สารบัญ

* การวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจากซีรัมสัตว์ป่วย----------1

* การทดลองผลิตวัคซีนป้องกันโรคสนัพเพิลของกระต่ายทดลอง------12

* บทความพิเศษ----------19

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
บรรณาธิการผู้ช่วย	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	วรากิจ จันทรัศมี
	ไสภณ ท้วมแสง
	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	เดิมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพ ฯ
วัตถุประสงค์	1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์
	2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคสัตว์
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน มีนาคม และ เดือน กันยายน
พิมพ์ที่	โรงพิมพ์ดีพร้อม อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS

Editor in chief	Ab Kongthon
Assistance Editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial Board	Varakit Chuntarasmi
	Sophon Tuamsang
	Somjai Kamolsiripichaiporn
	Dermpol Ratanawonk
Business Office	Division of Veterinary Biologics
	Phyathai Bangkok Thailand

The Journal of Veterinary Biologics is a publication of the Division of Veterinary Biologics, Department of Livestock Developement intended to make available the results of technical work in the veterinary biological science. The Journal of Veterinary Biologics edition is issued 2 times per year in March and September.

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

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

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

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)** ให้เขียนนำหน้าต้นเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของต้นเรื่อง 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 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านหฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะ เพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 *เอกสารอ้างอิง (Literature cited)*

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้ราชงานตามตัวอักษร 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) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอักษรหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือคารา ให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(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

(iii)

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบ เพื่อหาความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย จากซีรัมสัตว์ป่วย

DIAGNOSIS OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS FROM INFECTED ANIMAL SERUM

วิไล ลินจงสุบงกช[1] สินสมุทร นิลฉวี[1] วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1]
Wilai Linchongsubongkoch Sinsamoot Nilchavee
Watcharee Sinsuwongwat

ABSTRACT

The type identification of the field serum samples which were sent to Foot and Mouth Disease Center for FMDV diagnosis since December 1991 to April 1993 has been tested and described. The VIA test has been performed by the Agar gel immunodiffusion (AGID) test to detect the antibody to virus infection associated (VIA) antigen in infected animal serum. This test has been done in parallel with the Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) to determine the antibody titre against 3 types of FMDV, type O, type A and type Asia I. 138 of field sera which were collected from cattle, buffaloes and pigs has been tested and identified. The positive result 22.46 % were type O, 0% were type A, 52.90% were type Asia I and 24.64% of the samples were negative.

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จากซีรัมท้องที่ต่าง ๆ ที่ส่งไปที่ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยการตรวจสอบ VIA Test เพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ Virus Infection Associated (VIA) antigen ด้วยวิธี Agar gel immunodiffusion (AGID) Test ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดี้ไตเตอร์ ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ คือ ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน ด้วยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) ซีรัมท้องที่จำนวน 138 ตัว

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

อย่างซึ่งมาจาก โค กระบือ และสุกร ที่ส่งมาตรวจที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยตั้งแต่เดือนธันวาคม 2534 ถึงเดือน เมษายน 2536 พบว่าได้ผลบวกเป็นไทป์โอ 22.46% ไทป์เอ 0% ไทป์เอเชียวัน 52.90% และได้ผลลบ 24.64%

คำนำ

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing และวิธี CF test ซึ่งยังคงใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยตรวจหาเชื้อไวรัส (Antigen detection) จากตัวอย่างที่มาจากเนื้อเยื่อวิการ เช่น เยื่อลิ้น เหงือก เยื่อบุภายในช่องปาก วิการจาก อุ้งเท้า ไรกีบ และจากจมูก เป็นต้น ในบางครั้งการเก็บเนื้อเยื่อวิการจากสัตว์ป่วยนั้น เก็บได้ปริมาณน้อยเก็บวิการที่มีลักษณะเก่าเกินไปหรือเก็บล่าช้าไป ส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีดังกล่าวไม่ได้ผล จึงได้มีการศึกษาค้นคว้า และพัฒนาหาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อวิการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ เพื่อให้ได้ซึ่งการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง และรวดเร็วให้กับสัตว์ป่วยในท้องที่ว่าป่วยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ใด เพื่อเป็นประโยชน์ต่อสัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ในท้องที่ เกษตรกร เจ้าของฟาร์ม ในการใช้วัคซีนฉีดป้องกันโรคและกำจัดโรคได้อย่างถูกต้องตรงกับไทป์ที่กำลังระบาดอยู่ เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหาย และการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจของประเทศชาติ ดังนั้นการตรวจซีรัมในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี VIA test ควบกับวิธี LP ELISA จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในงานวินิจฉัยโรค และจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ กล่าวคือในกรณีมีการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเกิดขบวนการที่เรียกว่า Viral replication ขึ้นในเซลสัตว์และจะมีการปล่อย enzyme ที่เรียกว่า RNA polymerase ซึ่งก็คือ Virus infection associated (VIA) antigen เพราะฉะนั้นในร่างกายสัตว์ จะมีการสร้างแอนติบอดี้ต่อต้าน VIA antigen ขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบ VIA antibody ในซีรัมของสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้ว แต่จะไม่พบ VIA antibody ในซีรัมสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อตายหรือ Inactivated vaccine [(Mcvicar J.W.และคณะ, 1970) และ Pinto A.A. และคณะ, 1978)] ด้วยทฤษฎีและเหตุผลดังกล่าว จึงได้มีการนำเอาวิธีการตรวจสอบ VIA test และ LP ELISA มาใช้ในการวินิจฉัยโรค ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจและเป็นวิธีที่นำมาใช้แก้ปัญหาได้ในระดับหนึ่งในกรณีไม่สามารถเก็บเชื้อจากเนื้อเยื่อวิการได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ซีรัมท้องที่

เจาะเลือดแยกเฉพาะส่วนซีรัมนำมา inactivate โดยแช่ใน water bath 56°C. นาน 30 นาที ก่อนนำมาตรวจสอบ

2. เตรียม VIA antigen ในห้องปฏิบัติการ

การเตรียม VIA antigen สามารถเตรียมและแยก VIA antigen ออกจาก FMDV ได้โดยให้จับกับ DEAE Sephadex A-50 และแยกโดยวิธี Ion Exchange Chromatography ตามวิธีของ วิไล ลินจงสุขงกช และคณะ, 2528 (ประมวลเรื่องประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 12 ประจำปี 2528)

3. การตรวจสอบ VIA test ด้วยวิธี Agar gel immunodiffusion test (AGID)

3.1 เตรียมวุ้น 0.8% Agarose ในเพลทพลาสติก หนาประมาณ 3 ม.ม.

