ศึกษาการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้หมดฤทธิ์ในการก่อโรค ด้วยส่วนผสมของไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1] ธนรัตน์ จานุกิจ[2] ไชยา สง่าประโคน[3]

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ (O_{189}) ให้หมดฤทธิ์ในการก่อโรคด้วยส่วนผสมของไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์ (BEI-FA) ขนาดความเข้มข้น 1 mM และ 0.04% เปรียบเทียบกับการทำให้หมดฤทธิ์ด้วยไบนารีเอททิลีนอีมีน (BEI) ขนาดความเข้มข้น 1 mM และฟอร์มัลดีไฮด์ (FA) ขนาดความเข้มข้น 0.04% พบว่า BEI และ BEI-FA สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ FA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการสูญหายของปริมาณ 146S แอนติเจน พบว่าการทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI, FA และ BEI-FA มีการสูญหายไป 52.04%, 46.61% และ 30.96% ตามลำดับ ดังนั้น BEI-FA จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยให้หมดฤทธิ์

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย การทำให้หมดฤทธิ์ ไบนารีเอททิลีนอีมีน ฟอร์มัลดีไฮด์ ส่วนผสมของไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์

---

[1]กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2]กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[3]กลุ่มทดสอบคุณภาพชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเชื้อตาย โดยเริ่มจากกระบวนการเพาะเลี้ยงไวรัส และเพิ่มปริมาณไวรัสจากเซลล์ BHK_{21} จนได้ความรุนแรงของเชื้อสูงตามเกณฑ์ที่กำหนด จากนั้นทำลายความรุนแรงของเชื้อไวรัส หรือการทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรค แต่ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้ร่างกายสร้างความคุ้มโรคได้ (inactivate) ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี ได้แก่ฟอร์มัลดีไฮด์ (FA) อะเซทิลเอททิลีนอีมีน (AEI) เบต้า-โพรพิโอแลคโตน (β-PL) และไบนารีเอททิลีนอีมีน (BEI) (พยนต์, 2547; Brown *et al*., 1963; Bahnemann, 1990) กระบวนการในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรคนับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด เดิมมีการใช้ FA ในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ แต่พบว่าไวรัสหมดฤทธิ์ได้อย่างไม่สมบูรณ์ เนื่องจากคุณสมบัติของ FA นอกจากจับกับโปรตีนของไวรัสแล้ว ยังสามารถจับกับโปรตีนทุกชนิดที่อยู่ในมีเดียที่เพาะเลี้ยงไวรัส FA จึงไม่สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสได้ทั้งหมด (Barteling and Woortmeyer, 1984) ยังมีไวรัสที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ในวัคซีน เมื่อนำไปฉีดในสัตว์ทำให้เกิดโรคได้ (vaccine break) แต่ FA ก็มีข้อดีคือ มีไวรัสสูญหายไปในระหว่างกระบวนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์น้อยมาก และเมื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนจะมีความคงตัว และมีอายุการใช้งานที่ยาวนานกว่าวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI (Rowlands *et al*., 1972)

ต่อมามีการใช้ AEI เป็นตัวทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ ซึ่งก็ให้วัคซีนที่ให้ภูมิคุ้มโรคสูง (Brown *et al*., 1963) เนื่องจาก AEI เป็นสารที่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้อง และต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ ปัจจุบันจึงพัฒนามาใช้สาร BEI ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ AEI แต่เสถียรกว่าที่อุณหภูมิห้อง และให้ภูมิคุ้มโรคสูงเช่นกัน เมื่อนำมาใช้ในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรคจะไม่เกิดการจับตัวกับโปรตีน ซึ่งจะสามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้เร็วและสมบูรณ์ แต่จะมีการสูญหายของปริมาณไวรัสในระหว่างกระบวนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ นอกจากนั้นวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI ยังมีอายุการใช้งานสั้นกว่าวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วย FA (Barteling and Cassim, 2004; Brown, 2002)

ดังนั้นเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงได้ทำการศึกษาทดลองใช้ส่วนผสมของ BEI และ FA ในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ในการก่อโรค เพื่อลดการสูญหายของไวรัสแอนติเจน ระหว่างกระบวนการทำให้หมดฤทธิ์ และยังทำให้หมดฤทธิ์ได้เร็วและสมบูรณ์ปลอดภัย คงคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรคที่นานมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมไบนารีเอททิลีนอีมีน (BEI)

เติม 2-bromoethylamine hydrobromide (BEA salt; เกลือ บี อี เอ) จำนวน 10.75 กรัม ลงใน 0.14 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มล. ในขวดขนาด 500 มล. ที่ฆ่าเชื้อโรคแล้ว จากนั้นปั่นด้วยแท่งแม่เหล็ก ที่ 37° ซ นาน 3 ชั่วโมง แล้ววัด pH ให้ได้ที่ 7.5-7.8 ถ้ามีการเปลี่ยนสีจากใสไม่มีสีเป็นสีส้มหรือสีม่วงต้องเตรียมใหม่ จะได้สารละลาย 0.1 M BEI และการเตรียม BEI นี้ จะต้องเตรียมก่อนการใช้งานเท่านั้น

การเตรียมส่วนผสมของไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์ (BEI-FA)

แบ่งสารละลาย 0.1 M BEI ปริมาตร 250 มล. แล้วเติม 37% FA 2.5 มล. ปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กที่ 37° ซ นาน 10 นาที จะได้สารละลายของ BEI-FA และการเตรียมสารละลายตัวนี้จะต้องเตรียมก่อนการใช้งานเท่านั้น

การเตรียม 20% โซเดียมไทโอซัลเฟต

เติมเกลือโซเดียมไทโอซัลเฟตปริมาณ 200 กรัม ลงในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 1,000 มล. แล้วปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กให้เข้ากัน แบ่งลงขวด 100 มล. จำนวน 10 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเพื่อการใช้งานได้นาน 6 เดือน

ตัวอย่างน้ำไวรัส

เพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไทป์โอ (O_{189}) ในเซลล์ BHK_{21} ชนิดแขวนลอยบ่มที่ 37° ซ นาน 20-24 ชั่วโมง เมื่อเกิด cytopathic effect (CPE) อย่างสมบูรณ์ นำน้ำไวรัสมาทำการแยกกากเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแบบต่อเนื่อง ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที อัตราการไหล 600 ลิตรต่อชั่วโมง และกรองด้วยเครื่องกรองแบบแท่งขนาดรูไส้กรองเท่ากับ 0.2 ไมครอน เก็บตัวอย่างน้ำไวรัสที่ได้หลังการกรองแล้วใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 ลิตร ขวดละ 400 มล. จำนวน 3 ขวด ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4-7.8 ด้วยไกลโคคอลบัฟเฟอร์ โดยใส่ประมาณ 4 มล. แต่ละขวดนำไปทำการทดลองทำไวรัสให้หมดฤทธิ์ด้วยสารเคมี 3 ชนิดคือ FA BEI และ BEI-FA โดยจะทำการทดลองซ้ำ จำนวน 5 ครั้ง

การทำไวรัสให้หมดฤทธิ์

จากตัวอย่างน้ำไวรัสจำนวน 3 ขวด ๆ ละ 400 มล. ข้างต้น นำมาทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์คือ

