่อุณหภูมิห้อง และนาน 4 วันที่อุณหภูมิตู้อบ 37°C.แต่ในสภาพแวดล้อมอุณหภูมิต่ำถึงต่ำมาก ปริมาณไวรัสมีชีวิตลดลงอย่างช้าๆ ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เก็บในสภาวะนี้ จะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาของการเก็บน้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง นั่นคือ การเก็บวัคซีนต้องเก็บที่อุณหภูมิต่ำถึงต่ำมาก

คำนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นโรคระบาดที่ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก การใช้วัคซีนป้องกันโรคนี้เป็นสิ่งจำเป็น วัคซีนที่ใช้ต้องมีการเก็บรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพของไวรัสมีชีวิตในระหว่างการเก็บ วัคซีนแห้ง(lyophilized)หลอดลมอักเสบสามารถเก็บได้นาน 30 ปี (3)ในอุณหภูมิเย็น (ตู้เย็น) โดยมี 10% กลูโคสเป็นสารที่ทำให้ไวรัสนี้คงสภาพในการทำแห้ง และสภาพแช่แข็ง วัคซีนหลอดลมอักเสบไก่ชนิดแห้งผลิตโดยกรมปศุสัตว์ บรรจุขวด 1 ซี.ซี.ภายใต้สุญญากาศและมี 10% กลูโคส เป็นสารคงสภาพในวัคซีนเช่นกัน จึงนำมาศึกษาหาปริมาณไวรัสมีชีวิตและประสิทธิภาพวัคซีนแห้งระหว่างการเก็บในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่นอุณหภูมิห้อง,ตู้อบ,ตู้เย็นธรรมดา จนถึงตู้แช่แข็งพิเศษ (Biofreezer)จากข้อมูลที่ได้นำมาเขียนกราฟ และประมาณอายุการเก็บวัคซีนที่อุณหภูมิต่ำได้หาให้รู้จักวิธีเก็บวัคซีนที่ถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบไก่ ใช้วัคซีนแห้งชุดที่ 24/29 ผลิตเมื่อ 10/9/29 ที่ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง ได้จากการผ่าน Attenuated virusเข้าallantoic fluid (A.F.)ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน คัดไข่ตายใน 24 ชั่วโมงทิ้ง เก็บทั้งไข่เป็นและไข่ตายในชั่วโมงที่ 36 แช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 5°C.ค้างคืน (overnight) จึงเก็บ(Harvest)น้ำไข่ทั้งหมด จากนั้นนำน้ำไข่มาผสมกับสารคงสภาพ(Stabilizer)ได้แก่0.3% PVP(Polyvinylpyrrolidone)ซึ่งมี 10% กลูโคสประกอบอยู่ด้วยผสมให้เข้ากันแล้วแจกใส่ขวดๆ ละ 1 ซี.ซี.นำเข้าเครื่องทำแห้ง (Freeze-drying machine)นาน 27 ชั่วโมง วัคซีนแห้ง 1 ขวดมี 100 โดส

การทำวัคซีนในไก่ ผสมวัคซีนแห้ง 1 ขวด กับน้ำยาละลายวัคซีน (น้ำกลั่นมาตรฐาน)5 ซี.ซี. นำไปหยอดจมูกหรือหยอดตาไก่ตัวละ 2 หยด เก็บซีรั่มไก่ก่อนทำวัคซีน (negative serum) และหลังทำวัคซีน 21 วัน (positive serum)ซีรั่มที่เก็บจะนำมาหาแอนติบอดี้ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี neutralization test และคำนวณหาค่า neutralizing index (NI)

---

[1]ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

ไก่และไข่ไก่ฟัก จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง เป็นลูกไก่พันธุ์ลิกฮอร์นขาว คละเพศ อายุประมาณ 1 เดือน ไม่เคยทำวัคซีนหลอดลมอักเสบมาก่อน นำมาทำวัคซีนโดยวิธีหยอดจมูกหรือตา ด้วยเชื้อหยอดจมูกกลุ่มละ 10 ตัว จำนวน 5 กลุ่ม

ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน เป็นไข่เปล็อกขาวจากพ่อแม่ไก่พันธุ์ลิกฮอร์นขาว จำนวน 1000 ฟอง จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง

การเก็บวัคซีน แบ่งวัคซีนออกเป็น5กลุ่มๆละ100ขวด นำวัคซีนแห้งที่ได้หมักจากเครื่องคุดแห้งไปเก็บในสภาพต่างๆดังนี้ อุณหภูมิห้อง(28°-30°C.),ตู้อบร้อน(37°C.),ตู้เย็น(5°,-20°,-40°C.)แล้วตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิตและประสิทธิภาพวัคซีนแห้งดังนี้

ที่อุณหภูมิห้องและตู้อบร้อน ทำการตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนในวันที่ 0,3,5,7,10,14,21,30 วัน

ที่ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง ทำการตรวจหาปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนทุกๆ 2 เดือนต่อครั้งจำนวน 10 ครั้งเป็นเวลา 24 เดือน

การหาปริมาณไวรัสมีชีวิต นำตัวอย่างวัคซีนแห้งมาทำให้ละลาย ด้วยสารละลาย PBS ไดเตรทตัวอย่างวัคซีนแห้ง โดยวิธีเจือจางเป็น 10 เท่าตามลำดับ จากความเจือจาง 10^{-1}ถึง 10^{-7}แล้วฉีดแต่ละความเจือจางใน allantoic fluid ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันความเจือจางละ 5 ฟอง ๆละ 0.1 ซีซี.ส่องดูไข่ตายทุกวัน และจดบันทึกอัตราการตายไว้นาน 7 วัน จึงนำมาคำนวณหาค่า Embryo infective dose 50% (EID_{50}/ml) ตามวิธีReech and Muench

การหาประสิทธิภาพวัคซีน ละลายวัคซีนแห้ง 1 ขวด ด้วยน้ำยาละลาย 5 ซีซี. นำไปไบหยอดจมูกหรือตา เก็บซีรัมก่อนและหลังการทำวัคซีนมาทำ neutralization test และใช้ไวรัสเตรนเดียวกับวัคซีน โดยการเจือจางไวรัสเป็น 10 เท่าจาก 10^{-1} ถึง 10^{-7}ผสมกับซีรัมทั้งก่อน และหลังทำวัคซีน แล้วฉีดส่วนผสมไวรัสกับซีรัมเข้าไข่ไก่ฟักอายุ10 วันความเจือจางละ 5 ฟอง นำเข้าตู้ฟักไข่ แล้วบันทึกอัตราการตายทุกวัน นาน 7วัน จึงคำนวณหาค่า EID_{50}/ml.ตามวิธี Reech and Muench และคำนวณหาค่า neutralizing index (NI) ค่า NI $\geq$ 2 จึงจะถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค

การวิเคราะห์ผลการทดลอง นำข้อมูลการหาปริมาณไวรัสมีชีวิต ที่ได้ในห้องปฏิบัติการ2 ครั้งตามสภาพแวดล้อมการเก็บวัคซีน และการหาประสิทธิภาพ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี paired-t test

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 และ 2 ในสภาวะแวดล้อมอุณหภูมิสูง ความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสมีชีวิตหลีดลงกับค่า NI มีนัยสำคัญทางสถิติโดยที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 0 กับ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)และในวันที่ 0 กับ 5 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง($p<0.001$) ส่วนการเก็บที่ตู้อบร้อน 37°C.ความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสมีชีวิตหลีดลงกับ NI มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในวันที่ 0 กับ 3 ($p<0.001$)

จากความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสมีชีวิตกับค่า NI สามารถเขียนกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r = -0.99$ ถ้าให้ X เป็นปริมาณไวรัสมีชีวิต Y เป็นค่าNIจากตาราง 1 และ 2ได้กราฟเส้นตรง $Y_1 = 0.68\ X-0.45$ และ $Y_2 = 0.72\ X-0.66$ ตามลำดับซึ่งถ้ารู้ค่า NI ก็สามารถหาปริมาณไวรัสมีชีวิตได้ ดังนั้นถ้าตามมาตรฐานกำหนด NI=2 (3)จะคำนวณหาปริมาณไวรัสมีชีวิตอย่างน้อยที่สามารถให้ความคุ้มโรคได้ เท่ากับ $10^{3.6} \pm 0.165$ หรือ $10^{3.765}$ (confidence limit) ในสภาพอุณหภูมิสูง

ตารางที่ 3 ในสภาวะแวดล้อมอุณหภูมิต่ำ(5°C. ถึง -40°C.)ปริมาณไวรัสมีชีวิตที่เก็บในตู้เย็น 5°C.ลดลงมากกว่าที่อุณหภูมิ -20°C.และ -40°C.ซึ่งประสิทธิภาพของวัคซีนลดลงตามปริมาณไวรัสมีชีวิตที่มีอยู่ด้วย แต่ค่าNIไม่น้อยกว่า 2 ตลอด 24 เดือน เนื่องจากความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัสมีชีวิตหลีดลงกับระยะเวลาการเก็บวัคซีน สามารถเขียนกราฟได้เส้นตรง ถ้า A เป็นระยะเวลาการเก็บวัคซีน (เดือน) B เป็นปริมาณไวรัสมีชีวิต $\log_{10}EID_{50}$/ml.ซึ่งกำหนดตามมาตรฐาน B= 30.0 ($10^{3.0}EID_{50}$/ml.)(3) จะสามารถทำนายระยะเวลาการเก็บวัคซีนได้โดยวิธีแทนค่าในสมการ ดังนี้

อุณหภูมิ 5°C. สมการกราฟเส้นตรง คือ A=5.96-0.10 B($r = -0.96$; $n = 11$)แทนค่า B= 3.0 ได้ B= 29.6 เดือน หรือ 2 ปี

อุณหภูมิ -20°C.สมการกราฟเส้นตรง คือ A= 5.95-0.07B($r = -0.97$; $n = 11$)แทนค่า B= 3.0ได้ A= 42.1เดือนหรือ 3.5 ปี

อุณหภูมิ -40°C.สมการกราฟเส้นตรง คือ A= 5.76-0.07B($r = -0.97$; $n = 11$)แทนค่า B= 3.0ได้ A= 138เดือนหรือ 11.5 ปี

Table 1 Keeping the Infectious Bronchitis Vaccine in the room temperature (28°C.-30°C.) ($p^* < 0.05$ ค่าอื่น ๆ $p < 0.001$)

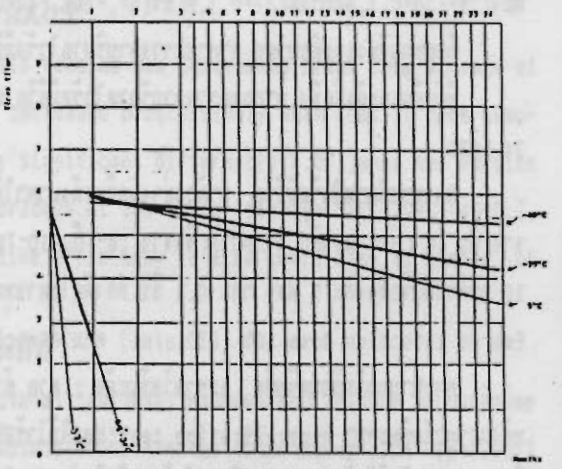
	Duration (Days)							
	0	3	5	7	10	14	21	30
Virus titer Log 10 EID_{50}/ml.	5.69* ± 0.15	5.25 ± 0.23	4.54 ± 0.12	4.39 ± 0.03	4.25 ± 0.10	3.22 ± 0.08	2.83 ± 0.04	2.19 ± 0.06
NI	3.33 ± 0.10	3.05 ± 0.09	2.60 ± 0.16	2.60 ± 0.11	2.48 ± 0.02	1.93 ± 0.17	1.47 ± 0.06	0.86 ± 0.24

Table 2 Keeping the Infectious Bronchitis Vaccine in the incubator (37°C.) ($p^* < 0.05$ ค่าอื่น ๆ $p < 0.01$)

	Druation (Days)			
	0	3	5	7
Virus titer Log 10 EID_{50}/ml.	5.69* ± 0.015	4.33 ± 0.010	3.44 ± 0.11	2.29 ± 0.18
NI	3.33 ± 0.10	2.59 ± 0.18	1.81 ± 0.15	0.92 ± 0.35

Table 3 Keeping the Infectious Bronchitis Vaccine in the cold temperature (5°C.,-20°C. and -40°C.)

Virus titer Log 10 EID_{50}/ml.	Duration (months)												NI
	1	3	6	9	11	13	15	17	20	22	24		
At 5°C.	5.68	5.68	5.49	5.30	4.65	4.46	4.29	4.25	3.88	3.42	3.30		2.2
At -20°C.	5.69	5.68	5.60	5.40	5.31	5.20	4.88	4.68	4.58	4.46	4.32		2.6
At -40°C.	5.68	5.68	5.85	5.85	5.46	5.37	5.35	5.30	5.28	5.25	5.23		2.6



KEEPING QUALITY OF THE INFECTIOUS BRONCHITIS VACCINE

สรุปและวิจารณ์

การเก็บวัคซีนแห้ง (lyophilized vaccine)หลอดลมอักเสบไก่ในอุหภูมิสูง ปริมาณไวรัสมีชีวิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ($p<0.001$)นาน 5 วัน ที่อุหภูมิห้อง(28°-30°C.)และนาน 3 วันที่อุบร้อน 37°C. ปริมาณไวรัสมีชีวิตมีชีวิตลดลง สัมพันธ์กับค่า NI ซึ่งเมื่อนำมาเขียนกราฟจะได้กราฟเส้นตรงจากกราฟเส้นตรงนี้จะได้ปริมาณไวรัสมีชีวิตอย่างน้อย$10^{3.765}EID_{50}$/ml.ที่ทำให้วัคซีนมีความคุ้มโรค คือค่า NI=2 และวัคซีนจะหมดประสิทธิภาพ (ค่า NI<2)ที่อุหภูมิห้อง และอุบร้อนในวันที่ 14 และ 5ตามลำดับ ผลปริมาณไวรัสมีชีวิตที่ได้มากกว่ามาตรฐานไวรัสมีชีวิตของหลอดลมอักเสบที่กำหนดไว้(3) พบว่าปริมาณไวรัสมีชีวิตต้องมีค่าอย่างน้อย $10^{3.5}EID_{50}$/ml. จึงจะให้ความคุ้มโรค

ในทางตรงข้ามการเก็บวัคซีนในอุหภูมิต่ำ ปริมาณไวรัสมีชีวิต และประสิทธิภาพวัคซีนเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ที่อุหภูมิต่ำมาก เช่น-20°C.หรือ-40°C.ปริมาณไวรัสมีชีวิตและประสิทธิภาพวัคซีนก็อบไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการเก็บวัคซีนแห้งในสภาวะนี้จึงมีอายุการเก็บนานปลายปีจากการคำนวณตามตาราง 3 ซึ่งสอดคล้องกับการกล่าวว่าวัคซีนแห้งหลอดลมอักเสบไก่ที่บรรจุในขวดแก้วภายใต้สุญญากาศเก็บในตู้เย็นได้นานอย่างน้อย30ปี(3)เนื่องจากปริมาณไวรัสมีชีวิตของวัคซีนแห้งที่ผลิตแต่ละชุดเริ่มต้นไม่เท่ากัน ถ้าวัคซีนแห้งมีปริมาณไวรัสมีชีวิตเริ่ม 10^6EID_{50}/ml.จากกราฟสามารถทำนายได้ว่าการเก็บวัคซีนแห้งที่อุหภูมิ 5°C.นาน2ปี ที่อุหภูมิ-20°Cนาน 3 ปี และที่อุหภูมิ-40°C.นาน11ปี สรุปว่าสภาวะดีที่สุดสำหรับการเก็บวัคซีน คืออุหภูมิต่ำถึงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง(-20°C,-40°C.)

เอกสารอ้างอิง

1. Biester and Schwarte,1975,Avian Infectious Bronchitis,Diseases of Poultry 5th edtion:601-606.
2. Hofstad M.S.,Calnek B.W.,Helmboldt C.F.,Reid W.M.,Yoder H.W.,1978, Avian Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry 7th edition : 487-503.
3. National Academy of Sciences Washington D.C. 1971. Infectious Bronchitis vaccine.Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens:42-107
4. Reed,L.J.,and H.Muench.1938.A simple method for estimating fifty percent endpoints.Amer.J.Hyg 27:493-497.

พยาธิสภาพเส้นเลือดเสื่อมของสมอง และไขสันหลัง

SWINE CEREBROSPINAL ANGIOPATHY

บุศนีย์ จันทร์ประเสริฐ[1] มาซาชิ โมริวากิ[1]

Busanee Chanprasert Masashi Moriwaki

ABSTRACT

7 Pseudorabies suspected pigs were submitted to National Animal Health and Production Institute for diagnosis. Those pigs showed diarroea, circling spasms and convulsion. No macroscopic changes were examined. Histopathological examination showed wide spread damage to blood vessels of central nervous system. The vascular lesions were degenerative and there were necrotic changes of the vessel walls. Many vessels were surrounded by zone of droplet varying in diameter which showed periodic acid-schift-positive eosinophilic droplet. Demyelination and malacia were found in pons and midbrain.

บทคัดย่อ

สุกรแสดงอาการ ท้องเสีย เดินเป็นวงกลม ชัก เกร็ง ผู้ดูแลสงสัยว่าสุกรป่วยเป็นโรคออเจสกี้ เมื่อผ่าชากไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในต่าง ๆ แต่เมื่อดูทางจุลพยาธิพบว่าเส้นเลือดของสมองเสื่อมทั่ว ๆ ไปโดยพบว่าการเส้นเลือดสมองเสื่อม และลักษณะเนื้อตายของผนังเส้นเลือดขนาดเล็กและขนาดกลาง เส้นเลือดบางเส้นถูกล้อมรอบด้วย Eosinophilic droplet ขนาดต่าง ๆ กันซึ่งเมื่อย้อมด้วยสี Periodic acid-schift พบว่าให้ผลเป็นสีแดง นอกจากนี้ที่ผนังเส้นเลือดบางเส้นมีลักษณะhyaline degeneration

ที่เนื้อสมองส่วนของ Pons และ midbrain พบลักษณะของ malacia และ demyelination ลักษณะดังกล่าวเป็นวิการเฉพาะที่เรียกว่า Cerebrospinal angiopathy

คำนำ

วิการเส้นเลือดเสื่อมในสมอง และไขสันหลังของสุกร Swine cerebrospinal angiopathy นี้ ได้รายงานการพบครั้งแรกโดย Harding 1966 และต่อมาได้รายงานการพบวิการดังกล่าวอีกหลายแห่ง (3,4,5,6,7) ลักษณะจำเพาะของวิการดังกล่าวคือผนังเส้นเลือดแดงขนาดกลางและขนาดเล็กของสมองและไขสันหลัง จะพบวิการการเสื่อมแบบ fibrinoidหรือ hyaline degeneration ของชั้นใน (tunica intima) และชั้นกลาง (tunica media) และมักพบ pyknosis และ degeneration ของเซลล์กล้ามเนื้อรอบ ๆ เส้นเลือดในรายที่วิการรุนแรงจะพบว่ามี eosinophilic droplet ขนาดต่าง ๆ กันอยู่รอบ ๆ เส้นเลือด ซึ่งเมื่อย้อมด้วย periodic acid-schift จะให้ผลบวกเป็นสีแดง ลักษณะของ eosinophilic ดังกล่าวเป็นผลมาจากการที่เส้นเลือดเสื่อม ทำให้น้ำเลือดและสารโปรตีนบางอย่างจากเส้นเลือดซึมผ่านผนังเส้นเลือดและสะสมอยู่รอบ ๆ เส้นเลือด ลักษณะของการสะสมสารโปรตีนรอบๆ เส้นเลือดนี้จะพบอยู่ทั่วไปในเนื้อสมองพบลักษณะของเซลล์ประสาทบวม (axon swelling) ในบางแห่งของเนื้อสมอง ร่วมกับวิการ demyelination และ malacia โดยพบการเพิ่มจำนวนของ glitter cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่กินสารไขมันในบางแห่ง วิการ demyelination และ malacia นี้เป็นผลมาจากการที่เส้นเลือดเสื่อมสภาพและตีบตัน

---

[1] สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

บางครั้งพบการอุดตันของเส้นเลือดด้วย (thrombosis) ทำให้การนำอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อสมองไม่เพียงพอเนื้อสมองเสื่อม และสัตว์แสดงอาการทางประสาท อาการของ cerebrospinal angiopathy นี้ อาจคล้ายกับโรคทางระบบประสาทหลายโรค เช่นโรคออเจสกี้ meningoencephalitis, eosinophilica, polioencephalomalacia และการเป็นพิษของสารตะกั่ว ซึ่งต้องดูด้วยจุลพยาธิเท่านั้นที่จะแยกวินิจการจากกันได้

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกร 7 ตัว จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์หับกวาง ถูกส่งมาตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์ โดยผู้ดูแลสงสัยว่าสุกรดังกล่าวเป็นโรคออเจสกี้ สุกรดังกล่าวอายุ 4 สัปดาห์ 2 ตัว อายุ 5 วัน 5 ตัว โดยมาจาก 2 คอกจากสุกรป่วยจำนวน 3 คอก ขณะนำส่งนั้นสุกรยังมีชีวิตอยู่ เมื่อผ่าชากตรวจวินิจการอวัยวะภายในด้วยตาเปล่าแล้ว วินิจการบางส่วนส่งไปเพาะเชื้อแบคทีเรีย และบางส่วนส่งไปตรวจสอบพยาธิออเจสกี้ และโรคอหิวาต์สุกรต่อไป เนื้อเยื่อถูกส่วนหนึ่งจะถูกเก็บในน้ำยาฟอร์มาลินบัฟเฟอร์ 10 % หลังจากนั้นนำมาตัด และผ่านขบวนการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน แล้วตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 0.4 - 0.6 µ และย้อมด้วยสี Hematoxylinและ eosin เนื้อเยื่อบางส่วนนำมาย้อมสีพิเศษ periodic acid-schift (PAS), Elastic Van Gieson, Masson's trichrome, Weigert's fibrin stain, Alcian blue

ผลการทดลอง

สุกรทั้ง 7 เมื่อผ่าชากดูด้วยตาเปล่าไม่พบวินิจการผิดปกติ แต่เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสุกรที่อายุ 4 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือดแดงของสมอง โดยเส้นเลือดแดงขนาดกลางและขนาดเล็ก จะพบว่าผนังเส้นเลือดหนาตัวขึ้นกว่าปกติ เส้นเลือดแดงที่หนาตัวขึ้นนั้น พบวินิจการความเสื่อมของเส้นเลือดด้วยความรุนแรงต่าง ๆ กัน โดยพบว่าผนังเส้นเลือดบางแห่ง จะบวม และพบลักษณะของ pyknosis และ karyorrhexis ของ nucleus ของเซลล์ชั้น tunica media และ intima endothelial cell มีลักษณะกลมและเพิ่มจำนวนมากขึ้น และอาจพบ proliferation และ infiltration ของชั้น adventitia

ในผนังเส้นเลือดแดงบางเส้น จะพบลักษณะ fibrinoid necrosis หรือ hyaline degeneration ของผนังเส้นเลือดชั้น media

ในเส้นเลือดที่มีวินิจการรุนแรงอาจพบว่ารอบ ๆ เส้นเลือดมี eosinophilic droplet ขนาดต่าง ๆ กัน ซึ่งเมื่อย้อมด้วย PAS จะให้สีแดง เมื่อย้อมด้วย Van Gieson ให้สีเหลือง และให้สีม่วงเมื่อย้อมด้วย Weigert's fibrin stain และให้สีแดงเมื่อย้อมด้วย Alcian blue

วินิจการความเสื่อมของเส้นเลือดดังกล่าวพบทั่วไปในทุกส่วนของสมอง ที่เยื่อหุ้มสมองพบว่าผนังเส้นเลือดแดงหนาตัวขึ้น แม้ว่าจะไม่พบ eosinophilic droplet เลยก็ตามความรุนแรงของวินิจการความเสื่อมของเส้นเลือดนั้น พบเป็นมากที่สุดที่ส่วนของ pons และ midbrainนอกจากนี้ในส่วนของเนื้อสมองยังพบวินิจการ gliosisและperivascular cuffing รอบ ๆ เส้นเลือดบางแห่งด้วย

ในเนื้อสมองส่วนของ pons และ midbrain พบการเพิ่มจำนวนของ glitter cell และวินิจการ encephalomalacia และ axon swelling ข้าง ๆ เนื้อสมองที่เกิด demyelination

นอกจากนี้ ยังพบเส้นเลือดของดับ ตับอ่อน และลำไส้เล็ก มีวินิจการของผนังเส้นเลือดเกิด swelling จากการเพาะเชื้อแบคทีเรีย จากวัยวะภายใน พบเชื้อ streptococcus และ staphylococcus

จากการตรวจ FA ต่อเชื้ออหิวาต์สุกรและพิษสุนัขบ้าเทียม ไม่พบเชื้อทั้งสองดังกล่าว

สรุปและวิจารณ์

รายงานนี้เป็นรายงานทางจุลพยาธิครั้งแรกในประเทศไทย ที่พบวินิจการ Cerebrospinal angiopathy โดยมีลักษณะจำเพาะเหมือนที่รายงานโดย (1,2,3,4,5,7) อันประกอบไปด้วย fibrinoid necrosis หรือ hyaline degeneration

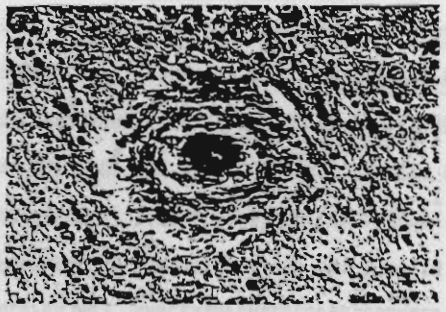


Fig 1 Blood vessel in midbrain with proliferation and infiltration of adventitial layer

Fig 2 Cerebral blood vessel with fibrinoid necrosis

Fig 3 Meningeal vessels with very thick medial wall

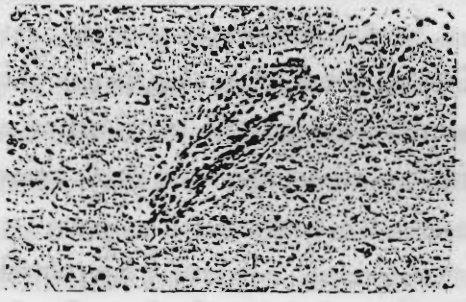


Fig 4 Cerebral blood vessel with considerable adventitial infiltration of round cells

Fig 5 Focal demyelination in brain stem

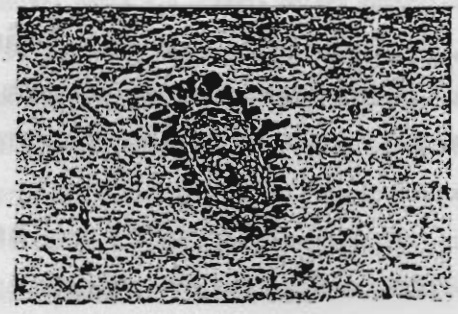


Fig 6 Severe vascular lesions hyaline degeneration of arterial wall with perivascular eosinophilic droplets in brain stem (PAS staining)

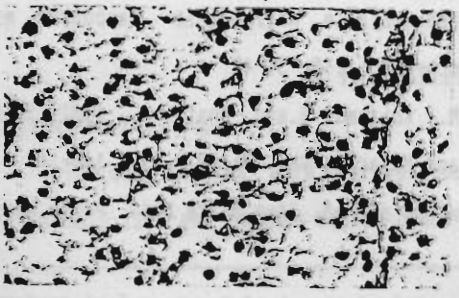


Fig 7 Focal malacia in midbrain with glitter cells proliferation

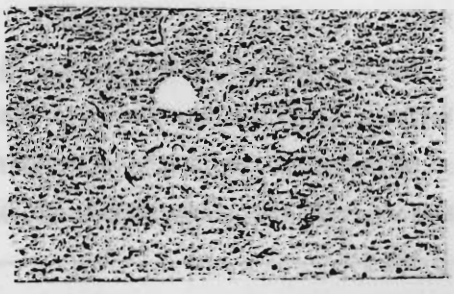


Fig 8 Axon swelling and proliferation of microglia cells

ของผนังเส้นเลือด และพบ perivascular eosinophilic droplet ที่รอบ ๆ เส้นเลือดบางแห่งในเนื้อเยื่อสมอง โดยพบว่ามีวิการ malacia และ demyelination ซึ่งพบการเพิ่มจำนวนของ glitter cell และ axon swelling วิการของ demyelination ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณเส้นเลือดที่พบว่ามีความเสื่อมเล็กน้อยอาจจะเพิ่งเกิด และเกิดระยะสั้น ทำให้พบเพียงความเสื่อมแบบ demyelination ของเนื้อสมอง ส่วนบริเวณเนื้อสมองที่พบวิการ malacia อยู่ในบริเวณที่เส้นเลือดเสื่อมแบบรุนแรง โดยพบมีการหลุดรอดของสารโปรตีนจากเส้นเลือดรอบ ๆ เส้นเลือดที่พบความเสื่อมอย่างรุนแรงนั้น และวิการ malacia อาจจะเป็นผลจากการที่อาหาร และออกซิเจนไปเลี้ยงสมองไม่ได้เป็นเวลานานๆ วิการ malacia และ demyelinationนี้ ได้มีรายงานโดย 1,2,3,4,5,7 ว่าพบร่วมกันกับวิการ Cerebrospinal angiopathy การที่สัตว์แสดงอาการทางประสาทนั้น เกิดเนื่องจากวิการที่พบในสมองนั้นเอง ซึ่งต้องแยกให้ดี จากอาการจากโรคทางประสาทอื่น ๆ เช่น โรคออเจสกี้ meningoencephalitis, eosinophilica, polioencephalomalacia หรืออาการเป็นพิษของสารตะกั่ว วิการ cerebrospinal angiopathy นี้ ได้มีผู้รายงานว่าเป็นอาการแบบเรื้อรัง chronic ของ Edema disease (6,7) แต่ในกรณีของสุกรทั้ง 7 ตัวนี้ไม่พบเชื้อ E. coli ซึ่งอาจเป็นเพราะในครั้งแรก สุกรติดเชื้อ E. coli แล้วต่อมาเมื่อโรคลุกลามต่อไป มีการติดเชื้อแทรกซ้อนของเชื้อตัวอื่นซึ่งก็มีรายงานในลักษณะนี้ (7) ใน Edema disease นั้น มักพบวิการการบวมน้ำของอวัยวะภายในต่าง ๆ และที่เปลือกตา จมูก กระเพาะอาหาร เยื่อบุลำไส้ โดยส่วนใหญ่สุกรจะตายภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มแสดงอาการ Edema disease นั้น มักเกิดขึ้นในสุกรระยะหย่านมซึ่งเกิดความเครียดขึ้น โดยมักพบในตัวที่สมบูรณ์ที่สุด ในรายงานนี้ความเครียดที่เกิดขึ้น เกิดจากการที่เจ้าของเปลี่ยนรา ทั้ง Cerebrospinal angiopathy และ Edema disease มักเกิดกับสุกรอายุประมาณ 4-10 สัปดาห์มีรายงานว่า Cerebrospinal angiopathy นี้เกิดขึ้นจากการที่สัตว์ติดเชื้อ E. coli ชนิดที่สร้าง enterotoxin (5.7) เนื่องจากโรคทั้งสองดังกล่าว มักเกิดในระยะที่สุกรมีความเครียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะหย่านม ดังนั้นในระยะดังกล่าวจึงควรระมัดระวังเรื่องความเครียดที่จะเกิดเพิ่มขึ้นอีก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายวิเชียร วัดนธงชัย ที่ช่วยในการเครียมสไลด์ และขอขอบคุณ สพ.ญ. สมบูรณ์ สุธีวัฒน์ และ น.สพ. ม.ร.ว. อำนวยพร เกษมสันต์ ที่ช่วยสนับสนุนการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Harding, J.D.J. 1966. A Cerebrospinal Angiopathy in Pig. Path. Vet. 3 : 83-88.