3.2 เจาะวุ้นตามรูปแบบแสดงใน Figure 1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ม.ม. หลุมตรงกลางสำหรับใส่ VIA antigen หลุมรอบข้างสำหรับใส่ Positive control serum และ test serum ที่ส่งมาจากท้องที่ต่าง ๆ ปริมาตรที่ใช้ 50 µl ต่อหลุม

3.3 นำเพลตใส่ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นเล็กน้อย เก็บในอุณหภูมิห้อง อ่านผล precipitation line ที่เกิดขึ้นภายใน 1-5 วัน

4. ELISA reagents

Rabbit trapping antibody และ Guinea pig detecting antibody เป็น ELISA reagent ที่เตรียมและผลิตจากศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย วิธีการมีดังนี้

4.1 เตรียม Rabbit anti FMDV ทั้ง 3 ไทป์ คือ ไทป์โอ เอ และเอเชียวัน ซึ่งเตรียมจากกระต่ายขนาดน้ำหนักตัว 1.5 กิโลกรัม โดยฉีด Purified 146S antigen ผสมกับ Complete Freund adjuvant ฉีดเข้ากล้ามขนาด 40 µg/ตัว ปล่อยไว้ 28 วัน ทำการฉีด Purified 146S antigen ซ้ำด้วยขนาด 30 µg/ตัว เจาะเลือดในระยะ 10 วันหลังฉีด แยกเฉพาะส่วนซีรัมนำมา Titrate เพื่อหา Working dilution สำหรับใช้ในงาน LP ELISA

4.2 เตรียม Guinea pig anti FMDV ทั้ง 3 ไทป์ ซึ่งเตรียมจากหนูตะเภาน้ำหนักขนาด 500 กรัม โดยฉีด Purified 146S antigen ผสมกับ Complete Freund adjuvant ฉีดเข้ากล้ามขนาด 20 µg/ตัว ปล่อยไว้เป็นเวลา 28 วัน ทำการเจาะเลือดแยกเฉพาะส่วนซีรัมนำมา Titrate เพื่อหา Working dilution สำหรับใช้ในงานตรวจสอบ LP ELISA ต่อไป

5. Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

เป็นการตรวจหาแอนติบอดี้ ไตเตอร์ ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 3 ไทป์ คือ ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน โดยใช้วิธี ELISA แบบ Indirect double antibody sandwich method รูปแบบแสดงไว้ใน Fiqure 2 วิธีการมีดังนี้

5.1 Coat ELISA plate ด้วย Rabbit anti type O, type A และ type Asia I ลงบน solid phase เขย่า incubate ใน 37°C. 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS

5 ครั้ง

5.2 เตรียม Virus-test serum mixture ลงในเพลทก้น U หรือ CF plate โดยการ dilute serum ที่ตรวจสอบแบบ 2 fold dilution ปริมาตร 50 µl ต่อหลุม จากนั้นเตรียม constant virus ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน ลงในแต่ละเพลท ปริมาตร 50 µl ต่อหลุม นำไปเขย่า และ incubate ใน 37°C. 1 ชั่วโมง

5.3 ถ่าย virus- test serum mixture ลงบน ELISA plate ที่ได้ทำการ coat ไว้แล้วด้วย Rabbit anti FMD serum เขย่า incubate 37°C. 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง

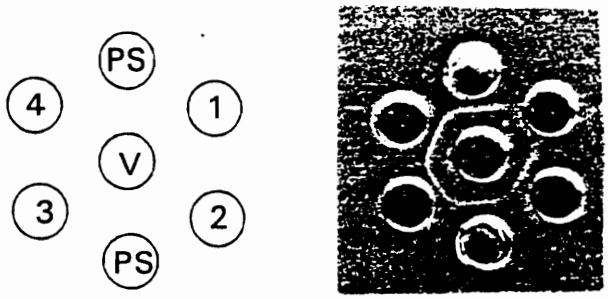
5.4 เติม Guinea pig anti type O, type A และ type Asia I ลงบน เพลท เขย่า incubate 37°C. 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง

5.5 เติม conjugate ซึ่งเตรียมจาก Anti guinea pig Immunoglobulin ที่ ติดฉลากด้วย Enzyme horseradish peroxidase conjugate เขย่า incubate ใน 37°C. 1 ชั่วโมง ล้าง PBS 5 ครั้ง

5.6 เติม Substrate ซึ่งเตรียมจากสาร TMB (Tetra methyl benzidine) ซึ่งมี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกริยา วางในอุณหภูมิห้อง 20 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการเติม 1N H_2SO_4

5.7 อ่านค่า OD โดยเครื่อง ELISA Reader ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง computer จากนั้นคำนวณค่า serum titre จาก computer ดังแสดงใน Figure 2

Figure 1 Arragement of reagents and samples on plate for VIA test by Agar gel immunodiffusion test

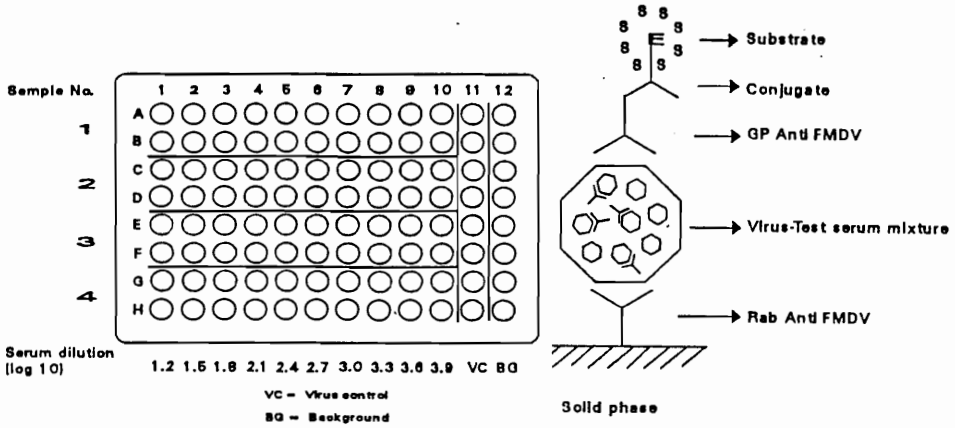


V = VIA antigen

PS = Positive control serum

1-4 = Test serum

Figure 2 Arrangement of reagents and serum samples on plate for LP ELISA test by indirect double antibody sandwich method



ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจตัวอย่างซีรัมตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2534 ถึงเดือน เมษายน 2536 จำนวน 138 ตัวอย่างนั้น ซึ่งเป็นซีรัมจากสัตว์ป่วยและสัตว์ที่สงสัยว่าป่วย ส่วนใหญ่ได้จาก โค กระบือ และสุกร ซึ่งจากการตรวจสอบ VIA test ควบคู่กับ LP ELISA แล้วนำผลการตรวจทั้ง 2 วิธี มาทำการวิเคราะห์ผลปรากฏว่าให้ผลบวกเป็น ไทป์โอ จำนวน 31 ตัวอย่าง หรือ 22.46% ให้ผลบวกเป็นไทป์เอเชียวัน จำนวน 73 ตัวอย่าง หรือ 52.90 % ให้ผลลบหรือไม่ป่วยเป็นโรค จำนวน 34 ตัวอย่าง หรือ 24.64% และไม่พบว่าตัวอย่างซีรัมให้ผลบวกเป็นไทป์เอ คือ 0% จากรูปแสดงใน Table 1, Table 2 และ Figure 3

การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ให้ผลเป็นที่น่าพอใจให้ความไวสูงพอสมควรและการอ่านผลรวดเร็วกว่าวิธีที่ใช้ทั่ว ๆ ไป สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี้ ไตเตอร์ โดยวิธี Virus neutralization test ซึ่งอุปกรณ์และสารตรวจสอบต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ แต่การนำวิธี LP ELISA มาพัฒนาใช้แทนวิธี VN test ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้อุปกรณ์และสารตรวจสอบที่ใช้ไม่ต้องคำนึงถึงสภาวะปลอดเชื้อ (Westbury H.A.และคณะ, 1988)

วิธีการจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการตรวจสอบ VIA test ควบคู่กับ LP ELISA เพื่อจะให้ได้การวิเคราะห์ผลในการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและแม่นยำสูงนั้นมีขอบเขตการใช้ที่จำกัด กล่าวคือตัวอย่างซีรัมที่ส่งมาตรวจจะต้องทราบประวัติสัตว์ป่วย รวมทั้งการฉีดวัคซีนอย่างละเอียดและถูกต้อง เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ผล คือการทำ VIA

test นั้น สามารถจะบอกสภาวะได้ว่าสัตว์ได้รับการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วหรือยัง แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารบ่งบอกไทป์ของไวรัสได้ เนื่องจาก VIA antigen มีคุณสมบัติเป็นเพียงแค่ FMDV specific เท่านั้น ไม่มีคุณสมบัติเป็น Type specific ด้วย(Cowan and Graves, 1966) จึงต้องอาศัยการบ่งบอกไทป์ไวรัสด้วยการตรวจหา แอนติบอดี้ ไตเตอร์ ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ไทป์ คือ ไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน โดยวิธี LP ELISA ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงแนวโน้มของไทป์ไวรัสที่ให้เกิดโรคได้ กล่าวคือ สัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วจะมีแอนติบอดี้ ไตเตอร์ สูงในไทป์เดียวกันกับที่ทำให้เกิดโรค (วิไล ลินจงสุบงกช และคณะ, 2528) แต่ในกรณีที่สัตว์ป่วยมีประวัติการฉีดวัคซินไตรวาเลนท์หลาย ๆ ครั้งต่อเนื่องกัน อาจจะมีปัญหาในเรื่องการวิเคราะห์ผลจากค่าแอนติบอดี้ ไตเตอร์ ต่อไวรัสทั้ง 3 ไทป์ เนื่องจากค่า แอนติบอดี้ ไตเตอร์ จะสูงใกล้เคียงกันทั้ง 3 ไทป์ ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ แต่ในกรณีที่สัตว์ไม่ได้รับการฉีดวัคซินเป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี หรือยังไม่เคยฉีดวัคซินมาก่อน การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีดังกล่าวจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ

นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจสอบ VIA test ด้วยวิธี AGID test เพื่อจะตรวจหา VIA antibody ในซีรัมสัตว์ป่วยพบว่าระยะเวลาที่สามารถตรวจพบได้คือ ระยะ 1 สัปดาห์ ภายหลังจากสัตว์ได้รับการติดเชื้อแล้ว จนถึงระยะ 4 เดือน (วิไล ลินจงสุบงกช และคณะ, 2534) เพราะฉะนั้นการเจาะเลือดในระยะแรกก่อน 1 สัปดาห์ ของการติดเชื้อก็จะไม่ให้ผลบวกใน VIA test ควรเจาะเลือดในระยะที่แผลที่เท้าเริ่มหาย การตรวจจะได้ผล คือ สามารถตรวจพบ VIA antibody ในซีรัมสัตว์ป่วยได้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลซีรัม เพื่อการวินิจฉัยโรค

Sample	History	VIA test	Antibody titre O	A	Asia I	Diagnostic Result
Gr1 -1	ไม่เคยฉีดวัคซิน	* +	178	45	>1413	Asia I
-2	~ 2 ปี	+	32	45	>1413	
Gr2 -1	ไม่เคยฉีดวัคซิน	+	178	<11	22	
2	~ 3 ปี	+	355	<11	22	O
3		+	178	<11	<11	
4		+	355	16	<11	
Gr3 -1	ฉีดวัคซินไตรวา	* -	89	45	45	Neg
2	เลนท์ 7 วัน	-	179	45	45	
Gr4 -1	ฉีดวัคซินไทป์	+	45	<11	355	
2	เอเชียวัน	+	45	<11	355	
3	~ 10 วัน	+	45	<11	355	Asia I
-4		+	45	<11	355	
-5		+	45	<11	355	

*VIA + = Positive result แสดงว่าสัตว์ได้รับการติดเชื้อไวรัสแล้ว

VIA - = Negative result แสดงว่าสัตว์ยังไม่ได้รับการติดเชื้อไวรัส

Gr. = กลุ่มตัวอย่างซีรัมท้องที่ที่ส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