ขวดที่ 1 เติมสารละลาย 37% FA จำนวน 0.5 มล. ลงในตัวอย่างน้ำไวรัสเพื่อให้ได้ความเข้มข้น FA ในน้ำไวรัสเท่ากับ 0.04%

ขวดที่ 2 เติมสารละลาย 0.1 M BEI จำนวน 4 มล. ลงในน้ำไวรัสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ BEI ในน้ำไวรัสเท่ากับ 1 mM

ขวดที่ 3 เติมสารละลายของ BEI-FA จำนวน 4 มล. ลงในน้ำไวรัสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ BEI และ FA ในน้ำไวรัสเท่ากับ 1 mM และ 0.04% ตามลำดับ

นำตัวอย่างทั้ง 3 ขวด ไปกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่ 37° ซ นาน 24 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำไวรัสจากทั้ง 3 ขวด ปริมาตร 20 มล. ที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง หลังการทำให้หมดฤทธิ์ และเพื่อกำจัดสารส่วนเกินและเป็นการหยุดการทำงานของ BEI ต้องเติมสารละลาย 20% โซเดียมไทโอซัลเฟต ลงในตัวอย่างที่เก็บจากขวดที่ 2 และ 3 จำนวน 0.2 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1% แล้วจึงทำการแบ่งตัวอย่างใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มล. ทั้ง 3 ขวด โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80° ซ เพื่อหาปริมาณไวรัสที่มีชีวิตคงเหลือและปริมาณอนุภาคไวรัสแอนติเจน 146S ต่อไป

การทดสอบหาปริมาณของไวรัส

1. หาปริมาณไวรัสแอนติเจน โดยการหาปริมาณอนุภาคไวรัส 146S ด้วยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation (มนตรี และเชาวฤทธิ์, 2535) เพื่อดูความคงตัวของไวรัสแอนติเจน

2. หาปริมาณไวรัสโดยเพาะในเซลล์และอ่านค่า CPE เพื่อศึกษาการหมดฤทธิ์ของไวรัส หน่วยเป็น log 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/มล. โดยการคำนวณ (Reed and Muench, 1938)

ผล

ปริมาณอนุภาคไวรัส 146S แอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ (O_{189})

ค่าเฉลี่ยปริมาณอนุภาค 146S จากการทำให้หมดฤทธิ์ด้วยสารเคมี (ตามตารางที่ 1) นาน 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ มีดังนี้

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย FA มีค่า 4.28 3.46 3.22 2.50 และ 2.30 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 24 มีค่าลดลงจากชั่วโมงที่ 0 คิดเป็น 45.61%

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI มีค่า 4.30 3.36 2.98 2.54 และ 2.06 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 24 มีค่าลดลงจากชั่วโมงที่ 0 คิดเป็น 52.04%

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วยส่วนผสมของ BEI-FA มีค่า 4.08 3.58 3.38 3.16 และ 2.82ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 24 มีค่าลดลงจากชั่วโมงที่ 0 คิดเป็น 30.96%

ปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ (O_{189}) ($TCID_{50}$/มล.)

ค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสหลังทำให้หมดฤทธิ์ด้วยสารเคมี (ตามรูปที่ 1) นาน 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ มีดังนี้

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย FA มีค่า 6.22 3.98 3.50 3.30 และ 3.20 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI มีค่า 6.54 0.89 0 0 และ 0 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ

การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI-FA มีค่า 6.14 1.20 0 0 และ 0 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ

วิจารณ์

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจนที่ตรวจสอบได้จะมีปริมาณลดลงทั้งการทำให้หมดฤทธิ์ด้วย FA, BEI และ BEI-FA โดยจะมีปริมาณอนุภาค 146S ลดลงที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 45.61%, 52.04% และ 30.96% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทุกชนิดมีการลดลงของปริมาณอนุภาค 146S แต่การทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI-FA จะมีการลดลงน้อยกว่าการทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะมีการลดลงใกล้เคียงกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ FA โดยการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี t-test ($p=0.05$) (แอบ และสุนีจิต, 2546)

สำหรับค่า $TCID_{50}$ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการทำให้หมดฤทธิ์ด้วย FA โดยใช้ความเข้มข้น 0.04% นั้น ไม่สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง แต่จากรายงานของ Makarasen (1983) ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ของกรมปศุสัตว์ ระบุว่าใช้ 37% FA ในการทำไวรัสให้หมดฤทธิ์ในปริมาณ 0.5% ในวัคซีนโค-กระบือ และ 0.6% ในวัคซีนสุกรหรือความเข้มข้นสุดท้ายของ FA ในการทำให้หมดฤทธิ์เท่ากับ 0.185% และ 0.22% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37°ซ ใช้เวลา 24 ชั่วโมง แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ที่ 0.04% ต้องใช้เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง

ส่วนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ด้วย BEI และ BEI-FA พบว่าบางตัวอย่างไม่พบปริมาณไวรัส ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และทุกตัวอย่างไม่พบไวรัสในชั่วโมงที่ 12 ใกล้เคียงกับรายงานของ Barteling (2002) ที่พบว่าเมื่อใช้ BEI-FA จะทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ใน 8 ชั่วโมง

สรุป

การใช้ BEI-FA ในการทำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ (O_{189}) ให้หมดฤทธิ์ สามารถทำให้หมดฤทธิ์ได้ที่ 12 ชั่วโมง และปริมาณ 146S แอนติเจนมีการลดลงน้อยกว่าการใช้ BEI เป็นตัวทำให้หมดฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่างจากการใช้ FA ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ ที่ให้คำแนะนำ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในหน่วยผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือ ที่ช่วยจัดหาน้ำไวรัสสำหรับทดลองครั้งนี้ให้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในหน่วยทดลอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ช่วยในการทดสอบตัวอย่าง ทำให้การทดลองครั้งนี้ประสพผลสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

มนตรี มนต์มธุรพจน์ และเชาวฤทธิ์ บุญมาฑิต 2535 การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3 (1): 31-41

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14 (1): 1-64

แอบ คงทน และสุนีจิต คงทน 2546 การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 13(2): 40-48

Bahnemann, H.G. 1990. Inactivation of viral antigen for vaccine production with particular reference to the application for binary ethyleneimine. Vaccine. 8: 299-303.

Barteling, S.J. 2002. Development and performance of inactivated vaccines against foot-and-mouth disease. Res. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 21 (3): 577-588.

Barteling, S.J. and Cassim, N.I. 2004. Very fast (and safe) inactivation of foot-and-mouth disease virus and enteroviruses by a combination of binaryethyleneimine and formaldehyde. Dev. Biol. (Basel) 119: 449-455.

Barteling, S.J. and Woortmeyer, R. 1984. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus: Condition for the preparation of safe vaccine. Arch. Virol. 80: 103-117.

Brown, F., Hyslop, N.S.G, Crick, J. and Morrow, A.W. 1963. The use of acetyl-ethyleneimine in the protection of inactivated foot and mouth disease vaccine. J. Hyg. 61: 337-44.

Brown, F. 2002. Review inactivation of virus by aziridine. Vaccine. 20: 322-327.