2. Harold, J.K.; Martin, E.B.; Donald, M.B. 1969. Pathologic Change in Edema Disease of Swine. Am. J. Vet. Res. Vol. 30,5:791-806.

3. Hoorens, J.; Thoonen, H. 1967. Cerebrospinal Angiopathie (type Harding) bij het Varken. Vlaams.Diergeneeskd Tijdsch 36:553-557.

4. Kohler, H.; Herceg, M.; Glawischnig, E.1971. Cerebrospinale Angiopathie Verbunden mit Senstorungen bei Schweinen. Dtch Tieraerztl Wschr 78 : 1-5, 39-42.

5. Nakamura, K.; Kubo, M.; Shoya, S.; Kashiwazaki, M.; Koizumu, S.and Onai, M. 1982. Swine Cerebrospinal Angiopathy with Demyelination and Malacia. Vet. Pathol. 19 : 140-149.

6. Nielsen, N.O. 1986. Edema disease. In Disease of Swine, 6th ed. Iowa State Univ. Press.Ames. 528-540.

7. Yoshikawa, T.; Mirumu, M.; Tsubaki, S. 1978. An Epizootic Outbreak of Cerebrospinal Angiopathy in Swine. Jpn. J. Vet. Sci. 40 : 97-102.

CEREBRAL TRYPANOSOMIASIS IN CATTLE DUE TO NATURAL TRYPANOSOMA EVANSI INFECTION*

Kukiet Suwanlak,[1] Nopporn Sarataphan,[1] Darune Tantasuvan[1]

ABSTRACT

Two cases from 12 Brahman cross-bred cattle farms in Tumbol Nagno, Amphoe Muang and one farm in Amphoe Namnao, Phetchabun province,Thailand, were studied with parasitological methods. One to twenty cattle in each farm died during October, 1988 to February,1989. Forty-two from five hundred and thirty animals died with nervous symptoms including circling,exciting,jumping, aggressive,lateral-recumbency, convulsion and death.T. evansi were isolated from the brains of both cases with mouse inoculation test. Serum samples from animals were examined using the indirect fluorescent antibody test (IFAT) for trypanosomiasis (Trypanosoma evansi). It was concluded that the cases of cerebral trypanosomiasis in cattle were only occured in early infection or outbreak of the disease in each farm. Parasitological and serodiagnostic tests may therefore have a place in future programmes for surveillance and control of T. evansi infection in cattle.

INTRODUCTION

T.evansi epidemics tend to involve different animal hosts e.g. camels,horses,donkeys,dogs cattle,buffaloes,sheep,goats and pigs in different parts of the world e.g.Indochina,Soviet,Africa,Central and South America. Susceptibility of domestic animals to infection with T.evansi depend on the species of animals,season (Mahmoud and Gray,1980). An outbreak of the disease caused by T.evansi in dairy cattle in Chiangmai province, Thailand during June to September 1986. Seven of the pregnant cows aborted, 6 calves too early and live calves had low birth weight.The milking cows decreased milk yield suddenly without any notable symptoms except high fever(Trisanarom et al,1987). Trypanosomiasis is one of the most serious parasitic diseases in wide range of animals. Surveillance of the desease was done by our institute since 1987. In this study demonstrates the nervous symptoms in cattle due to natural T.evansi infection. Parasitological and serodiagnostic tests were studied under field cases.

MATERIALS AND METHODS

Epidemiology

The case studies were carried out from 13 cattle farms in Tumbol Nagno, Amphoe Muang, (farm no.1-12) and Amphoe Namnao (farm no.13), Phetchabun province,Thailand during October,

---

*Under the Thai-Japanese technical cooperation

[1]Division of Diseases Control Dept. of Livestock Developement Bangkok Thailand

1988 toFebruary, 1989. Forty-two from 530 Brahman-cross bred cattle died during the late period of rainy season with nervous symptoms including circling,exciting, jumping,aggressive, lateral recumbency, convulsion and death. Prevalence of the T. evansi infection was observed in 2 farms,(farm no.1 and no.4) on 7 November and 20 December 1988 respectively. Sixteen and 23 blood samples were collected from adult female animals from the two farms.

Sample collection

Blood

Blood samples were collected from the jugular vein into ethylene-diamine-tetra-acetic acid disodium salt (EDTA) vacuum tubes.Plasma samples were separated and kept -10°C.for detection of antibodies to T. evansi using the indirect fluorescent antibody test (IFAT).

Brain

Brains of two cows (no.401 and no.1301) with nervous signs from farm no.4 and no.13 were removed from the skulls and separated indifferent parts e.g.cerebral, cerebellum, pons, spinal cord,and cerebrospinal fluid (CSF).The brain impression smears were stained with Giemsa.

Tabanid flies

Six tabanid flies which fed on the cow no. 1301 were collected and the gut contents smear were stained with Giemsa.

Sample examination

Parasitological tests

Wet preparation

Fresh whole bloods were dropped on glass slides and cover with coverslips. T. evansi were detected with field light microscope at 100-400 magnification.

Woo's method

Packed cell volume (PCV) were estimated immediately from the blood samples.T.evansi could be detected at the area between plasma and buffy coats in microhaematocrit capillary tubes (##) with light microscope at 100-200 magnification (Woo and Rogers, 1974).

Blood films

The thick and thin blood films were stained with Giemsa and examined for T. evansi.

Mouse inoculation test

One ml of the whole blood were infected intraperitoneally into mice. About two grams of the brain were blended with PBS and antibiotics ### in motar.1 ml of the inoculums were also injected intraperitoneally into mice.T. evansi were detected every two days for one month from the tail tip blood.

Blu.-tip, Monojet Scientific, Division of Sherwood Medical, Louis M.D. USA., ### Penicillin Dehydrostreptomycin a SIGMA, Chemical Company, P.O. BOX 14508,st. Louis,Mo 63178 USA.

Serological test

IFAT

The indirect fluorescent antibody test (IFAT) was used to detect the specific antibody to T. evansi. Briefly, T. evansi antigen slides (prepared from mouse infected blood with T. evansi from cow no.401) were allowed to air dry. The slides were fixed in acetone for 10 minutes at 4°C. and allowed to air dry. The slides were wrapped with aluminium foils and stored frozen at -70°C. until used. Plasma samples were then serially diluted in phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.2, beginning with a dilution of1:40. Known positive and negative sera were selected as controls. After diluted sera were placed in squares scores on the antigen slides, the reactants were incubated in a humidified chamber at 37°C.for 30 minutes. Slides were then rinsed in tap water and three of 5- minute washes in PBS,and air dry. The incubation-wash cycle was repeated after placement of fluoresce in isothiocyanate conjugated rabbit anti-bovine IgG : (diluted 1:100 in PBS) onto the antigent -antibody reaction areas. Finally,the slides were mounted with 50/50 v/v glycerol/PBS and examined with a microscope equipped with an ultraviolet light source for determination of specific parasites fluorescence. Sera which gave a fluorescence at a dilution of 1 : 40 or more were regarded as positive for trypanosomiasis.

RESULTS

One to twenty cattle in 13 farms died with nervous symptoms during October 1988 to February 1989. These outbreaks occured during the late period of rainy season.It was found that forty-two (7.9%) of 1 to 5-year-old cattle from all of these farms (530 cattles) died at early outbreaks in each farms.A summary of the fatality of the disease is shown in Table 1.

The first outbreaks of the disease occured in farm no.1. Blood samples of the animals in farm no. 1 were collected about one month after 20 animals died.One of 48 cattle in farm no.4 (no.401) was sick with lateral recumbency and convulsion on the same day of the blood samples collection. The detection of T. evansi infection with various methods is shown in Table 2. Prevalence of T. evansi infection in farm no.1 and no.4 were 100% and 39.1% respectively by serological test (IFAT). Frequency of anti-T. evansi IFA titers of the animals is illustrated in Fig. 4.

In Table 3, T. evansi were detected from cow no.401 and 1301 with all methods of the parasitological test while anti-T. evansi IFA titers were negative and weak positive respectively. It revealed that early infection was occured. The detection of T. evansi from whole blood brain with brain impression smear and mouse inoculation in cow no.401 and no.1301 is shown in Table 4.

A mass of T. evansi in the brain impression smears of both cows is shown in Fig.2. All of six gut content smears were positive to T. evansi. Viability of T. evansi in EDTA blood

Table 1 Number of cattle died with nervous symptoms from 13 farms in Phetchabun province,Thailand during October 1988 to February1989.

Farm no.	No. of cattle	No. of death (Head)
1	80	20
2	5	1
3	40	1
4	48	1
5	50	3
6	40	1
7	30	3
8	50	3
9	20	2
10	30	3
11	40	1
12	47	2
13	50	1
	530	42 (7.9%)

Table 2 Summary of T. evansi detection with various test from Farm no.1 and no.4

Methods	Farm no. 1		Farm no. 4	
	No. of tests	No. of pos. (%)		
No. of tests	No. of pos.(%)			
Parasitological tests				
Wet prep.	16	1 (6.3%)	23	1 (4.3%)
Woo's	16	7 (43.8%)	23	1 (4.3%)
Bl.smear	16	7 (43.8%)	23	1 (4.3%)
Mouse inoc.	16	16 (100%)	8	3 (37.5%)
Serological test				
IFAT	16	16 (100%)	23	9 (39.1%)

Table 3 T. evansi were detected with various tests from 2 cows in Farm no. 1 and no. 13

Cow no.	PCV (%)	Wet prep.	Woo's	Bl.smear	Mouse inoc.	IFA titers
401	26	++++	++++	++++	+	<1:40
1301	26	++++	++++	++++	+	1:40

Table 4 T. evansi were detected from the whole blood, brain with smears and mouse inoculation tests in 2 cows.

Specimen	Cow no. 401		Cow no. 1301	
	Smears	Mouse inoc.	Smears	Mouse inoc.
Whole blood	++++	++++ (4)	++++	++++ (3)
Cerebrum	++	++++ (8)	+	++++ (9)
Cerebellum	+	++++ (7)	+	++++ (9)
Pons	+	++++ (7)	+	++++ (12)
Spinal cord	+	++++ (9)	-	-
CSF	+	nd		nd

( ) = mice died after inoculation (days)

nd = not done

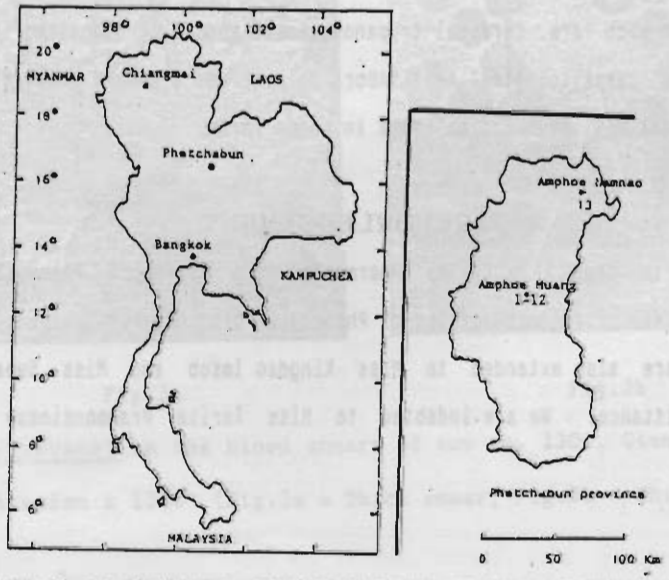


Fig1 Map of Thailand and Phetchabun province.Numbers are coresponded to the number in table 1

and the brain tissues were tested with mouse inoculation test within 1/2, 24 and 30 hours after the animals were killed. T. evansi could be isolated within 24 hours in the blood and 1/2 hour in the brain tissues under 4°C.

DISCUSSION

This paper would be the first report of cerebral trypanosomiasis due to natural T. evansi infection in cattle. Although, Malik and Mahmoud (1978) confirms the T. evansi infection in cattle may act as reservoir hosts. Hoerchner (1989) described similary that T. evansi isolated from buffaloes in Northeast Thailand were used to infect goat and cattle experimentally. All goats died 70-75 days after infection displaying the classical symptoms of an acute cerebral trypanosomiasis.The infected bovines controled the infection much better over an observation period of 6 months. Although several parasitaemic peaks, a slight anaemia and retardation of weight gain were observed. More serveral clinical symptoms did not occured These findings revealed that catlle can serve as reservoir host. In our studies revealed that early outbreaks of the disease in the farm which seronegative to T. evansi antibodies could cause severe loss of economy. Then, mild clinical sign and high parasitaemic peaks of T. evansi still occured in the farms without treatment.These situations are harmful to spread out the disease by blood sucking flies especially tabanid flies during rainy season. Parasitological and serological tests are importance tools to know the status of the farm about T. evansi infection. The sensitivity of the Woo's method were 43.75% less than 100% in mouse inoculation test during the outbreaks of the disease. Woo and Rogers (1974) reported that their method detected 85% of the trypanosome present in each capillary blood samples. In our studies mouse inoculation test and IFA test are closely related results during the outbreaks.

T. evansi in the brain and seronegative or low antibody titers revealed that early infection occured in each farm. Cerebral trypanosomiasis should be diagnosed immediately after animals died with the parasitological test. Abortion case was a second problem in all of these farms. The next report will be abortion cases in these farms.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Mr.Chalam Phormsenee and Mr.Amnach Phinyosri, veterinary officers of provincial livestock office of Phetchabun province for helping collection the specimems. Thanks are also extended to Miss Kingdao Imsub and Miss Supavan Sangiumlak for technical assistance. We are indebted to Miss Tarika Pramoonsinsub for supplying lots of mice.

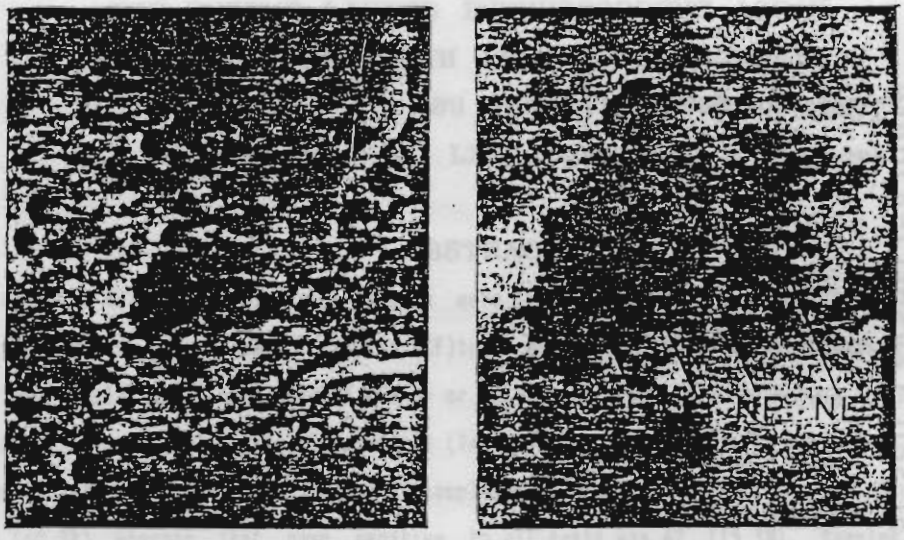


Fig.2a Fig.2b

Fig.2 A mass of T.evansi in the brain smears,Giemsa's stain (Fig.2a = magnification x 400, Fig.2b = magnification x 1000) F= flagellum,K=Kinetoplst,NP=Nucleus of parasites,NL=Nucleus of leukocytes

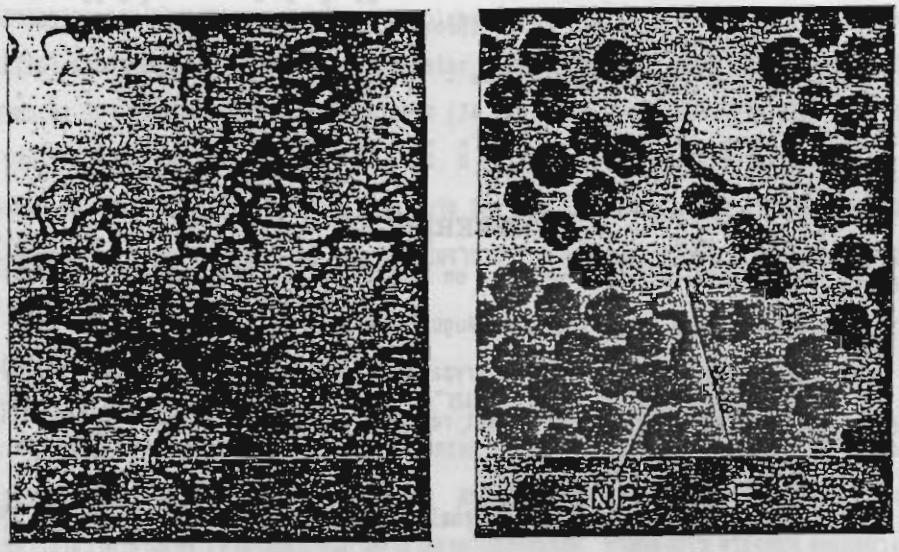


Fig.3a Fig.3b

Fig.3 T.evansi in the blood smears of cow no. 1301, Giemsa's stain magnification x 1000 (Fig.3a = Thick smear, Fig.3b = Thin smear)

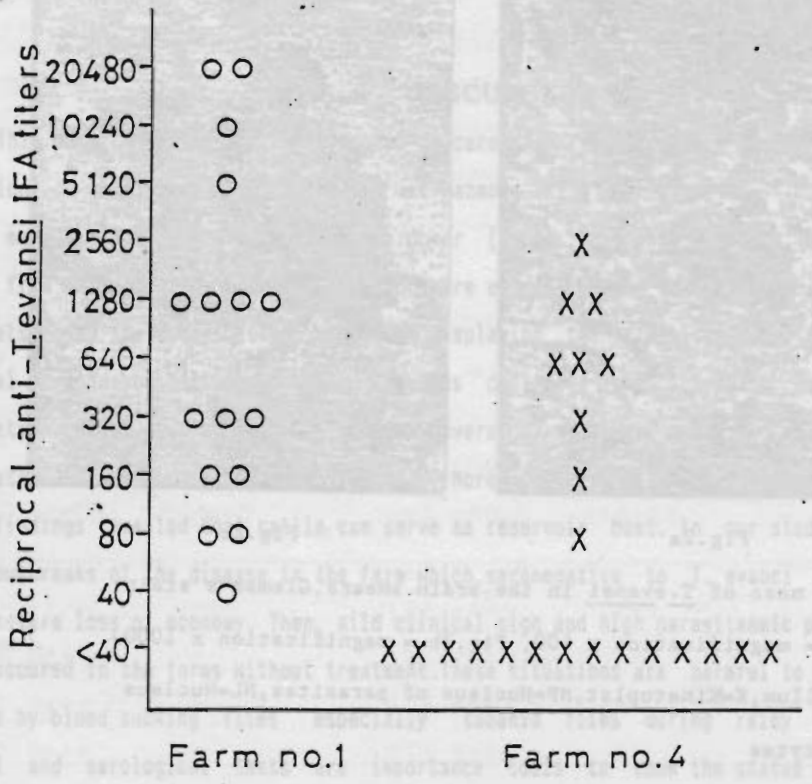


Fig.4. Frequency of reciprocal anti-T.evansi IFA titers from the cattle in 2 farms .

REFERENCES

Hoerchner, F. 1989. International seminar on animal health and Production services for village livestock,Khon Kaen, Thailand, August 2-9 : 67-71.

Mahmoud, M.M. and Gray, A.R. 1980. Trypanosomiasis due to Trypanosoma evansi (steel, 1885) Balbaini, 1888. A review of recent research tropical animal health production, 12 : 35-47.

Malik, K.H. and Mamoud, M.M. 1988. Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry, 19 : 47-57.

Trisanarom, A.,Markmee, S. and ped-ugsorn, C. 1978. Trypanosoma evansi infection in Chiangmai dairy cattle.Abstracts of the 6th Annual Livestock conference,Department of Livestock Development, May 18-20.

Woo, P.T.K. and Rogers, D.J. 1974. Transections of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68 : 319-326.

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย
โดยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเส
THE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR FOOT AND MOUTH DISEASE DIAGNOSIS

แอบ คงทน[1] วิไล ลินจงสุบงกช[1] ธนรัตน์ จานุกิจ[1]

Ab Kongthon Wilai Linchongsubongkoch Thanarat Janukit

ABSTRACT

A total of 437 epithelial tissue samples were examamined for the presence of foot and mouth disease virus by complement fixation (CF)test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by virus isolation in baby hamster kidney or fetal lamb lung cell cultures. The positive results were 329 samples (75.29%), 324 samples (74.14%) and 320 samples (73.23%) by CF, ELISA and virus isolation respectively. Number of samples gave positive results to the three tests was 266 (60.9%) whereas that gave negative to all tests was 67 (15.3%). Samples showing positive to one or two tests were 104 (23.8%).

The CF test detected viral antigen in 284 (89.0%) of 319 virus-positive samples, whereas the ELISA detected in 281 (86.5%) of the specimens. Simultaneous application of the three tests increased positive results to 84.7%.

บทคัดย่อ

ผลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี complement fixation (CF),enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ baby hamster kidney หรือ fetal lamb lung จำนวน 437 ตัวอย่าง ได้ผลตามลำดับ คือ 329 ตัวอย่าง (75.29%), 324 ตัวอย่าง (74.14%) และ 320 ตัวอย่าง (73.23%) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 3 วิธี รวม 266 ตัวอย่าง (60.9%) ที่ให้ผลลบทั้ง 3 วิธี มี 67 ตัวอย่าง (15.3%) ส่วนที่ให้ผลบวกเพียง 1 หรือ 2 วิธี มีด้วยกันทั้งหมด 104 ตัวอย่าง (23.8%) วิธี CFให้ผลบวกจำนวน 284 (89.0%) ในจำนวน 319 ตัวอย่าง ที่สามารถแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ได้ในขณะที่วิธี ELISA ให้ผลบวก 281 (86.5%) ในจำนวน 325 ตัวอย่าง การใช้ทั้ง 3 วิธี เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคไปพร้อม ๆ กัน จะได้ผลเพิ่มขึ้นเป็น 84.7%

คำนำ

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยทำการแยกชนิด (typing) นิยมใช้วิธี complement fixation (CF)กันอย่างกว้างขวางและเป็นเวลานานมาแล้ว เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วในการปฏิบัติ สารทดสอบเตรียมเองได้ง่าย หรือหาซื้อได้ทั่วไปในราคาที่ไม่แพง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ไม่ยุ่งยากสลับซับซ้อน หรือต้องการเครื่องมือพิเศษแต่อย่างใด แต่บางครั้งพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถทำการตรวจจำแนกเชื้อได้ อาจจะเนื่องจากวิธีนี้ไม่มีความไวสูงพอที่จะตรวจสอบกับการที่มีปริมาณน้อย หรือการชักการเก่าที่มีแอนติคอมพลีเมนท์ ในระยะหลังนี้มีผู้นิยมใช้วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) แบบ indirect sandwich มาทำการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แทนวิธี CF เพราะเชื่อว่ามี ความไว ความถูก

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ค้อง และความแม่นยำสูงกว่า กับทั้งไม่มีปัญหาเกี่ยวกับแอนติคอมพลีเมนท์ด้วย (Westbury และคณะ 1988) ได้รายงานเปรียบเทียบการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง รวม 123 ตัวอย่าง วิธี CF ตรวจได้ผล 30 ตัวอย่าง (24%) ในขณะที่วิธี ELISA ตรวจได้ผล 100 ตัวอย่าง (81%) และสรุปว่าในการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วิธี ELISA มีประสิทธิภาพเป็น 3 เท่าของวิธี CF

ในการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA นั้น จำเป็นต้องเตรียม reagent โดยเฉพาะ ซึ่งต้องใช้เวลาและเสียค่าใช้จ่ายสูง บางชนิดต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศและมีราคาสูงเช่นเดียวกัน ในการปฏิบัติงานต้องใช้เครื่องมือพิเศษราคาแพง นอกจากนี้ยังต้องใช้ ELISA plate ซึ่งเป็นวัสดุสิ้นเปลือง จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศในราคาแพงอีกด้วย ดังนั้นจะเป็นว่าการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA นั้น สลับซับซ้อน ต้องมีเครื่องมือพิเศษทำได้โดยผู้มีความชำนาญเท่านั้น และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย ซึ่งแตกต่างจากวิธี CF ซึ่งง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยได้ใช้วิธี CF ทำการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสตั้งแต่ปี 2503 เป็นต้นมา และได้มีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการ เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นตลอดมา และพบว่าวิธี CF สามารถทำการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสได้สูงกว่าที่ Westbury และคณะ (1988) ได้รายงานไว้มาก จึงสมควรที่จะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ตลอดจนข้อดีและข้อเสียของวิธีทั้งสองนี้ เพื่อหาข้อสรุปว่าในฐานะที่ประเทศไทยเป็นประเทศกำลังพัฒนา มีงบประมาณจำกัดควรจะใช้วิธีไหนที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้การวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อสนับสนุนให้โครงการป้องกันและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อย บรรลุเป้าหมายภายในเวลากำหนด และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการทดสอบเกี่ยวกับ false negative และ false positive ได้ทำการแยกเชื้อ (isolate) ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพราะการแยกเชื้อไวรัสจะเป็นการยืนยันขั้นสุดท้ายสำหรับการวินิจฉัย (definite test) รายงานนี้เป็นรายงานการเปรียบเทียบผลการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี CF และ ELISA และผลการแยกไวรัสจากตัวอย่างที่ส่งไปที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อวินิจฉัยโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างเชื้อจากท้องที่ เป็นวิการเยื่อลิ้น ไรกีบ หรืออุ้งเท้า ที่เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ท้องที่เก็บส่ง ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อการวินิจฉัยโรคตั้งแต่เดือน คุลาคม 2531 ถึงเดือน กรกฎาคม 2533 รวม 437 ตัวอย่าง วิการเหล่านี้จะเก็บรักษาใน 50% glycerine buffer ส่วนมากจะส่งไปที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยทางไปรษณีย์ในสภาพที่ไม่แช่เย็น ก่อนทำการวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อ ทำการสกัดไวรัส โดยบดวิการให้ละเอียด แล้วเตรียมเป็น 10% สารแขวนตะกอนด้วย 0.04 M phosphate buffer นำไปปั่นแยกเอาน้ำใสส่วนบนไปแขวนสมกับสารไดฟลอน (daiflon) เพื่อกำจัดโปรตีน สิ่งปนเปื้อน และเชื้อแบคทีเรียออกไป นำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง เก็บน้ำใสส่วนบนไปทำการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี CF, ELISA และแยกไวรัส (isolate) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

2. การเตรียม trapping และ detecting antibodies ได้เตรียม trapping และ detecting antibodies ซึ่งเป็น reagents ที่สำคัญสำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยทำการเตรียม trapping antibody ในกระต่าย และ detecting antibody ในหนูตะเภา โดยใช้ไวรัส O_1 BHK 60, A_{15} และ A_{22} เรียกว่า A-combined และ AsI BKK 60 วิธีเตรียมโดยย่อ ๆ มีดังนี้

2.1 การเตรียม trapping antibody ครั้งแรกเตรียม purified virus ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 2 ฉีดกระต่าย 2 ครั้ง ห่างกัน 28 วัน ครั้งแรกใช้ไวรัส 40 µg ผสมกับ complete Freund adjuvant ฉีดเข้ากล้าม ครั้งที่สองใช้ไวรัส 20 µg ผสม incomplete Freund adjuvant ฉีดเข้ากล้ามเช่นเดียวกัน เจาะเลือดกระต่าย 10 วันหลังฉีดครั้งที่สองนำมาแยกเอาซีรัม แล้วนำมาหา optimum dilution สำหรับใช้ในวิธี ELISA

2.2 การเตรียม detecting antibody นำ purified virus จำนวน 20 µg ผสมกับ complete Freund adjuvant ฉีดเข้ากล้ามหนูตะเภา อีก 28 วันต่อมา เจาะเลือดแยกเซรัม นำมาทดสอบหา cross reaction และ optimum

dilution สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

วิธีการทดลอง

1. การตรวจจำแนกเชื้อด้วยวิธี ELISA การตรวจจำแนกเชื้อโดยวิธี ELISA ได้ดำเนินการตามวิธีของ Roeder and Le Blane Smith (1987) โดยย่อ ๆ มีดังต่อไปนี้

Coat ELISA plate ด้วย trapping antibody ต่อไวรัส O_1 BKK 60,A-combined, AsI BKK 60 และ normal rabbit serum ที่เจือจางใน 0.05 M carbonate / bicarbonate buffer (pH 9.6) หลุมละ 50 µl นำ plate เข้าไปแช่ใน 37°C. incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 5 ครั้ง นำตัวอย่างที่จะทำการทดสอบและ positive control antigen มาเจือจางแบบ serial two fold ใน ELISA diluent แล้วเติมหลุมละ 50 ul นำไปแช่ใน incubator 1 ชั่วโมง นำออกมาล้างด้วย PBS 5 ครั้ง ต่อไปเติม detecting antibody ต่อไวรัส O_1 BKK 60, A- combined, AsI BKK 60 และ normal guinea pig serum หลุมละ 50 µl นำเข้าแช่ใน incubator อีกเป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย PBS 5 ครั้ง ต่อไปเติม conjugate (Rabbit anti guinea pig IgG conjugated to horseradish peroxidase (Dako P141, Denmark) หลุมละ 50µl นำไปแช่ใน incubator เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย PBS อีก 5 ครั้ง เติม 0.01% 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine (TMB) / 0.005% hydrogen peroxide (H_2O_2) หลุมละ 100 µl เก็บไว้ห้องมืดหรือในห้องปลอดรังสีทำให้เกิดสีขึ้นภายในเวลา 20 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยการเติม 1 N H_2SO_4 หลุมละ 50µl แล้วนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ wavelength 450 nm (Multiscan- Flow Laboratories) นำค่าเฉลี่ยของ background of control wells ไปหักออกจากค่าที่อ่านได้จากตัวอย่าง ค่าที่ได้ตั้งแต่ 0.1 หรือมากกว่า ถือว่าให้ผลบวก

2. การตรวจจำแนกเชื้อด้วยวิธี CF การเตรียม reagent และการตรวจจำแนกเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี CF นั้นได้ดำเนินการตามรายงานของ บุศนีย์ จันทร์ประสิริและคณะ (2530)

3. การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง นำส่วนของตัวอย่างมาผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง baby hamster kidney (BHK) หรือ fetal lamb lung (FLL) ถ้าเซลล์เพาะเลี้ยงเกิด cytopathic effect (CPE) นำ infectious fluid ไปตรวจจำแนกเชื้อด้วยวิธี CF หรือ ELISA ถ้าการตรวจจำแนกเชื้อได้ผลถือว่าการแยกเชื้อให้ผลบวก ถ้าการผ่านครั้งแรกไม่เกิด CPE จะผ่านในเซลล์เพาะเลี้ยงไปอีก 2 หอดถ้าเกิด CPE นำไปตรวจจำแนกเชื้อ เป็นการยืนยัน ถ้าผ่านถึง 3 หอดแล้วยังไม่เกิด CPE ถือว่าการแยกเชื้อไวรัสไม่ได้ผล