Neg. = ได้ผลลบ

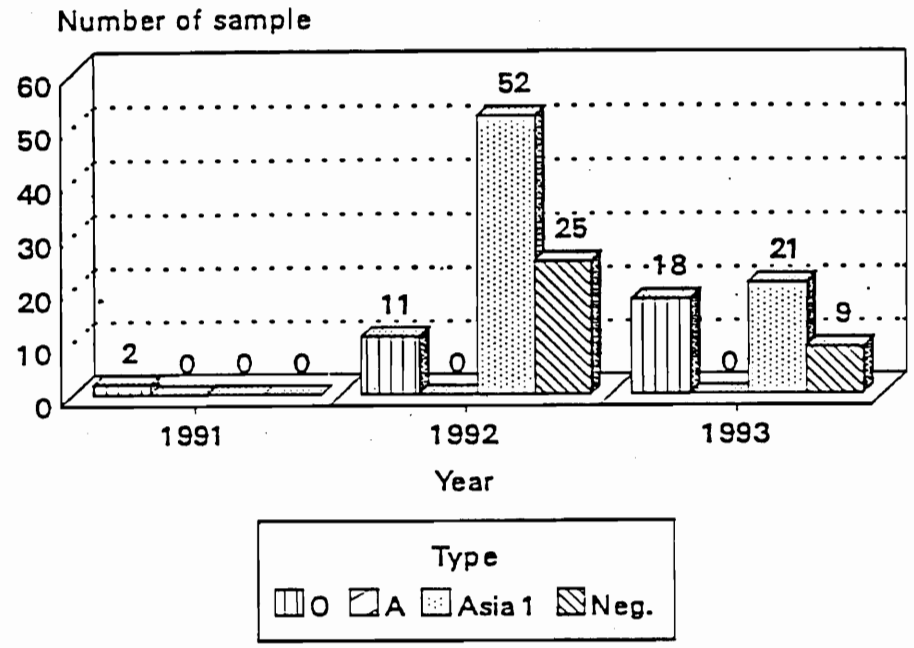
Table 2 Results of type identification of infected and suspected sera which were tested by VIA test and LP ELISA test

Month, Year	Total sample	VIA test Positive /total	Type identified			Negative samples	**Remarks
			O	A	Asia I		
Dec. 91	2	2/2	2				
Jan. 92	4	4/4	4				
Mar. 92	3	3/3	1		2		
May. 92	4	4/4	2		2		
Jun. 92	3	3/3			3		
Jul. 92	10	6/10	4		2	4	
Sep. 92	28	19/28			19	9	*1 sam=As+ve
							*1 sam=NT
Oct. 92	18	13/18			13	5	
Nov. 92	13	10/13			10	3	*2 sam=As+ve
Dec. 92	5	1/5			1	4	*1 sam=NT
Jan .93	17	13/17	9		4	4	*1 sam=As+ve
Feb. 93	16	12/16	9		3	4	*1 sam=O+ve
Mar. 93	9	9/9			9		
Apr. 93	6	5/6			5	1	
Total Sample	138	104/138	31	0	73	34	
			22.46%	0%	52.90%	24.64%	

*1 sam = 1 sample was positive by ELISA typing test

**Remarks = FMDV typing result from lesion which was sent together with serum

Figure 3 Diagnosis of FMDV from field serum samples received during 1991 to 1993



สรุป

การวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยในกรณีส่งตัวอย่างเป็นซีรัมนั้น สามารถทำการแยกชนิดไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ โดยการตรวจสอบ VIA test เพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen หรือ VIA antibody ในซีรัมสัตว์ป่วยและตรวจควบคู่กับวิธี LP ELISA เพื่อตรวจ แอนติบอดี้ ไตเตอร์ ที่มีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน แล้วนำข้อมูลจากการตรวจด้วย 2 วิธีดังกล่าวมาวิเคราะห์ผล ทั้งนี้การวินิจฉัยโรคจะถูกต้องและแม่นยำต้องอาศัยข้อมูลต่าง ๆ จากประวัติสัตว์ป่วยด้วย ผลการตรวจวินิจฉัยซีรัมจากท้องที่ตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2534 ถึงเดือน เมษายน 2536 จำนวน 138 ตัวอย่าง พบว่าเป็นไทป์โอ 22.46% ไทป์เอ 0% ไทป์เอเชียวัน 52.90% และได้ผลลบ 24.64% เป็นที่น่าสังเกตุว่าสภาวะการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในระยะ 2 ปีหลังนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นไทป์เอเชียวัน รองลงมาเป็นไทป์โอ และยังไม่พบการระบาดของไทป์เอ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคในกรณีส่งตัวอย่างเป็นซีรัมนั้น มีขอบเขตจำกัดในการตรวจสอบของทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแล้ว ระยะเวลาที่จะทำการเจาะเลือดส่งตรวจในห้องปฏิบัติการและประวัติสัตว์ป่วยมีความสำคัญมาก ในกรณีที่สัตว์เริ่มแสดงอาการป่วยมีแผลที่ ลิ้น ไรกีบ หรืออุ้งเท้า แนะนำให้รีบเก็บเนื้อเยื่อวิการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการตรวจ Typing จากเนื้อเยื่อวิการซึ่งให้ความจำเพาะ ความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าการส่งซีรัมตรวจ ยกเว้นในกรณีที่ส่งเนื้อเยื่อวิการตรวจแล้วไม่ได้ผล อาจเนื่องจากเก็บวิการน้อยเกินไป สภาพเก่าหรือเน่า และไม่สามารถเก็บเชื้อใหม่ได้จากตัวอื่น ๆ จำเป็นต้องเจาะเลือดส่งตรวจเพื่อให้ทราบชนิดไวรัสที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งการตรวจซีรัมโดยวิธี VIA test และ LP ELISA นี้ เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาในกรณีที่ทำ Typing จากเนื้อเยื่อวิการไม่ได้ผลเท่านั้น จึงจำเป็นต้องยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยจากตัวอย่างซีรัมแทน เพื่อจะได้ทราบสภาวะการระบาดของโรคในขณะนั้นว่าเป็นไทป์ใด และจะได้หามาตรการการป้องกันและกำจัดโรคให้สงบลงโดยเร็วที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ น.สพ.สิทธิพร อนันตจินดา ให้ความร่วมมือด้าน Graphic computer และ น.สพ.พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. วิไล ลินจงสุบงกช สุวรรณา จักราวรวุธ สมใจ กมลศิริพิชัยพร และอดิลักษ์ เล็บนาค 2528 การแยก VIA antigen จากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อ VIA antigen ในซีรัมสัตว์ โดยวิธี Double gel immunodiffusion test ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 12 ประจำปี 2528 หน้า 289-300
2. วิไล ลินจงสุบงกช อดิลักษ์ เล็บนาค และแอบ คงทน 2534 การตรวจหาแอนติบอดี้ ต่อไวรัสอินเฟ็คชั่น แอสโซชิเอดเต็ด (วีไอเอ) แอนติเจน ในซีรัมสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 2 เล่มที่ 2 เดือนกันยายน 2534 หน้า 9-19
3. Cowan K.M. and Graves J.H.1986. A third anti-genic component associated with FMD infection. Virology, 30, 528-540.