Makarasen, P. 1983. FMD vaccine production in Thailand, Third country training programme on foot and mouth disease control (group training course) March 14-April 3, 1983. Department of Livestock Development, Thailand. pp. 148-161.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Rowlands, D.J., Sangar, D.V. and Brown, F. 1972. Stabilizing the immunizing antigen of foot-and-mouth disease virus by fixation with formaldehyde. Arch. Virol. 39: 274-283.

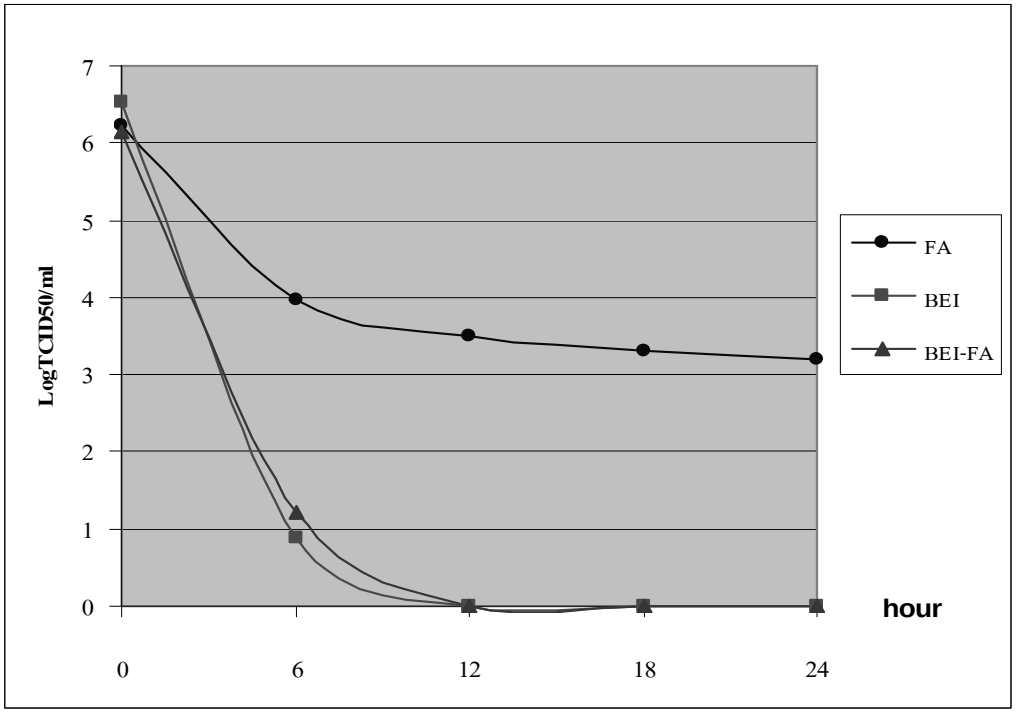
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยปริมาณ 146S ของแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMD) ไทป์โอ (O_{189}) หลังการถูกทำให้หมดฤทธิ์ด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (FA), ไบนารีเอททิลีนอีมีน (BEI) และส่วนผสมไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์ (BEI-FA) ในเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

Inactivation by	146S (μg/ml) of FMD type O_{189} (Mean ± SD)					% virus yield	% lost
	Inactivation time (hour)						
	0	6	12	18	24		
FA	4.28±0.54	3.46±0.22	3.22±0.23	2.50±0.32	2.30±0.23	54.39±8.64	45.61±8.64
BEI	4.30±0.44	3.36±0.42	2.98±0.58	2.54±0.62	2.06±0.62	47.96±13.09	52.04±13.09
BEI-FA	4.08±0.61	3.58±0.48	3.38±0.65	3.16±0.47	2.82±0.69	69.04±11.01	30.96±11.01

FA : 0.04% in virus fluid

BEI : 1 mM in virus fluid

BEI-FA : BEI 1 mM and FA 0.04% in virus fluid



รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย log $TCID_{50}$ ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMD) ไทป์โอ (O_{189}) หลังการถูกทำให้หมดฤทธิ์ด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (FA), ไบนารีเอททิลีนอีมีน (BEI) และส่วนผสมไบนารีเอททิลีนอีมีนและฟอร์มัลดีไฮด์ (BEI-FA) ในเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

Study on inactivation of foot and mouth disease virus by a combination of binary ethyleneimine and formaldehyde

Wacharee Sinsuwonkwat[1] Thanarat Janukit[2] Chaiya Sangaprakon[3]

Abstract

A study on inactivation of foot and mouth disease virus by using a combination of binary ethyleneimine and formaldehyde (BEI-FA) at the concentration of 1 mM and 0.04%, binary ethyleneimene (BEI) at the concentration of 1 mM and formaldehyde (FA) 0.04%. BEI and BEI-FA completely inactivated the virus in 12 hours while FA could not completely the virus in 24 hours. The loss of 146S antigen after inactivation by BEI, FA and BEI-FA were 52.04%, 45.61% and 30.96%, respectively. Therefore, BEI-FA is the most appropriate agent for FMDV inactivation.

Key words: foot and mouth disease virus, inactivation, BEI, FA, BEI-FA.

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

[2]Research section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

[3]FMD quality control section, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ผลการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ 2 และ 3 ครั้ง ในโคและสุกรที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน

วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์[1] ไชยา สง่าประโคน[1]

บทคัดย่อ

ผลการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ในโคและสุกร ที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ฉีด 2 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 0 และ 24) และการฉีด 3 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24) โดยดูระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัม และความคุ้มโรคจากการฉีดเชื้อพิษทับ ทำการเก็บเลือดทุก 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน โดยวิธี serum neutralization test พบว่าในโคและสุกรที่ฉีดวัคซีน 3 ครั้ง โคและสุกรมีระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดีสูงขึ้นมากหลังฉีดครั้งที่ 2 ใน 4 สัปดาห์ต่อมา และยังคงมีแอนติบอดีในระดับสูงระหว่างสัปดาห์ที่ 8-24 ผลการทดสอบความคุ้มโรคในโคและสุกรในสัปดาห์ที่ 30 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก โดยการฉีดเชื้อพิษทับที่ระดับความรุนแรง 10,000 BID_{50} และ 10,000 $TCID_{50}$ ตามลำดับ พบว่าโคและสุกรที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง มีความคุ้มโรคไม่ต่างกัน แต่ในสัตว์ที่ฉีดวัคซีนเพียง 2 ครั้ง มีความเสี่ยงการเกิดโรคหากมีการระบาดของโรค เนื่องจากมีระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดีต่ำในช่วงสัปดาห์ที่ 8-24 ดังนั้นเพื่อให้โคและสุกรที่ไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อนมีระดับแอนติบอดีเพียงพอต่อความคุ้มโรค ควรฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ให้แก่สัตว์หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ และฉีดครั้งที่ 3 เมื่อครบ 6 เดือน การฉีดวัคซีนตรงตามเวลาที่แนะนำสามารถกระตุ้นทำให้เกิดภูมิคุ้มโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โค สุกร การฉีดกระตุ้นซ้ำ