ผล

ผลการตรวจจำแนกเชื้อด้วยวิธี CF, ELISA และผลการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง รวม 437 ตัวอย่าง ได้ผลตามลำดับคือ 329 ตัวอย่าง (75.29%), 324 ตัวอย่าง(74.14%) และ 320 ตัวอย่าง (73.23%) ในจำนวน 437 ตัวอย่างนี้ให้ผลทั้ง 3 วิธี รวม 266 ตัวอย่าง (60.9%) ไม่ได้ผลทั้ง 3 วิธี รวม 67 ตัวอย่าง (15.3%) ส่วนที่ได้ผลเพียงหนึ่งหรือสองวิธี รวม 104 ตัวอย่าง (23.8%) การแยกเชื้อไวรัสได้จากตัวอย่างเป็นการยืนยันว่ามีไวรัสในตัวอย่างจริง (definitive test)ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง CF และการแยกเชื้อ ถือว่าเป็น true positive ซึ่งจะเท่ากับ 89.0% (ตารางที่ 1) วิธี ELISA ให้ true positive เท่ากับ 86.5% ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี CF และ ELISA แต่แยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ได้ มีตามลำดับคือ 45 และ 43 ตัวอย่าง สำหรับผลการเปรียบเทียบของวิธี CF และ ELISA ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสองวิธีรวม 303 ตัวอย่าง (69.3%), ให้ผลลบทั้งสองวิธีรวม 87 ตัวอย่าง (19.9%) ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดย CF แต่ให้ผลลบโดย ELISA รวม 26 ตัวอย่าง และที่ให้ผลลบ โดยวิธี CF แต่ให้ผลบวก โดยวิธี ELISA รวม 21 ตัวอย่าง ผลการทดสอบตัวอย่างจำนวน 104 ตัวอย่างที่ให้ผลเพียงหนึ่งหรือสองวิธี ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก โดยวิธี CF และ ELISA แต่แยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ได้รวม 37 ตัวอย่าง ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกโดยวิธี CF แต่ให้ผลลบโดยวิธี ELISA จะแยก

ตารางที่ 1 ผลการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี CF, ELISA และผลการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง

	Virus isolation		Number of
	Positive	Negative	Specimens
CF			437
Positive	284	45	
Negative	35	73	
ELISA			437
Positive	281	43	
Negative	44	69	

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี CF และ ELISA

	CF test	
	Positive	Negative
ELISA		
Positive	303	21
Negative	26	87

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน

Test results		Virus isolation	
		Positive	Negative
CF	ELISA		
Positive	Positive	(266)	37
Positive	Negative	18	8
Negative	Positive	15	6
Negative	Negative	20	(67)

เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 18 ตัวอย่างแยกเชื้อไม่ได้ 8 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี CF แต่ให้ผลบวกโดยวิธี ELISA นำไปแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 15 ตัวอย่าง แยกเชื้อไม่ได้ 6 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งวิธี CF และ ELISA แต่แยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 20 ตัวอย่าง

สรุปและวิจารณ์

การวินิจฉัยโรคบากและเท้าเปื่อย เพื่อหาการจำแนกชนิด (typing) ได้นิยมใช้วิธี CF มานานแล้ว เพราะเป็นวิธีที่ง่าย หาได้สะดวกประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ต่อมามีรายงานว่า วิธี ELISA มีความไวสูงกว่าวิธี CF มาก เช่น Hamblin et al (1984) ได้รายงานผลการจำแนกเชื้อไวรัสโรคบากและเท้าเปื่อย ของ World Reference Laboratory โดยวิธี CF ว่าได้ผลเพียง 25% เท่านั้น ส่วน Westbury et al (1988) รายงานว่าการใช้วิธี CF เพื่อหาการตรวจจำแนกเชื้อ จะให้ผลเพียง 24% สำหรับวิธี ELISA ให้ผลถึง 81% ในการทดลองครั้งนี้วิธี CF และ ELISA ให้ผลสอดคล้องกันคือ 75.29% และ 74.14% ตามลำดับ ถ้าคิดเปอร์เซ็นต์ true positive แล้ว วิธี CF และ ELISA จะให้ผลถึง 89 และ 86.5% ตามลำดับวิธี CF จึงมีความไวและความแม่นยำไม่น้อยกว่าความไวของ EILSA ที่ Westbury และคณะ ได้รายงานไว้ การที่ผลของวิธี CF ในการทดลองครั้งนี้มีความไวเท่ากับ ELISA อาจจะเนื่องจากได้ทำการ treat ตัวอย่างก่อนทำการตรวจจำแนกเชื้อด้วยสารไดพลอน ซึ่งทำให้การอ่านผลโดยวิธี CF ชัดเจนและขจัดแอนติคอมพลีเมนต์ไปในตัวด้วยดังนั้นการใช้วิธี CF

ทำการตรวจจำแนกเชื้อจึงมีความเหมาะสมกับสภาพความเป็นจริงของประเทศไทย ที่หาได้ง่ายสะดวก ประหยัด และให้ผลดี คือให้ผลได้ถึง 75.29% แต่ถ้าจะใช้ทั้งสองวิธี คือ CF และ ELISA ทำไปพร้อม ๆ กันก็จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลเพิ่มขึ้นเป็น 350 ตัวอย่าง (80.1%) ตามที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 การวินิจฉัยโรคจากตัวอย่างจะได้ผลเพิ่มขึ้น การแยกเชื้อไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง BHK และ FLL ซึ่งเป็น cell line ที่สามารถแยกเชื้อได้ถึง 73.23% นั้นนับว่าให้ผลสูงพอสมควร Westbury ได้รายงานการใช้ primmary bovine thyroid cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความไวมากที่สุด สำหรับไวรัสโรคบากและเท้าเปื่อย (Snowdon, 1966) แยกเชื้อไวรัสได้ 67% ของตัวอย่าง Hamblin et al (1984) ได้รายงานว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใน primary bovine thyroid cell ได้เพียง 70% ดังนั้น การใช้ BHK หรือ FLL ซึ่งเป็น cell line นั้น นับว่ามีความไวเท่า ๆ กับ primary cell แต่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้ primary cell line มาก การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น จำเป็นต้องทำทุกตัวอย่าง เพื่อนำไวรัสที่แยกได้มาศึกษาคุณสมบัติว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรหรือไม่ และตรวจสอบว่าวัคซีนที่ใช้อยู่นั้น ให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสนั้น ๆ ได้หรือไม่เพียงไร ผลพลอยได้อีกประการหนึ่งของการแยกเชื้อไวรัสคือ ทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคเพิ่มขึ้นนอกเหนือไปจากการใช้ทั้ง CF และ ELISA แล้ว จะเห็นได้จากการทดลองครั้งนี้ ตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้ง CF และ ELISA แต่แยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ถึง 20 ตัวอย่าง ดังนั้น ถ้าใช้ทั้ง 3 วิธีด้วยกัน การตรวจวินิจฉัยโรคจะได้ถึง 370 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) หรือเท่ากับ 84.7% วิธี CF และ ELISA ให้ผล false negative 10.0 และ 13.5% ตามลำดับนั้น แสดงว่าตัวอย่างจำนวนหนึ่งเก็บในระยะเวลาที่เหมาะแต่ว่าปริมาณน้อยไป ดังนั้นถ้าเน้นวิธีการเก็บตัวอย่างให้มากพอ ตัวอย่างที่ให้ผล false negative นี้ อาจจะให้ผลบวกโดยวิธี CF หรือ ELISA ก็ได้ ซึ่งจะทำให้ทราบผลการวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วขึ้น เพราะผลการย้อมเชื้อต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2 วัน หลังจากการทดสอบด้วย CF หรือ ELISA แล้ว ส่วนตัวอย่าง false positive จำนวน 45 และ 43 ตัวอย่างนั้น น่าจะเกิดจากเก็บตัวอย่างในระยะหลังของการเป็นโรค ดังนั้นถ้าแนะนำให้มีการเฝ้าระวังโรค เพื่อให้ทราบการเกิดโรคได้ทันที และเก็บตัวอย่างได้เหมาะต่อการวินิจฉัยโรคจะได้ผลทั้งการควบคุมและเก็บตัวอย่างที่ดีได้

สรุปแล้ว การใช้ CF ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสโรคบากและเท้าเปื่อย ยังใช้ได้ผลดีไม่ด้อยกว่าวิธี ELISA ถ้าจะใช้สองวิธีพร้อม ๆ กัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การวินิจฉัยโรคสูงขึ้น ในการปฏิบัติจริง ๆ อาจจะใช้วิธี CF ก่อน ส่วนตัวอย่างไหนที่ให้ผลลบต่อ CF จึงทำซ้ำด้วยวิธี ELISA ส่วนการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น มีความจำเป็นจะต้องทำอยู่แล้ว ผลจากการแยกเชื้อนี้ ทำให้การวินิจฉัยเพิ่มขึ้นด้วย เซลล์ BHK และ FLL ซึ่งเป็น cell line มีความไวใกล้เคียงกับ primary bovine thyroid cell

เอกสารอ้างอิง

บุศนีย์ จันทร์ประเสริฐ, สมใจ กมลศิริพัชรพร, แอบ คงทน และธนรัตน์ จานุกิจ (2530) การตรวจเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อย ณ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย, ประมวลเรื่อง การประชุมทางวิชาการด้านการปศุสัตว์ ครั้งที่ 6 พฤษภาคม 2530 หน้า179-188

Hamblin, C.,Armstrong, R.M., and Hedger, R.S. 1984. A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot and mouth disease virus in epithelial tissues. Vet. Microbiol. 9:435-443.

Roeder, P. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. The 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.

Snowdon,W.A.1966.Growth of foot and mouth disease virus in monolayer cultures of calf thynoid cells. Nature (London),210:1079-1080.

Westbury,H.A., Doughty,W.J., Forman,A.J. Suchinta Tangchaitrong and Ab Kongthon, 1988. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and virus isolation for foot and mouth disease diagnosis. Vet. Microbiol. 17:21-28.

การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกรชนิดน้ำมัน

PREPARATION OF OIL ADJUVANT FOOT AND MOUTH DISEASE VACCINE TYPE O FOR PIG

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1] พิจิตร มกรเสน[1]

Wacharee Sinsuwonkwat Pichit Makarasen

ABSTRACT

The comparison between aqueous vaccine and oil emulsion vaccine for pigs has been done at the FMD center, Pakchong,Nakhonratchasima Thailand. The purpose is to improve vaccine quality. The results of the experiments shown that the oil emulsion vaccine which used Montanide ISA50 and Montanide ISA70 were better than the aqueous vaccine (Aluminum-Saponin vaccine), because of using the amount of antigen per dose smaller than aqueous vaccine. The aqueous vaccine must have the antigen = 12.65 μgm of 140 S per dose for 100% protection rate, but oil emulsion vaccine have only 1.99 to 7.30 μgm of 140 S per dose for 100% protection rate in both vaccine which using Montanide ISA50 and Montanide ISA70 and both concentrated and non-concentrated virus.

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกรที่ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา นั้นมีจุดประสงค์เพื่อจะเป็นการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนให้ดีขึ้น และ จากการทดลองก็ปรากฏว่าได้ผลดี กล่าวคือ วัคซีนที่ผลิตแบบ oil emulsion vaccine จะให้ผลคุ้มโรคได้ดีกว่าวัคซีนที่ผลิตแบบ aqueous vaccine (Aluminium - Saponin vaccine) กล่าวคือ วัคซีนที่ผลิตแบบ aqueous vaccine จะต้องใช้ antigen ถึง 12.65 μgm (140S) ต่อโด๊ส จึงจะให้ผลคุ้มโรค 100% แต่ oil emulsion vaccine ใช้เพียง 1.99-7.33 μgm (140S) ต่อโด๊ส ก็ให้ผลความคุ้มโรค 100% เช่นกัน ซึ่งทั้ง oil emulsion vaccine ที่ใช้ Montanide ISA50 และ Montanide ISA70 ทั้งแบบ concentratedและ non-concentrated virus ก็ให้ผลคุ้มโรค 100% นั่นแสดงให้เห็นว่าถ้าผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกรแบบ oil emulsion vaccine ก็จะสามารถผลิตวัคซีนได้มากกว่าผลิตแบบ aqueous vaccine (ซึ่งผลิตในปัจจุบัน) และให้ผลความคุ้มโรคสูงกว่าและคุ้มโรคได้ยาวนานกว่าโดยฉีดเพียงครั้งเดียว

คำนำ

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอสุกร ที่ผลิตโดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ปัจจุบัน ผลิตโดยวิธีฆ่าเชื้อไวรัสด้วย BEI และมีอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลเป็นแอ็ดจูแวนท์ (Makarasen. P, Sinsuwonkwat. P, 1986) ซึ่งวัคซีนที่ผลิตโดยวิธีนี้จะให้ความคุ้มโรคในสุกรได้ไม่ดีเท่าที่ควรกล่าวคือจะต้องใช้ปริมาณแอนติเจน (ไวรัส) ในวัคซีนจำนวนมากจึงจะให้ความคุ้มโรคได้ดี

จากรายงานของต่างประเทศพบว่า การนำอามิเนอร์ลออยล์มาเป็นแอ็ดจูแวนท์ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วจะทำให้วัคซีนให้ความคุ้มโรคได้ดี โดยที่มีแอนติเจน (ไวรัส) ในวัคซีนจำนวนน้อย และยังให้ความคุ้มโรคได้นานขึ้นอีกด้วย (P. Auge de Mello, et al, 1978)

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

ดังนั้น เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย จึงได้ทำการทดลองผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไหม้โอสุกรแบบ oil emulsion โดยเปรียบเทียบระหว่างวัคซีนที่ผลิตแบบปกติกับวัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยใช้ oil 2 ชนิด คือ Montanide ISA50 (seppic) และ Montanide ISA70 (seppic) นอกจากนี้ ยังเปรียบเทียบระหว่างการผลิตวัคซีนปกติ แบบไม่ทำไวรัส (แอนติเจน)ให้เข้มข้นและ การผลิตวัคซีนแบบ oil emulsion จากไวรัส(แอนติเจน)ที่ทำให้เข้มข้น

นอกจากนี้ยังเป็นการศึกษาว่า oil emulsion ทั้งสองชนิดที่นำมาทดลองนั้น จะทำให้เกิดการแพ้หลังจากนำไปฉีดสัตว์แล้วหรือไม่ อีกทั้งยังเป็นการทดลองว่า oil ชนิดใดจะเป็นค่า adjuvant สำหรับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดีกว่ากัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง - ลูกหนูขาวดูดนมอายุ 1-2 วัน
   - สุกรลูกผสมอายุ 1 เดือนครึ่ง ซึ่งได้รับการตรวจแล้วว่าไม่มีแอนโตบอดี้ต่อโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง3ไหม้
2. เซลล์ ใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer ซึ่งเพาะโดยวิธี Rolling cell culture method
3. ไวรัส - Seed virus ใช้ไวรัสไหม้โอสุกร (OPN BHK Tm_9)
   - Seed Challenge ใช้ไวรัสไหม้โอสุกร (OPN-P_{14})
4. Mineral oil ใช้ - Montanide ISA50 (Seppic)
   - Montanide ISA70 (Seppic)

การเตรียมไวรัส

เตรียมไวรัสไหม้โอสุกร โดยนำ Seed virus for production มา innoculated ในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ monolayer ซึ่งเพาะในขวดหมุนมีบริมาตรเซลล์ต่อขวด ประมาณ $1x10^9$ เซลล์/ขวด ใช้ปริมาตรไวรัส M.O.I. = 0.01 ใส่ Maintenance media 500 ซีซี/ขวด incubate ที่ 37°C. 18-24 ชั่วโมง จนเกิด CPE 95-100% จึงทำการ Harvest ไวรัสที่ได้แล้วนำไวรัสที่ได้มาแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 non-concentrated virus โดยนำมาผสมกับ chloroform ในอัตราส่วน 0.5% V/V ปั่นผสมให้เข้ากันที่ 4°C. ประมาณ 3 ชั่วโมง (Moslet. U, et al) หลังจากนั้นนำมาปั่นด้วยเซนตริฟิว 6000 รอบ/นาที นาน 30 นาที แล้วจึงนำไวรัสที่ได้ (supernatant) มา inactivate ด้วย BEI soln ที่ 37°C.24 ชั่วโมง (Makarasen.P, et al, 1985) แล้วจึงนำไวรัสที่ inactivated แล้วไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

ส่วนที่ 2 Concentrated virus โดยนำไวรัสที่ Harvest แล้วมาปั่นแยกกากเซลล์ออกด้วยเซนตริฟิวความเร็ว 6000 รอบ/นาที นาน 30 นาที แล้วนำไวรัสที่ได้ไป inactivated ด้วย BEI soln ที่ 37°C. 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไวรัสที่ inactivated แล้วไปทำการ Concentrate 10 เท่า ด้วย Amicon Hollow fiber (Molecular weight cut off 100,000) จากนั้นจึงนำ Concentrated ไวรัสไปเติม Chloroform 0.5% ปั่นผสมให้เข้ากันที่ 4°C. 3 ชั่วโมง แล้วนำไวรัสนั้นไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเซนตริฟิว ความเร็ว 6000 รอบ/นาที นาน 30 นาทีอีกครั้ง ไวรัสที่ได้ครั้งสุดท้ายนี้ (supernatant) จะนำไปผลิตเป็นวัคซีนเพื่อทดลองต่อไป Virus fluid ที่ได้ทุกขั้นตอน จะต้องนำไปหาค่าปริมาตร antigen ใน fluid โดยวิธี plaque forming unit (pfu), complement fixation unit (cfu) และ SRID (Single Radial Immunodiffusion)

การเตรียมวัคซีน

ชนิดที่ 1 Aqueous vaccine โดยนำไวรัสส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 หลังจากผ่านขั้นตอนการเตรียมไวรัสมาหมดแล้ว มาเตรียมเป็นวัคซีนแบบ Aqueous vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Makarasen. P, et al.1989) และเพื่อใช้เป็นค่า control ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อเตรียมเสร็จแล้วจะได้วัคซีน 1 ชุด

ชนิดที่ 2 oil emulsion vaccine โดยนำไวรัสส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมไวรัสมาหมดแล้ว มาเตรียมเป็นวัคซีนแบบ oil emulsion vaccine (Auge'de mello.P,et al,1978) โดยใช้ oil 2 ชนิด คือ Montanide ISA50 และ Montanide ISA70 การผสมไวรัสกับ oil หลังจากผสมแล้ว ทำให้เข้ากันด้วย Homogenizer ความเร็ว 4000 รอบ/นาที ที่ 4°C.นาน 15 นาที หลังจากผลิตเป็นวัคซีนแล้วจะได้ oil adjuvant vaccine for type O pig เป็น 4 ชุด คือ

1. วัคซีนที่ผลิตโดยใช้ Montanide ISA50 (มีส่วนผสม virus : oil = 50:50) 2 ชุด คือ

1.1 ชุดผลิตจาก non-concentrated virus

1.2 ชุดผลิตจาก concentrated virus

2. วัคซีนที่ผลิตโดยใช้ Montanide ISA70 (มีส่วนผสม virus : oil = 30:70) 2 ชุด คือ

2.1 ชุดผลิตจาก non-concentrated virus

2.2 ชุดผลิตจาก concentrated virus

การทดสอบความปลอดภัย (safety test)

1. sterility test เป็นการทดสอบความบริสุทธิ์ของไวรัส และ วัคซีนที่เตรียมได้ในมีเดียมเลี้ยงเชื้อคือ nutrient agar และ thioglycolate broth

2. inactivation test เป็นการทดสอบเพื่อจะดูว่ายังมี infective virus เหลืออยู่หรือไม่ หลังจาก inactivated ด้วย BEI soln แล้ว โดยนำ inactivated virus มาผ่านในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ทำติดต่อกัน 3 ครั้ง เพื่อดูสภาพของเซลล์ว่าเจริญตามปกติ หรือ มีสภาพ cytopathic effect (CPE) เกิดขึ้นหรือไม่

3. inocuity test โดยการฉีดวัคซีนในลูกหนูขาว (suckling mice) และสุกร

ในลูกหนูขาว ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 ม.ล. จำนวน 16 ตัว ต่อ วัคซีนแต่ละชนิด แล้วสังเกตอาการทุกวัน นาน 10 วัน ถ้าลูกหนูติดเชื้อจะตาย

ในสุกร ฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 10 ม.ล. และเข้ากับตัวละ 2 ม.ล.ใช้สุกร 2 ตัว ต่อวัคซีนแต่ละชนิด สังเกตอาการ 7-10 วัน เพื่อดูว่ามีการเกิด Allergic Reaction หรือแสดงอาการของโรคปากและเท้าเปื่อยขึ้นหรือไม่

การทดสอบความคุ้มโรค (potency test)

ทดสอบโดยการฉีดวัคซีนแต่ละชุดในสุกรชุดละ 5 ตัว และมีตัวคอนโทรล 2 ตัว (ไม่ได้ฉีดวัคซีน)

- วัคซีนชนิด aqueous vaccine ฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 5 ซีซี. ฉีด 2 ครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์
- วัคซีนชนิด oil emulsion vaccine ฉีดเข้ากล้ามตัวละ 2 ซีซี. เพียงครั้งเดียว

เมื่อครบ 4 สัปดาห์หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว (นับจากฉีดครั้งสุดท้ายใน aqueous vaccine) นำสุกรทดสอบวัคซีนทั้งหมด รวมทั้งตัวคอนโทรลด้วยมาฉีดพิษทับ (challenge) ด้วยไวรัสไทป์โอสุกร OPN-P_{14} ในขนาด 300 PID_{50} (50% pig infective dose) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณอุ้งเท้าขาหลังด้านซ้ายตัวละ 0.2 ซีซี. แล้วอ่านผลหลังจากฉีดพิษทับ 7 วัน จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การทดลองผลิตวัคซีน โอ สุกร ทั้งแบบ aqueous vaccine และ oil emulsion vaccine นั้น ให้ผลความคุ้มโรคได้ดีถึง 100% เช่นเดียวกันทั้งหมด แต่ aqueous vaccine นั้น จะต้องใช้ปริมาณแอนติเจนสูงมากถึง 12.65 µgm/dose แต่ oil emulsion vaccine จะใช้ปริมาณ antigen เพียง 1.99-7.30 µgm/dose ก็ให้ความคุ้มโรคได้ดีเช่นเดียวกัน (ดังแสดงไว้ใน table 1) และ oil emulsion vaccine ฉีดเพียงครั้งเดียว ส่วน aqueous vaccine ต้องฉีดถึง 2 ครั้ง จึงจะให้ความคุ้มโรค นอกจากนี้แล้วการทดสอบวัคซีนต่าง ๆ ทุกขั้นตอนก็ผ่านได้อย่างดี และมีผลออกมาให้เห็นว่าการใช้ Montanide ISA50 จะทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่ฉีดในสุกรทดสอบบางตัวเพียง 1-2 วันก็จะหายไป แต่ก็ไม่ทำให้เกิดอันตรายใด ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 2)

Table1 Show the results of SN titer (log) (average) of the experimental animals (pigs) 4 weeks after vaccination (before challange) and the protection rate after challenge

Vaccine	Dose	Amount of antigen 140S (µgm/dose)	Average of SN titer (log) 4 weeks after vaccination	Prolection rate (%)
1.Aqueous vaccine (aluminium-Saponin vacc.)	5ml*	12.65	2.0168	100
2.Non-concentrated antigen with ISA50 vacc.	2 ml	3.33	2.2276	100
3.Non-concentrated antigen with ISA70 vacc.	2 ml	1.99	2.5684	100
4.Concentrated antigen with ISA50 vacc.	2 ml	7.30	1.9868	100
5.Concentrate antigen with ISA70 vacc.	2 ml	4.38	1.4148	100

* Booster after first injection 1 week

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่าวัคซีนไทป์โอสุกรที่ผลิตขึ้นแบบ oil emulsion vaccine นั้น จะให้ผลดีกว่าวัคซีนแบบ aqueous vaccine ที่ผลิตในปัจจุบันทั้งนี้จะเห็นได้จากค่า antigen ต่อ dose ของ aqueous vaccine นั้น ต้องใช้จำนวนมาก แต่ในขณะเดียวกัน antigen ต่อ dose ของ oil emulsion vaccine ทั้ง Montanide ISA50 และ Montanide ISA70 จะใช้น้อยกว่า aqueous vaccine แต่ให้ความคุ้มโรคเท่ากัน

ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่า การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ สุกร โดยวิธีการใช้ oil emulsion เป็น adjuvant นั้น จะให้ผลความคุ้มโรคได้ดีกว่าการผลิตแบบ aqueous vaccine (Aluminium saponin vaccine) อีกทั้งยังเป็นการประหยัดปริมาณ antigen ด้วย เพราะเมื่อการผลิตวัคซีนแบบ oil emulsion ใช้ปริมาณ antigen ต่อ dose น้อย ก็ทำให้สามารถผลิตวัคซีนไทป์ โอ สุกรได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นและมีประสิทธิภาพดีด้วย

นอกจากนี้จากการทดลองยังมีผลทำให้เลือกใช้ oil ได้ กล่าวคือ จะเลือกใช้ได้ทั้งMontanid ISA50 และ Montanide ISA70 ซึ่งก็จะนำมาเป็น adjuvant ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ สุกรได้ดีทั้งสองชนิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในหน่วยควบคุมคุณภาพวัคซีน ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ทุกท่านที่ได้ช่วยแนะนำและช่วยให้งานด้าน ๆ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

Table 2 Show the results of another test of the O-Pig experiment vaccine (X = Swelling at the infection site, - = no reaction)

Vaccines	Inactivation test	Purity test	Safety test in suckling mice	Safety test in pig	Allergic reaction
1.Aqueous vaccine (Aluminium-Saponin vacc.)	PASS	PASS	ND	PASS	-
2.Non-concentrated antigen with ISA50 vacc.	PASS	PASS	PASS	PASS	-
3.Non-concentrated antigen with ISA70 vacc.	PASS	PASS	PASS	PASS	-
4.Concentrated antigen with ISA50 vacc.	PASS	PASS	PASS	PASS	X
5.Concentrated antigen with ISA70 vacc.	PASS	PASS	PASS	PASS	-

เอกสารอ้างอิง

Auge' de Mello, P., Gomes, TVO., Alonso Fernandes, A. Mascarenhas, J.C. 1978. Foot-And-Mouth Disease oil adjuvanted vaccine for pigs.II Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine. Bltn. Centro. Panamericano Fiebre Aftosa. 31-32,21-27

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P., 1986. Vaccine and vaccine production. The Report of third country training Programme on Foot and Mouth Disease Control. Bangkok. 259 P.

Makarasen, P., Sinsuwonkwat, P., Tanachareonwatch, P. 1985. Binary Ethyleneimine and Foot and Mouth Disease vaccine Production in Thailand,PP.308-309. In Anthony J.Delta-porta (eds.). Veterinary Viral Disease,Their Significance in South-East Asia and the Weatern Pacific, Academic Press, Australia.

Moslet, V. and Lei, J.C. 1972. Choroform treatment and clarification by filtration of Foot and Mouth Disease virus suspension. A survey of preliminary experiences. Bull. off. int. Epiz. 77.PP 1303-1314.

การศึกษาแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้

Studies on a approach to control and eradicate Aujeszky's disease

กูเกียรติ สุวรรณลักษ์[1] จารุณี สาตรา[2] สุนีจิต คงทน[2]

Kukiet Suwanlak Jarunee Satra Suneechit Kongthon

บทคัดย่อ

โรคออเจสกี้หรือซูโดเรบีส์ เป็นโรคติดต่อที่ เกิดจากเชื้อไวรัสเฮอร์บีส์ พบมากในสุกร ซึ่งเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ และยังทำให้เกิดโรคใน โค กระบือ แกะ สุนัข แมว และสัตว์ป่าบางชนิด สุกรเป็นตัวอมโรคหรือแอบแฝงโรคตามธรรมชาติ จึงเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรคในท้องที่ การควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้ให้ได้ผล จะต้องทำการตรวจคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก พร้อมทั้งมีมาตรการในการจัดการฟาร์มที่ดี เพื่อป้องกันไม่ให้มีการนำโรคเข้ามาในฟาร์มสุกร ความสามารถในการตรวจหาการติดเชื้อแอบแฝงในสุกร จึงมีความสำคัญต่อการทำโปรแกรมกำจัดโรคออเจสกี้ ลักษณะการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยประกอบด้วยฟาร์มหลายขนาด และมีการจัดการฟาร์มแตกต่างกันไปตามสภาพการเลี้ยงในแต่ละท้องที่ ดังนั้นแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรค จึงต้องคำนึงถึงขนาดของฟาร์ม การจัดการฟาร์ม สภาวะทางเศรษฐกิจ และสภาวะการณ์ของโรค ในท้องที่ที่มีการระบาดของโรคในอัตราที่สูงและเชื้อแพร่กระจายอยู่ทั่วไป มีความจำเป็นต้องใช้วัคซีนเพื่อลดความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตาม วัคซีนที่มีใช้อยู่ทั่วไปไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ หรือการแพร่จำนวนของไวรัสที่แอบแฝงอยู่ในสุกรที่ได้รับวัคซีนซึ่งมีการติดเชื้อ การใช้วัคซีนตามลำพังเพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส แต่จะต้องทำควบคู่ไปกับการตรวจ และคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก การใช้วัคซีนที่ผลิตจากส่วนประกอบหลักส่วนของไวรัส จะทำให้สามารถตรวจแยกสุกรที่ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ออกจากสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้น จึงควรใช้สับยูนิตวัคซีน หรือวัคซีนพันธุวิศวกรรม ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจแยกสุกรที่ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ออกจากสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ โดยสัตว์ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีแอนติบอดีต่อส่วนของไวรัส สำหรับฟาร์มสุกรที่เคยใช้วัคซีนชนิดอื่นมาก่อน อาจต้องเปลี่ยนมาใช้สับยูนิตวัคซีน หรือวัคซีนพันธุวิศวกรรมไปสักระยะหนึ่ง จนกระทั่งแอนติบอดีที่เกิดจากการใช้วัคซีนชนิดเดิมหมดไป จึงเริ่มทำการตรวจและคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก ควรเริ่มจากฟาร์มสุกรที่มีการจัดการฟาร์มดี และมีจำนวนมากพอเพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการตรวจและคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ซึ่งผลิตลูกสุกรให้แก่ฟาร์มอื่นและเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรค ขณะเดียวกันในส่วนของภาคราชการ โดยกรมปศุสัตว์ ก็ควรพัฒนาและนำเอาเทคนิคการบล็อคของอิไลซ่า หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิไลซ่า มาใช้ในการตรวจสภาวะการณ์ของโรค รวมทั้งการให้บริการในการตรวจสอบและมีมาตรการในการออกใบรับรองให้แก่ฟาร์มสุกรที่ปลอดโรค คลอดคล้องการออกกฎหมายเพื่อนำมาใช้ในการควบคุม และกำจัดโรคออเจสกี้

เนื้อหา

สาเหตุและความรุนแรงของโรค

โรคออเจสกี้ หรือซูโดเรบีส์ เป็นโรคติดต่อ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเฮอร์บีส์ พบมากในสุกรซึ่งเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ (Shope, 1935) และยังทำให้เกิดโรคใน โค กระบือ แกะ สุนัข แมว และสัตว์ป่าบางชนิด (Mc.Inis, 1978)

การติดต่อทางระบบหายใจเชื้อไวรัสเริ่มเพิ่มจำนวนที่เยื่อบุจมูกแล้วแพร่กระจายไปยังหลอดลมและถุงปอด (Shope, 1934) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในสิ่งขับถ่ายจากช่องจมูกและปากตั้งแต่วันแรกที่ติดเชื้อจนถึง 10 วัน (Mc.ferran and Dow, 1962) และสามารถตรวจพบเชื้อในเยื่อบุจมูกและปากอย่างน้อย 2 สัปดาห์ (Wittmann et al,1980) เชื้อไวรัสจะผ่านความร้อนที่ 70 องศา

---

[1]กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพมหานคร

[2]ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีววัตถุ กองผลิตชีววัตถุ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

ไปยังต่อมน้ำ เหลือง และถูกขับเชื้อออกทางจมูก และปาก (Mc Ferran and Dow, 1965) การกระจายของเชื้อไวรัสในตัวสัตว์เกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเชื้อไวรัสถูกสูดเข้าไปทางจมูกและปาก แล้วไปตามหลอดลมและเข้าสู่บอด หากให้บอดอักเสบจะสามารถตรวจแยกเชื้อไวรัสได้จากเยื่อบุหลอดลมและบอด (Baskerville, 1971)