4. Mcvicar J.W. and Sutmoller P. 1970. The agar gel diffusion precipitin test for antibody to VIA antigen as a tool for epizootiologic surverys. American Journal of epidemiol. Vol. 92 No. 4
5. Pinto A.A. and Hedger R.S. 1978. The detection of antibody to VIA antigen in various species of African wildlife following natural and experimental infection with FMDV. Archives of Virol. 57, 307-314.
6. Westbury H.A., Chamnanpood P.,Tangchaitrong S. and Doughty W.J. 1988. Single dilution ELISA for detection of serum antibody to FMDV in cattle. Vet. Micro. 18, 273-283.

การทดลองผลิตวัคซีนป้องกันโรคสนัฟเฟิลของกระต่ายทดลอง

AN EXPERIMENTAL VACCINE PRODUCTION FOR SNUFFLES IN RABBITS

โสภณ ท้วมแสง[1] วันชัย ตีรถะวรวรรณ[1]
SOPHON TUAMSANG WANCHAI TEERATHAWORAWAN

ABSTRACT

An experimental on Snuffles vaccine production for Snuffles in rabbit. The organism was isolated from the rabbits of the experimental laboratory section of the Veterinary biologics center. Vaccine and challenged organism were made from this organism. Twenty nine rabbits aging 8-12 weeks formed 3 groups. Challenge was intramuscular route with $1.3x10^8$ organisms, given 3 weeks after the last vaccination. The rabbits were killed 2 weeks later. Group 1 (12 rabbits) was vaccinated s.c. with $3.8 x10^{10}$ CFU 4 times at 0,7,14 and 35 days and challenged. None developed anorexia or dyspnoea. Group 2 (12 rabbits) was vaccinated s.c. 2 times at 0,14 days and challenged. None developed anorexia or dypnoea. Group 3 (5 rabbits) was not vaccinated but were challenged. 5 rabbits (100%) became anorectic and dypnoeic and 4 (80%) died. All of them developed mild to severe lung lesion, myocarditis and tracheitis.

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตวัคซีนป้องกันโรคสนัฟเฟิลในกระต่าย เชื้อที่นำมาผลิตวัคซีนและเชื้อพิษเก็บจากฝูงกระต่ายของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระต่ายจำนวน 29 ตัว อายุ 8-12 สัปดาห์ ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ใช้เชื้อพิษ ขนาด $1.3x10^8$ CFU เข้ากล้ามเนื้อ หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 3 สัปดาห์ กระต่ายถูกฆ่าหลังจาก 14 วัน หลังฉีดเชื้อพิษ กลุ่มที่ 1 กระต่าย 12 ตัว ฉีดวัคซีน 4 ครั้ง ด้วยขนาด $3.8x10^{10}$ CFU วันที่

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

0,7,14 และ 35 เข้าใต้ผิวหนังหลังจากนั้น 14 วัน จึงฉีดเชื้อพิษทับพบว่ากระต่ายทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยและไม่ตาย กลุ่มที่ 2 กระต่าย 12 ตัว ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง วันที่ 0,14 เข้าใต้ผิวหนังแล้วฉีดเชื้อพิษทับหลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย ผลกระต่ายทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยและไม่ตาย กลุ่มที่ 3 กระต่าย 5 ตัว ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน ฉีดเชื้อพิษ ผลกระต่าย 5 ตัว (100%) แสดงอาการป่วย 4 ตัว (80%) ตายภายใน 2-5 วัน จากการผ่าชากทั้ง 5 ตัว ตัว มีวิการคือมีการอักเสบของ หลอดลม, ปอด และหัวใจ

คำนำ

จากการผ่าชากกระต่ายที่ตายด้วยการติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจ ในฝูงกระต่ายของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กระต่ายพ่อพันธุ์แม่พันธุ์และกระต่ายน้ำหนัก 2 ก.ก.ขึ้นไป มีวิการส่วนใหญ่ คือ หัวใจ ปอด หลอดลม และตับ มีการอักเสบจนถึงเป็นหนอง จากการเพาะเชื้อพบว่า เป็นเชื้อ *Pasteurella multocida*. Deeb. B.J.: และคณะ (1990) รายงานว่า กระต่ายอายุ 10 เดือน 75% ติดเชื้อ *Pasteurella multocida* ลูกกระต่ายอายุ 4-5 สัปดาห์ (Weaning) 25% พบ nasal infection ด้วย *Pasteurella multocida* การติดเชื้อของลูกกระต่ายนี้ติดมาจากแม่กระต่าย

วิธีการควบคุมโรคเพื่อลดอัตราการเกิด และการตายของโรคทางเดินหายใจของฝูงกระต่ายที่มีจำนวนมากนั้น ส่วนมากใช้วิธีการคัดทิ้ง ควบคู่ไปกับการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ทั้งสองวิธีเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ CHO. S.K.: และคณะ (1989) รายงานว่า การใช้วัคซีนที่ใช้เชื้อที่แยกได้จากเชื้อจากกระต่ายที่เป็นโรคทางเดินหายใจ สามารถป้องกันโรคได้ถึง 5 เดือนหลังจากฉีดวัคซีน 2 ครั้ง และยังพบว่ากระต่ายที่ฉีดวัคซีนจำนวน 300 ตัว กับกระต่ายที่ไม่ฉีด 300 ตัว อัตราการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจลดลงในฝูงกระต่ายที่ฉีดวัคซีน คือ ฝูงที่ฉีดวัคซีนเป็นโรคเพียง 5% ส่วนฝูงที่ไม่ฉีดวัคซีน เป็นโรคถึง 30%

อุปกรณ์

1. เชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เก็บจากตับกระต่ายที่ตายด้วยอาการของโรคสนัพเพิลของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
2. เชื้อพิษ เป็นเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เก็บจากกระต่ายของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
3. กระต่ายทดลองใช้กระต่าย อายุ 8-12 สัปดาห์ ของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

วิธีการ

1. นำเชื้อที่เก็บได้ไปทดสอบยืนยันทาง Biochemical test ว่าเป็นเชื้อ *Pasteure multocida* เก็บเชื้อที่ได้ใน 10% skim milk แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80°C.

2. การเตรียมวัคซีนชนิดเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลีน นำเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่ได้ไปผลิตวัคซีนชนิดเชื้อตาย (Formalinized) โดยเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DSA (Dextrose Starch agar) อบในตู้อบ 37°C. นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่ได้ 2 loopful แล้วเพาะลงใน Tryptose broth อบในตู้ 37°C. นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเพาะเชื้อลงใน Roux flask ที่มี Tryptose agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออบในตู้ 37°C. นาน 18-24 ชั่วโมง ล้างเชื้อออกด้วย Normal saline solution นับเชื้อมีจำนวน 7.76×10^{10} CFU/ml ฆ่าเชื้อด้วย 0.5% Formalin ทดสอบ Purity test, Sterility test, Safety test

3. เตรียมเชื้อพิษ โดยนำเชื้อที่เก็บไว้ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DSA ใน petridish อบในตู้ 37°C. นาน 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่ขึ้นแล้วจำนวน 15 Colony เพาะลงในอาหารเลี้ยงเหลว (Tryptose broth) 10 ml อบในตู้อบ 37°C. นาน 18 ชั่วโมง จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น นำเชื้อพิษไปฉีดกระต่าย กลุ่ม 1, 2 และ 3 ด้วยขนาดของเชื้อ 1.3×10^{8} CFU/ตัว

4. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนโดยทำดังนี้

แบ่งกระต่ายเป็น 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ตัว ฉีดวัคซีนขนาด 0.5 ซีซี.(7.76×10^{10} CFU/ml) เข้าใต้หนัง 4 ครั้ง คือ 0,7,14, และ 35 หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 21 วัน ฉีดเชื้อพิษทับ ขนาด 1.3×10^{8}/ตัว ดูผล 14 วัน
- กลุ่มที่ 2 จำนวน 12 ตัว ฉีดวัคซีนขนาด 0.5 ซีซี. (7.76×10^{10} CFU/ml) เข้าใต้หนัง 2 ครั้งคือ 0,14 วัน หลังจากฉีดวัคซีนครั้งสุดท้าย 21 วัน ฉีดเชื้อพิษทับขนาด 1.3×10^{8} CFU/ตัว
- กลุ่มที่ 3 จำนวน 5 ตัว ไม่ฉีดวัคซีน ฉีดเชื้อพิษทับในวันเดียวกับกลุ่มที่ 1, 2 ขนาด 1.3×10^{8} CFU/ตัว

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบทาง Biochemical test ของเชื้อ *P. multocida* ที่เก็บได้จากตับกระต่ายของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การทดสอบ	*P. multocida*	ตัวอย่างตับ
1. Motility at 22°C.	Negative	Negative
2. Catalase	Positive	Positive
3. Oxidase	d	d
4. Growth on MacConkey agar	Negative	Negative
5. Growth on KCN	Positive	Positive
6. Carbohydrates,acid form		
arabinose	d	d
lactose	d	d
maltose	d	d
mannitol	Positive	Positive
raffinose	Negative	Negative
salicin	Negative	Negative
sucrose	Positive	Positive
trehalose	d	d
xylose	d	d
7. Nitrate reduced	Positive	Positive
8. Indole	Positive	Positive
9. Gelatin hydrolysis	Negative	Negative
10.Urease	d	d

d = positive or delayed

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Purity test, Sterility test และ Safety test ของวัคซีนเชื้อตายสนัพเพิล

ถารทดสอบ	ผล	หมายเหตุ
1. Purity test	ผ่าน	-
2. Sterility test	ผ่าน	-
3. Safety test	ผ่าน	กระต่ายทดลองไม่มีอาการผิดปกติ

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายสนัพเพิลในกระต่ายทดลองกลุ่มต่าง ๆ

	ป่วย	ตาย	เปอร์เซนต์รอด	วิการที่พบ
กลุ่มที่ 1 กระต่าย 12 ตัว	0 (0%)	0 (0%)	100%	ไม่มี
กลุ่มที่ 2 กระต่าย 12 ตัว	0 (0%)	0 (0%)	100%	ไม่มี
กลุ่มที่ 3 กระต่าย 5 ตัว	5(100%)	4 (80%)	20%	Rhinitis, tracheitis, pneumonia myocarditis

กลุ่มที่ 1 กระต่าย 12 ตัว (100%) ไม่แสดงอาการป่วยหลังจากฉีดเชื้อพิษ จากการผ่าชากทั้ง 12 ตัว ไม่พบวิการของโรคระบบทางเดินหายใจ

กลุ่มที่ 2 กระต่าย 12 ตัว (100%) ไม่แสดงอาการป่วยหลังจากฉีดเชื้อพิษ จากการผ่าชากทั้ง 12 ตัว ไม่พบวิการของโรคระบบทางเดินหายใจ

กลุ่มที่ 3 กระต่าย 5 ตัว หลังจากฉีดเชื้อพิษกระต่ายทั้ง 5 ตัว แสดงอาการป่วย คือ ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก และกระต่าย 4 ตัว (80%) ตาย จากการผ่าชากกระต่ายทั้ง 5 ตัว พบวิการของโรค Pasteurellosis คือหลอดลมอักเสบ myocarditis และ puenmonia

วิจารณ์และสรุปผล

การทดลองในครั้งนี้ตัวอย่างที่เก็บจากตับของกระต่ายเมื่อนำมายืนยันทาง Biochemical test พบว่าเป็นเชื้อ *Pasteurella multocida* (Cowan.S.T.,1981) จากตารางที่ 1 และเมื่อมาทำเป็นวัคซีนเชื้อตายโดยมีจำนวนเชื้อขนาด $3.8x10^{10}$ CFU/ตัว พบว่ากระต่ายที่ฉีดวัคซีนทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ฉีดวัคซีน 4 ครั้ง กับกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง เมื่อฉีดเชื้อพิษทับแล้วไม่มีตัวใดแสดงอาการป่วยในขณะที่กลุ่มที่ 3 กระต่ายทุกตัวแสดงอาการป่วย (100%) และตาย 80% แสดงว่าวัคซีนสามารถสร้างภูมิคุ้มโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับ CHO,S.K.; และคณะ 1989 พบว่าวัคซีนเชื้อตาย (Formalinized Vaccine) ที่เตรียมจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซึ่งแยกจากกระต่ายที่เป็นโรคทางระบบทางเดินหายใจสามารถผลิตภูมิคุ้มโรคได้นานถึง 5 เดือน หลังจากฉีดวัคซีนเพียง 2 ครั้ง และอัตราการเกิดโรคทางเดินหายใจของกระต่ายที่ฉีดวัคซีนกับที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน เป็น 5 และ 30% ตามลำดับ ในขณะที่ Long,G.Y. และคณะ 1986 ใช้ 10^7 living cells ในการผลิตวัคซีนเชื้อเป็นสามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ในกระต่ายทดลอง