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

การฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้สัตว์ในพื้นที่เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคได้นั้น ในสภาวะปกติควรฉีดปีละ 2 ครั้ง (ทุก 6 เดือน) อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มั่นใจว่าสัตว์มีระดับภูมิคุ้มกันสูงพอในการป้องกันโรค แต่บางครั้งพบว่ามีการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยระบาดทั้งๆ ที่ได้รับวัคซีนแล้วก็ตาม ซึ่งการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจะให้ค่านิวทรัลไลเซชันแอนติบอดี (SN titer) สูงหลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ หลังจากนั้นก็จะเริ่มลดลง (Dannacher *et al.,* 1972; Sutmoller and Vieira, 1980) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์แนะนำการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้กับสัตว์ดังนี้ โค-กระบือฉีดเมื่ออายุประมาณ 6 เดือน สุกรฉีดเมื่ออายุ 2 เดือน และฉีดซ้ำ (booster) ระยะ 4 สัปดาห์หลังการฉีดครั้งแรกเพื่อกระตุ้นให้ระดับแอนติบอดีสูงขึ้น หลังจากนั้นให้ฉีดทุก 6 เดือน (กองผลิตชีวภัณฑ์, 2543)

อย่างไรก็ตามพบว่าในบางพื้นที่สัตว์ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเพียงครั้งเดียว ไม่มีการฉีดซ้ำตามข้อแนะนำในคู่มือการใช้วัคซีน เนื่องจากเหตุผลหลายประการ เช่น เกษตรกรเจ้าของสัตว์ไม่พร้อม สัตว์มีอายุน้อยเกินไป หรือการเข้าถึงพื้นที่ยากลำบาก ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ในโคและสุกร ที่ไม่เคยได้รับวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อน ระหว่างการฉีด 2 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 0 และ 24) และการฉีด 3 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24) โดยดูระดับแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อยในซีรัมของสัตว์ และความคุ้มโรคจากการฉีดพิษทับ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

1.1 โคลูกผสมพื้นเมืองไม่จำกัดเพศ อายุ 6-8 เดือน จำนวน 18 ตัว

1.2 สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 2 เดือน จำนวน 18 ตัว

โดยโคและสุกรไม่มีประวัติการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยมาก่อนและไม่มีแอนติบอดีต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้งไทป์โอ ไทป์เอ และไทป์เอเชียวัน

2. วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์สำหรับโค และสุกร

ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ซึ่งประกอบด้วยแอนติเจนไทป์โอ (O_{189}), ไทป์เอ (A_{118}) และไทป์เอเชียวัน โดยวัคซีนโคใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 2 มล. ส่วนวัคซีนสุกรใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 2 มล.

3. การฉีดวัคซีนและการเก็บตัวอย่างซีรัม

แบ่งโคและสุกรออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0 และ 24

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีน 3 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ฉีดวัคซีน

เจาะเลือดโคและสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ทุก 2 สัปดาห์ จนถึง 30 สัปดาห์ (0, 2, 4.... 30) รวม 16 ครั้ง เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี โดยวิธี serum neutralization test (SNT) โดยเจือจางเป็น 10 เท่าตามอนุกรม

4. การทดสอบความคุ้มโรคในสัปดาห์ที่ 30

4.1 โค ฉีดเชื้อพิษทับที่มีความรุนแรง 10,000 BID_{50} (50% bovine infective dose)/ตัว เข้าที่ลิ้น (Intradermolingual) ของโคแต่ละกลุ่ม ดังนี้ ฉีดเชื้อพิษไทป์โอจำนวน 2 ตัว ฉีดเชื้อพิษไทป์เอ จำนวน 2 ตัว และฉีดเชื้อพิษทับไทป์เอเชียวัน จำนวน 2 ตัว สังเกตอาการและวิการที่กีบเท้าทุกวันเป็นเวลา 8 วัน โดยโคที่มีความคุ้มโรคต้องไม่แสดงอาการและไม่มีวิการที่กีบเท้าทั้ง 4 กีบ และโคกลุ่มควบคุมต้องแสดงอาการและเกิดวิการที่กีบเท้าไม่น้อยกว่า 3 กีบ (OIE, 2008)

4.2 สุกร ฉีดเชื้อพิษทับที่มีความรุนแรง 10,000 $TCID_{50}$ (50% tissue culture infective dose)/ตัว เข้าที่กีบเท้าหน้าซ้ายบริเวณ Intracoronary band ของสุกรแต่ละกลุ่ม ดังนี้ ฉีดเชื้อพิษไทป์โอ จำนวน 2 ตัว ฉีดเชื้อพิษไทป์เอ จำนวน 2 ตัว ฉีดเชื้อพิษทับไทป์เอเชียวัน จำนวน 2 ตัว สังเกตอาการและวิการที่กีบเท้าทุกวันเป็นเวลา 10 วัน สุกรที่มีความคุ้มโรคต้องไม่แสดงอาการและไม่มีวิการที่กีบเท้าอื่นนอกจากกีบเท้าที่ฉีดเชื้อพิษ และสุกรกลุ่มควบคุมต้องเกิดวิการที่กีบเท้าอื่นอีกไม่น้อยกว่า 1 กีบ (OIE, 2008)

ผล

ระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ

ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) จากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ 2 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0 และ 24 พบว่าหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เพิ่มขึ้นและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (1.87, 1.37 และ 1.95 ตามลำดับ) และลดลงอยู่ในเกณฑ์ต่ำในสัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป เมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 24 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน เพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 26 เท่ากับ 2.66, 2.52 และ 3.00 ตามลำดับ (รูปที่ 1)

ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในโคที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ จำนวน 3 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24 พบว่าสัปดาห์ที่ 4 หลังฉีดวัคซีนครั้งแรก ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เพิ่มขึ้นและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (1.70, 1.48 และ 2.02 ตามลำดับ) เมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรกค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและอยู่ในระดับสูงจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ก่อนจะลดลงเป็นลำดับ และต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 24 (1.46, 1.14 และ 1.54 ตามลำดับ) และเมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 24 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน สัปดาห์ที่ 26 เท่ากับ 2.96, 2.96 และ 3.18 ตามลำดับ (รูปที่ 2)

ระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร

ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในสุกรที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร 2 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0 และ 24 พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 หลังฉีดวัคซีนครั้งแรก ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.74, 1.50 และ 1.62 ตามลำดับ สัปดาห์ที่ 24 จะมีค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และ

เอเชียวัน เท่ากับ 0.58, 0.68 และ 1.04 ตามลำดับ และเมื่อมีการฉีดวัคซีนซ้ำในสัปดาห์ที่ 24 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน ในสัปดาห์ที่ 26 จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.86, 2.44 และ 2.98 ตามลำดับ (รูปที่ 3)

ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (logSN titer) ในสุกรที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรจำนวน 3 ครั้ง ที่สัปดาห์ 0, 4 และ 24 พบว่าหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวันเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 (1.52, 1.40 และ 1.32 ตามลำดับ) เมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและคงอยู่ในระดับสูงจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ก่อนจะลดลงเป็นลำดับ และต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 24 (0.92, 1.42 และ 1.66 ตามลำดับ) และเมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 24 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ, เอ และเอเชียวัน ในสัปดาห์ที่ 26 จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.14, 2.52 และ 3.10 ตามลำดับ (รูปที่ 4)