เชื้อไวรัสผ่านจากจมูกไปตามเส้นประสาทเข้าสู่ประสาทส่วนกลาง และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในระบบประสาทส่วนกลางได้หลังจากติดเชื้อ 48 ชั่วโมงไปแล้ว หากให้สมองอักเสบ ซึ่งจะพบสูงสุด 6-10 วัน หลังจากติดเชื้อ (McFerran and Kow, 1965) ในระบบประสาทส่วนกลางเชื้อไวรัสกระจายไปทั่วสมอง แต่มักจะไม่ตรวจพบเชื้อไวรัสในน้ำหล่อเลี้ยงสมอง และไขสันหลัง และไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในประสาทส่วนกลางเกินกว่า 10 วัน (McFerranand Dow,1965) เชื้อไวรัสทำให้เยื่อหุ้มสมองและเนื้อเยื่อสมองอักเสบ และสามารถตรวจพบ inclusion bodies ในบางส่วนของเซลล์ประสาท และทำให้เกิดการทำลายในสมอง (Sabo et al 1968)

Corner, 1965 ได้รายงานว่าเชื้อไวรัสไม่ค่อยจะเพิ่มจำนวนในหลอดอาหาร ดังนั้น การกระจายของเชื้อไปยังลำไส้ค่อนข้างยากเว้นแต่จะให้เชื้อไวรัสจำนวนมากและ Mc Ferran and Dow,1964 ได้รายงานว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากต่อมน้ำ เหลืองบริเวณ ลำไส้ ต่อมน้ำลาย ตับ กล้ามเนื้อ กระเพาะบัสสาวะ ผนังลำไส้ อุจจาระหรือบัสสาวะ อย่างไรก็ตาม Wang et al, 1980 ได้รายงานว่า สามารถตรวจพบไวรัสในเนื้อเยื่อบุมประสาทจมูก ระบบประสาทส่วนกลาง เส้นประสาทไขสันหลัง ตับ ไต บอด และต่อมน้ำ เหลือง ในการตรวจทางพยาธิวิทยา อาจพบเลือดออกที่ไตและใต้เยื่อหุ้มหัวใจม้ามอาจโตขึ้นเล็กน้อย และอาจพบจุดเนื้อตายที่ม้าม และ ตับ (Mohanty and Dutta, 1981)

เชื้อไวรัสมีผลต่อระบบหายใจ ระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์ของลูกรุ มีอาการหลัก คือ สมองอักเสบ และความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (Mc Ferran and Dow,1965;Mohanty and Dutta, 1981; Wohlgemuth et al, 1978) การระบาดของโรคในรายหัวไปพบว่า มีอาการไข้สูง ร่วมกับการเบื่ออาหารและซึม จาม กล้ามเนื้อสั่น อัตราการตายน้อยกว่า 5% (Shope, 1935) ในภาวะการณ์ที่โรครุนแรง จะแสดงอาการหายใจขัด ริดสั่น หรือ เดินเป็นวงกลม อัตราการตายสูงขึ้น อาจสูงถึง 80% (Baskerville, 1971; Gordon and Luke, 1955) ความรุนแรงของโรค จะขึ้นกับอายุสัตว์ด้วย พบว่าอัตราการตายในลูกสุกรอายุไม่เกิน 10 วัน ประมาณ 81% ในขณะที่อัตราการตายในลูกสุกรอายุ 21-35 วัน ลดลงเหลือ 25% (Akkermans,1970) ไม่ค่อยพบอาการที่ติดเชื้อรุนแรงในสุกรโต สุกรแม่พันธุ์มักแสดงอาการ เบื่ออาหาร ซึม และท้องผูก ไข้อาจสูงถึง 106°F.(Gordon and Luke, 1955) ในรายที่รุนแรงทำให้เกิดการแท้งลูก การตายแรกคลอด และการตายของลูกอ่อนในท้อง (Csontos et al, 1962; Gordon and Luke, 1955) เชื้อไวรัสสามารถผ่านทางน้ำนม และ รกจากแม่สุกรที่ติดเชื้อไปยังลูกสุกร ทำให้เกิดการตายในลูกสุกร (Csontos et al, 1962; Gordon and Luke, 1955, Wohlgemuth et al, 1978)

เชื้อไวรัสสามารถเอบนผงอยู่ในเนื้อเยื่อของลูกที่เป็นโรค และ หายจากอาการป่วยนาน ถึง 13 เดือน (Beran et al, 1980) สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ใน 6 สัปดาห์ ถึง 13 เดือนต่อมา และแหล่งสะสมเชื้อไวรัสได้แก่ ทอนซิล นมประสาท เส้นประสาทจมูกและตา (Beran et al, 1980; Gutekunst et al 1980) อย่างไรก็ตาม Gutekunst et al, 1980 ได้รายงานว่า สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส โรคออเจสกี้ในแม่สุกรที่มีระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดีต่ำ โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในนมประสาท (trigeminal ganglia) เท่านั้น แต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในทอนซิลหรือสิ่งขับถ่ายทางช่องจมูก

ไวรัสโรคออเจสกี้ทำให้เกิดการตายใน โค กระบือ แกะ สุนัข และแมว (Mohanty and Dutta, 1981) อาการที่พบทั่วไปคือ สัตว์จะแสดงอาการคัน เกาหรือเลียอย่างรุนแรงบริเวณผิวหนังที่ติดเชื้อ แล้วตามด้วยอาการทางประสาท อัมพาต โคม่า และตายในที่สุด สุนัขที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ จะแสดงอาการน้ำลายไหล ประสาทสั่นพลิง อาเจียร และ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในสมองและทอนซิล (Shell et al,1981) เชื้อไวรัส สามารถทำให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ กระต่าย หนูแรท และหนูตะเภา กระต่ายจะแสดงอาการคันอย่างรุนแรงภายใน 40-50 ชั่วโมง และตายในที่สุด ระยะเวลาที่จะแสดงอาการหลังติดเชื้ออยู่ในช่วงเวลาระหว่าง 15 ชั่วโมง ถึง 6 วัน อย่างไรก็ตาม บางสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ไม่สามารถทำให้เกิดอาการคันในกระต่าย

จนกว่าจะได้ผ่านเชื้อไปหลายครั้ง (Gordon and Luke, 1955)

ระบาดวิทยา

เชื้อไวรัสจะสามารถคงอยู่ในธรรมชาติได้โดยผ่านจากสัตว์ตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง จากการศึกษาพบว่า สุกรเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ และเป็นตัวอมโรค และ แพร่กระจายเชื้อโรค(Taylor,1979) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สุกรที่คลอดลูกจะแพร่กระจายเชื้อให้สุกรตัวอื่นได้มานานหลายเดือน และ สามารถแยกเชื้อไวรัสจากสุกรได้นานถึง 6 เดือนหลังจากที่หายจากอาการป่วย (Sabo and Grunert, 1971) ในหน่ายผสมพันธุ์ คาดว่าไวรัสอาจถูกขับออกจากสุกร เนื่องจากภาวะความเครียดจากสภาพดินฟ้าอากาศ การเคลื่อนย้าย การคลอด และการให้นม (Beran et al, 1980)

การติดต่อของเชื้อไวรัสในฝูงสุกร ผ่านทางระบบทางเดินหายใจ (Shope,1934) เชื้อไวรัสสามารถคงอยู่ในสุกรที่หายป่วยและจะยังคงมีเชื้ออยู่นาน อย่างน้อยเป็นสัปดาห์ ส่วนสุกรที่อมโรค หรือแอบแฝงโรค จะเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่เชื้อไวรัสในห้องที่ (Sabo and Grunert,1971; Sabo et al,1969; Shope, 1935) อย่างไรก็ตาม ในห้องที่มีการระบาดของโรค เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายในฝูงสุกรได้ง่าย โดยผ่านทางสิ่งขับถ่ายจากช่องจมูก และปาก สุกรอาจแพร่เชื้อไวรัสโดยการสัมผัส ส่วนโคกระบือ สุนัข และแมว ไม่ยินเชื้อไวรัส จึงไม่สามารถแพร่กระจายเชื้อไวรัส (Wright and Thawley, 1980) แต่ Pensaert et al,1980 ได้รายงานว่า สุนัขที่ติดเชื้อจากการทดลอง จะแสดงอาการเบื่ออาหาร ประสาทส่วนกลางถูกกด และกลืนอาหารลำบาก น้ำลายไหลฟูมปาก หายใจขัด เดินเป็นวงกลม หมดสติ และตายในที่สุด และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากสมองและประสาทไขสันหลังส่วนคอ ในบางครั้งอาจแยกได้จากทอนซิลและต่อมน้ำลาย ดังนั้นสุนัขอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อในธรรมชาติ

ความสูญเสียทางเศรษฐกิจ

โรคอหิวาต์สุกร ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร อัตราการตายในลูกสุกรอายุต่ำกว่า 2 สัปดาห์ มักสูงถึง 100%, อัตราการเจริญเติบโตของสุกรลดลง, มีการสูญเสียน้ำหนัก และ ความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่การแท้ง การตายแรกคลอด และการตายของลูกอ่อนในท้อง,การลดจำนวนของลูกในแต่ละครอก สิ่งเหล่านี้ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นมูลค่าหลายล้านดอลล่าห์สหรัฐ การติดต่อของโรคในสุกรจำนวน 80 ล้านตัว ความสูญเสียประมาณ 6.4 ล้านดอลล่าห์ และเพิ่มขึ้น 10 เท่าตัว ในช่วงสุดท้ายของการระบาดของโรค ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของโลก ค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยเฉลี่ยต่อปีประมาณ 650 ล้านดอลล่าห์สหรัฐ รวมค่าความสูญเสียทั้งทางตรง ซึ่งเกิดจากการตายของสุกร และโดยทางอ้อม ได้แก่ การลดประสิทธิภาพการผลิต และการจำกัดการขายสำหรับผู้ผลิตสุกร โรคอหิวาต์สุกร ยังทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสำหรับโรค หรือปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาได้แก่โรคระบบทางเดินอาหารและโรคระบบทางเดินหายใจ จากความสูญเสียเป็นมูลค่ามหาศาลเช่นนี้ จึงเป็นเหตุผลสำคัญ ที่จะต้องควบคุม และกำจัดโรคอหิวาต์สุกร (Upjohn, 1987)

สำหรับประเทศไทย การระบาดของโรคครั้งแรกเกี่ยวข้องกับการนำเข้าสุกรพันธุ์จากต่างประเทศ หลังจากการระบาดของโรคครั้งแรกสองถึงสามปี โรคได้แพร่กระจายไปทั่ว และ เกิดการระบาดของโรคอยู่ทั่วไป ฟาร์มสุกรพันธุ์ส่วนมากได้ทำการควบคุมโรค และ ให้วัคซีนโรคอหิวาต์สุกร แก่สุกรพันธุ์และลูกสุกรหย่านม แต่การแพร่กระจายของโรคผ่านทางสุกรที่เป็นตัวแอบแฝงโรค จากแหล่งบริการสุกรพันธุ์ยังเป็นปัญหาที่ใหญ่ (บุญมีและคณะ 2531) ปัจจุบัน การระบาดของโรครุนแรงมากขึ้น และโรค ได้แพร่กระจายไปในสุกรขุน ทำให้ลูกสุกรตายเป็นจำนวนมาก สุกรขุน มักมีอาการบวมน้ำ หายใจลำบาก และอัตราการตายสูงขึ้น ได้มีการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายมาใช้ในฟาร์มสุกร เป็นมูลค่าปีละหลายล้านบาท อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการประมาณค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่แน่นอน

การตรวจวินิจฉัยโรค

หลักในการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร ทำได้โดยดูจากอาการร่วมกับการตรวจทางพยาธิวิทยา ในส่วนของ สมอง ทอนซิลและ

บอด ซึ่งอาจพบว่าการเด่นชัด และการตรวจพบ inclusion bodies จะสามารถตรวจแยกจากโรคอื่น ๆ ได้ (Taylor, 1979) นอกจากนี้ ควรยืนยัน โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่การใช้เทคนิคทางอิมมูนวิทยา และไวรัสวิทยา เช่น พลออเรสเซนต์แอนติบอดี้เทคนิค (Albrecht et al, 1963) วิธีนิวตรอลไลเซชั่น (Haffer et al, 1980) และเทคนิคอิมมูโน คิมฟ้าส์ชั่น (Gutekunst et al, 1978) ปัจจุบัน ได้มีการนำอาเทคนิคอิไลซ่ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัย และ การสำรวจทางระบาดวิทยา (Moutou and Toma,1978) และได้พัฒนาเทคนิคการบล็อคของอิไลซ่า หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี้อิไลซ่า ซึ่งสามารถใช้ตรวจแยกระหว่างสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ และสุกรที่ได้รับวัคซีน (Oirschot et al, 1988)

การควบคุมและกำจัดโรค

การใช้วัคซีนโรคออเจสกี้

วัคซีนเชื้อตายและวัคซีนเชื้อเป็นได้ถูกนำมาใช้เพื่อลดความรุนแรงของโรคออเจสกี้ ในอดีตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร แต่วัคซีนเหล่านี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ และการแยบแผ่งของเชื้อไวรัสในสุกรที่ได้รับวัคซีน และมีการติดเชื้อ โดยทั่วไป การให้วัคซีนโรคออเจสกี้มักจะประสบผลสำเร็จในการกำจัดการแสดงอาการทางคลินิคอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ สุกรทดลองที่ได้รับวัคซีนและสัมผัสกับเชื้อไวรัสห้องที่ยังติดเชื้อกระจายทั่วไป จะขับเชื้อไวรัสน้อยกว่าสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน จากการพิจารณาถึงจุดเหล่านี้ จึงกระตุ้นความสนใจที่จะใช้วัคซีนโรคออเจสกี้ในโปรแกรมการควบคุม และกำจัดโรคออเจสกี้ไปทั่วโลก (Ormiston, 1990)

ความเข้าใจถึงโครงสร้างในระดับโมเลกุลของไวรัสโรคออเจสกี้มากขึ้น ได้ช่วยพัฒนาวัคซีนโรคออเจสกี้ จากการใช้โปรแกรมในการควบคุมและกำจัดโรค การเพิ่มความเข้าใจในส่วนนี้ ได้ก่อให้เกิดการพัฒนาวัคซีนพันธุกรรม ร่วมกับวิธีการตรวจแยก หาให้สามารถตรวจการติดเชื้อไวรัสจากห้องที่ในสุกรที่ได้รับวัคซีน การลดจำนวนสุกรในฝูงโดยการตรวจแยก และคัดเลือกสุกร หรือกลุ่มสุกรที่ติดเชื้อออก และเพิ่มจำนวนสุกรที่ปลอดจากเชื้อโรคออเจสกี้ จึงเป็นหลักพื้นฐานที่จะหาให้ฝูงสุกรปลอดจากการติดเชื้อ ความต้องการที่จะต้องตรวจแยกสุกรที่ติดเชื้อ ซึ่งเกิดความสับสนอย่างมากจากความจำเป็นที่ต้องให้วัคซีน จึงต้องมีการพัฒนาวัคซีนนิคดีลีชั่น และ วิธีการตรวจแยก จนกว่าทุกสเตรนของเชื้อไวรัสจากห้องที่ จะได้ถูกกำจัดออกไปจากฝูงที่ติดเชื้อ (Ormiston, 1990)

Molitor and Thawley,1987 ได้รวบรวมผลงานเกี่ยวกับวัคซีนเชื้อตาย วัคซีนเชื้อเป็น และสับยูนิตไวรัสวัคซีน ไว้ดังนี้

1. วัคซีนเชื้อตาย (Inactivated or killed virus vaccine)

วัคซีนเชื้อตาย โดยทั่วไปจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ในระบบหมุนเวียนต่อส่วนของโปรตีนที่หุ้มไวรัส (viral coat proteins) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรค วัคซีนเชื้อตายส่วนมากเตรียมจากการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง และฆ่าเชื้อไวรัสด้วยสารเคมี

การใช้วัคซีนเชื้อตายมีข้อได้เปรียบและเสียเปรียบดังต่อไปนี้

- จะต้องระมัดระวังอย่างมาก ที่จะต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีเชื้อไวรัส (live virus) คงค้างอยู่ในวัคซีนหลังจากการฆ่าเชื้อ เพราะใช้สเตรนที่รุนแรงของเชื้อไวรัสในการเตรียมวัคซีน

- อาจมีไวรัสที่สองซึ่งไม่ได้คาดหวังไว้และอาจมีความหนหาหรือดื้อต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าวัคซีนไวรัส

- การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และปริมาณของวัคซีนเชื้อตาย อาจมีความยุ่งยากมากขึ้น เนื่องจาก ส่วนประกอบของแอดจูแวนท์

- การให้วัคซีนเชื้อตายทาง parenteral route มักจะถูกจำกัดการให้ภูมิต้านทางเฉพาะแห่ง (limited local resistance) ต่อโรคตรงทางตามธรรมชาติ เช่นทางระบบทางเดินหายใจ

- การเตรียมวัคซีนเชื้อตาย ค่าใช้จ่ายสูงกว่าวัคซีนเชื้อเป็น และต้องเติมแอดจูแวนท์เพื่อกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

เมื่อใช้วัคซีนโรคออเจสกี้เชื้อตายในห้องที่จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวัคซีนเชื้อเป็น ถึงแม้ว่า จะได้มีการศึกษา และรายงานไว้เป็นจำนวนมากว่า วัคซีนเชื้อตายมีประสิทธิภาพในการป้องกันสุกรในการทดลองให้เชื้อพิษทับ และการติดเชื้อในสภาพห้องที่

(Donaldson et al,1985;McFerran et al,1979;Van Oirschot and Deleeuw,1985) ตัวการที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มี
ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย ก็คือโด๊สของแอนติเจนที่เพียงพอ และแอดจูแวนท์ที่มีประสิทธิภาพ ระดับแอนติบอดี้ที่ถูกกระตุ้นโดยวัค
ซีนเชื้อตายโดยทั่วไปจะแคบกว่า และมีระยะเวลาสั้นกว่าระดับแอนติบอดี้ที่ถูกกระตุ้นโดยวัคซีนเชื้อเป็น ความได้เปรียบของวัคซีน
เชื้อตายก็คือ สามารถเพิ่มการตอบสนองจากการกระตุ้นครั้งที่สอง (secondary or booster) ในสัตว์ที่เคยได้รับวัคซีนโรคออ
เจสกี้เชื้อเป็น หรือติดเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้จากห้องที่มาก่อน ในการทดลองให้ชื้อพิษทับด้วยไวรัสที่รุนแรง วัคซีนเชื้อตายไม่
สามารถป้องกันการติดเชื้อ และการขับออกของเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามวัคซีนเชื้อตายจะช่วยลดระยะเวลา และความรุนแรงของ
อาการทางคลินิค (Donaldson et al,1985; McFerran et al,1979) วัคซีนเชื้อตาย ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการต่อต้าน
การระบาดของโรคออเจสกี้ชนิดเฉียบพลันในห้องที่ ในกรณีเช่นนี้มักใช้ได้รายงานวัคซีนเชื้อตายมีประสิทธิภาพน้อยลงในการควบคุมอา
การของโรค

2. วัคซีนเชื้อเป็น (Attenuated or modified live virus vaccine)

เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนเชื้อตาย วัคซีนเชื้อเป็น มีความได้เปรียบในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบล้อเลียน
การติดเชื้อตามธรรมชาติโดยการเพิ่มจำนวนในโฮสต์ วัคซีนเชื้อเป็นมักจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ที่คงอยู่ได้นานกว่า และเป็นการ
สร้างแอนติบอดี้ตรงทางเข้าของการติดเชื้อตามธรรมชาติ (ถ้าใช้วัคซีนตรงตำแหน่งนั้น)วัคซีนเชื้อเป็นต้องการการเพิ่มจำนวนในสัตว์
ที่เป็นโฮสต์เพื่อผลิตปริมาณแอนติเจนให้เพียงพอเพื่อไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ไวรัสเหล่านี้ อาจมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวัคซีนเชื้อตาย
เมื่อให้แก่สัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันอยู่แล้ว อย่างไรก็ตาม ควรจะต้องคิดตามสั่งเกต และสืบสวนเรื่องราวต่อไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนเชื้อ
เป็นชนิดใหม่ ๆ

มีข้อเสียเปรียบบางอย่างในการใช้วัคซีนเชื้อเป็นก็คือ

2.1 อาจมีความเสี่ยงที่วัคซีนไวรัสจะเปลี่ยนกลับไปมีความรุนแรงมากขึ้น ในระหว่างการเพิ่มจำนวนในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ ถึง
แม้ว่าการเปลี่ยนกลับมารุนแรงของวัคซีนที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้ จะไม่ได้พิสูจน์ปัญหาดังกล่าว ในทางปฏิบัติ และเป็นไปไม่ได้

2.2 อาจตรวจไม่พบสิ่งแปลกปลอม หรือการบนเปื้อนของสารที่อาจติดมากับเซลล์ ซึ่งใช้ในการผลิตวัคซีน ไวรัสแปลกปลอม
ได้แก่ Avian Leukosis และ Retrovirus อื่น ๆ, SV-40 Bovine Viral Diarrhea (BVD) virus, porcine
parvovirus และ cytomegalovirus ได้ถูกตรวจพบในวัคซีนหลายชนิด สารแปลกปลอมอื่น ๆ ก็อาจคงอยู่ แต่ยังไม่ได้มีการ
ตรวจแยก, สารแปลกปลอมอาจทำให้เกิดโรค อาจไปกดการสร้างภูมิต้านทาน หรือเป็นหน้ากากบ้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าสู่โฮสต์

2.3 อาจมีความเสี่ยงเมื่อให้วัคซีนเชื้อเป็นแก่สัตว์ท้อง บางครั้งอาจพบอาการทางคลินิคในสุกรหลังให้วัคซีนเชื้อเป็น อย่าง
ไรก็ตามสัตว์ที่ได้รับวัคซีนจะหายป่วยทันที ถ้าสัตว์ที่ได้รับวัคซีนท้องก็มีความเสี่ยงต่อการตายของลูกในท้อง หรือเกิดการแท้ง

2.4 ถึงแม้ว่าวัคซีนเชื้อเป็นอาจจะปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสำหรับสัตว์ที่เป็นโฮสต์ ที่ต้องการให้วัคซีน แต่อาจจะไม่ปลอด
ภัยสำหรับโฮสต์ชนิดอื่น

2.5 ความยุ่งยากในการเก็บรักษาและมีอายุสั้นสำหรับวัคซีนเชื้อเป็นก็เป็นปัญหาเช่นกัน

วัคซีนโรคออเจสกี้ชนิดเชื้อเป็น ได้รับความเชื่อถือ โดยสัตวแพทย์ผู้ปฏิบัติงานทางด้านสุกร ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีวัคซีน
เชื้อเป็นหลายชนิดผลิตจากสเตรนต่าง ๆ ของไวรัสโรคออเจสกี้ได้แก่สเตรน BUK มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ ในการกระ
ตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกร บรากฏว่ามีความปลอดภัยต่อสุกรอายุมากกว่า 3 วัน และสุกรท้อง สัตว์ที่ได้รับวัคซีนสามารถป้องกันอาการทาง
คลินิค แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อโรคออเจสกี้ได้หมด สัตว์ที่ได้รับวัคซีน สามารถติดเชื้อไวรัสในห้องที่และขับเชื้อไวรัสออกมา
ตรวจ ๆ (Baskerville et al, 1973; Donaldson et al, 1985; Mc Feran et al, 1979; Sabo, 1969) ถึง
แม้ว่า วัคซีนชนิดนี้จะปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสำหรับสุกร แต่ยังคงมีความรุนแรงมากสำหรับสัตว์ชนิดอื่น และทำให้ตายได้ รวมถึง
สัตว์ทดลอง แกะ โค กระบือ แมว และสุนัข (Clark et al, 1984;Thurber, 1977; Van Alstine, 1984)

ไวรัสออเจสกี้ สเตรนอื่นได้แก่ K หรือ สเตรน Bartha, เป็นเชื้อที่แยกได้จากห้องที่ และลดความรุนแรงโดยผ่านในเซล
เพาะเลี้ยง (Bartha, 1961) ไม่มีความรุนแรงต่อสุกร แต่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสพิษทับ (Kojnok and Bartha

1962) ไวรัส สเตรนBartha มีความรุนแรงแก่สัตว์ชนิดอื่นน้อยกว่าสเตรน BUK

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ข้อเสียเปรียบอย่างหนึ่งของวัคซีนเชื้อตายก็คือการขาดภูมิต้านทานที่จุดเริ่มต้นของการติดเชื้อโรคออเจสกี้ จากเหตุการณ์นี้ จึงได้ชักนำให้มีการใช้วัคซีนเชื้อเป็น (Bartha strain) โดยการให้วัคซีนเข้าทางจมูกของสุกร (Deleeuw et al 1982; Van Oirschot and Deleeuw,1985) จากการศึกษาเหล่านี้ได้แนะนำว่า การสร้างภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งที่ช่องจมูกของไวรัสสเตรน Bartha ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อไวรัสพิษหนักดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการให้วัคซีนเชื้อเป็น หรือเชื้อตายทาง parenteral route การสร้างภูมิคุ้มกันที่ช่องจมูกของไวรัสสเตรน Bartha ยังช่วยลดระยะเวลาของการขับออก ของเชื้อไวรัสที่รุนแรงหลังการติดเชื้อหรือการทดลองให้เชื้อพิษทับ และสามารถใช้ในสุกรที่มีสุกรที่มีภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ในระดับที่ต่ำ (Van Oirschot and Deleeuw, 1985)

การให้วัคซีนโรคออเจสกี้เชื้อเป็น เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมทางอากาศ ในการระบาดของโรคออเจสกี้อย่างเฉียบพลัน

3. วัคซีนพันธุวิศวกรรม (Genetically engineered vaccine)

จากข้อแนะนำของ Mengeling, 1989 มีดังต่อไปนี้คือ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่น่าตื่นเต้นมากที่สุดเพื่อที่จะควบคุมโรคออเจสกี้ก็คือการพัฒนาของวัคซีน ซึ่งทำให้สามารถตรวจแยกระหว่างสุกรที่ได้รับวัคซีนอย่างเดียวเท่านั้น กับสุกรที่ได้ติดเชื้อไวรัสในท้องที่ เช่น วัคซีนที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยมีการหายไปของยีนส์บางส่วน (deletion-mutant vaccine) ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ หรือการตัดโดยเทคนิคพันธุวิศวกรรมของไวรัสยีนส์ ที่เป็นระหัส สำหรับการสร้างหนึ่งโปรตีนหรือมากกว่าจากผลที่ตามมาก็คือ สุกรที่ได้รับวัคซีน จะไม่มีแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สัมพันธ์กับส่วนของยีนส์ที่ถูกตัดออกไป นอกเสียจากว่าสุกรเหล่านี้ได้สัมผัสกับเชื้อไวรัสท้องที่ซึ่งมียีนส์อยู่ครบ หลักการปฏิบัติก็คือ จะต้องหาการตรวจแยกสุกรที่ติดเชื้อไวรัสท้องที่ เพราะว่า สุกรเหล่านี้ชอบที่จะเป็นพาหะในการติดเชื้อแบบแอบแฝง และอาจชักนำเชื้อไวรัสในเวลาต่อมาเป็นบางวันหลังจากเชื้อไวรัสกลับฟื้นขึ้นมาในการพัฒนาวัคซีนชนิดตัดยีนส์ และการตรวจโปรตีนที่เฉพาะซึ่งหายไป มีความแตกต่างกันไปของวัคซีนชนิดต่าง ๆ แต่วัตถุประสงค์หัวใจก็คือ การคงไว้ของโปรตีนทุกส่วนที่จำเป็นสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในขณะที่โปรตีนส่วนที่อาออกไม่จำเป็น สำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัส และความเป็นแอนติเจนที่สูง เมื่อคำนึงถึงความเป็นแอนติเจน ได้พิจารณาว่า การติดเชื้อไวรัสท้องที่ของสุกร ที่ได้รับวัคซีนเหมือนกับการกระตุ้นครั้งที่สอง ต่อ ส่วนของโปรตีนทั้งหมด ที่ร่วมอยู่กับวัคซีนไวรัส เพียงแต่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันครั้งแรกต่อส่วนของโปรตีนที่ใช้ในการตรวจแยกซึ่งไม่อยู่ในวัคซีน ยิ่งไปกว่านั้น ปริมาณของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อโปรตีนที่ใช้ในการตรวจแยก คงเหมือนว่าจะน้อยกว่าสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน และติดเชื้อไวรัสท้องที่ในสภาวะเดียวกัน จากการคาดหวังว่า เชื้อไวรัสท้องที่จะเพิ่มจำนวนได้น้อยในสุกรที่มีภูมิคุ้มกัน สิ่งที่นั่นเหล่านี้จึงมีความจำเป็นสำหรับส่วนของโปรตีนที่ใช้ในการตรวจแยก จะต้องมีความเป็นแอนติเจนที่สูงและสามารถเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจได้ภายใต้สภาวะที่มีช่วงกว้าง คุณสมบัติเหล่านี้คงเหมือนว่าจะเป็นจุดสำคัญที่สุดในการคัดเลือกวัคซีนชนิดตัดยีนส์ที่มีประสิทธิภาพ และเป็นสิ่งหนึ่งที่มีความยุ่งยากมากต่อการประเมินผลที่แน่นอน จนกว่าวัคซีนจะถูกใช้อย่างกว้างขวางในท้องที่

รหัสโปรตีนของไวรัสที่ใช้ในการตรวจแยกได้แก่ไกลโคโปรตีน มีชื่อว่า gI, gIII และ gX ยีนส์ gI ที่หายไปเกิดขึ้นตามธรรมชาติ เมื่อมีการผ่านเชื้อหลายครั้ง เพื่อลดความรุนแรงของวัคซีนไวรัส การตัดยีนส์ gIII และ gX เกิดขึ้นโดยพันธุกรรม การตัดเลือกที่แสดงออกภายนอก ขึ้นกับหลักความจริงที่ว่า โปรตีนเหล่านี้เป็นแอนติเจนที่ดี และหราบคำแหน่งของยีนส์ที่แน่นอน และเป็นส่วนที่สำคัญ ความสามารถที่มีส่วนสัมพันธ์ ที่จะไปกระตุ้นแอนติบอดี้ จึงถูกพิจารณาในลำดับสอง การตัดยีนส์ thymidine kinase (TK) ของวัคซีนชนิดตัดยีนส์ก็เพื่อลดความรุนแรงของไวรัส และน่าจะลดการติดเชื้อแบบแอบแฝง

4. สับยูนิควัคซีน (Subunit virus vaccines)

สับยูนิควัคซีน มีส่วนประกอบของไวรัส (subunits) ที่ต้องการสำหรับการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน สิ่งที่ต้องการเป็นอันดับแรกสำหรับการผลิตสับยูนิควัคซีนก็คือ การหราบถึงส่วนของไวรัสที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในโฮสต์ สำหรับ enveloped virus เช่น ไวรัสโรคออเจสกี้ ส่วนของ enveloped proteins เป็นแอนติเจนเฉพาะแห่งที่สุด สามารถสัมผัส

กับระบบป้องกันของโฮสต์ร่วมกับการสกัดโปรตีนด้วย detergent และทำให้บริสุทธิ์ การผลิตสับยูนิตโปรตีนโดยวิธีอื่น ได้รวมถึงการสังเคราะห์แอนติเจนขึ้น โดยวิธีทางเคมี และเทคนิคของ recombinant DNA (r DNA)