เนื่องจากกระต่ายที่มีอายุ 2-4 เดือน 50% ติดเชื้อ *Pasteurella multocida* จากธรรมชาติอยู่แล้ว (Deeb, B.J.; 1990) ทำให้กระต่ายในกลุ่มที่ 3 ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนอาจจะมีภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ จึงทำให้กระต่ายกลุ่มนี้ตายเพียง 80% Long,G.Y.และคณะ 1986 พบว่ากระต่ายที่เป็นโรคสนัพเพิล จะมีวิการหลอดลมอักเสบ หัวใจอักเสบ และปอดบวม ตามมา ซึ่งตรงกับการทดลองครั้งนี้ ที่พบว่ากระต่ายในกลุ่มที่ 3 ที่ฉีดเชื้อพิษทับอย่างเดียว จะมีวิการดังกล่าว (ตารางที่ 3) ในการฉีดเชื้อพิษ *Pasteuralla multocida* ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ขนาดเชื้อ $1.3x10^8$ CFU/ตัว ซึ่งเป็น 1000 เท่า ของ LD_{50} ซึ่ง AL-LEBBAN. Z.S. และคณะ (1988) พบว่า LD_{50} ของกระต่ายต่อเชื้อ $P._{1059}$ (turkey isolated) เป็น $10^{5.5}$ CFU

การทดลองครั้งนี้ สามารถเป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนโรคสนัพเพิลขึ้นใช้เองเพื่อลดอัตราการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจของกระต่ายในฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง และยังมีประโยชน์ทำให้สัตว์มีสุขภาพดีและให้ผลผลิตสูงขึ้น

REFERENCE

AL-LEBBAN. Z.S.; CORBEIL, L.B.; COLES, E.H. Rabbit pasteurellosis: induced disease and vaccination. American Journal of Veterinary Research (1988) 49 (3) 312-320 Coll. Vet. Med.; State Univ. Manhattan, KS 66506 USA.

CHO, S.K.; PARK, J.M.; KIM. J.Y.; YOON, Y.D. (Studies on the development of a combined vaccine for control fo snuffles (Pasteurella multocida, Bordetilla bronchiceptica infections in rabbits). Research Reports of the Rural Development Administration. Veterinary (1989) 31 (3) 29-37 Veterinary Research Institure, RDA, Anyang, Korea Republic.

Cowan. S.T.1981 : Pasteurellas and the pasteurella-live group. In : Text book of manual for the identification of medical bacteria. Cambridge university press P 93-95 2nd edition.

DEEB. B.J.; DIGIACOMO, R.F.; BERNARD, B.L.; SILBERNAGEL, S.M.: Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica infection in rabbits. Journal of Clinical Microbiology (1990) 28 (1) 70-75 Department of Comparative Medicine School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA.

LONG, G.Y.; LIANG, H.Z.; LIU, J.S.(Immunization of rabbits against Pasteurellosis). Chinese Journal of Veterinary Science and Technology. No. 2, 3-7 Lanzhou Vet Res. Inst; Acau. Agric Sci.; Lanzhou, Gansu, China.

บทความพิเศษ

เรื่อง

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (โรคคอบวม) ในโค กระบือ

เรียบเรียง โดย รัชนี อัตถิ

มารู้จักโรคนี้กันเถอะ

ในฤดูฝนบ้านเราสองข้างทางที่ถนนตัดผ่านในต่างจังหวัดเราจะได้เห็นสีเขียวชอุ่มของต้นไม้ใบหญ้า พร้อม ๆ กับ โค กระบือ ที่อ้วนท้วนสมบูรณ์ยืนและเล็มหญ้าอย่างมีความสุข แต่สิ่งที่มาพร้อมกับฤดูฝนนอกเหนือไปจากความอุดมสมบูรณ์ของพืชและสัตว์ก็ยังมีสิ่งที่เจ้าของสัตว์ไม่พึงปรารถนาตามมาด้วย หากไม่มีการป้องกันที่ดีพอ นั่นก็คือโรคระบาดสัตว์นั่นเอง โรคที่มีเกิดในช่วงฤดูฝนซึ่งอยู่ในราวเดือน สิงหาคม ถึงเดือน ตุลาคม ก็คือโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย หรือเรียกอีกอย่างว่า โรคคอบวม ใน โค กระบือ โรคนี้ถ้าจะเปรียบเทียบความโด่งดังกับโรคปากและเท้าเปื่อยแล้วก็เห็นจะดังไม่เท่า แต่ถ้าจะเปรียบเทียบกันด้วยความรุนแรงน่ากลัว และการสูญเสียทางเศรษฐกิจของโรคนี้ก็คงไม่แพ้กันเลย เพราะโรคนี้เมื่อสัตว์เป็นแล้วจะตายจำนวนสูงมาก จึงอยากจะแนะนำให้เกษตรกรผู้เป็นเจ้าของ โค กระบือ ได้ทำความรู้จักกับโรคนี้เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ และชีวิตของสัตว์เลี้ยงอันเป็นที่รักและจำเป็นของเกษตรกรเอง

โรคคอบวมและสาเหตุ

"โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย" หรืออีกชื่อหนึ่งตามภาษาง่าย ๆ ที่ชาวบ้านรู้จักทั่วไปคือ "โรคคอบวม" ซึ่งทั้งสองชื่อนี้เรียกขึ้นตามลักษณะอาการเด่นเฉพาะของสัตว์ป่วยก็คือ คอบวม และเกิดเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (Haemorrhagic Septicaemia) ซึ่งมีความหมายตามภาษาไทยว่า การติดเชื้อเข้ากระแสโลหิตแบบมีเลือดออก โรคคอบวมนี้เป็นโรคติดต่อชนิดเฉียบพลันของ โค กระบือ จัดเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 โรคหนึ่ง ดังนั้นเมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้นในท้องที่ใดจะต้องแจ้งเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ประจำอำเภอในจังหวัดนั้น เพื่อดำเนินการควบคุมป้องกันโรคต่อไป

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ชื่อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา (Pasteurella multocida) ซึ่งเชื้อนี้บางครั้งมีอยู่ที่เยื่อเมือกระบบหายใจ และระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของสัตว์หลายชนิดโดยธรรมชาติ โดยไม่ทำให้สัตว์เหล่านั้นแสดงอาการของโรค แต่เมื่อสัตว์อ่อนแอลงเนื่องจากการทำงานหนักเกินไป การเปลี่ยนอากาศ อากาศชื้นแฉะเกินไป หนาวเกินไป ขาดอาหาร และอื่น ๆ ที่ทำให้ความต้านทานโรคของสัตว์ลดลง เชื้อก็จะมีความรุนแรงขึ้นมาทำให้สัตว์เป็นโรคได้