ความคุ้มโรคต่อการฉีดเชื้อพิษทับ

เมื่อฉีดเชื้อพิษทับในโคและสุกรทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 30 ด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอ และเอเชียวัน พบว่า โคและสุกรที่มีการฉีดวัคซีน 2 ครั้ง และ 3 ครั้งทุกตัว ไม่แสดงอาการและไม่มีวิการของโรคปากและเท้าเปื่อย โคและสุกรกลุ่มควบคุมแสดงอาการและมีวิการของโรคปากและเท้าเปื่อยชัดเจน

วิจารณ์และสรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดี และเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ในโค โดย นพพร และคณะ (2543) พบว่าโคที่มีความคุ้มโรค 100% ต้องมีค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.83, 1.79 และ 2.16 ตามลำดับ และความคุ้มโรค 70% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.32, 1.20 และ 1.20 ตามลำดับ ดังนั้นระดับแอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนในโคทั้ง 2 กลุ่ม จะให้ความคุ้มโรคประมาณ 100% ต่อไวรัสไทป์โอ และเอเชียวัน ขณะที่ไทป์เอจะให้ความคุ้มโรคมากกว่า 70% และเมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 ในโคพบว่าระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 6-8 (รูปที่ 2) แล้วมีแนวโน้มลดลงเป็นลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pay (1984) ที่ระบุว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นภายใน 1 เดือนเมื่อได้รับการฉีดกระตุ้น ในช่วงระยะ 8-24 สัปดาห์ ระดับแอนติบอดีจะค่อย ๆ ลดลง แต่ยังสูงพอที่ให้ภูมิคุ้มกันโรคได้ทั้ง 3 ไทป์ ความคุ้มโรคต่อไวรัสไทป์โอและเอเชียวันมากกว่า 70% ไทป์เอให้ความคุ้มโรคประมาณ 70% (รูปที่ 2) ส่วนในกลุ่มที่ไม่มีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการฉีดครั้งแรก ระหว่าง 8-24 สัปดาห์ระดับแอนติบอดีจะลดลงมากกว่าแต่อยู่ในเกณฑ์ให้ความคุ้มโรคได้ ความคุ้มโรคไทป์โอ และไทป์เอเชียวันประมาณ 70% แต่ไทป์เอมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคได้ ความคุ้มโรคต่ำกว่า 70% (รูปที่ 1)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดี และเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคจากการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในสุกร โดย นพพร และคณะ (2543) พบว่าสุกรที่มีความคุ้มโรค 100% ต้องมีระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 1.89, 1.74 และ 1.41 ตามลำดับ และความคุ้มโรค 60% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.32, 1.20 และ 1.20 ตามลำดับ ดังนั้นระดับแอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนแก่สุกรทั้ง 2 กลุ่ม

จะให้ความคุ้มโรคมากกว่า 60% (รูปที่ 3 และ 4) แต่เมื่อมีการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรกในสุกร ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมที่ฉีดกระตุ้นให้สุกรมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น (Chung *et al.,* 2002) ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่ 6 มีค่าเท่ากับ 2.68, 3.36 และ 3.40 ตามลำดับ และให้ความคุ้มโรค 100% (รูปที่ 4) และสัปดาห์ที่ 24 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีต่อไทป์โอ เอ และเอเชียวัน เท่ากับ 0.92, 1.42 และ 1.66 ตามลำดับ ความคุ้มโรคต่อไวรัสไทป์เอ และเอเชียวัน มากกว่า 60% ไทป์โอ คุ้มโรคต่ำกว่า 60% ส่วนในกลุ่มที่ไม่มีการฉีดครั้งที่ 2 หลังฉีดครั้งแรก ระดับแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 24 เท่ากับ 0.58, 0.68 และ 1.04 ตามลำดับ ซึ่งให้ความคุ้มโรคต่ำทุกไทป์

ทั้งโคและสุกรที่ฉีดวัคซีนซ้ำในสัปดาห์ที่ 24 พบว่าระดับแอนติบอดีต่อทั้ง 3 ไทป์ จะถูกกระตุ้นให้สูงขึ้นอย่างชัดเจนได้ความคุ้มโรค 100% ผลจากการฉีดเชื้อพิษทับและระดับนิวทรัลไลเซชันแอนติบอดีให้ผลสอดคล้องกัน

จากผลการทดลอง สัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการฉีดครั้งแรก ระดับแอนติบอดีอยู่ในระดับต่ำเป็นเวลานาน (สัปดาห์ที่ 8-24) ทำให้มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคหากมีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อให้โคและสุกรที่ไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อนมีระดับแอนติบอดีเพียงพอต่อความคุ้มโรคควรฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ให้แก่สัตว์หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ และฉีดครั้งที่ 3 เมื่อครบ 6 เดือน การฉีดวัคซีนตรงตามเวลาที่แนะนำสามารถกระตุ้นทำให้เกิดภูมิคุ้มโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ช่วยในการตรวจสอบตัวอย่างซีรัมในการทดลองครั้งนี้จนงานสำเร็จเรียบร้อยไปด้วยดี และขอขอบคุณ น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา สำหรับคำแนะนำในการจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กองผลิตชีวภัณฑ์ 2543 คู่มือการใช้วัคซีนและแอนติเจน กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 68 หน้า

นพพร พัฒนประสิทธิ์ สมเกียรติ เพ็ชรวาณิชกุล และวิไล ลินจงสุบงกช 2543 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับนิวทรัลไลซิ่ง แอนติบอดี และเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและสุกร วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10 (1-2): 41-49

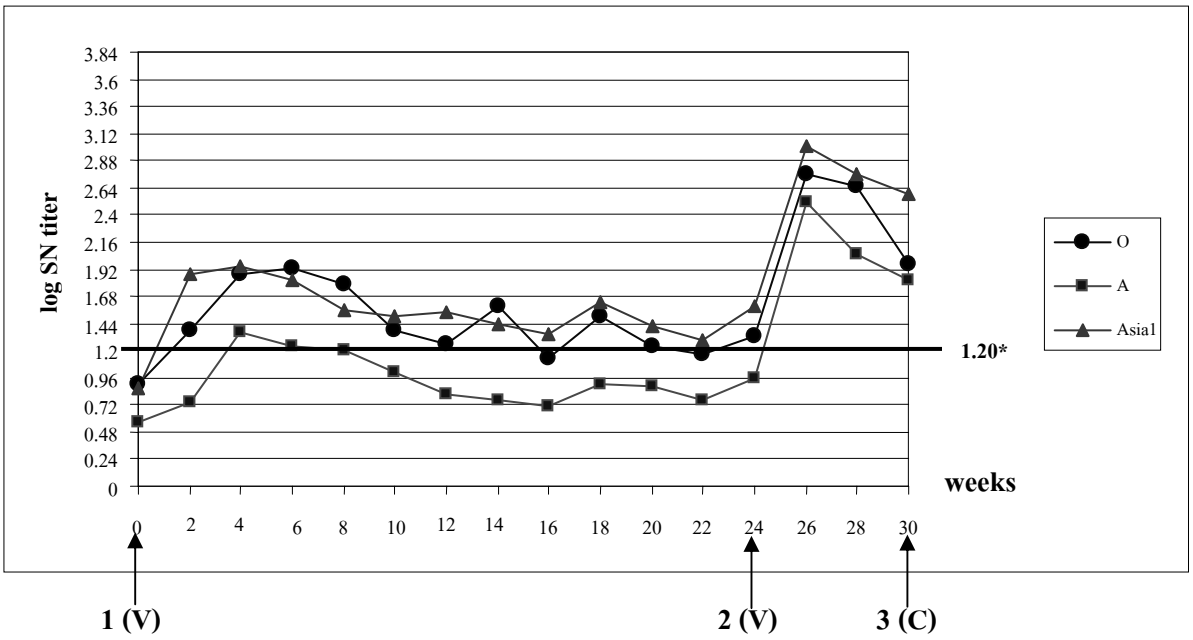
Chung, W.B., Liao, P.C., Chen, S.P., Yang, P.C., Lin, Y.L., Jong, M.H. and Sheu, T.W. 2002. Optimization of foot and mouth disease vaccination protocols by surveillance of neutralizing antibodies. Vaccine. 20: 2665-2670.