ความได้เปรียบของสับยูนิตวัคซีนได้แก่ ความปลอดภัยและความสามารถในการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีน และสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ เนื่องจากวิธีการในการผลิต สับ-ยูนิตวัคซีน มีประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ, ทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อวัคซีนไวรัสในโฮสต์ ดังนั้นจึงไม่มีการติดเชื้อหรือเป็นโรคชนิดแอบแฝงจากการให้วัคซีนแก่สัตว์ สิ่งแปลกปลอมจะถูกกำจัดโดยวิธีกรรมของสับยูนิต สิ่งหนึ่งที่น่าสนใจมากของ สับ-ยูนิตวัคซีนโรคออเจสกี้ก็คือ ความสามารถที่จะแยกการตอบสนองของแอนติบอดี้ระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีน และสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ เนื่องจากวัคซีน สับ-ยูนิตประกอบด้วยบางส่วน ของไวรัส สัตว์ที่ได้รับวัคซีน จะตอบสนองต่อแอนติเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของวัคซีน ในขณะที่สัตว์ ซึ่งติดเชื้อตามธรรมชาติ จะตอบสนองด้วยแอนติบอดี้ต่อ envelope proteins ทั้งหมด,internal core viral proteins และ nonstructural proteins อื่น ๆ

ความเสียเปรียบของสับยูนิตวัคซีนได้แก่ ความต้องการแอดจูแวนท์ หรือสารประกอบในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ความมีราคาแพงและความยุ่งยากในการเตรียม พบว่ามีแอดจูแวนท์เพียง 2-3 ชนิดเท่านั้น ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในทางสัตวแพทย์ เช่นวัคซีนเชื้อตายมักจะประกอบด้วย อลูมิเนี่ยมเจล หรือแกล็อแคลเซี่ยม ต่อมาพบว่าสารประกอบหลายชนิดได้แก่ quil A,avridin และ dimethyl- diodacyl- ammonium bromide มีประสิทธิภาพสูง ในการกระตุ้น การตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อไวรัส รวมถึงไวรัสโรคออเจสกี้ เพื่อขยายหรือเพิ่มการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันให้มากกว่าเกลืออลูมิเนี่ยม แอดจูแวนท์ มีความจำเป็นสำหรับการสร้างแอนติบอดี้ให้เข้มข้นมากขึ้น แต่อาจจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cell-mediated immunity) ในรูปแบบของ macrophages และ T cells ด้วย

ปัญหาในการพัฒนาสับยูนิตวัคซีนไวรัสโรคออเจสกี้ที่สำคัญก็คือ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมสูง วิธีการที่ใช้สำหรับการเตรียมสับ-ยูนิต ได้แก่การสกัดโปรตีนแล้วผ่านใน affinity column รวมทั้ง lectin เพื่อให้จับกับคาร์โบไฮเดรท หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี้เพื่อให้จับกับ specific proteins วิธีการเหล่านี้กินเวลามาก และอาจยุ่งยากที่จะผลิตให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ และจำเป็นสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ด้วยราคาที่เป็นไปได้

การเตรียมสับยูนิตวัคซีนไวรัสโรคออเจสกี้สองชนิดที่ได้ทดลองทดสอบ และพบว่ามีประสิทธิภาพสำหรับสุกรทั้งสองกรณี วัคซีนประกอบด้วยไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ virus protein ถูกสกัด และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการบางอย่าง แล้วผสมกับแอดจูแวนท์ ผลจากการศึกษา ได้แสดงให้เห็นว่าสับยูนิตวัคซีนกระตุ้นระดับแอนติบอดี้ได้ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับวัคซีนโรคออเจสกี้ ชนิดเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย หนึ่ง หรือ สองโด๊สของวัคซีนสามารถลดความรุนแรงทางอาการของโรค หลังจากให้เชื้อพิษ (Platt, 1984 ; Sharper et al, 1986)

การควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้ในกลุ่มชาติยุโรป

โปรแกรมการควบคุมโรคออเจสกี้ในกลุ่มประชาคมยุโรป แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ในขณะที่ประเทศเดนมาร์ค และสหราชอาณาจักร ได้ส่งเสริมโปรแกรมการกำจัดโรค ภายใต้แผนการไม่ทำวัคซีนให้แก่สัตว์อย่างเข้มงวด นโยบายของประเทศอื่น ๆ ในกลุ่มประชาคมยุโรป แตกต่างกันไป ตั้งแต่การใช้วัคซีนชนิดที่ตรวจแยกได้ทางซีรั่มวิทยา โดยร่วม หรือไม่ร่วมกับการตรวจและคัดเลือกสุกรที่ติดเชื้อเข้าโรงฆ่าสัตว์ หรือไม่มีการวางระเบียบเลย

ถึงแม้ว่าโรคออเจสกี้ได้เกิดขึ้นในทุกประเทศ ของกลุ่มประชาคมยุโรปเป็นเวลานานหลายปี แต่การระบาดของโรคออเจสกี้พบค่อนข้างน้อยและความสูญเสียทางเศรษฐกิจไม่เด่นชัด จนถึงระยะแรกของปี ค.ศ. 1970 ซึ่งสาเหตุที่การระบาดของโรคเพิ่มขึ้นนี้ไม่ทราบแน่ชัด แต่คิดเหมือนว่า อาจมีสาเหตุมาจากการเจริญเติบโดอย่างมากของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร โดยมิได้มีการนำเอาเศรษฐของไวรัสที่รุนแรงกว่าเข้ามา แต่เดิมเมื่อเชื้อไวรัสเข้าไปในฟาร์มสุกรขนาดเล็ก อัตราการตายค่อนข้างต่ำ และการกระจายไปยังฟาร์มสุกรขนาดใหญ่ค่อนข้างถูกจำกัด ในบางประเทศ พบการระบาดที่รุนแรงครั้งแรกในฟาร์มสุกรพันธุ์ขนาดใหญ่ หรือฟาร์มผสมระหว่างสุกรพันธุ์ และสุกรขุน ในขณะที่บางประเทศมีปัญหาของโรคในฟาร์มสุกรขุน

โปรแกรมการควบคุมโรคระดับชาติ ยึดหลักการตรวจและทำลายสุกรที่ไม่ได้ทำวัคซีน ซึ่งมีเลือดบวกหรือใช้ระบบการทำวัคซีนเป็นเวลายาวนานในฟาร์มสุกรที่ติดเชื้อ และความเคร่งครัดในการซื้อขายสุกร ซึ่งประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันได้นำทั้ง 2 วิธีนี้มาใช้ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1970 อย่างไรก็ตามในประเทศที่อ้างว่าได้กำจัดโรคออเจสกี้ แต่ก็ไม่มีข้อมูลหางชีรั่มวิทยา ที่จะสนับสนุนว่าไวรัสโรคออเจสกี้จะไม่หมุนเวียนอยู่ในฝูงสุกรที่ฉีดวัคซีน โปรแกรมการกำจัดโรคอย่างมีระบบได้นำมาใช้ในสหราชอาณาจักร ประเทศเดนมาร์ค และประเทศสลักเซ็มเบอร์ก ตั้งแต่ปี ค.ศ.1983,1980 และ 1988 ตามลำดับ ประเทศเหล่านี้ มีอัตราการเกิดโรคต่ำในระยะเริ่มแรกได้มีการห้ามไม่ให้ใช้วัคซีน และต่อมาก็ไม่มีการใช้วัคซีนอีกเลย (Terpstra, 1990)

นโยบายการกำจัดโรคในสหราชอาณาจักรได้ยึดถือการทำลายฝูงสุกรที่ติดเชื้อ โดยการส่งเข้าโรงฆ่าตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ การติดตามการเคลื่อนย้ายสัตว์จากฝูงที่ติดเชื้อ การตรวจเช็คเลือดของฝูงสัตว์ที่สัมผัสกับฝูงที่ติดเชื้อ และทุกฝูงที่อยู่รอบบริเวณที่เกิดโรคระบาดในรัศมี 2 กิโลเมตร (Taylor,1989) ในระยะต่อมาหาการสำรวจหางชีรั่มวิทยาโดยการตรวจเลือดตัวอย่างจากแม่สุกรและพ่อสุกรในโรงฆ่า และคิดตามค้นหาต้นตอที่มีตัวอย่างเลือดเป็นบวก

ประเทศเดนมาร์คได้ใช้นโยบายให้ความสำคัญแน่นการตรวจเลือดของสุกรทุกฝูง ร่วมกับการทำลาย (stamping out) ฝูงสุกรที่ติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน และทำลายสุกรที่มีเลือดบวกในฝูงอื่นโดยการส่งเข้าโรงฆ่า (sloughtering) และบังคับการซื้อขายสุกรให้เคร่งครัดในบริเวณที่มีการติดเชื้อ (Anderson et al, 1989) ความระวังระไวทุกช่วงระยะในการทำลายฝูงสุกรที่ติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน การตรวจเลือดตัวอย่าง 15% ของสุกรโตเต็มวัย ในฟาร์มสุกรพันธุ์ และสุกรขุน และ 5%ของจำนวนสัตว์ในฟาร์มสุกรขุนทุกๆ 2 ปี การตรวจเลือดสุกรพ่อพันธุ์ที่มีน้ำหนักมากกว่า 100 กิโลกรัม ทั้งหมดที่โรงฆ่า และทุกเดือนสำหรับสุกรพ่อพันธุ์ที่เคลื่อนย้าย

จำนวนของการระบาดในสหราชอาณาจักรลดลงจาก 400 รายในปี ค.ศ.1983 เหลือเพียง 5 ราย ในปี ค.ศ.1989 และไม่เกิดขึ้นเลยในระยะ 8 เดือนแรกของปี ค.ศ. 1990 การเคลื่อนย้ายสุกรพันธุ์ที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการของโรค โดยเฉพาะจากแหล่งที่มีมาตรฐานการจัดการฟาร์มที่ต่ำ และใช้สุกรพ่อพันธุ์ร่วมกัน เป็นเส้นทางที่เกิดบ่อยที่สุดในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสในช่วงระยะสุดท้ายของการกำจัดโรค (Taylor, 1989)

หลังจากช่วงระยะเวลา 12 เดือน ในปี ค.ศ.1985/1986 ซึ่งไม่ตรวจพบการติดเชื้อในประเทศเดนมาร์ค การระบาดของโรคได้มีรายงานอีกครั้งในปีต่อๆ มา (Anderson et al,1989) ซึ่งเกิดขึ้นในเกาะทางภาคใต้ และหมู่เกาะที่อยู่โดยรอบ และมักจะเริ่มขึ้นในฤดูหนาว การติดตามทางระบาดวิทยาของฤดูแรกของการระบาด ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการสัมผัสที่จะสามารถอธิบายถึงการปรากฏของโรคอีกครั้ง จากการวิเคราะห์โดยใช้ Restriction endonuclease analysis แสดงให้เห็นว่า DNA pattern ของเชื้อที่แยกได้ แตกต่างไปจากเชื้อของเดนมาร์คที่แยกได้ แต่กลับมี pattern เหมือนเชื้อของเยอรมัน จากสภาพภูมิประเทศและฤดูการเกิดการระบาดของโรคโดยไม่มีการสัมผัส แต่ pattern ของเชื้อที่แยกได้ไปเหมือนกับเชื้อของเยอรมัน ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสสามารถติดต่อทางอากาศ (transmitted airborne) จากแหล่งระบาดทางภาคใต้ของเขตชายแดนประเทศเดนมาร์ค (Anderson et al, 1989) ในขณะที่การติดต่อทางอากาศ ใน สหราชอาณาจักร ประมาณว่าไปได้ถึง 9 กิโลเมตร (Gloster et al, 1984) แต่ในประเทศเดนมาร์ค ได้รายงานว่า การกระจายของเชื้อ ไปได้ระยะทางถึง 80 กิโลเมตร ดูเหมือนว่าการกระจายของเชื้อไวรัสต้องการอุณหภูมิที่ต่ำ ความชื้นสูง และผ่านไปตามความยาวของสายน้ำ จากประสบการณ์ในประเทศเดนมาร์คจึงได้ให้ความสำคัญกับวิธีการร่วมมือ เพื่อควบคุมโรคออเจสกี้ในกลุ่มประชาคมยุโรป ความร่วมมือนี้ ยังรวมถึงความต้องการในการเลือกใช้วัคซีนโรคออเจสกี้ชนิดดัดแปรสที่ถูกต้อง (Terpstra, 1990)

การศึกษาเรื่องโรคออเจสกี้ในประเทศไทย

บุญมี และคณะ (2521) ได้รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการพบโรค ซึ่งมีลักษณะของโรคออเจสกี้ในสุกร โดยได้ทำการศึกษาโรคระบาดชนิดนี้ จากสุกรของฟาร์มแห่งหนึ่ง ในอำเภอเมืองจังหวัดนครปฐม โรคนี้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง โดยเฉพาะลูกสุกรแรกเกิด ถึงอายุ 18 วัน มักจะตายหมดครอก ก่อนตายลูกสุกรจะแสดงอาการ ตัวสั่น ชัก มีไข้สูง 104-107°F. หลังจากแสดงอาการตัวสั่นมักจะตายภายใน 48 ชั่วโมง บางตัวมีอาเจียร แต่ส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการท้องเสีย ลักษณะพิเศษอย่างหนึ่งคือ

สุกรพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และสุกรอายุ 2 เดือนขึ้นไปมักไม่ค่อยด้วยโรคนี้ ผลจากการศึกษาด้วยวิธีผ่าชากและทางจุลชีววิทยาพบว่า ในลูกสุกรที่ป่วยและตายด้วยโรคนี้ มีน้ำเยื่อสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งมี Cowdry's type A inclusion bodies ในเซลล์ประสาท และมีจุดเนื้อตายตามหน้าเซลล์ ต่อมน้ำเหลือง และไต เชื้อไวรัสที่แยกได้จากสมองของลูกสุกรป่วย เมื่อฉีดเข้าหนูตะเภาและกระต่าย ทำให้หนูตะเภาและกระต่ายตาย กระต่ายก่อนตายจะแสดงอาการคันมากครั้งหนึ่งหรือฉีดเชื้อ และตามมาด้วยอาการชักและตาย และเชื้อไวรัสนี้ เมื่อฉีดเข้าลูกสุกรสามารถทำให้เกิดโรค ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับลูกสุกรที่เกิดโรคโดยธรรมชาติ เมื่อตรวจเยื่อสมองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน พบเชื้อไวรัสจำนวนมาก

จารุณี (2524) ได้รายงานการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไวรัสซูโดเรบีส์ หรือไวรัสโรคออเจสกี้ ซึ่งแยกได้จากสุกรป่วยของฟาร์มแห่งหนึ่งใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม พบว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้เกิดโรคในลูกสุกร กระต่าย และหนูขาว ลูกหนูขาวตายหมด มีความไวต่อเชื้อไวรัสมากกว่าลูกหนูขาวหย่านม และหนูขาวโตเต็มที่ตามลำดับ แต่ต่ำกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 เพียงเล็กน้อย ส่วนกระต่ายมีความไวต่อเชื้อไวรัสเท่ากับเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 (ตารางที่ 1) เชื้อไวรัส สามารถจำหน่ายได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เช่น CEF, PK-15 และ BHK-21 ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์สองลักษณะ ลักษณะหนึ่งประกอบด้วยเซลล์มารวมตัวกันหรือมีขนาดใหญ่ขึ้น (syncytia or giant cells) และอีกลักษณะหนึ่งคือเซลล์มีรูปร่างกลมขึ้น (rounded cells) เชื้อไวรัสสามารถจำหน่ายบน chorioallantoic membrane (CAM) และทำให้เกิด pock lesions การตรวจเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยการเพาะเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง และสังเกตลักษณะพยาธิสภาพต่อเซลล์ และตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ วิธีนิวตรอลไลเซชั่น หรือวิธีอิมมูโนดิฟฟิวส์ชั่น (ตารางที่ 2)และการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

พิพลและคณะ (2525) ได้รายงานการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าเทียม หรือโรคออเจสกี้ในสุกรทางภาคใต้ ของประเทศไทย โดยมีสาเหตุมาจากการเคลื่อนย้ายสุกรจากทางภาคกลางของประเทศ การระบาดของโรคนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในฟาร์มสุกรแห่งหนึ่ง ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทำให้ลูกสุกรตุ่นป่วยและตายในอัตราที่สูง ส่วนใหญ่แสดงอาการทางประสาท ล้มลงนอนชัก ตัวสั่น และตายแม่สุกร ก็แสดงอาการป่วยด้วย โดยมีอาการซึม เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย จากการตรวจโดยการผ่าชากในลูกสุกรที่ป่วยและตาย พบว่าการของจุดเนื้อตายขนาดเล็กของต่อมทอนซิล บอดบาม พบจุดเลือดออกขนาดปลายเข็มหมุดบนเนื้อไต ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบการอักเสบของสมอง และบางรายพบเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมด้วย และพบ intranuclear inclusion bodies ในเซลล์ประสาท นอกจากนี้ยังพบหย่อมเนื้อตาย และ intranuclear inclusion bodies Cowdry's type A ในผนังเซลล์ของต่อมทอนซิล และเซลล์อื่นๆ และได้ทำการตรวจยืนยันในห้องปฏิบัติการ โดยวิธีพลูออเรสเซนต์แอนติบอดี้ การฉีดเข้ากระต่ายทดลอง และการตรวจแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง

บุญมี และจารุณี (2525) ได้รายงานการทำให้เกิดโรคซูโดเรบีส์ หรือโรคออเจสกี้ในสุกรทดลอง โดยการให้เชื้อไวรัสที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคออเจสกี้สจาก จังหวัดนครปฐม ให้แก่สุกรทดลอง 3 กลุ่ม ซึ่งมีอายุ 4 วัน 9 วัน และ 40 วันตามลำดับ โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องจมูก ปรากฏว่า สุกรกลุ่มอายุ 4 วัน และ 9 วัน มีอัตราการป่วยและอัตราการตาย 100% ส่วนสุกรกลุ่มอายุ 40 วัน มีอัตราการป่วย 100% แต่อัตราการตายเพียง 20% ประมาณ 48 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อไวรัส สุกรป่วย จะมีไข้ขึ้นสูงมาก แต่จะลดลงสู่ระดับปกติ หรือเกือบปกติภายในเวลาสัปดาห์ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่สำคัญคือพบจุดเนื้อตายที่ทอนซิลและต่อมบอดบาม สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ภาวะเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาที่สำคัญคือ พบleukocytosis (shift to the left)

จารุณี และคณะ (2525) ได้รายงานการตรวจหาเชื้อไวรัส และภูมิคุ้มกันในสุกรที่เกิดเชื้อซูโดเรบีส์ หรือไวรัสโรคออเจสกี้ สเตรนนครปฐม โดยการฉีดเชื้อไวรัสเข้าทางช่องจมูกแก่สุกรทดลองอายุ 40 วัน จำนวน 5 ตัว ปรากฏว่าสุกรตัวหนึ่งป่วยและตายอีก 4 ตัว ที่เหลือแสดงอาการป่วยและหายจากการเป็นโรคในเวลาต่อมา สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในช่องจมูกจากการกระทำ nasal swabs ได้ในวันที่ 7 หลังจากให้เชื้อไวรัส แต่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในวันที่ 14, 21, 28 และ 35 หลังจากให้เชื้อไวรัส สามารถตรวจพบ precipitating antibodies โดยวิธี ไมโครอิมมูโนดิฟฟิวส์ชั่น (MIDT) ในวันที่ 7 หลังจากให้เชื้อไวรัส ในขณะที่ระดับของ neutralizing antibodies ยังต่ำอยู่ สุกรทุกตัวให้ผลบวกต่อ MIDT และมีระดับ neutralizing antibodies สูงขึ้นในวันที่ 14, 21, 28 และ 25 หลังจากให้เชื้อไวรัส และยังให้ผลบวกต่อ delayed-type hypersensitivity

skin reaction ในขณะที่สุกรในกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับเชื้อไวรัสไม่สามารถตรวจพบทั้ง precipitating antibodies หรือ neutralizing antobodies และให้ผลลบต่อ delayed-type hypersensitivity skin reaction (ตารางที่ 3)

จารุณี และคณะ (2525) ได้รายงานการทดลองผลิตวัคซีนน้องกันโรคซูโดเรบีส์ หรือโรคออเจสกี้ชนิดเชื้อตาย จากเชื้อห้องที่ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ PD-15 และฆ่าเชื้อไวรัสด้วย binary ethylene imine (BEI) แล้วนยกผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน หรืออลูมิเนียมเจล ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน ปรากฏว่าวัคซีนทุกชนิดมีความปลอดภัยสำหรับลูกหมูอายุตั้งแต่นมกระด้างและลูกสุกร วัคซีนสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดีทั้ง cell mediated และ humoral immune responses โดยวัคซีนชนิดน้ำมัน ซึ่งเตรียมจากเชื้อไวรัสห้องที่ สเตรนนครปฐม สามารถกระตุ้นระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ในซีรั่มสุกรได้สูงกว่าวัคซีนชนิดน้ำมันที่นำเข้าจากต่างประเทศ และวัคซีนชนิดเอเดียส ซึ่งมีอลูมิเนียมเจลเป็นแอดจูแวนท์และเตรียมจากเชื้อไวรัสห้องที่สเตรนนครปฐมตามลำดับ (รูปภาพที่ 1) สุกรที่ฉีดวัคซีนแล้วหกตัว สามารถต้านทานการฉีดพิษทับด้วยไวรัสซูโดเรบีส์ โดยไม่ปรากฏวิการตามอวัยวะต่างๆ ในขณะที่สุกรในกลุ่มควบคุมตายไปหนึ่งตัว โดยมีวิการและตรวจพบเชื้อไวรัสจากช่องจมูก ทอนซิล ปอด ม้าม สมอง และต่อมน้ำเหลือง และสุกรในกลุ่มควบคุมอีกสองตัว แสดงอาการทางระบบหายใจเป็นบอดบาม และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในทอนซิลและปอด

จารุณี 2530 ได้รายงานการศึกษาสองวิธีการของเอ็นไซด์ลิงค์อิมมูโนซอบเบ้นท์เอสเอส สำหรับการตรวจโรคออเจสกี้ในสุกร จะเห็นว่าอีไลซ่าเทคนิค ตามวิธีการของสถาบันสุขภาพสัตว์ แห่งประเทศญี่ปุ่น ในการอ่านผลต้องลบด้วยค่า absorbance ของ negative control antigen (O.D.NA) (ตารางที่ 4) ส่วนการอ่านผลอีไลซ่าเทคนิค ตามวิธีการของ บริษัทนิชิเรกน แห่งประเทศญี่ปุ่น ใช้สูตรการคำนวณ

$$\frac{S-N}{P-N} = \frac{\text{O.D. of Tested Serum} - \text{O.D. of Negative Serum}}{\text{O.D. of Positive Serum} - \text{O.D. of Negative Serum}}$$

$\frac{S-N}{P-N} \Rightarrow \geq 0.4$ Positive serum sample

$\frac{S-N}{P-N} < 0.4$ Negative serum sample

จารุณี และสุนีจิต (2531) ได้รายงานการศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนโรคออเจสกี้ชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตาย ต่อการป้องกันโรคในสุกรขุน โดยการตรวจหาระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ พบว่าในการฉีดวัคซีนโรคออเจสกี้ให้แก่สุกรสองครั้งห่างกันสองสัปดาห์ สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อตายมีระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้สูงกว่าสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็น (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตามในการฉีดพิษทับเข้าทางช่องจมูกหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก 6 สัปดาห์ พบว่าวัคซีนเชื้อเป็น สามารถลดความรุนแรงของโรค และการขับออก ของเชื้อไวรัสฉีดพิษทับได้ดีกว่าวัคซีนเชื้อตาย ในขณะที่สุกรทุกตัวในกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ทำวัคซีน แสดงอาการ และมีวิการของโรคออเจสกี้ที่รุนแรง มีการขับออกของเชื้อไวรัสฉีดพิษทับทางช่องจมูก และตรวจพบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ (จารุณี และสุนีจิต 2531)

สรุปและวิจารณ์

จากรายงานการศึกษาวิจัยเรื่องโรคออเจสกี้ทั้งในและต่างประเทศพอจะสรุปได้ว่า โรคออเจสกี้ หรือซูโดเรบีส์เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัสเฮอร์บีส์ พบมากในสุกรซึ่งเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติและยังทำให้เกิดโรคใน โค กระบือ แกะ สุนัข แมวและสัตว์ป่าบางชนิด ติดต่อทางระบบหายใจทำให้ปอดอักเสบ สมองอักเสบ และเกิดความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ เชื้อไวรัสสามารถแอบแฝงอยู่ในเนื้อเยื่อของสุกรที่เป็นโรคและหายจากอาการป่วย สุกรที่อมโรค หรือแอบแฝงโรค จะเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่เชื้อในห้องที่ โรคออเจสกี้ ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร อัตราการตายในลูกสุกรอายุต่ำกว่าสองสัปดาห์อาจสูงถึง 100% อัตราการเจริญเติบโตของสุกรลดลง มีการสูญเสียน้ำหนัก และความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคอีไลซ่ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและการสำรวจทางระบาดวิทยา และได้พัฒนาเทคนิค การบล็อคของอีไลซ่า หรือ โมโนโคลนอล แอนติบอดี้อีไลซ่า ซึ่งสามารถใช้ตรวจแยกระหว่าง สุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ และสุกรที่ได้รับวัคซีน

ตารางที่ 1 การตรวจสอบความรุนแรงของเชื้อไวรัสชูไดเรบีส์ในหนูขาวอายุต่าง ๆ กัน กระ
ต่าย และเซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 และคำนวณค่าตามวิธีของ Reed และ Muench

Host	Age	Amount of inoculum/ host (ml)	Route	Infectivity titer (log10) of LD50 or TCID50/ml	Lethal effect		CPE	
					Sigs	Days first noted	Grade	Days first noted
Swiss albino mice	Suckling	0.1	IP	7.5	died	3	-	-
	Weanling	0.1	IM	6.0	died	3	-	-
	Adult	0.1	IM	4.5	died	4	-	-
PD-15 cells	-	0.1	-	8.0	-	-	4+	1
Rabbits	Adult	1.0	SC	6.5	pruritis	3	-	-
PK-15 cells	-	0.1	-	6.5	died+	-	4+	1

ตารางที่ 2 การตรวจแยกชนิดของไวรัส ต่อ known reference sera ของไวรัสชูไดเรบีส์
(PRV) ไวรัสอหิวาต์สุกร (HCV) และไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) โดยวิธีไมโคร
นิวตรอลไลเซชั่น และวิธีไมโครอิมมูโนดิฟฟิวส์ชั่น

Antibody	Results Tested by	
	Micro-neutralization test	Micro-immunodiffusion test
Homologous PRV	+	+
Reference PRV	+	+
Reference HCV	-	-
Reference FMDV	-	-
Swine normal serum	-	-

ตารางที่ 3 ผลการตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน หลังจากสุกรได้รับเชื้อไวรัสซูไดเรบีส์ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยวิธีไวรัสนิวตรอลไลเซชั่น (VN) ไมโครอิมมูโนดิฟฟิวส์ชั่น (MIDT) และ delayed-type hypersensitivity skin reaction (EMIR)

Methods	Pig No.	Days Post Inoculation				
		>	14	21	28	35
VN	B 3843	2	32	64	256	512
	B 3844	2	32	128	512	512
	B 3846	2	32	128	256	128
	B 3850	2	128	256	512	256
MIDT	B 3843	+	+	+	+	+
	B 3844	+	+	+	+	+
	B 3846	+	+	+	+	+
	B 3850	+	+	+	+	+
CMIR	B 3843	ND	8*	ND	18*	ND
	B 3844	ND	ND	12*	ND	ND
	B 3846	ND	ND	20*	ND	ND
	B 3850	ND	10*	ND	15*	ND

ND = Not Done

* = diameters (mm) of the area of thickening

ตารางที่ 4 การอ่านผลอีไลซ่าตามวิธีการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งประเทศญี่ปุ่น(NIAH)

Samples	O.D.PA	O.D.NA	O.D.ELISA	RESULT
Blank-no. serum	0.005	0.014	-0.009	0
PS 1:400 (1x)	1.138	0.089	1.049	5
PS 1:800 (2x)	0.771	0.064	0.707	3
PS 1:1600 (4x)	0.543	0.038	0.505	2
PS 1:3200 (8x)	0.333	0.037	0.296	1
NS 1:100 (0)	0.085	0.093	-0.008	0
No. 1	0.210	0.208	0.002	-(0)
*No. 2	1.418	0.363	1.055	+(5)
No. 3	0.309	0.280	0.029	-(0)

ตารางที่ 4 การอ่านผล อีไลซ่า ตามวิธีการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งประเทศญี่ปุ่น (NIAH) (ต่อ)

Samples	O.D.PA	O.D.NA	O.D.ELISA	RESULT
No. 4	0.483	0.441	0.042	-(0)
No. 5	0.374	0.369	0.005	-(0)
No. 6	0.326	0.335	-0.009	-(0)
No. 7	0.238	0.278	-0.040	-(0)
No. 8	0.314	0.307	-0.007	-(0)
No. 9	0.364	0.435	-0.071	-(0)
No.10	0.412	0.360	0.052	-(0)
No.11	0.310	0.307	0.003	-(0)
No.12	0.436	0.436	0	-(0)
No.13	0.251	0.272	-0.021	-(0)
No.14	0.149	0.167	-0.018	-(0)
No.15	0.276	0.265	-0.001	-(0)
No.16	0.267	0.272	-0.005	-(0)
No.17	0.291	0.272	0.019	-(0)
*No.18	1.345	0.388	0.959	+(5)
*No.19	1.567	0.309	1.258	+(6)
No.20	0.284	0.280	0.004	-(0)
*No.21	1.008	0.253	0.855	+(4)
No.22	0.308	0.299	0.009	-(0)
*No.23	0.555	0.338	0.217	+(1)
*No.24	0.778	0.510	0.268	+(1)
No.25	0.275	0.280	-0.005	-(0)
*No.26	1.499	0.406	1.093	+(5)
*No.27	1.482	0.244	1.238	+(6)
*No.28	1.297	0.412	0.885	+(4)
*No.29	1.753	0.338	1.415	+(7)
*No.30	1.539	0.281	1.258	+(6)
*No.31	1.770	0.268	1.502	+(7)
*No.32	1.583	0.393	1.190	+(6)
*No.33	1.536	0.344	1.192	+(6)
*No.34	1.294	0.321	0.973	+(5)

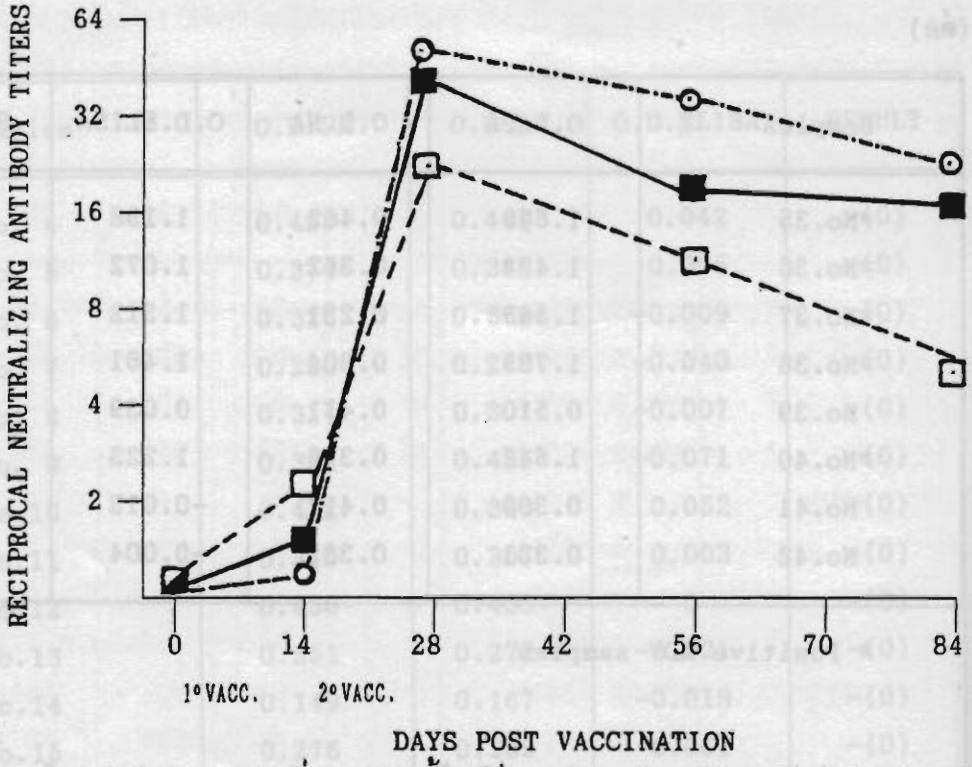
ตารางที่ 4 การอ่านผลอีไลซ่า ตามวิธีการของสถาบันสุขภาพสัตว์ แห่งประเทศญี่ปุ่น (NIAH) (ต่อ)