การระบาดของโรค

โรคคอบวมนี้จะพบระบาดในหลายประเทศทางแถบเอเชียตอนใต้ และวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ไทย ลาว กัมพูชา ศรีลังกา นอกจากนี้ยังจะพบได้ในประเทศแถบทวีปอาฟริกา ฤดูที่เกิดก็มักจะเกิดในช่วงฤดูฝนตอนต้น สำหรับประเทศไทยเราก็จะอยู่ในช่วงเดือน สิงหาคม ถึงเดือน ตุลาคม ซึ่งเข้าใจว่าเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงของอากาศจากฤดูร้อนอันแห้งแล้งมาเป็นฤดูฝนอันชื้นแฉะ ทำให้สัตว์ปรับตัวไม่ทัน มีความต้านทานโรคลดลง นอกจากนี้สภาพคอกและโรงเรือนที่ อับชื้น สกปรก ไม่ถูกสุขลักษณะก็ล้วนแต่ทำให้ความต้านทานของสัตว์ลดลง เมื่อสัตว์ตัวหนึ่งตัวใดเกิดเป็นโรคคอบวมขึ้น ก็จะมีการติดต่อจากสัตว์ป่วยไปยังสัตว์ปกติอย่างรวดเร็ว

อาการและการติดต่อของโรค

ภายหลังจากสัตว์ได้รับเชื้อไม่ว่าจากทางใดทางหนึ่ง โรคนี้จะมีระยะฟักตัวประมาณ 2-5 วัน แต่ถ้าเชื้อรุนแรงมากระยะฟักตัวอาจจะเร็วขึ้นเป็น 1-2 วัน สัตว์จะเริ่มแสดงอาการไข้สูงมี น้ำมูก น้ำลายไหล คอบวมตั้งแต่บริเวณขากรรไกร ซึ่งบางครั้งบวมลงมาถึงบริเวณ ทรวงอก ไหล่ ขาหน้า หายใจลำบากเนื่องจากทางเดินหายใจถูกกด หายใจมีเสียง และบางครั้งมีอาการท้องร่วงร่วมด้วย จากนั้นสัตว์จะล้มลงนอนและตายเนื่องจากหายใจไม่ออกภายในเวลา 12 - 14 ชั่วโมง หลังจากแสดงอาการในกรณีที่เป็นชนิดเฉียบพลันมาก (Peracute) จนถึง 2-5 วัน ในรายที่เป็นชนิดเฉียบพลัน (Acute) กระบือจะเป็นโรคนี้ง่ายกว่าโค และมีความต้านทานต่อโรคต่ำกว่า โดยมากเมื่อกระบือป่วยจะตายเร็วและมักจะทำการรักษาไม่ค่อยทัน สิ่งขับถ่าย น้ำมูก น้ำลาย เลือด ของสัตว์ที่ป่วยและตายจะเต็มไปด้วยเชื้อที่ทำให้เกิดโรค ดังนั้นการติดต่อของโรคก็โดย

1. การสัมผัสกันโดยตรงระหว่างสัตว์ป่วยกับสัตว์ปกติ
2. การกินอาหารและน้ำที่มีเชื้อโรคปะปนอยู่
3. ลูกโคอาจติดโรคจากการกินนมแม่โคที่เป็นโรค

การวินิจฉัยโรคเบื้องต้น

เนื่องจากอาการของโรคค่อนข้างเป็นลักษณะอาการเฉพาะ ทำให้ง่ายต่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นในท้องที่ โดยจะสามารถวินิจฉัยโรคได้จากประวัติของโรค ช่วงเวลาเกิดโรค อาการป่วยและตายอย่างรวดเร็ว แต่ก็จะต้องมีการทดสอบยืนยันโดยการย้อมสีเชื้อจากเลือดสัตว์ป่วย และตรวจเชื้อทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม

จะทำอย่างไรเมื่อเกิดโรคขึ้น

ข้อควรปฏิบัติเพื่อควบคุมป้องกันโรคระบาด

ด้วยเหตุที่โรคนี้วินิจฉัยเบื้องต้นได้ไม่ยากจากอาการป่วยและการตายของสัตว์ ดังนั้น หากมีการปฏิบัติที่ถูกต้องก็จะสามารถควบคุมโรคได้รวดเร็ว โดยเกษตรกรเองก็สามารถมีบทบาทในการปฏิบัตินี้ได้ดังนี้ คือ เมื่อเจ้าของ โค กระบือ สังเกตุเห็นว่าสัตว์ของตนเริ่มแสดงอาการป่วยหรือตายด้วยอาการดังกล่าวข้างต้น หรือสงสัย ต้องรีบแจ้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง เช่น ปศุสัตว์อำเภอให้ทราบทันที เพื่อทำการวินิจฉัยโรค และไม่ควรชำแหละสัตว์ที่ตายแล้วนำเนื้อมารับประทานกันจนกว่าเจ้าหน้าที่ไปดำเนินการ ถ้าสัตว์ตายด้วยโรคนี้ก็ควรจะนำไปฝังลึก ๆ ไม่ควรชำแหละชาก เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดของโรครุนแรงขึ้น ส่วนเจ้าของสัตว์อื่น ๆ ในละแวกเดียวกันก็ให้สังเกตุอาการสัตว์เลี้ยงของตนว่าเริ่มแสดงอาการป่วยหรือไม่ ถ้าเริ่มป่วยก็ต้องแจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบ เพื่อทำการฉีดยารักษาเสียก่อน และแยกสัตว์ป่วยออกจากสัตว์ที่แข็งแรงดี และทำการฉีดวัคซีนให้สัตว์ที่ยังแข็งแรงนั้น

การรักษา

ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค การดูแลสัตว์ป่วยและรักษา ถ้ารีบทำเสียแต่ในระยะเริ่มแรกมักจะหาย ซึ่งยาที่ให้ผลดีก็คือ ยาปฏิชีวนะ เช่น เตตราซัยคลิน สเตร็พโตมันซิน จะให้ผลดีมาก ยกเว้นในรายที่อาการของโรครุนแรงแล้วเท่านั้น

การป้องกัน

ปัจจุบันวิธีการที่ดีที่สุด คือ การสร้างภูมิต้านทานโรคให้กับสัตว์ โดยการฉีดวัคซีนสัตว์เป็นประจำ ปีละ 2 ครั้ง วัคซีนที่ใช้ในบ้านเราปัจจุบันกรมปศุสัตว์เป็นผู้ผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ชนิดผสมอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ เจล ซึ่งให้ความคุ้มโรคนานประมาณ 6 เดือน

จึงขอให้เกษตรกรตระหนักถึงความสำคัญของการป้องกันโรค โดยการฉีดวัคซีนเป็นประจำก่อนเกิดโรคระบาดขึ้นมา เพราะโรคนี้ **เราป้องกันได้**