Dannacher, G., Fedida, M., Coudert, M. and Peillon, M. 1972. Duree'de I'immunite' Conferee' par la vaccination anti-aphteuse du proc. Bull. Off. Int. Epizoot. 77: 1100.

Office International des Epizooties. 2008. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 190-217. Available from http://www.oie.int/eng/normes/ manual/2008/pdf/ 2.01.05FMd.pdf [Accessed 19 December 2008].

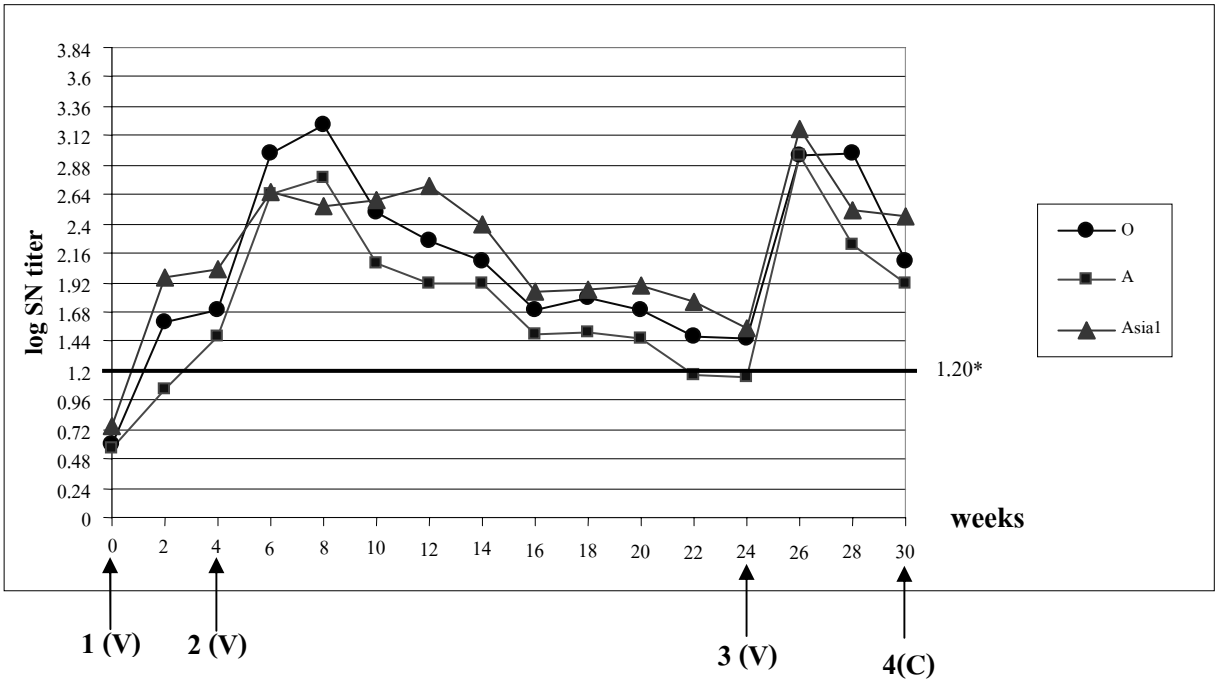
Pay, T.W.F. 1984. Factor influencing the performance of foot and mouth disease vaccine under field condition. Applied Virology. Academic Press. pp. 73-86.

Sutmoller, P. and Vieira, A. 1980. The relationship of neutralizing antibody titer for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. Biol. Cent. Panam. Fiebre Aphtosa. 57: 39-40.



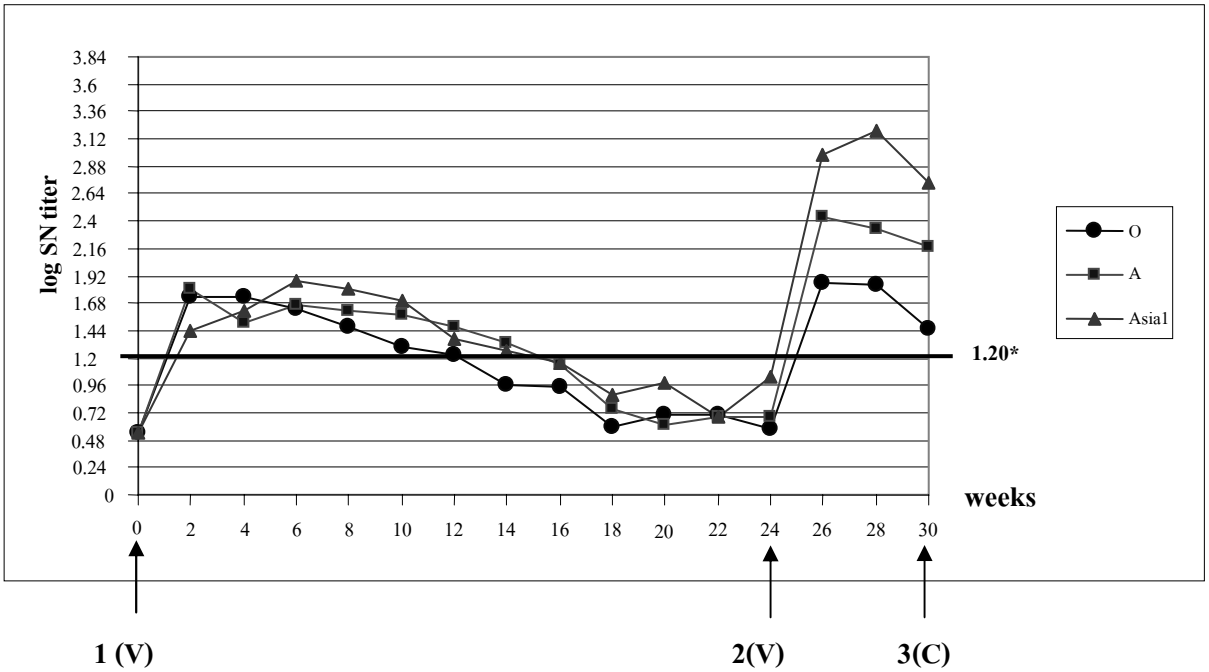
รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในโคที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ 2 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0 และ 24 (n=6)

* ค่าระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรค 70% (นพพร และคณะ, 2543), V = Vaccination, C = Challenge