Samples	O.D.PA	O.D.NA	O.D.ELISA	RESULT
*No.35	1.660	0.462	1.198	+(6)
*No.36	1.434	0.362	1.072	+(5)
*No.37	1.543	0.231	1.312	+(6)
*No.38	1.705	0.304	1.401	+(7)
No.39	0.510	0.471	0.039	-(0)
*No.40	1.642	0.319	1.223	+(6)
No.41	0.399	0.412	-0.013	-(0)
No.42	0.331	0.335	-0.004	-(0)

* Positive ADV samples

ตารางที่ 5 ระดับนิวตตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ในสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซินไรคออเจสกี้ ชนิดเชื้อเป็น ชนิดเชื้อตาย และกลุ่มควบคุม

Vaccination group	An Serum Neutralizing Antibody Titer			
	Prevaccinate D 0	Post vaccinate D 14	Prechallenge D 42	Post challenge D 49
Experiment I				
Attenuated strain				
BUK-TK/650	<1	3.8	8.7	86.6
Inactivate ADV vaccine	<1	4.5	47.2	215
Contact control	<1	<1	<1	1.5
Additional control	<1	<1	<1	<1
Experiment II				
Attenuated strain				
Bucharest	<1	1.7	4.2	64
Sub unit vaccine	<1	1.5	49.3	159
Control control	<1	<1	<1	1.3
Additional control	<1	<1	<1	<1



ภาพที่ 1 แสดงระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ในซีรั่มสุกร 3 กลุ่ม กลุ่มแรกฉีดวัคซีนชูโดเรบีส์ชนิดน้ำมันซึ่งเตรียมจากเชื้อไวรัสท้องที่สเตรนนครปฐม กลุ่มที่สองฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ (Roger Bellon Laboratory) กลุ่มที่สามฉีดวัคซีนชนิดเอเควียส ซึ่งมีอลูมิเนียมเจลเป็นแอดจูแวนท์ และเตรียมจากเชื้อไวรัสท้องที่สเตรนนครปฐม

วัคซีนเชื้อตาย และวัคซีนเชื้อเป็น ได้ถูกนำมาใช้เพื่อลดความรุนแรงของโรคออเจสกี้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร แต่วัคซีนเหล่านี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ และการแยกแผงของเชื้อไวรัสในสุกรที่ได้รับวัคซีนและมีการติดเชื้อ การพัฒนาวัคซีนพันธุวิศวกรรมหรือสับ-ยูนิควัคซีนร่วมกับวิธีการตรวจแยก หาให้สามารถตรวจการติดเชื้อไวรัสจากห้องที่ในสุกรที่ได้รับวัคซีน การลดจำนวนสุกรในฝูงโดยการตรวจแยกและคัดเลือกสุกร หรือกลุ่มสุกรที่ติดเชื้อออก และเพิ่มจำนวนสุกรที่ปลอดจากเชื้อโรคออเจสกี้ จึงเป็นหลักพื้นฐานที่จะทำให้ฝูงสุกรปลอดจากการติดเชื้อ โปรแกรมการควบคุมโรคออเจสกี้ในกลุ่มประชาคมยุโรปแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ในขณะที่ประเทศเดนมาร์ค และ สหราชอาณาจักร ได้ส่งเสริมโปรแกรมการกำจัดโรคภายใต้แผนการไม่ทำวัคซีนให้แก่สัตว์อย่างเข้มงวด นโยบายของประเทศอื่น ๆ ในกลุ่มประชาคมยุโรปแตกต่างกันไป ตั้งแต่การใช้วัคซีนชนิดที่ตรวจแยกได้ทางซีรั่มวิทยาโดยร่วมหรือไม่ร่วมกับการตรวจและคัดเลือกสุกรที่ติดเชื้อเข้าโรงฆ่าสัตว์ หรือไม่มีการวางระเบียบเลย สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการพบโรคออเจสกี้ในสุกรในห้องที่ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม จากการศึกษาของบุญมี และคณะ (2521), จารุณี (2524), บุญมี และจารุณี (2525) นิพล และคณะ (2525) ตรวจพบสูงจนได้ว่า ลูกสุกรป่วยเกิดจากเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้ โรคได้แพร่กระจายไปทั่ว และเกิดการระบาดของโรคอยู่ทั่วไป ฟาร์มสุกรพันธุ์ส่วนมากได้ทำการควบคุมโรคและให้วัคซีนโรคออเจสกี้แก่สุกรพันธุ์และสุกรสุกรหย่านม แต่การแพร่กระจายของโรค ผ่านทางสุกรที่เป็นตัวแยกแผงโรคจากแหล่งบริการสุกรพันธุ์ ยังเป็นปัญหาที่ใหญ่ จารุณี และคณะ (2525) ได้รายงานการทดลองผลิตวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้ชนิดเชื้อตายจากเชื้อห้องที่ และแสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิดน้ำมันซึ่งเตรียมจากเชื้อไวรัสท้องที่สเตรนนครปฐม สามารถกระตุ้นระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ ในซีรั่มสุกรได้สูงกว่าวัคซีนชนิดน้ำมัน ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และวัคซีนชนิดเอเควียสตามลำดับ และสุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวสามารถต้านทานการฉีดพิษกับด้วยไวรัสโรคออเจสกี้ แสดงว่าสามารถใช้วัคซีนในการลดความรุนแรงของโรค ปัจจุบัน การระบาดของโรครุนแรงมากขึ้น และโรคได้แพร่

กระจายไปในสุกรขุน ได้มีการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศ ทั้งชนิดเชื้อเป็น และเชื้อตายมาใช้ในฟาร์มสุกรเป็นมูลค่าปีละหลายล้านบาท จารุณี และสุนีจิต (2531) ได้รายงานการศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนโรคออเจสกี้ชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตาย ต่อการป้องกันโรคในสุกรขุน พบว่า ในการฉีดวัคซีนโรคออเจสกี้ให้แก่สุกรสองครั้งห่างกันสองสัปดาห์ สุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย มีระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้สูงกว่าสุกรกลุ่มที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็น จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันจากแม่สุกรให้แก่ลูกสุกร อย่างไรก็ตามในการฉีดพิษทับเข้าทางช่องจมูก พบว่า วัคซีนเชื้อเป็นสามารถลดความรุนแรงของโรค และการขับออกของเชื้อไวรัสฉีดพิษทับ ดังนั้นวัคซีนเชื้อเป็นจึงเหมาะสม สำหรับการควบคุมอาการของโรค ในการระบาดของโรคออเจสกี้อย่างเฉียบพลัน และลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ลักษณะการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยประกอบด้วยฟาร์มหลายขนาด และมีการจัดการฟาร์มแตกต่างกันไปตามสภาพการเลี้ยงในแต่ละท้องที่ ดังนั้นแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรค จึงต้องคำนึงถึงขนาดของฟาร์ม การจัดการฟาร์ม สภาวะทางเศรษฐกิจ และสภาวะการณ์ของโรค ในท้องที่ที่มีการระบาดของโรคในอัตราที่สูง และเชื้อแพร่กระจายอยู่ทั่วไป มีความจำเป็นต้องใช้วัคซีนเพื่อลดความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามวัคซีนที่มีใช้อยู่ทั่วไปไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ หรือการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่แอบแฝงอยู่ในสุกรที่ได้รับวัคซีนซึ่งมีการติดเชื้อ การใช้วัคซีนตามลำพังเพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส แต่จะต้องทำควบคู่ไปกับการตรวจและคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก การใช้วัคซีนที่ผลิตจากส่วนประกอบหกส่วนของไวรัสจะทำให้ไม่สามารถตรวจแยกสุกรที่ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ออกจากสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงควรใช้สับ-ยูนิตวัคซีน หรือวัคซีนพันธุวิศวกรรม ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจแยกสุกรที่ได้รับวัคซีนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ออกจากสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ สำหรับฟาร์มสุกรที่เคยใช้วัคซีนชนิดอื่นมาก่อน อาจต้องเปลี่ยนมาใช้สับ-ยูนิตวัคซีน หรือวัคซีนพันธุวิศวกรรมไปสักระยะหนึ่ง จนกระทั่งแอนติบอดี้ที่เกิดจากการใช้วัคซีนชนิดเดิมหมดไป จึงเริ่มทำการตรวจและคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก จากการศึกษาแนวทางในการควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้ จึงเป็นประโยชน์ในการจัดทำโปรแกรมเพื่อควบคุม และกำจัดโรคออเจสกี้ในประเทศไทย ควรเริ่มจากฟาร์มสุกรที่มีการจัดการฟาร์มดี และมีเงินทุนมากพอ เพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการตรวจและคัดเลือกสุกรที่เป็นตัวอมโรคออก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในฟาร์มสุกรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ ซึ่งผลิตลูกสุกรให้แก่ฟาร์มอื่นและเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรค ขณะเดียวกันในส่วนของภาคราชการโดยกรมปศุสัตว์ ก็ควรพัฒนาและนำเอาเทคนิคการบล็อคของอีไลซ่าหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี้อีไลซ่า มาใช้ในการตรวจสภาวะการณ์ของโรค รวมทั้งการให้บริการในการตรวจสอบ และมีมาตรการในการออกใบรับรองให้แก่ฟาร์มสุกรที่ปลอดโรค ตลอดถึงการออกกฎหมาย เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผ.ศ.นายสัตวแพทย์ บุญมี สัญชุสจจาริ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร.ศ.ดร. สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, ศ.ดร.พรชัย มาตังคสมบัติ และ ผศ.เภสัชกร ปราณี สิทธิสาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Addermans, J. P.W.M.1970. Serum prophylaxis in Aujeszky's disease in pigs. Neth. J.Vet. Sci. 3:12-17.

2. Albrecht, P., Blaskovic, D., Jakubik, J. and Lesso, J. 1963. Demonstration of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures and infected animals by the fluorescent antibody technique. Acta virol., Prague 7:289-296.

3. Andersen J.B., Bitsch V., Christensen L.S.,Hoff-Jorgensen R. & Kirdegaard Petersen B.(1989). The control and eracication of Aujeszky's disease in Denmark:epidemiological aspects. In: Current Topics in Vet.Med.and An.Sci.,(Ed.J.T.van Oirschot;Kluwer Acad.Publ.),49:175-183.

4. Bartha A. (1961). Attempts at attenuating the virulence of Aujeszky's disease. Magy Allatory Lab., 16:42-45.

5. Baskerville, A. 1971. A Study of the pulmonary tissue of the pig and its reaction to the virus of Aujeszky's disease. Ph.D. Thesis, Queen's Univ., Belfast.

6. Baskerville A.,Mc ferran J.B.& Dow C.(1973).Aujeszky's disease in pigs.Vet.Bull.,43:465-480.

7. Beran, G.W., Davies, E.B., Aramblulo, P.V., will, L.A., Hill,H.T. and Rock, D.L. 1980. Persistence of pseudorabies virus in infected swine. JAVAMA 176:998-1000.

8. Clark K.,Molitor T.W.,Gunther R. & Joo H.S.(1984). Pathogenicity of a modified - live pseudorabies vaccine virus in lambs. JAVMA., 1535-1537.

9. Corne,A.H.1965.Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets.Res.Vet.Sci.6:337-343

10. Csontos, L., Hejj, L. and Szabo, I. 1962. A contribution to the aetiology of Aujeszky's disease in the pig. Foetal damage and abortion due to the virus.Acta vet. hung. 12:17-23.

11. Deleeuw P.E., Wijsmuller J.M. & Zantinga J.W.(1982). Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. I. Comparison of intranasal and parenteral vaccination with an attenuated vaccine in 12-week old pigs from immunized ams.Vet.Q.,4:49-56.

12. Donaldson, A.I., Wardley P.C., Martin S. & Harkness J.W. (1985). Influence of vaccination on Aujeszky's disease virus and transmission. Vet. Rec., 115:121-124.

13. Gloster,J.,Donaldson A.J.& Hough M.N.(1984).Analysis of a series of outbreaks of Aujeszky's disease in York in 1981-1982 : The possibility of airborne disease spread.Vet. Rec., 114:234-239.

14. Gordon, W.A.M. and Luke, D. 1955. An outbreak of Aujeszky's disease in swine with heavy mortality in piglets, illness in sows, and deaths in utero. Vet. Rec. 67:591-597.

15. Gutekunst,D.E.Pirtle,E.C.and Mengeling,W.L.1978. Development and evaluation of microimmuno diffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. Am. J. Vet. 39:207-210.

16. Gutekunst, D.E.,Pirtle,E.C.,Miller,L.D.and Stewart,W.C.1980.Isolation of pseudorabies virus from trigeminal ganglia of a latently infected sow. Am. J. Ros. 41:1315-1316.

17. Kojnok,J. & Bartha A.(1962).Immunization experience with attenuated Aujeszky's disease virus. Magy allatory Lap., 17:19-20.

18. Megeling W.L. (1989). At the threshold of pseudorabies eradication. Proceedings of French Association of Porcine Veterinary Medicine, 39-45.

19. Molitor,T. & Thawley,D.(1987).Pseudorabies vaccines : past, present and future. Compendium Food Animal : Swine Continuing Education Article., 9:409-416.

20. Mc Ferran,J.B. and Dow, C. 1962. Growth of Aujeszky's disease virus in rabbits and tissue cultures. Br. vet. J. 118:386-389.

21. Mc Ferran,J.B.and Dow,C.1964 a.The excretion of Aujeszky's disease virus by experimentally infected pigs. Res. Vet. Sci. 5:405-410.

22. Mcferran, J.B. and Dow, C. 1965. The distribution of the virus of Aujeszky's disease (pseudorabies virus) in experimentally infected swine. Am. J. Vet. Res. 26:631-635.

23. Mc Ferran,J.B.,Dow D.& Mc cracken R.M.(1979).Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2:327-334.

24. Mc Innis,G.A. 1978. Pseudorabies in swine. Virginia Veterinary News. No.4 Cooperative Extension Service. Virginia Polytechnic Institute and State University.

25. Mohanty, S.B. and Dutta, S.K. 1981. Veterinary Virology 3rd edit., Lea & Febiger, Philadelphia:14-16.

26. Moutou, F. and Toma, B. 1978. Application of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszky's disease in swine. Vet. Rec. 102-264.

27. Pensaert, M.B.,Commeyne, S. and Andries,K.1980. Vaccination of dogs against pseudorabies (Aujeszky's disease), using an inactivated-virus vaccine. Am. J. Vet. Res. 41:1026-2019.

28. Platt,K.B.(1984).The evaluation of a lectin-agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease (pseudorabirs)in pigs.Vet.Microbiol., 21:144.

29. Sabo, A. (1969). Persistence of per orally administered virulent pseudorabies virus in organisms of non-immune and immunized pigs Acta Virol., 13:269-277.

30. Sabo, A. and Grunert, Z.1971. Persistence of virulent pseudorabies virus in herds of vaccinated and nonvaccinated pigs. Acta virol. 15:87-94.

31. Sabo,A.,Rajcani,J.and Blaskovic,D.1968.Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease.I. Distribution of the virulent virus in piglets after per oral infection.Acta virol. 12:214-221.

32. Sabo, A., Rajcanim, J. and Blaskovic, D. 1969. Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. III.The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. Acta virol. 13:407-414.

33. Sharpee, R.L., Nelson, L.D. & Gerber, J.D. (1986).Evaluation of a subunit vaccine against Aujeszky's disease (pseudorabies) in swine. Proc. Int. Pig. Vet. Soc.:353.

34. Shell, S.G., Ely, R.W. and Crandell, R.A.1981. Pseudorabies in a dog. JAVMA 178:1159-1161.

35. Shope, R.E. 1934. Pseudorabies as a contagious disease in swine. Science 80:102-103.

36. Shope,R.E.1935.Experiments on the epidemiology of pseudorabies.I. Mode of transmission of the disease in swine and their possible role in its spread to cattle.J.exp.Med.62:101-117

37. Taylor, D.J. 1979. Pig Disease. The Burlington Press Ltd. Great Britain:28-31.

38. Talor, K.C. (1989). Epidemiological aspects of Aujeszky's disease control in Great Britain. In : Current Topics in Vet. Med. and An. Sci., 19:185-196.

39. Thurber,E.T.(1977).A new modified live vaccine for prevention of pseudorabies. Proccedings of the 18th Annual George A. Young Conference., August, Lincoln, NE.

40. Van Alstine, W.G., Anderson, T.D. & Reed. D.E. (1984). Vaccine induced pseudorabies in lambs. JAVMA., 185:409-410.

41. Van Oirschot,J.T.1988.Induction of antibodies to glycoprotein I in pigs exposed to different dose of a mildly virulent strain of Aujeszky's disease virus.Vet.Rec.122:599-603.

42. Van Oirschor, J.T. & Deleeuw, P.W. (1985). Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titers.Vet.Microbiol.,10:401-408.

43. Upjohn News 1987. Aujeszky's disease and its Effects.

44. Wang, J.T., Chan,T.J.and Sheu C.C. 1980. Localization of pseudorabies virus in tissues from infected pigs. IPVS Congress, Copenhagen, Denmark.

45. Wittmann, G., Jakubik, J. and Ahl, R.1980. Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non- vaccinated pigs after intranasal infection. Arch. Virol. 66:227-240.

46. Wohlgemuth, K., Leslie, P.F.,Reed,D.E. and Smidt, D.K.1978. Pseudorabies virus associated with abortion in swine. JAVMA 172:478-479.

47. Wright,J.C.and Thawley,D.G.1980. Role of the raccoon in the transmission of pseudorabies. A field and laboratory investigation. Am. J. Vet. Res. 41:581-583.

48. จารุณี สาครา(2524) การศึกษาคุณสมบัติบางประการของซูโดเ รบีส์ไวรัสการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 8 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

49. จารุณี สาครา (2530) สองวิธีการของเ อ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเ บ็นท์ เ อสเ ส สำหรับการตรวจโรคออเ จสกี้ในสุกรสัตวแพทย-สาร ปีที่ 38 เ ล่ม 3 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

50. จารุณี สาครา, บุญมี สัญญสุจจารี, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา (2525) การตรวจหาเ ชื้อไวรัส และภูมิคุ้มกันในสุกรที่คิดเ ชื้อซูโดเ รบีส์ไวรัสเ ตรนนครปฐม การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 9

51. จารุณี สาครา, บุญมี สัญญสุจจารี, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา (2525) การทดลองผลิตวัคซีน ป้องกันโรคซูโดเ รบีส์ชนิดเ ชื้อตายจากเ ชื้อห้องที่ การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 9 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

52. จารุณี สาครา และสุนีจิต คงทน (2531) การศึกษาเ ปรียบเ ทียบวัคซีนโรคออเ จสกี้ชนิดเ ชื้อเ ป็น และชนิดเ ชื้อตาย ต่อการป้องกันโรคในสุกรขุน (ก)การตรวจหาระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเ จสกี้ การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 15 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

53. จารุณี สาครา และสุนีจิต คงทน (2531) การศึกษาเ ปรียบเ ทียบวัคซีนโรคออเ จสกี้ชนิดเ ชื้อเ ป็น และชนิดเ ชื้อตายต่อการป้องกันโรคในสุกรขุน (ข) การขับออกของเ ชื้อไวรัสในสุกรและการแยกเ ชื้อไวรัสโรคออเ จสกี้ชนิดรุนแรงจากอวัยวะต่างๆ การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ครั้งที่ 15 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

54. บุญมี สัญญสุจจารี และจารุณี สาครา(2525)โรคซูโดเ รบีส์ในสุกร-การหาให้เ กิดโรคในห้องทดลอง การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ครั้งที่ 9 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

55. บุญมี สัญญสุจจารีม จารุณี สาครา, ราตรี วงษ์ชาตาวง (2532) New approuches of control of Aujeszkys disease in Thailand เ อกสารประกอบการบรรยายในการสัมนาทางวิชาการ ให้แก่นักวิชาการนานาชาติในแถบภาคพื้นเ อเ ชียตะวันออกไกล ที่จังหวัดเ ชียงใหม่

56. บุญมี สัญญสุจจารี, พิเ ศราะห์ อาจหาญคุณ, มาโนช เ ฟื่องฟุ้งศรี (2521) รายงานเ บื้องต้นเ กี่ยวกับการพบโรคซึ่งมีลักษณะของ Aujeszky's Disease ในสุกร สัตวแพทยสารปีที่ 29 เ ล่ม 3 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

57. นิพล สุขสายไทยชะนะ, พน สุขบัญญาธรรม, วิชิต วงษ์วัชราวาง, นิวัฒน์ สินสุวงศ์, ราตรี วงษ์วัชราวาง, ผดุง ชนจันทร์, มาซูโอะ อูชิมุระ, วิเ จอร์รี คิชิ (2525)การระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าเ ทียม(Aujeszky's disease)ในสุกรทางภาคใต้ของประเ ทศไทย การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 9 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเ ทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

การควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในระดับพื้นที่

Field Control of Foot and Mouth Disease

กู้เกียรติ สุวรรณลักษณ์[1] แอบ คงทน[2]

Kukiet Suwanluk Ab Kongthon

บทคัดย่อ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจการเลี้ยงสัตว์ ทำให้กิดการสูญเสียเนื่องจากผลิตผลลดลง และเป็นข้อจำกัดในการส่งสัตว์ หรือเนื้อสัตว์ไปจำหน่ายต่างประเทศ ถ้ากำจัดโรคให้หมดไปได้แล้วจะช่วยยกฐานะของเกษตรกรซึ่งเป็นประชาชนส่วนใหญ่ของประเทศ และนำเข้าเงินตราต่างประเทศโดยการส่งออกสัตว์หรือเนื้อสัตว์ได้เป็นจำนวนมาก การรณรงค์ควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในระยะเวลาที่ผ่านมาไม่ประสบผล เนื่องจากไม่มีวัคซีนเพียงพอที่จะใช้ป้องกันโรคประกอบกับการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ทำได้ไม่เด็ดขาด ในขณะนี้ได้มีการผลิตและจัดหาวัคซีนเพียงพอสำหรับใช้ทั่วทั้งประเทศแล้ว การวางแผนและวิธีการควบคุมโรคเพื่อให้ได้ผลจำเป็นจะต้องพิจารณาจากปัจจัยหลายประการด้วยกันหนึ่งนอกเหนือไปจากวัคซีน เพื่อให้สัมพันธ์กับทรัพยากรที่มี

ประการแรกต้องแบ่งพื้นที่ของประเทศเป็นเขตต่าง ๆ ที่มีระดับการระบาดของโรคต่าง ๆ กัน คือ เขตปลอดโรค เขตมีการระบาดน้อย และเขตมีโรคระบาด เพื่อกำหนดมาตรการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้าออกหรือผ่านเขตเหล่านั้น การนำสัตว์เข้าเขตปลอดโรคคือภาคใต้ของประเทศต้องทำการกักในด่านเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 21 วัน สัตว์ที่ไม่แสดงอาการของโรคจึงจะนำเข้าเขตปลอดโรคได้ การนำสัตว์เข้าเขตปลอดโรคหรือข้ามจังหวัดภายในเขตที่มีโรค ต้องฉีดวัคซีนให้สัตว์มีความคุ้มโรคเสียก่อนทำการเคลื่อนย้าย การฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในเขตที่มีโรคเพื่อให้มีความคุ้มโรคและลดอุบัติการกิดโรค ต้องทำการฉีดวัคซีนรวม 3 ชนิดปีละ 2 ครั้ง โดยฉีดให้ได้ไม่น้อยกว่า 70% ของประชากร เมื่อเกิดโรคขึ้นในบริเวณที่ได้ฉีดวัคซีนป้องกันไว้นี้ ต้องทำการฉีดวัคซีนซ้ำเป็นวงแหวน (ring vaccinataion) และควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ในจุดนี้โดยเข้มงวด การฆ่าทำลายสัตว์ป่วยหรือสัมผัสสัตว์ป่วย อาจกระทำเมื่อการระบาดของโรคลดลงมากแล้ว และต้องแน่ใจว่าเมื่อฆ่าและทำลายสัตว์เหล่านั้นแล้ว ได้ขจัดไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในจุดนั้น ๆ จริง

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่สำคัญยิ่งโรคหนึ่งของสัตว์ เป็นโรคระบาดที่ติดต่อได้ง่ายและรวดเร็วมาก ตามปกติแล้วโรคปากและเท้าเปื่อยไม่ทำให้สัตว์ตาย แต่การสูญเสียกิดจากการให้ผลิตผลลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่ให้ผลิตผลสูง โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นสาเหตุที่ไม่อาจจะส่งสัตว์ หรือเนื้อสัตว์ไปยังประเทศที่ปราศจากโรคนี้ได้ ความสำคัญของโรคนี้ในประเทศที่กำลังพัฒนาในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จึงมีหลายประการด้วยกัน เช่น ผลิตผลจากสัตว์ลดลงการใช้แรงงานจากสัตว์ต้องหยุดลงชั่วคราว ทำให้มีข้อจำกัดในการที่จะใช้สัตว์พันธุ์ดีให้ผลผลิตสูงยกระดับสัตว์พื้นเมือง และทำให้เสียโอกาสส่งสัตว์หรือเนื้อสัตว์ไปจำหน่ายประเทศที่ไม่มีโรคนี้ซึ่งเป็นตลาดใหญ่มีความต้องการสูง ดังนั้นถ้าขจัดโรคนี้ให้หมดไปได้จะช่วยยกระดับฐานะของเกษตรกร ซึ่งเป็นประชาชนส่วนใหญ่ของประเทศในภูมิภาคแถบนี้ ปกติเกษตรกรมีอาชีพหลักทางเกษตรกรรม อาศัยรายได้ทางพืชผลเกษตรซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติและราคามักจะตกต่ำ ถ้าไม่มีโรคปากและเท้าเปื่อยแล้ว ผลิตผลจากสัตว์เลี้ยงจะได้เต็มเม็ดเต็มหน่วย ความต้องการของตลาดสูงทั้งในและต่างประเทศทำให้ได้ราคาดี อีกประการหนึ่งการเลี้ยงสัตว์จะเป็นวิธีการอีกอย่างหนึ่งที่จะเปลี่ยนวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นสัตว์หรือเนื้อสัตว์ไปจำหน่ายต่างประเทศ แทนที่จะจำหน่ายวัตถุดิบโดยตรง ซึ่งจะทำเงินตราต่างประเทศได้สูงกว่ามาก ประเทศไทยมองเห็นความสำคัญในจุดนี้ จึงได้เริ่มดำเนินงานควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยตั้งแต่ พ.ศ. 2501 เป็นต้นมา โดยก่อตั้งสถานปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อทำการวินิจฉัยโรคหรือทำการแยกชนิดของไวรัส จากตัวอย่างที่เก็บจากการระบาดของโรคในโรคติดต่อ

---

[1]กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพมหานคร

[2]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

กันมาตลอด โดยใช้การฉีดวัคซีนทั้งการฉีดเพื่อป้องกันและเพื่อบราบโรค ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ การกักสัตว์ และการฆ่าทำลายสัตว์ป่วยและสัตว์ที่สัมผัสกับสัตว์ป่วย แต่การระบาดของโรคก็ยังไม่หมดไปหรือลดลงถึงขั้นที่น่าพอใจทั้งนี้พอจะอธิบายได้ดังต่อไปนี้

การใช้วัคซีนป้องกันโรค การใช้วัคซีนป้องกันโรคตั้งแต่เริ่มต้นมาจนถึงก่อนจะมีวัคซีนจากโครงการขยายการผลิตวัคซีน (พ.ศ. 2533) น่าจะได้พิจารณาเป็น 2 ลักษณะ คือ วัคซีนที่ใช้สำหรับโค กระบือ และวัคซีนที่ใช้สำหรับสุกร เนื่องจากปริมาณการผลิตและความต้องการวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ต่างกันโดยสิ้นเชิง

วัคซีนที่ใช้ในโค กระบือ ผลิตออกมาใช้เป็นชนิดเดียว (monovalent) บางปีอาจจะซื้อวัคซีนต่างประเทศมาผสมบ้างเล็กน้อย จำนวนโค กระบือ ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย และที่เป็นโรคได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 1 เปอร์เซนต์ของโค กระบือ ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะต่อย ๆ เพิ่มมากขึ้น ตั้งแต่ปี 2520 (4.07%) ถึง 2530 (90%) ถ้าพิจารณาให้ถ่องแท้แล้วจะเห็นว่าในระยะเวลาทั้งหมดนี้จำนวนโค กระบือ ยังได้รับวัคซีนไม่เพียงพอที่จะหยุดยั้งการระบาดของโรคได้ โค กระบือ ที่ได้รับการฉีดวัคซีน 4.07% นั้น เป็นการได้รับการฉีดครั้งเดียวและชนิดเดียวด้วย ดังนั้นจริง ๆ แล้วเปอร์เซนต์โค กระบือ ที่จะมีความคุ้มโรคจริง ๆ นั้นมีเพียง 0.68% (4.07/2x3) เท่านั้นเอง ลองมาพิจารณาดูในปี 2530 โค กระบือ ได้รับการฉีดวัคซีนถึง 90.0% แต่สัตว์มีเปอร์เซนต์คุ้มโรคจริง ๆ เพียง 15% (90/2x3) เท่านั้นเอง นั่นก็คือโค กระบือ อีก 85% ยังเสี่ยงต่อการเป็นโรคอยู่ ดังนั้นการฉีดวัคซีนตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาไม่ว่าจะฉีดวัคซีนได้เพียง 4% หรือ 90% จะไม่มีผลทำให้เกิดโรคการระบาดลดลงไปในทิศทางที่จะทำการควบคุมได้เลย มีผลเฉพาะแห่งในระยะเวลาหลังจากฉีดวัคซีนระยะหนึ่งเท่านั้นเอง ถ้าต้องการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคแล้วจะต้องใช้วัคซีนฉีดโค กระบือ ไม่ต่ำกว่า 70% ต้องเป็นวัคซีนรวมชนิด 3 ไทป์และต้องฉีดให้ได้ปีละ 2 ครั้งด้วย จำนวนวัคซีนที่ต้องใช้ทั้งหมดคือ 14 ล้านโดส (trivalent) วัคซีนนี้ยังไม่คิดรวมถึงวัคซีนที่จำเป็นจะต้องใช้เสริมในกรณีมีการระบาดในบริเวณที่ได้มีการฉีดวัคซีนเพื่อ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโค กระบือ ที่ได้รับการฉีดวัคซีนและเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย *

ปี	จำนวนโค กระบือ				
	ทั้งหมด	ฉีดวัคซีน	เปอร์เซนต์	เป็นโรค	ป่วย/แสนตัว
2520	9,226,671	375,656	4.07	6,445	70
2521	10,921,202	514,749	4.71	15,493	142
2522	11,930,670	735,044	6.16	23,274	195
2523	10,873,419	1,278,916	11.6	75,253	692
2524	9,762,588	1,819,272	18.6	25,448	261
2525	9,903,902	4,668,458	47.1	12,579	127
2526	9,631,211	6,838,756	71.0	12,256	127
2527	9,522,939	7,758,424	81.5	6,704	70
2528	9,566,720	7,539,719	78.8	11,857	124
2529	9,332,255	7,299,888	78.0	4,331	46
2530	9,082,698	8,209,713	90.0	7,868	86
2531	9,215,493	-	-	2,280	25

* จากประมาลสถิติประจำปี กรมปศุสัตว์ 2520-2531

ป้องกันตามบกติไว้แล้ว เพื่อหาการฉีดเฉพาะที่ (ring vaccination) อีกครั้งหนึ่งด้วย

การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ที่ผ่านมาทำได้น้อยมาก อาจจะเนื่องมาจากเมื่อเกิดโรคระบาดขึ้นแต่ละครั้ง มีสัตว์ป่วยเป็นจำนวนมาก เพราะไม่มีวัคซีนฉีดป้องกันได้เพียงพอ การควบคุมจึงทำไม่ได้ทั่วถึง ประกอบกับเกษตรกรเองไม่เข้าใจถึงความสำคัญของโรคนี้ จึงไม่ให้ความร่วมมือที่ดีพอ

ด่านกักกันสัตว์เพื่อเข้าเขตปลอดโรคปฏิบัติงานได้ดีมาก ผลการปฏิบัติงานทำให้ภาคใต้เป็นเขตปลอดโรคอยู่ได้ ยกเว้นบางครั้งที่มีสัตว์จากคอนบนนำโรคลงใต้ได้ ต่อไปควรจะคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ให้ดี เพื่อให้สภาพปลอดโรคคงอยู่ตลอดไป

สรุปการควบคุมและปราบโรคปากและเท้าเปื่อยไม่ได้ผลเนื่องจากสาเหตุใหญ่ คือ ไม่มีวัคซีนเพียงพอ และมีสาเหตุอื่นเป็นตัวประกอบ แต่ขณะนี้โครงการขยายการผลิตวัคซีนได้เสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลิตวัคซีนได้ตามเป้าหมายที่คาดว่าจะเพียงพอต่อการใช้ควบคุมโรคทั้งประเทศ แต่ว่าการควบคุมโรคนั้นไม่ใช่ว่าฉีดวัคซีนได้ครบตามเป้าหมายแล้วจะปราบโรคให้สงบลงได้ จำเป็นต้องมีมาตรการอื่นหาเสริมขึ้นมา หรือหาไปพร้อม ๆ กัน ซึ่งน่าจะพิจารณาเป็นลำดับไป

โรคปากและเท้าเปื่อยในสกรจะเกิดมีปัญหามากบริเวณเขต 7 โดยเฉพาะในจังหวัดนครปฐม และราชบุรี เพราะมีการเลี้ยงสุกรกันหนาแน่น เกิดโรคบ่อยและเป็นอยู่ครั้งละนาน ๆ ความจริงแล้วการควบคุมโรคในสกรน่าจะทำได้ดีกว่าในโค เพราะมีปัจจัยเอื้ออำนวยหลายประการ เช่น สุกรอยู่ในคอกที่แน่นอนจะหาการฉีดวัคซีนหรือควบคุมให้อยู่ในพื้นที่จำกัดทำได้ง่ายมาก วงจรชีวิตสุกรสั้นกว่าของโคมาก ดังนั้นถ้าจะหยุดการเลี้ยงสุกรลงชั่วคราวเมื่อเกิดโรคระบาด เช่นว่างเล้าและทำลายแล้วทำความสะอาดล้างเชื้อในโรงเรือนและบริเวณ สามารถทำได้ในเวลาเพียงเดือนเดียวเท่านั้น ต่อไปก็จะใช้โรงเรือนนั้นซึ่งปราศจากเชื้อไวรัสเลี้ยงสุกรได้อีกต่อไป เท่าที่ผ่านมาการควบคุมโรคในสกรทำได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้นคือใช้ฉีดวัคซีนป้องกัน กรมปศุสัตว์จะจำหน่ายวัคซีนให้เกษตรกรนำไปใช้เอง ไม่เหมือนวัคซีนโคซึ่งกรมปศุสัตว์จะไปฉีดให้โดยไม่คิดมูลค่า เพื่อปฏิบัติตามแผนงานของการควบคุมโรคกรมปศุสัตว์โดยศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ผลิตวัคซีนได้ประมาณปีละ 2-2.5 ล้านโด๊ส ถ้าปีไหนไม่มีโรคระบาดเกษตรกรจะไม่ซื้อวัคซีนไปใช้ทำให้วัคซีนเหลือแต่ถ้ามีโรคระบาดเกิดขึ้นความต้องการวัคซีนมีมากกว่ากำลังผลิตหลายเท่า วัคซีนที่ผลิตได้จึงไม่พอกับความต้องการ ดังนั้นการระบาดแต่ละครั้งจึงมีขึ้นค่อนข้างจะมาก เป็นเวลานาน และเกิดความสูญเสียมากมาย ต่อมาในระยะหลัง ๆ นี้โรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ชนิด คือ โอ เอ และเอเชียวัน ทำให้เกิดปัญหาในบริเวณนี้ จึงทำให้มีความยุ่งยากให้การป้องกันเพิ่มขึ้นอีกเป็นหวีดุ

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ได้เตรียมปัจจัยทุกอย่างพร้อมดำเนินการควบคุมและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อย ดังนั้นน่าจะพิจารณาวิธีการเพื่อดำเนินงานให้บรรลุเป้าหมายตามเวลาที่กำหนด

การควบคุมโรค หมายถึงการป้องกันการระบาดหรือป้องกันการกระจายของโรค หรือตัดขั้นตอนวงจรของโรคในช่วงระยะติดต่อจากสัตว์ตัวหนึ่งไปอีกตัวหนึ่ง การตัดขั้นตอนการระบาดของโรคประกอบด้วย

1. ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์
2. กักกันสัตว์ป่วย
3. ป้องกันการติดต่อโดยทางอ้อม
4. ฉีดวัคซีน
5. ฆ่าทำลาย
6. เฝ้าระวังโรค

ก่อนที่จะพิจารณาวิธีการป้องกันการระบาดตามหัวข้อข้างบนนี้ ควรจะพิจารณาถึงเหตุหรือปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการแพร่กระจายของโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อจะได้หาวิธีการป้องกันได้รัดกุมและมีประสิทธิภาพ ปัจจัยเหล่านี้ประกอบด้วย

1. ความไวต่อการติดโรค (susceptibility of host)
2. ปริมาณไวรัสที่เกิดขึ้นในสัตว์ป่วย
3. ความคงอยู่ของไวรัสในผลิตผลสัตว์ (animal product)
4. สภาพอากาศ

ความไวต่อการติดโรค

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อได้ง่ายและรวดเร็วมาก เนื่องจาก (1) มีสัตว์หลายชนิดเป็นโรคนี้ได้ (2) มีการติดต่อได้หลายทาง (3) เชื้อไวรัสเพียงจำนวนน้อยทำให้เกิดโรคได้ (4) สัตว์ป่วยขับไวรัสออกมาก่อนแสดงอาการ (5) สัตว์ป่วยจะขับไวรัสออกมาเป็นจำนวนมาก (Donaldson and Hofner 1990) สัตว์แต่ละชนิดจะมีความไวแตกต่างกัน และโดยทางติดต่อต่าง ๆ กัน (Seller,1971) โคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคจะเป็นโรคได้ง่ายต่อไวรัสทุกสเตรน และติดต่อได้ง่ายทางอากาศหายใจ สุกรจะมีความ

ต้านทานต่อไวรัสบางสะเดาะ หางที่ติดต่อได้ง่ายที่สุดคือ การกิน แกะเป็นโรคโดยมีอาการไม่ชัดเจน (Pay, 1988) แต่ก็ติดโรคทางอากาศหายใจได้ง่ายกว่าการกินเช่นเดียวกับโค เชื่อกันว่าความไวต่อการเป็นโรคและหางติดต่อในกระบือเป็นเช่นเดียวกันกับในโค

การติดโรคในสัตว์ยังขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในตัวสัตว์เอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของวัคซีนที่ฉีดให้กับสัตว์ความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสที่ระบาดกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน ช่วงระยะเวลาหลังจากฉีดวัคซีนและการต่อต้านภูมิคุ้มกันเฉพาะตัว สัตว์ที่ให้ผลิตผลสูงถึงแม้จะไม่เป็นโรคได้ง่ายกว่าสัตว์ที่ให้ผลผลิตต่ำแต่ก็เป็นโรครุนแรงกว่า ดังนั้นเราจะพบบ่อย ๆ ว่า สัตว์ที่ให้ผลิตผลสูงที่สั่งมาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง เวลาเป็นโรคจะรุนแรงกว่าสัตว์พื้นเมืองมาก

ปริมาณไวรัสที่เกิดขึ้นในสัตว์ป่วย

เมื่อสัตว์เป็นโรคปากและเท้าเปื่อยจะเกิดมีไวรัสเป็นจำนวนมาก และไวรัสจะถูกขับออกมากับสิ่งขับถ่ายทุกชนิด (secretion และ excretion (Cottral, 1969., Seller, 1971.,Parker, 1971) และไวรัสนี้มักจะปนเปื้อน เนื้อ น้ำนม หรือ offal ได้และที่สำคัญที่สุดสัตว์ป่วยที่ไม่แสดงอาการ (subclinical) และสัตว์ซึ่งได้รับเชื้อและอยู่ในระยะฟักตัว (incubation period) สามารถขับไวรัสออกมาได้ (Burrows, 1968) ซึ่งยากแก่การป้องกัน สัตว์แต่ละชนิดจะขับไวรัสออกมากับอากาศหายใจในปริมาณที่ต่าง ๆ กัน สุกรจะขับไวรัสออกมาเป็น 1000-3000 เท่าของโค (Donaldson, 1986) สุกรจึงเป็นตัวเพิ่มขยายจำนวนไวรัส (amplifier) และทำให้เกิด air-borne infection ได้ง่าย

ความคงอยู่ของไวรัสในผลิตผลจากสัตว์

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะหมดความรุนแรงเมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรด เช่น เมื่อเกิด rigor mortis ในกล้ามเนื้อสภาพความเป็นกรดทำให้ไวรัสในกล้ามเนื้อหมดความรุนแรงได้ แต่ไวรัสจะยังคงมีชีวิตอยู่ในสภาพอื่น ๆ หรือในอวัยวะเนื้อเยื่ออื่นเช่น ไขกระดูก,อวัยวะภายใน (Cottral,1969) และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น นม และผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ (Blackwell, 1976., Blackwell, 1978 a., Blackwell, 1978 b.) ซึ่งทำให้ผลิตผลเหล่านี้มีโอกาสนำโรคให้กระจายไปได้สูงมาก อย่างไรก็ตามอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคโดยวิธีนี้ จะเกิดกับสัตว์กินเนื้อเป็นอาหารมากกว่าจะเกิดในสัตว์กินพืชเป็นอาหาร ในบริเวณใดที่ไม่มีการเลี้ยงสุกรเป็นหลัก หรือไม่ได้นำเศษอาหารเลี้ยงสุกร อัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคจะลดน้อยลงมาก

สภาพอากาศ

เมื่ออยู่นอกร่างกายสัตว์ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจะอยู่ได้นานขึ้นในสภาวะที่มีความชื้นสูง, อุณหภูมิต่ำ, ความเป็นกรดด่างในระดับเป็นกลาง และไม่โดนแสงอุลตราไวโอเลท (Parker 1971, Donaldson & Ferris, 1975) ตามข้อเท็จจริงแล้วไวรัสที่ถูกนำไปโดยพาหะนั้น ไวรัสจะมีชีวิตอยู่ได้นานถ้าอยู่ในสภาพที่มีโปรตีนสูงซึ่งช่วยป้องกันจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยในการดงอยู่เช่น การปนเปื้อนด้วยอุจจาระของสัตว์ป่วยเป็นต้น การติดต่อทางอากาศจะเกิดขึ้นในระยะทางไกล ๆ ได้นั้น จะต้องมีปัจจัยต่อไปนี้ประกอบ คือ อากาศมีอุณหภูมิต่ำ ความชื้นสูง มีแสงปกคลุม และกระแสลมที่ช่วยพัดพาไป สภาพที่กล่าวมานี้จะไม่มีในประเทศเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทยด้วย ดังนั้นการระบาดโดยทาง air brone จะไม่มีความสำคัญในประเทศไทย การระบาดโดยพาหะนำไปก็ไม่มีความสำคัญเช่นเดียวกัน การระบาดที่สำคัญในประเทศภูมิภาคแถบนี้ คือ การเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วย หรือสัตว์ป่วยเป็นตัวนำไป

สรุปปัจจัยที่เอื้ออำนวยการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย คือ สัตว์หลายชนิดเป็นโรคได้ โค กระบือ ติดโรคได้ง่ายโดยทางอากาศหายใจ สุกรอาจจะมีความต้านทานไวรัสบางสะเดาะ ติดโรคได้ง่ายโดยการกิน เมื่อสัตว์เป็นโรคจะขับไวรัสออกมาก่อนแสดงอาการ สัตว์ป่วยโดยไม่แสดงอาการก็ขับไวรัสออกมาได้ เมื่อสัตว์ป่วยจะมีไวรัสอยู่ทุกส่วนของร่างกาย และขับไวรัสออกมาทาง excretion และ secretion ทุกอย่าง สุกรขับไวรัสออกมากับอากาศหายใจหลายพันเท่าของโค สุกรจึงเป็นตัวเพิ่มจำนวนไวรัสและเป็นแหล่งของการระบาดโดย air borne ไวรัสจะอยู่ในอวัยวะได้นานถ้าสถานการเหมาะสม rigor mortis จะทำลายไวรัสเฉพาะในกล้ามเนื้อเท่านั้น ไม่รวมถึงในเส้นเลือด ไขกระดูก หรือต่อมน้ำเหลือง การติดโรคโดยทางอากาศหรือพาหะพาไปไม่มีความสำคัญในประเทศเขตร้อน เนื่องจากสภาพสิ่งแวดล้อมไม่อำนวย การติดต่อที่สำคัญคือสัตว์ป่วยเป็นตัวนำไป เป็นการติดต่อโดยตรง

การควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย คือ การป้องกันหรือตัดวงจรการติดต่อของไวรัสทุก ๆ อย่างตามที่ได้กล่าวมาแล้วเพื่อไม่ให้โรคเกิดระบาดออกไป ต่อไปนี้จะได้กล่าวถึงวิธีการที่ใช้ในการควบคุมตามลำดับไปโดยสังเขป

ควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์

สภาพดินฟ้าอากาศในเขตร้อนไม่เอื้ออำนวยต่อการแพร่ระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยโดยทางอากาศ หรือการนำไปของพาหะ การระบาดของโรคเกิดขึ้นโดยการเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วย หรือการติดต่อโดยตรงจากสัตว์ป่วย Rweyemamu (1984) รายงานว่าความสำเร็จในการควบคุมโรคในทวีปอาฟริกาเนื่องจากควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์มากกว่าการใช้วัคซีน Anwar bin Hassan (1982) รายงานว่าโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศมาเลเซียเกิดขึ้นเนื่องจากการเคลื่อนย้ายโคหรือกระบือป่วย ข้อเท็จจริงนี้เกิดขึ้นกับประเทศในภูมิภาคนี้เช่นเดียวกับประเทศไทย ในบริเวณที่เกิดโรคระบาดโดยไม่ทราบต้นตอหรือแหล่งที่มา มักจะเกิดเนื่องจากมีการนำสัตว์ซึ่งติดโรคในระยะฟักตัว หรือสัตว์เป็นโรคที่ไม่แสดงอาการเข้ามาในบริเวณนั้น สำหรับสัตว์ที่เป็นตัวอมโรค(carrier) นั้น ยังมีความขัดแย้งกันว่าจะเป็นตัวแพร่เชื้อให้สัตว์ปกติหรือไม่ Hedger และ Candy (1985) เชื่อว่าควายป่าอาฟริกาซึ่งเป็นตัวอมโรคสามารถกระจายเชื้อไวรัสไปถึงโคได้ แต่ Anderson (1986) เชื่อว่าไม่น่าเป็นไปได้ ฉันในโคมีโรคระบาดมักจะไม่คำนึงถึงข้อนี้กัน แต่ถ้าจะนำสัตว์ที่หายป่วยจากโรคแล้วเข้าในบริเวณปลอดโรคจะเป็นการเสี่ยงต่อการระบาดของโรคได้

การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์เป็นการควบคุมโรคที่ดีมาก อย่างในกรณีของเขตปลอดโรคในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งคงสภาพปลอดโรคไว้ได้เพราะมีการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์อย่างเข้มงวดก่อนอนุญาตให้นำเข้าเขตปลอดโรค

ในการที่จะนำเอาวิธีการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์มาใช้เพื่อควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยนั้นควรจะคำนึงถึงองค์ประกอบ 2 ประการ คือ

1. การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ภายในประเทศ 2. ควบคุมการนำเข้าสัตว์

การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ภายในประเทศ ถ้าจะมองประเทศไทยตามสภาวะของโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วอาจแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ภาคใต้ หรือพื้นที่ในเขต 8 และ 9 ซึ่งไม่มีการระบาดของโรค และพื้นที่นอกจากนั้นเป็นเขตที่มีโรค ดังนั้นการเคลื่อนย้ายสัตว์ ซึ่งเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยจากพื้นที่มีโรคระบาดเข้าในเขตปลอดโรค จะต้องคำนึงดังนี้ คือ ทำการกักสัตว์ในบริเวณ buffer zone ซึ่งอยู่ระหว่างเขตมีโรคระบาดและเขตปลอดโรคเป็นเวลา 21 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ยอมรับกันในระหว่างนานาชาติว่า พันกำหนดระยะฟักตัวของโรคนั้น สัตว์ที่นำเข้ามากักกันไม่จำเป็นจะต้องฉีดวัคซีนไว้ก่อน เพราะต้องการตรวจดูว่ามีไวรัสที่ติดมากับสัตว์และอยู่ในระยะฟักตัวหรือไม่ ท่านนั้นเอง ถ้าสัตว์ไม่ได้ฉีดวัคซีนหรือไม่มีภูมิคุ้มโรค และมีไวรัสติดมาด้วยก็จะแสดงอาการโดยรวดเร็วและชัดเจน ในทางตรงข้ามสัตว์ที่ฉีดวัคซีนไว้แล้วหรือมีความคุ้มโรคอยู่ อาจเป็นโรคโดยไม่แสดงอาการและขับไวรัสออกมาได้ ซึ่งไม่อาจตรวจพบได้ด้วยการกักและสังเกตอาการ อีกประการหนึ่งสัตว์ที่มีภูมิคุ้มโรคอยู่เมื่อได้รับไวรัสจะทำให้ระยะเวลาเกิดโรคโดยเฉพาะระยะฟักตัวยาวนานขึ้นกว่าปกติอีกด้วย ดังนั้นสัตว์ที่นำมากักกันเพื่อจะนำเข้าเขตปลอดโรคนั้น ถ้าไม่เคยฉีดวัคซีนและถ้าได้ทำการตรวจสอบด้วยว่าไม่มีไวรัส และไม่มีแอนติบอดี้ พร้อมกับได้กักกันครบตามกำหนดเวลา จะเป็นสัตว์ที่เหมาะสมต่อการส่งเข้าเขตปลอดโรค และไม่ควรฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เหล่านั้น เนื่องจากไม่มีความจำเป็นจะต้องให้สัตว์เหล่านี้มีภูมิคุ้มโรค เพราะนำเข้าไปในเขตปลอดโรค แต่ถ้าบางครั้งบางคราวเกิดโรคระบาดขึ้นเป็นบางแห่งในเขตปลอดโรคนั้น และได้ทำการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในเขตปลอดโรคสัตว์ที่ส่งเข้าในเขตนี้ควรจะได้รับการฉีดวัคซีนให้มีความคุ้มโรคเสียก่อน

ในกรณีนำสัตว์จากเขตปลอดโรคเข้าไปในเขตโรคระบาด มีข้อพึงกระทำอย่างเดียว คือ ฉีดวัคซีนทั้ง 3 ชนิด คือ โอเอ และเอเชียวัน ให้มีความคุ้มโรค หรือฉีดมาแล้วไม่น้อยกว่า 21 วัน และไม่เกิน 4 เดือน ก่อนนำเข้าเขตมีโรคระบาด

ส่วนการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ในพื้นที่นอกเหนือไปจากเขตปลอดโรค ซึ่งหมายถึงพื้นที่ทั้งหมดในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง หรือในพื้นที่เขตปศุสัตว์ 1-7 นั้น ควรจะพิจารณาว่าการระบาดของโรคในพื้นที่เกิดขึ้นมากน้อยแค่ไหน และดูลักษณะทางภูมิศาสตร์ เพื่อที่จะแบ่งออกเป็นเขตโรคระบาดที่มีความร้ายแรงต่างๆ กัน เช่น ทางภาคตะวันออกมีการระบาดของโรคน้อย และเป็นแหล่งผลิตสัตว์เพื่อส่งออกไปที่อื่น ประกอบกับสภาพภูมิศาสตร์และทางคมนาคมเหมาะสมที่จะตั้งด่านกักสัตว์หรือด่านตรวจ (check point) ในกรณีเช่นนี้ควรจะวางมาตรการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ในกรณีนำสัตว์เข้าในภาคตะวันออกทำการกักสัตว์ถ้าทำได้ และสัตว์ทุกตัวจะต้องได้รับการฉีดวัคซีนในระยะเวลาที่ยังมีความคุ้มโรคสูงอยู่ การนำสัตว์ออกจากภาคตะวันออกต้องฉีดวัคซีนให้ความคุ้มโรคก่อน เช่นเดียวกับการเคลื่อนย้ายสัตว์ข้ามจังหวัดภายในภาคตะวันออก กระทำได้เมื่อสัตว์นั้นได้รับการฉีดวัคซีน และยังอยู่

ในระยะให้ความคุ้มโรคอยู่

สำหรับในพื้นที่ส่วนที่เหลือจะเห็นว่าเป็นพื้นที่ติดต่อกันเป็นบริเวณกว้างใหญ่ หางคมนาคมสะดวก การระบาดของโรคเกิดขึ้นพอๆ กัน จึงไม่อาจจะแบ่งออกเป็นบริเวณย่อยเพื่อควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ได้ การตั้งด่านกักสัตว์อาจจะไม่มีประสิทธิภาพแต่ควรมีจุดตรวจเพื่อตรวจดูว่าสัตว์ที่เคลื่อนย้ายข้ามจังหวัดได้รับการฉีดวัคซีนถูกต้องแล้ว

การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ในพื้นที่กว้างดังข้างบนนี้ คงหาไม่ได้ผลเด็ดขาด เพราะมีหางคมนาคมสะดวก การลักลอบผ่านเส้นทางที่ไม่มีด่านหรือจุดตรวจหาได้ง่าย การกักสัตว์เพื่อระยะพักตัวของโรคหาได้ยากในการปฏิบัติ และไม่มีความจำเป็นด้วย เนื่องจากพื้นที่ในบริเวณดังกล่าวอยู่ในสภาวะโรคอันเดียวกัน ในสภาพเช่นนี้ความสำคัญอยู่ที่ความคุ้มโรคในตัวสัตว์เอง ซึ่งได้จากการฉีดวัคซีน ถ้าต้องการเคลื่อนย้ายสัตว์ภายในบริเวณนี้ มีข้อที่ต้องตรวจสอบอย่างเดียว คือ สัตว์มีภูมิคุ้มโรคหรือไม่เท่านั้นเอง แต่ถ้าเกิดโรคขึ้นมาในบริเวณนี้สิ่งที่ต้องกระทำคือ กักสัตว์ในพื้นที่ดังจะได้กล่าวถึงรายละเอียดต่อไป

การกักสัตว์ป่วยในพื้นที่

เมื่อเกิดโรคขึ้น ณ หนึ่งที่ใด จำเป็นจะต้องกักสัตว์ป่วยและสัตว์อื่นๆ ในที่นั้น อาจจะทั้งหมู่บ้านหรือตำบล แล้วแต่กรณี เพื่อไม่ให้สัตว์แพร่เชื้อไปในที่อื่น การเคลื่อนย้ายสัตว์ป่วยเป็นอันตรายยิ่งกว่าการเคลื่อนย้ายสัตว์ปกติ การห้ามการเคลื่อนย้ายเฉพาะจุดเมื่อเกิดโรคขึ้นมาแล้วนั้น มักจะมีการฉีดวัคซีนเป็นวงแหวน (ring vaccination) พร้อม ๆ กันไปด้วย การกักสัตว์ในลักษณะนี้ยกเลิกได้เมื่อสัตว์ป่วยรายสุดท้ายหายจากโรคแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งระยะนี้สัตว์ป่วยได้ขับไวรัสออกจากร่างกายไปหมดแล้ว ยกเว้นสัตว์ที่เป็นตัวอมโรคได้ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ การกักกันเฉพาะจุดในพื้นที่ปฏิบัติได้ยากแต่มีความจำเป็นที่ต้องทำ นับการถ้าต้องการควบคุมโรคให้ได้ผล ถ้าต้องการเจ้าหน้าที่พอก็จำเป็นต้องกระทำ

การป้องกันการติดต่อทางอ้อม

การติดต่อทางอ้อมของโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งได้แก่ไวรัสที่ปนเปื้อนไปกับ เนื้อ ผลิตภัณฑ์เนื้อ นม ผลิตภัณฑ์นม น้ำ ขี้ดิน จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในประเทศที่ปราศจากจากโรคปากและเท้าเปื่อย แต่ประเทศที่มีโรคระบาดอยู่การติดต่อทางอ้อมนี้ดูไม่ค่อยมีความสำคัญนัก เพราะมีการติดต่อโดยตรงอยู่แล้ว ประกอบกับสภาพอากาศในประเทศร้อนทำให้ไวรัสอยู่ได้ไม่นาน แต่ถ้าประเทศไทยได้ดำเนินการควบคุมโรคจนการระบาดลดลงเหลือน้อยแล้ว จะเห็นว่าการระบาดโดยทางอ้อมนั้นจะมีความสำคัญขึ้นมาทันที และจะต้องหามาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีนให้ประชากรสัตว์เป็นการตัดขั้นตอนการติดต่อของโรค โดยการทำภูมิต้านทานโรคที่เกิดขึ้นทำให้สัตว์นั้น ๆ ไม่เป็นโรค การระบาดจึงถูกตัดตอนออกไป ประชากรมีภูมิต้านทานโรคยิ่งมากเท่าไร จะทำให้การระบาดลดลงมากขึ้นเท่านั้น ในทางปฏิบัติเราไม่สามารถฉีดวัคซีนให้ครบได้ 100% แต่เป็นที่ยอมรับกันว่าในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการฉีดวัคซีนนั้นจะต้องฉีดวัคซีนให้สัตว์มีความคุ้มโรคไม่ต่ำกว่า 70% อยู่ตลอดเวลาและให้ประชากรสัตว์ที่มีความคุ้มโรคและที่ไม่มีอยู่ปะปนกันอย่างสม่ำเสมอ โดยวิธีการนี้เมื่อเกิดโรคขึ้นจุดหนึ่งจุดใดการแพร่กระจายระบาดของโรคจะเป็นไปได้ช้า ซึ่งจะนำมาดำเนินการเสริมมาช่วย เช่น การกักกันเฉพาะที่และฉีดวัคซีนซ้ำเป็นวงแหวน หรือแม้แต่การฆ่าแล้วทำลาย การใช้วัคซีนที่มีพิษพอฉีดวัคซีนให้ประชากรสัตว์อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง จะเป็นวิธีการเริ่มต้นลดอุบัติการของโรคซึ่งมีอยู่จำนวนมากให้ลดลงจนเหลือน้อยมาก และเมื่อถึงขั้นนั้นแล้วจึงนำมาตรการอื่นเสริมเพื่อขจัดโรคให้หมดไปได้

เมื่อนำวัคซีนไปใช้ในท้องที่มีปัจจัยหลายอย่างทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง ปัจจัยเหล่านี้ประกอบด้วย

1. ความสัมพันธ์ทางเชรั่มวิทยา ของไวรัสในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน
2. ประสิทธิภาพของวัคซีน
3. การตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนครั้งแรกหรือฉีดซ้ำ
4. ระยะเวลาหลังจากฉีดวัคซีน

ความสัมพันธ์ทางเชรั่มวิทยาของไวรัสในท้องที่ กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน

การแบ่งแยกชนิด (type) ของโรคปากและเท้าเปื่อยอาศัยคุณสมบัติที่ไม่ให้ความคุ้มข้าม (cross protection) ซึ่งกันและกัน แต่หลังจากที่ได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบทางเชรั่มวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง complement fixation (CF) test พบว่า

ไวรัสในชนิดเดียวกัน ยังมีความแตกต่างกันทางเซรั่มวิทยา (Galloway et at, 1948) เรียกว่าชนิดย่อย (subtype) ไวรัสในsubtype เดียวกันจะให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกันสูง ในขณะที่ต่าง subtype กัน จะให้ความคุ้มต่ำ วิธี CF นั้นนำมาใช้แบ่งไวรัสอยู่เป็นเวลานาน แต่ต่อมาพบว่าการแบ่งโดยวิธี CF นี้ จะเป็นการแบ่งในลักษณะทางกายภาพมากกว่า เพราะวิธี CF เป็นการวัดระบบแอนติเจน-แอนติบอดีหุกประเภทที่มี วิธี serum neutralization (SN) เป็นการทดสอบเฉพาะแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรค (Rweyemamu et al 1977) ดังนั้นการแบ่งชนิดย่อยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี SN จะมีข้อดีมากกว่า CF เมื่อต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างของภูมิคุ้มโรค ในกรณีต้องการหาประสิทธิภาพของวัคซีนต่อไวรัสในท้องที่ ควรถือหลักเกณฑ์ดังนี้

1. ควรจะใช้วิธี SN แทน CF 2. ควรจะหาความแตกต่างทางเดียว (one way relationship, r value)

3. ใช้เซรั่มจากวัคซีนสะเดรน

วิธีการนี้นำมาใช้ได้ง่ายสะดวกรวดเร็วหาได้หลาย ๆ ตัวอย่างพร้อมกัน ซึ่งมีประโยชน์เป็นอย่างมากสำหรับการคัดตามไวรัสที่ระบาดในท้องที่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป ถึงชนิดวัคซีนที่ใช้อยู่นั้นคุ้มโรคได้หรือไม่ Pay และคณะ (1977) สรุปว่าค่า regression ของ log serum titer ต่อ log antigen dose มีค่าเท่ากับ 0.5 (Fig 1) ซึ่งมีสมการ regression y = 1.3 + 0.5 X สมการนี้มีประโยชน์มาก สามารถนำไปใช้หาประสิทธิภาพของวัคซีนโดยการฉีดวัคซีนในโคด้วยขนาดโด๊สปกติ เมื่อครบกำหนด 21 วัน แล้วเจาะเลือดนำเซรั่มมาหาSN titer แล้วคำนวณประสิทธิภาพวัคซีนออกมาในค่าของ log PD_{50} แต่สิ่งที่น่าสนใจกว่าคือ สามารถนำมาปรับใช้สำหรับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อไวรัสที่มีค่าสัมพันธ์ทางแอนติเจน(ค่า r)ต่าง ๆ กัน จากสมการตาม Fig 1 ถ้าวัคซีน 2 ชุดให้ค่า SN titer ต่างกับ 0.5 log วัคซีน 2 ชุดนี้จะมีประสิทธิภาพต่างกัน 1.0 log PD_{50} หรือจำนวน PD_{50} ต่างกัน 10 เท่า ในลักษณะเดียวกันถ้า SN titer ต่อ heterologous virus ต่ำกว่า homologous virus 0.5 log วัคซีนชุดนั้นจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า homologous 1.0 log (คือจำนวน PD_{50} จะมีแค่ 1/10) โดยวิธีการนี้ ถ้าเรามีวัคซีนซึ่งรู้ประสิทธิภาพ(จำนวน PD_{50})แน่นอน และมีเซรั่มต่อวัคซีนชุดนี้ด้วย เราสามารถจะทดสอบหาประสิทธิภาพของวัคซีนชุดนี้ต่อไวรัสในท้องที่ได้โดยง่าย และค่าที่ได้จะเป็นจำนวน PD_{50} ที่จะบอกให้ทราบด้วยว่าวัคซีนชุดนั้นมีประสิทธิภาพพอที่จะใช้สำหรับไวรัสที่มีค่า r เท่านั้นหรือไม่