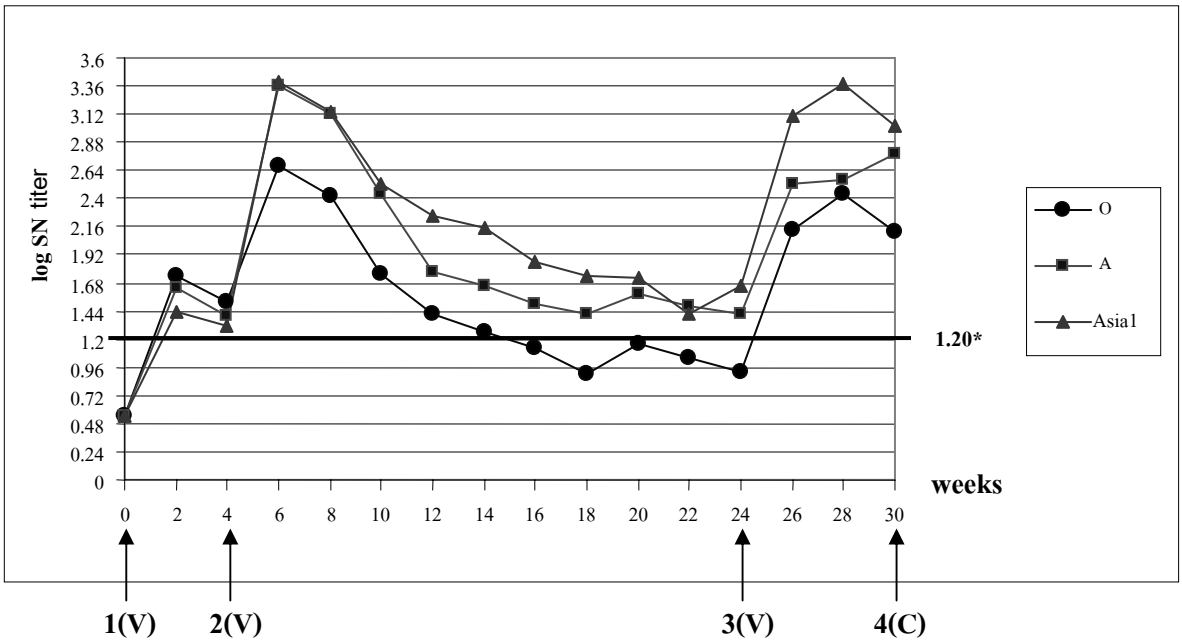
รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในโคที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ 3 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24 (n=6)

* ค่าระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรค 70% (นพพร และคณะ, 2543), V = Vaccination, C = Challenge



รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในสุกรที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ 2 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0 และ 24 (n=6)

* ค่าระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรค 60% (นพพร และคณะ, 2543), V = Vaccination, C = Challenge



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดี (log SN titer) ในสุกรที่ฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดไตรวาเลนท์ 3 ครั้ง สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 24 (n=6)

* ค่าระดับแอนติบอดีที่ให้ความคุ้มโรค 60% (นพพร และคณะ, 2543), V = Vaccination, C = Challenge

Results of vaccination of non-immune cattle and swine with trivalent FMD vaccine twice and three times

Wacharee Sinsuwonkwat[1] Chaiya Sangaprakhon[1]

Abstract

The result of vaccination of non-immune cattle and swine with trivalent FMD vaccine between twice (weeks 0 and 24) and three-time (weeks 0, 4 and 24) vaccination was compared by measuring of serum neutralization antibody to FMD and protection against challenge. Blood samples were collected every 2 weeks to determine antibody titers to FMDV type O, A and $Asia_1$ by serum neutralization test. Cattle and swine with three-time vaccination, the antibody titer increased sharply after the second vaccination at week 4 and the titer remained at high level during the weeks 8-24. Protection in cattle and swine against challenge at week 30 after first vaccination with 10,000 BID_{50} and 10,000 $TCID_{50}$, respectively, was similar in both twice and three-time vaccinated groups. However, twice vaccinated animals were at risk if there was an outbreak because their antibody titers were relatively low during the weeks 8-24. Thus, to ensure the animals have sufficient immunity to FMD, it is recommended that non-immune animals have a booster vaccine at 3-4 weeks after first vaccination followed by the third vaccination at 6 month. Vaccination of animals on schedule will stimulate host immune system effectively.

Key words: FMD vaccine, cattle, swine, booster

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

โรคกาฬโรคเป็ด หยุดได้อย่างไร?

(Duck Plaque: How to stop the disease?)

ปรีชา วงษ์วิจารณ์[1]

โรคกาฬโรคเป็ด (duck plague) เกิดจากเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส (herpesvirus) พบครั้งแรกในโลกที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2466 มีเป็ดป่วยตายเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทยเกิดการระบาดครั้งแรกที่จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อปี พ.ศ. 2519 มีเป็ดตายจากการระบาดครั้งนี้กว่า 850,000 ตัว โรคนี้อาการที่พบ คือ เป็ดป่วยขาไม่มีแรง อุจจาระไหล มีน้ำมูก มีขี้ตาและหนังตาบวม ตายภายใน 1-5 วัน อัตราการตาย 100% ซึ่งรุนแรงและสร้างความเสียหายอย่างมหาศาลแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ด

กรมปศุสัตว์ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ได้ศึกษาและพัฒนาการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเพื่อป้องกันโรคนี้เป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2519 และผลิตต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันนานกว่า 30 ปี ทำให้สามารถลดความเสียหายจากเป็ดป่วยตายด้วยโรคกาฬโรคเป็ดได้เป็นจำนวนมาก โดยเป็นวัคซีนทำแห้งบรรจุขวดละ 200 โด๊ส พร้อมน้ำยาละลาย 100 มล. ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.5 มล. โปรแกรมปกติได้แนะนำให้ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด เมื่อเป็ดอายุ 3-4 สัปดาห์ และฉีดซ้ำเมื่ออายุ 10-12 สัปดาห์ พ่อแม่พันธุ์ฉีดซ้ำทุก 6 เดือน

เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดในภาคกลางและภาคตะวันออกที่เลี้ยงเป็ดจำนวนมากเป็นฝูงใหญ่ ส่วนมากหรือเกือบทุกรายจะต้องทำวัคซีนป้องกันโรคกาฬโรคเป็ด แต่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เลี้ยงเป็ดน้อย รายละไม่กี่ตัวส่วนใหญ่ไม่ทำวัคซีนกาฬโรคเป็ด เมื่อเป็นโรคนี้ถึงแม้เป็ดตายหมด ความเสียหายไม่มากเพราะมีเป็ดจำนวนน้อย ในเขตที่เลี้ยงเป็ดหนาแน่น แม้ทำวัคซีนโรคกาฬโรคเป็ดก็ยังพบมีเป็ดป่วยตายด้วยอาการขาไม่มีแรง อุจจาระไหล หน้าบวม ซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงคาดว่าน่าจะเป็นอาการของโรคกาฬโรคเป็ด แต่ไม่ได้ส่งซากเป็ดตรวจพิสูจน์ แต่เคยพบว่ามีรายงานผลการชันสูตรซากเป็ดตายจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติว่ามีเป็ดป่วยตายด้วยโรคกาฬโรคเป็ดซึ่งเป็นเป็ดที่มีประวัติได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดไว้แล้ว ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจว่า มีปัญหาอะไรและควรได้รับการแก้ไขอย่างไร