ในทางปฏิบัติต้องหาการตรวจอยู่ตลอดเวลาว่าไวรัสในท้องที่ได้เปลี่ยนไปหรือไม่ ถ้าเกิดมีการเปลี่ยนไปถึงขั้นที่วัคซีนให้ความคุ้มโรคไม่ดีพอแล้ว วิธีแก้ไขดีที่สุดคือ พิมพ์เป็นไวรัสชนิดหรือชนิดย่อยใหม่เข้าไปกับวัคซีนเดิมเพื่อให้มีความคุ้มโรคครอบคลุมไวรัสได้หลายๆสะเดรน มักจะไม่เปลี่ยนสะเดรนไวรัสแทนตัวเดิม ยกเว้นเสียแต่ว่าไวรัสตัวเดิมนั้นได้หมดไปจากพื้นที่นั้นจริง ๆ แล้ว

ประสิทธิภาพของวัคซีน

เมื่อฉีดวัคซีนให้กับโคครั้งแรก การตอบสนองต่อวัคซีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจน หรือประสิทธิภาพของวัคซีน (Fig 2) ซึ่งก็คือถ้าวัคซีนมีประสิทธิภาพสูง จะให้ภูมิคุ้มโรคสูงอยู่ได้นานและให้ความคุ้มต่อ heterologus ไวรัสได้กว้างขึ้นด้วย เช่น วัคซีนชุดหนึ่งมีประสิทธิภาพ 6 PD_{50} ซึ่งจะให้ความคุ้มโรคต่อ homologous virus 94% แต่จะให้ความคุมโรคต่อ heterologus ที่มีค่า r 0.3 เท่ากับ 33% เมื่อเทียบกับวัคซีนอีกชุดหนึ่งมีประสิทธิภาพ 25 PD_{50} ซึ่งจะให้ความคุ้มโรคต่อ homologus virus 99.5% แต่จะให้ความคุ้ม heterologus (r = 0.3) ถึง 79% จะเห็นว่าในการใช้ป้องกันโรคโดยการฉีดครั้งแรกนี้ วัคซีนทั้งสองชุดจะให้ความคุ้มโรคต่อ homologous virus ไม่แตกต่างกัน แต่ในการป้องกัน heterologus virus จะมีความแตกต่างกันมาก วัคซีนชุดแรกนำมาใช้ป้องกัน heterologous ไม่ได้ แต่ชุดที่ 2 ให้ความคุ้มได้พอ

ความข้อเท็จจริงของการผลิตวัคซีน ถ้าเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนต่อ เพิ่มจำนวน PD_{50}/dose จะเป็นการเพิ่มราคาวัคซีนเช่นวัคซีนที่มี 25 PD_{50} ราคาอาจจะเป็น 4 เท่าของวัคซีน 6 PD_{50} แต่การเพิ่มจำนวน PD_{50} ไม่ทำให้เกิดภูมิคุ้มโรคเป็นสัดส่วนกับจำนวน PD_{50} ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่าง PD_{50} และantigen concentration ไม่เป็นเส้นตรงดังใน Fig 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงความคุ้มตั้งแต่ 90% ขึ้นไป ถึงแม้จะเพิ่มแอนติเจนจำนวนมากแต่ความคุ้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่ต้องใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงมาก จะเป็นการสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น แทนที่จะเสียเงินไปกับวัคซีนแพง ๆ แต่มีจำนวนน้อย สู้นำเงินจำนวนนั้นมาซื้อวัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐานแต่ได้จำนวนมากดีกว่า ประการหนึ่งเรายังผลิตวัคซีนเองได้ ซึ่งจะต้องตรวจสอบความแตกต่างของไวรัสในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนเป็นประจำอยู่แล้ว เชื่อได้ว่าไวรัสวัคซีนจะไม่มีความแตกต่างไปจากไวรัสใน

ห้องที่มากจนไม่มีความคุ้มโรคได้พอ ตามมาตรฐานของ European Pharmacopieae วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจะต้องมีประสิทธิภาพไม่ต่ำกว่า 3 PD_{50} ซึ่งให้ความคุ้มโรคประมาณ 87% วัคซีนที่มีความคุ้มโรค 87% นี้ จะมีค่าผิดพลาดสำหรับ low limit จะให้ความคุ้มไม่ต่ำกว่า 70% วัคซีนซึ่งให้ความคุ้มโดยการทดสอบถึง 70% นี้ มีคุณภาพพียงพอที่จะนำไปใช้ในห้องที่ เพราะว่าเมื่อนำวัคซีนนี้ไปใช้ในห้องที่ จะให้ความคุ้มโรค 100% (Danachar,1984) ข้อสำคัญของการฉีดวัคซีน คือฉีดสัตว์ให้มีความคุ้มมากๆ อยู่ตลอดเวลา

การตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนครั้งแรกและฉีดซ้ำ

การตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนครั้งแรกจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนหรือประสิทธิภาพของวัคซีน วัคซีนที่ผ่านมาตรฐานขั้นต่ำจะให้ความคุ้มได้พอเพียง แต่ระยะเวลาให้ความคุ้มโรคอาจจะไม่นาน ไม่ถึง 6 เดือนก็ได้ แต่ถ้าฉีดวัคซีนซ้ำการตอบสนองต่อวัคซีนจะมีมากขึ้น โดยที่ความคุ้มโรคจะเกิดเร็วขึ้นสูงและอยู่ได้นานกว่า ถึงแม้จะใช้ปริมาณวัคซีนน้อยกว่าการฉีดครั้งแรกก็ตาม หลังจากฉีดวัคซีนซ้ำนอกจากความคุ้มโรคจะอยู่ได้นานกว่า 6 เดือนแล้ว ความคุ้มต่อ heterologous virus ก็จะกว้างขึ้นและสูงขึ้นด้วย การที่ต้องฉีดวัคซีนให้สัตว์สม่ำเสมออย่างต่อเนื่อง จะมีความสำคัญอย่างยิ่งยวดในการสร้างภูมิคุ้มโรคให้สัตว์ในพื้นที่ เพื่อลดจำนวน susceptible ต่อโรค และเป็นการหาลายางจรการแพร่กระจายไวรัส ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยในบริเวณที่มีการระบาดของโรคซึ่งชุกชุมอยู่

ระยะเวลาหลังจากฉีดวัคซีน

ปัจจัยสุดท้ายที่มีความสำคัญต่อภูมิคุ้มโรค คือ ระยะเวลาหลังจากได้รับวัคซีน ความคุ้มโรคต่อ homologous virus จะอยู่ได้นานหรือไม่ขึ้นอยู่กับว่าเป็นการฉีดวัคซีนครั้งแรก ครั้งที่สอง หรือครั้งต่อๆ ไป สำหรับภูมิคุ้มโรคต่อ heterologous virusนั้นอยู่ได้ในช่วงระยะเวลาสั้นกว่า ซึ่งอาจจะเกิดโรคได้เมื่อภูมิคุ้มกันหมดไป ในกรณีเช่นนี้จะต้องทำการฉีดวัคซีนในลักษณะ "ring" หรือ "area" เพื่อช่วยยกระดับภูมิคุ้มโรคให้สูงขึ้นและในระยะแรกๆ ยังคงให้ภูมิคุ้มโรคต่อ heterologous ได้สูงพอจะควบคุมโรคไว้ได้

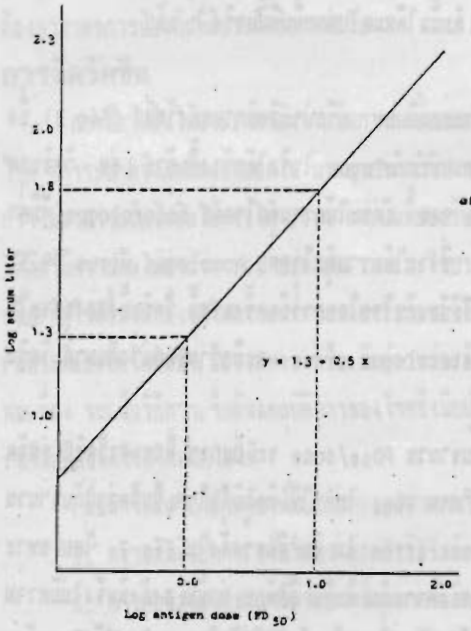


Fig 1 Serum neutralizing antibody ;dose response

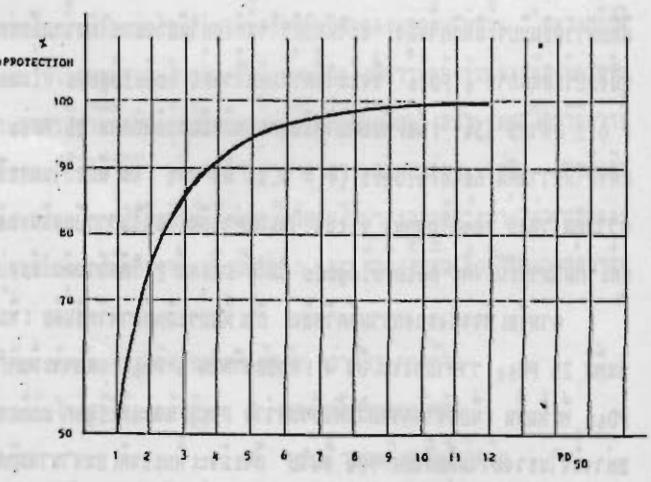


Fig 2 Percent protection; dose response

เอกสารอ้างอิง

Anderson,E.C.(1986).Potential for the transmission of foot and mouth disease virus from African buffalo (Syncerus caffer) to cattle. Res. Vet. Sci., 40, 278-280.

Anwar bin Hassan (1982). Report on vaccination performance and epizootiology of FMD in Malaysia. Proceeding of the 16th Conference of Foot and Mouth Disease Commission. Office International des Epizooties, Paris. 583-591.

Blackwell, J.H. (1976). Survival of foot and mouth disease virus in cheese. J. Dairy Sci. 59, 1574-1579.

Blackwell, J.H. (1978 a). Persistence of foot and mouth disease virus in butter and butter oil. J. Dairy Res. 45, 283-285.

Blackwell, J.H. (1978 b). Potential transmission of foot and mouth disease virus in whey constituents. J. Food. Prot. 41, 631-633.

Burrows, R. (1968). Excretion of foot and mouth disease virus, prior to development of lesions. Vet. Rec. 82, 387-388.

Cottral, G.E. (1969). Persistence of foot and mouth disease virus in animals, their products and the environment. Bull. Off. Int. Epizoot 71, 549-568.

Danacher, E.P. Comm. Spec. Meet. on FMD Vacc. Strasbourg.

Donaldson, A.I., Ferris, N.P. (1975). The surviral of foot and mouth disease virus in open air conditions. J. Hyg. 74, 409-416.

Donaldson,A.J.(1986). Aerobilogy of foot and mouth disease (FMD):an outline of recent advances. Rev. Sci. Tech. O.I.E. 5, 315-321.

Donaldson, A.J. and Hofner, M.C. (1990). Pathogenesis of foot and mouth disease in cattle. Working papers. OIE-FAVA Symp on Contr. of Ma., Livest. Dis. in Asia. Pattaya 117-127.

Galloway, J.A., Anderson, W.M., and Brooksby, J.S. (1948) Proc. Soc. Exp. Biol. 69, 57.

Hedaer, R.S., Candy, J.B. (1985). Transmission of foot and mouth disease from African buffalo virus carrier to bovine. Vet. Res. 117, 205.

Parker, J. (1971). Presence and inactivation of foot and mouth disease virus in animal feces. Vet. Rec. 88, 659-662.

Pay, T.W.F. and Parker, M.J. (1977) Deve. Biol. Stand. 35, 369-383.

Pay, T.W.F. (1988). Foot and mouth disease in sheep and goat : a review Foot and Mouth Disease Bulletin, 26, 2-13.

Rweyemamu, M.M., Pay, T.W.F. and Parker, M.J. (1971) M.J. Dev. Biol. Stand 65, 205-215.

Rweyemamu, M.M. (1984). Foot and mouth disease control strategy in Africa. Prev. Vet. Med. 2, 289-340.

Seller, R.F. (1971). Quantitative aspect of spread of foot and mouth disease. Vet. Bull., 41, 431-439.

การศึกษาชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอเชียวัน

A STUDY OF VARIATION AMONG STRAINS OF TYPE ASIA I FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS IN THAILAND

สมใจ กมลศิริพิชัยพร[1] แอบ คงทน[1]
บุศนีย์ จันทร์ประเสริฐ[2] ธนรัตน์ จานุกิจ[1]
Somjai Kamolsiripichaiporn Ab Kongthon
Busanee Chanprasert Thanarat Janukit

ABSTRACT

Fifteen foot-and-mouth disease virus (FMDV) strains of type Asia I were compared in complement fixation tests. With the test used, the range of antigenic variation among field isolates appeared to be in the same subtype while some antigenic variation was found to a vaccine strain.

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเชียวันจากท้องที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 15 ตัวอย่างได้ถูกคัดเลือกและทำการแยกเชื้อที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยในระหว่างปี 1984-1986 เชื้อดังกล่าวได้ถูกนำมาทดสอบและศึกษาชนิดย่อยของไวรัสโดยวิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชั่นเทสต์ เชื้อท้องที่ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน subtype เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรงและมีความสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในสัตว์ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุกร เชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยแบ่งออกเป็น 7 ชนิด คือ O,A,C,Asia I,SAT I,SAT II และ SAT III ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างและไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน (cross protection) และในไวรัสชนิดเดียวกันก็ยังมีความแตกต่างทางเซรั่มวิทยาเรียกว่าไวรัสชนิดย่อย (subtype) Brooksky (1968) ในประเทศไทย ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมี 3 ชนิด คือ O, A และ Asia I ซึ่งในแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างของไวรัสชนิดย่อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของไวรัส (Antigenic variation) นี้อาจเกิดจากการที่เชื้อแพร่กระจายไปในท้องที่จากสัตว์ตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเชื้อไวรัสอาจมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อที่จะเพิ่มปริมาณของตัวเองในสัตว์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มมาบ้าง (Anderson *et al.*,1974) ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างของไวรัสชนิดย่อยที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทางด้านระบาดวิทยา และเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อท้องที่กับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งพอจะเป็นแนวโน้มในการคัดเลือกตัวแทนของไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีน

จากการศึกษาครั้งนี้ ได้คัดเลือกเอาไวรัสชนิดเอเชียวัน เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังมาก่อน และวิธีที่ใช้ศึกษาก็คือ คอมพลีเมนต์ฟิกเซชั่นเทสต์ (Complement Fixation Test) ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นพื้นฐานในการจำแนกไวรัสชนิดย่อย (Traub and Mohlmann, 1946) และยังเป็นวิธีทดสอบที่สดวก ง่าย รวดเร็ว ประหยัดและให้ความเชื่อถือได้สูงวิธีหนึ่ง (Arrowsmith, 1977) นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการใช้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของเชื้อในทางระบาดวิทยา (Crowther, 1978)

---

[1]ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ [2]สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมแอนติเยน (Antigen)

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเชียวันจากห้องที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจำนวน 14 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างจากต่างประเทศ(มาเลเซีย) ซึ่งทำการแยกเชื้อที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง โดยใช้ Baby Hamster Kidney Cell Line (BHK_{21}) และทำการผ่านเชื้อใน BHK_{21} ประมาณ 6 ครั้งจนไวรัสสามารถเจริญได้ดีใน BHK_{21} จากนั้นนำมาเพาะในขาดหมุนเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น

การเตรียมแอนติซีรัม (Antiserum)

เตรียม antiserum จากหนูตะเภาโดยใช้หนูตะเภาน้ำหนักประมาณ 500 กรัม ฉีดเชื้อที่เตรียมขึ้นจากอนุภาคสมบูรณ์ของไวรัส (140S) โดยเตรียมไวรัสใน BHK_{21} จากนั้นทำให้ไวรัสตาย (inactivate) ด้วย 0.05% Bromoethyleneamine (BEA) ที่ 37°C. นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย Sodium thiosulfate และทำให้เข้มข้นด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและปั่นหลังจากนั้นเตรียม 140S โดยนำมาปั่นแยกโดยใช้ sucrose gradient แยกเก็บ 140S แล้วนำมาผสมกับ Freund's complete adjuvant ฉีดในหนูตะเภาประมาณ 5 ตัว โดยฉีดเข้ากล้ามหลังจากนั้น 28 วัน ก็ทำการฉีดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้น 7 วัน เก็บซีรัมมารวมกันแล้ว inactivate ที่ 56°C. นาน 30 นาที

การเตรียมคอมพลีเมนต์ (Complement)

เตรียมจากซีรัมของหนูตะเภา และนำมาหาไตเตอร์ก่อนใช้

การเตรียมฮีโมไลติก ซีสเต็ม (Haemotytic system)

เตรียมโดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะ 2% ใน veronal buffer ผสมกับ Haemolysin 2 H.U. ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วอบที่ 37°C. นาน 30 นาที

วิธีคอมพลีเมนต์ฟิกเซชั่นเทสต์ (Complement Fixation Test)

ทำ Complement Fixation Test ใน microplate โดยวิธี block titration โดยทำให้แอนติเยนและแอนติซีรัมเจือจางลงเป็น 2 เท่า โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยแอนติเยนแอนติซีรัมและคอมพลีเมนต์ จำนวนอย่างละ 0.025 ml. อบข้ามคืนที่ 4°C. หลังจากนั้นเติม Haemolytic system จำนวน 0.05 ml.เขย่าให้เข้ากัน แล้วอบที่ 37°C. ต่ออีก 30 นาที ใน water bath หลังจากนั้นนำมาปั่น 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

การอ่านผล

CF titre อ่านได้จากส่วนกลับของ serum dulution ที่ทำให้เกิด 50% haemolysis และอ่านค่านาฬผลโดยใช้วิธีของ Anderson (Anderson *et al*, 1974) ดังนี้

$$r_A = \frac{\text{complement fixed in reaction virus B + antiserum A}}{\text{complement fixed in reaction virus A + antiserum A}}$$

$$r_B = \frac{\text{complement fixed in reaction virus A + antiserum B}}{\text{complement fixed in reaction virus B + antiserum B}}$$

ค่า R คำนาฬได้จาก $R = \sqrt{r_A \cdot r_B} \times 100\%$

การหาค่าความสัมพันธ์โดยวิธีของ Brooksky (1968) โดยกำหนดค่า R ไว้ว่า

ถ้า R = 70% หรือมากกว่า เป็น subtype เดียวกัน

ถ้า R = 32-70% ต่าง subtype กัน

ถ้า R = 10-32% ต่าง subtype กันมาก

ถ้า R น้อยกว่า 10% เป็นคนละ type กัน

ผลการทดลอง

ผลจากการหา Block titration ของไวรัสชนิดเอเชียวันที่แยกได้จากเชื้อห้องที่จำนวน 15 ตัวอย่าง จาก โค กระบือ และสุกร ที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย

1. กรุงเทพ/60	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2503
2. ราชบุรี/86	แยกเชื้อได้จาก สุกร	ปี พ.ศ. 2529
3. สมุทรปราการ/86	แยกเชื้อได้จาก สุกร	ปี พ.ศ. 2529
4. เพชรบุรี/85	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2528
5. ชัยภูมิ/85	แยกเชื้อได้จาก กระบือ	ปี พ.ศ. 2528
6. กาญจนบุรี/85	แยกเชื้อได้จาก กระบือ	ปี พ.ศ. 2528
7. มาเลเซีย/85	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2528
8. นครราชสีมา/85	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2528
9. ราชบุรี/86	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2529
10. นครราชสีมา/86	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2529
11. ประจวบคีรีขันธ์/85	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2528
12. ลพบุรี/84	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2527
13. แพร่/85	แยกเชื้อได้จาก โค	ปี พ.ศ. 2528
14. อุดรดิตถ์/85	แยกเชื้อได้จาก กระบือ	ปี พ.ศ. 2528
15. เชียงใหม่/85	แยกเชื้อได้จาก กระบือ	ปี พ.ศ. 2528

ไวรัสตัวที่ 1 เป็นไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของโค ส่วนไวรัสตัว 2, 3 เป็นไวรัสที่แยกได้จากสุกร และไวรัสตัวที่ 7 แยกได้จากตัวอย่างที่ส่งมาจากประเทศมาเลเซีย

ผลการเปรียบเทียบค่า r และค่า R ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งค่า r ที่ได้จากค่าเฉลี่ยของ CF titre 3 ค่าเป็นอย่างน้อย

จากค่าที่คำนวนได้จากตารางที่ 1 และตารางที่ 2 พอจะสรุปได้ดังนี้

การเปรียบเทียบความแตกต่างของไวรัสในกลุ่มของเชื้อห้องที่

พบว่าโดยส่วนรวมแล้ว เชื้อห้องที่ที่นำมาศึกษามีความใกล้เคียงกัน โดยมีค่า R มากกว่า 70% ขึ้นไปเป็นส่วนใหญ่ และมีบางกลุ่มที่ให้ค่า R ระหว่าง 40-60% ซึ่งก็ยังคงจัดอยู่ใน subtype ที่ไม่ต่างกันมาก และไม่มีเชื้อใดที่มีความแตกต่างจากเชื้ออื่นอย่างเด่นชัดแม้ว่าเชื้อที่มาจากประเทศมาเลเซียก็ยังมีค่า R > 70% เป็นส่วนใหญ่

การเปรียบเทียบความแตกต่างของไวรัสเชื้อห้องที่กับเชื้อที่ใช้ทำวัคซีน

พบว่าค่า r, R ที่ได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับไวรัสห้องที่ตัวอื่นๆ แต่ก็คงจัดอยู่ใน subtype ที่ไม่ต่างกันมาก เนื่องจากค่า R อยู่ระหว่าง 32-70% ยกเว้นเชื้อจากราชบุรี ที่ให้ค่า R = 29% และเป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกร

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การศึกษาไวรัสชนิดย่อยของกลุ่มไวรัสจากเชื้อห้องที่คัดเลือกมาศึกษา ไม่มีความแตกต่างกันจัดอยู่ใน subtype เดียวกันเป็นส่วนใหญ่ (R > 70%) รวมทั้งเชื้อจากประเทศมาเลเซียก็จัดอยู่ใน subtype เดียวกัน ซึ่งไวรัสใน subtype เดียวกันจะให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน ในขณะที่ต่าง subtype กันจะให้ความคุ้มต่ำ ซึ่งจากค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่าไวรัสชนิดเอเชียวันจะไม่ค่อยมีความแตกต่างไวรัสชนิดย่อยเหมือนดังชนิดเอ ซึ่งมีความแตกต่างของไวรัสชนิดย่อย โดยแบ่งได้ 32subtype ในขณะที่ชนิดเอเชียวันมีการแบ่งได้เพียง 3 subtype เท่านั้น (World Reference Laboratory Classification)

TABLE 1 r VALUES IN CROSS - CF TEST AMONG ASIA 1 TYPE VIRUSES

Virus / Serum	Bangkok 1960	Ratcha buri 1986	Samut prakarn 1986	Phetcha buri 1985	Chaiya phum 1985	Kancha naburi 1985	Malay sia 1985	Nakhon ratcha sima 1985	Ratcha buri 1986	Nakhon ratcha sima 1986	Prachuab khiri khan 1986	Lop buri 1984	Phrae 1985	Utta radit 1985	Chiang mai 1985
Bangkok	1	0.25	0.44	0.33	0.47	0.28	0.33	0.36	0.28	0.42	0.36	0.38	0.35	0.34	0.68
Ratchaburi	0.34	1	0.96	0.52	0.72	0.58	0.33	0.33	0.75	0.44	0.54	0.96	0.69	0.92	0.53
Samutprakarn	0.72	0.86	1	0.78	0.80	1	0.54	0.70	0.85	0.68	0.87	1	0.72	1	1
Phetchaburi	0.69	0.67	0.82	1	0.86	1	0.97	0.76	0.91	0.96	1	0.80	0.84	0.83	1
Chaiyaphum	0.89	0.89	0.94	0.94	1	1	0.58	0.88	0.90	0.90	1	0.94	0.96	0.94	1
Kanchanaburi	0.77	0.88	0.93	1	0.94	1	0.70	0.56	0.69	0.72	0.71	0.75	0.81	1	1
Malaysia	0.79	0.73	0.83	1	0.87	0.82	1	0.85	0.88	0.82	1	0.7	1	0.81	1
Nakhonratchasima	0.61	0.40	0.75	0.8	0.75	1	0.6	1	0.78	0.89	0.87	0.88	0.53	0.81	1
Ratchaburi	1	0.75	1	0.69	1	1	0.76	1	1	1	0.94	1	0.82	0.93	1
Nakhonratchasima	0.63	0.63	0.93	0.93	1	1	0.77	0.73	1	1	1	1	1	1	1
Prachuabkhirikhan	0.58	0.55	0.69	0.62	0.88	0.70	0.50	0.62	0.62	0.47	1	0.64	0.76	0.61	1
Lopburi	0.82	0.53	0.75	0.33	0.93	0.93	0.67	0.69	0.67	0.58	0.82	1	0.67	0.73	1
Phrae	0.77	0.64	0.87	1	1	0.90	0.71	0.71	0.79	0.77	0.83	0.87	1	0.87	1
Uttaradit	0.82	0.53	0.76	0.58	0.69	0.60	0.76	0.66	0.75	0.64	0.75	0.73	0.64	1	0.72
Chiangmai	0.91	0.89	0.91	0.87	0.75	0.87	0.68	0.74	0.74	0.86	0.86	0.79	0.71	0.72	1

TABLE 2 R (%) DERIVED FROM r VALUES OF TABLE 1

Virus / Serum	Bangkok 1960	Ratcha buri 1986	Samut prakarn 1986	Phetcha buri 1985	Chaiya phum 1985	Kancha naburi 1985	Malay sia 1985	Nakhon ratcha sima 1985	Ratcha buri 1986	Nakhon ratcha sima 1986	Prachuab khiri khan 1986	Lop buri 1984	Phrae 1985	Utta radit 1985	Chiang mai 1985
Bangkok	100	29	56	48	64	46	51	47	53	51	46	56	52	53	79
Ratchaburi		100	91	59	80	71	49	36	75	53	66	71	66	70	69
Samutprakarn			100	80	87	96	67	72	92	79	77	87	79	87	95
Phetchaburi				100	90	100	98	78	79	94	79	76	92	48	93
Chaiyaphum					100	97	71	81	95	95	94	93	98	80	87
Kanchanaburi						100	76	75	83	85	70	83	85	77	93
Malaysia							100	71	82	79	71	68	84	78	82
Nakhonratchasima								100	88	81	73	78	61	73	86
Ratchaburi									100	100	76	82	80	83	86
Nakhonratchasima										100	68	76	88	80	93
Prachuabkhirikhan											100	90	79	68	93
Lopburi												100	76	73	89
Phrae													100	75	84
Uttaradit														100	72
Chiangmai															100

เมื่อพิจารณาค่า R ที่ได้จากเชื้อห้องที่มาเปรียบเทียบกับเชื้อที่ใช้ทำวัคซีนคือ Bangkok 1960 ค่า R ค่อนข้างต่ำอยู่ระหว่าง 32-70% แต่มีตัวอย่างเดียวที่ให้ค่า R ต่ำกว่า 32% คือเชื้อจากราชบุรี (R = 29%) ซึ่งเป็นเชื้อซึ่งแยกได้จากสุกรเมื่อปี 2529 จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ต่าง subtype กันมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า R ที่ได้จากเชื้อจากสมุทรปราการตัวอย่างจากสุกรในปีเดียวกันพบว่าตัวอย่างจากสุกรทั้งสองตัวอย่างมีความสัมพันธ์กันเองค่อนข้างสูง (R = 91%) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกรุงเทพ 1960 ก็จัดอยู่ในกลุ่มของต่าง subtype กัน (R = 56%) แต่ก็มีรายงานของ Forman (1975) และ Pereira (1976) ที่แนะนำให้ใช้ R < 25% เป็นตัวกำหนด subtype ที่ต่างกัน ซึ่งถ้าใช้ค่านี้เป็นตัวกำหนด ไวรัส 3 ตัวนี้จะถูกจัดอยู่ใน subtype เดียวกัน

ข้อสังเกตุที่น่าสนใจอีกข้อหนึ่งก็คือ เมื่อพิจารณาค่า r ของเชื้อกรุงเทพ 1960 แล้วค่า r ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 0.4 ซึ่งจากค่าที่ Fernandes (Fernandes *et al.*, 1977) กำหนดไว้ว่าเมื่อ r >.40 แล้วน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าสามารถให้ความคุ้มเพียงพอในการระบาดของโรคลัดได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า r เชื้อกรุงเทพ 1960 มีเชื้อห้องที่หลายตัวให้ r < 0.4 ซึ่งน่าจะต้องพิจารณาว่าเชื้อกรุงเทพ 1960 นี้ยังเหมาะสมในการใช้เป็นไวรัสวัคซีนอยู่หรือไม่

เมื่อพิจารณาค่า R ในกลุ่มของเชื้อห้องที่พบว่าเชื้อที่น่าสนใจนำมาศึกษาต่อไป คือ เชื้อจากจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งให้ค่า R ส่วนใหญ่ > 70% และมีความใกล้เคียงกับเชื้อกรุงเทพ 1960 (R = 69%) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อตัวนี้น่าจะให้ความคุ้มกว้างพอที่จะครอบคลุมลักษณะเชื้อห้องที่กลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้ยังมีเชื้อจากจังหวัดราชบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา/86 ที่ให้ค่า r > 0.4 ไวรัส 4 ตัวอย่างดังกล่าวนี้น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มเชื้อห้องที่ควรจะนำมาศึกษาต่อไปเกี่ยวกับด้านความคุ้มโรคเช่นวิธี serum neutralization test ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบและสามารถบ่งชี้เกี่ยวกับความคุ้มโรคได้ โดยที่ complement fixation test เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเยนกับแอนติบอดี้ทุกประเภท ซึ่งจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับความแตกต่างของไวรัสชนิดย่อยเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

Anderson, E.C., Anderson, J. and Doughty, W.J. 1974. The foot and mouth disease virus subtype variant in Kenya. J. Hyg. Camb. 73, 237-244.

Arrowsmith,A.E.M.1977. A survey of FMD type "O" strains from the far east. International Symposium on Foot-and-Mouth-Disease. Lyon 1976. Develop. Biol. Standard. 35, 221-230.

Brooksby, J.B. 1968. Variants and immunity : definitions for serological investigations. International Symposium on Foot-and-Mouth Disease : Variants and Immunity, Lyon, 1967. Symposia Series in Immunological Standardization 8, 1-10.

Crowther, J.R. 1978. Subtyping of FMD virus. New approaches. Bull. Off. Int. Epiz., 89 (11-12), 831-850.

Fernandez, A.A., Gomes, I, Sondahl, M.S. 1977. Serological and immunological relationships among type A foot and mouth disease strains in South America. International Symposium on Foot and Mouth disease, Lyon, 1976, Develop. Biol. Standard, 35, 231-235.

Forman, A.J. 1975. The sub-type classification of strains of foot-and-mouth disease virus. J. Hyg. Camb., 74, 227.

Pereira, H.G. 1976. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. International Symposium on foot-and-mouth disease, Lyon 1976. Develop. biol. Standard, 35, pp. 167-174.

Traub, E. & Mohlmann, H. 1946. Untersuchungen uber immunologische Varianten der Typen A und B des Maul-und Klauenseuehenvirus. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 1,1-5.*