สทช. เป็นผู้ผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเพียงผู้เดียวในประเทศไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญและความจำเป็นในการป้องกันโรคกาฬโรคเป็ด ได้ส่งทีมงานเพื่อพบปะเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดและเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ในพื้นที่เลี้ยงเป็ดภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 9 จังหวัด ในระหว่างเดือน เมษายน-กรกฎาคม 2553 เพื่อหาข้อมูลการใช้วัคซีนโรคกาฬโรคเป็ด พบข้อมูลจากผู้เลี้ยงเป็ดที่หลากหลายน่าสนใจ เช่น

- ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดครั้งแรกเมื่อเป็ดอายุ 14-15 วัน และฉีดซ้ำอีกเกือบทุกเดือน เพราะกลัวเป็ดเป็นโรคกาฬโรคเป็ด
- บางรายฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดรวมกับยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันโรค
- บางรายผสมยาปฏิชีวนะในน้ำยาละลายวัคซีนพร้อมการละลายวัคซีน
- บางรายใช้น้ำเกลือแทนน้ำยาละลายวัคซีน

---

[1] ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

- บางรายใช้วัคซีน 2 ขวดต่อน้ำยาละลาย 1 ขวดเพื่อให้วัคซีนเข้มข้น
- หลายรายพบเป็ดมีอาการคอบิด ชัก เดินกระตุกหน้ากระตุกหลัง ตาสีฟ้า พบเมื่อเป็ดอายุประมาณ 2 เดือน เป็ดตายประมาณ 3-5 % ฉีดยาปฏิชีวนะให้เป็ดไม่ป่วยเพิ่มอีก
- กรณีที่เลี้ยงเป็ดในเล้า จะฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดซ้ำอีกครั้งก่อนเข้าเล้าไข่ และฉีดซ้ำทุกๆ 3-4 เดือน เมื่อมีข่าวว่าเกิดโรคระบาดก็จะฉีดวัคซีนซ้ำอีก
- เมื่อพบเป็ดป่วยด้วยอาการขาไม่มีแรง และตาย ก็ทำการน็อกวัคซีน และพบว่ามีเป็ดรอดตายประมาณ 50%

หลายเรื่องดังกล่าวควรได้รับการอธิบายให้ผู้ใช้วัคซีนเข้าใจ เช่น โปรแกรมวัคซีนสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมและสภาพแวดล้อม หรือการใช้ยาปฏิชีวนะฉีดร่วมด้วยก็อาจเป็นประโยชน์ในการรักษาอาการของโรคแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรียแต่รักษาโรคกาฬโรคเป็ดโดยตรงไม่ได้ เพราะโรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัส รักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล ส่วนการใช้น้ำเกลือแทนสารละลายที่ได้ไปก็เป็นการสิ้นเปลือง เพราะน้ำยาละลายของวัคซีนก็เป็น 0.85% NaCl ซึ่งเป็นน้ำเกลือเช่นกัน สำหรับการมีเป็ดป่วยภายหลังการฉีดวัคซีนต้องเข้าใจว่า วัคซีนฉีดเพื่อป้องกัน ถ้าติดเชื้อโรคอยู่แล้วก็ไม่สามารถป้องกันได้ทัน และการฉีดวัคซีนทุกชนิดจะให้ได้ผลดี สัตว์ต้องมีสุขภาพดี ถ้าสัตว์ไม่แข็งแรง ผอม มีพยาธิ เมื่อฉีดวัคซีนร่างกายสัตว์จะไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มโรคได้สูงพอ และเมื่อเป็ดป่วยตาย ต้องส่งซากตรวจเพื่อทราบโรคที่แท้จริง เพราะมีหลายโรคที่อาการคล้ายกัน เช่น การป่วยเนื่องจากเชื้อรา อะฟลาทอกซิน (Aflatoxicosis) และโรคทางระบบหายใจ ซึ่งหลายเรื่องเหล่านี้ เจ้าหน้าที่ในท้องที่ควรจะเป็นผู้ให้ความกระจ่างแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดเพื่อความเข้าใจในเบื้องต้น

ด้านความต้องการซื้อวัคซีนของเกษตรกรได้รับคำตอบจำนวนมากว่า ซื้อวัคซีนได้ยาก ไม่ค่อยมีขาย ส่วนใหญ่ซื้อจากร้านค้าที่สั่งจากกรมปศุสัตว์และวัคซีนบริษัท แต่ทุกรายก็ยังคงเลี้ยงเป็ดต่อเพราะเป็นอาชีพที่มีรายได้เลี้ยงตัว เลี้ยงครอบครัวได้ โดยเฉพาะเป็ดไข่ เลี้ยงแบบไล่ทุ่ง เนื่องจากต้นทุนค่าอาหารต่ำ แม้เป็ดไข่ไม่ถึง 50% ก็อยู่ได้ มีปัญหายุ่งยากที่สามารถแก้ไขได้ ก็ทำการแก้ไข บางอย่างแก้ไม่ได้แต่พอทนอยู่ได้

ข้อมูลที่ได้รับจากเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ว่า เกษตรกรไม่มาซื้อวัคซีน ไม่จองวัคซีน จองวัคซีนแล้วไม่มารับวัคซีน มีปัญหาเรื่องสต็อกวัคซีน ที่เก็บวัคซีนไม่มี การจำหน่ายวัคซีนเป็นการเพิ่มภาระหน้าที่รับผิดชอบ ยุ่งยากในการรายงาน เพิ่มงาน เสี่ยงต่อความเสียหายในเรื่องการเงิน

ปัญหาจากผู้ผลิตวัคซีนที่ สทช. มีวัคซีนค้างในสต็อกจำนวนมาก ทางพื้นที่ไม่สั่งวัคซีน ผลิตวัคซีนได้ไม่เต็มกำลังการผลิตทั้งที่วัคซีนกาฬโรคเป็ดเป็นวัคซีนที่กระบวนการผลิตไม่ยุ่งยากและซับซ้อนมากนัก สามารถผลิตวัคซีนได้มีคุณภาพตามมาตรฐานสากลและปริมาณเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศได้

ข้อมูลที่ได้รับจากทั้ง 3 ฝ่าย คือ เกษตรกรเลี้ยงเป็ดผู้ใช้วัคซีน เจ้าหน้าที่ผู้กระจายวัคซีนและ สทช. ผู้ผลิตวัคซีน เห็นได้ว่าไม่ค่อยสอดคล้องและประสานกันอย่างราบรื่นนัก ดังนั้นจะยังคงเห็นเป็ดป่วยตายด้วยโรคกาฬโรคเป็ดและเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดได้รับความเดือนร้อนตลอดไป หากไม่ได้รับความร่วมมือและร่วมกันแก้ไขปัญหาอย่างจริงจัง เป็นเรื่องน่าเสียดายที่ผลผลิตจากเป็ดควรเพิ่มมากขึ้นกว่านี้ รวมทั้งวัคซีนกาฬโรคเป็ดสามารถผลิตได้มากกว่านี้เพื่อลดปริมาณการนำเข้า แต่ยังคงไม่สายเกินไป หากจะร่วมกันแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น

สทช. ขอเสนอแนวทางการแก้ไขปัญหาที่เป็นไปได้และทำได้ทันทีไม่ต้องลงทุนหรือใช้ทรัพยากรอื่นใดเพิ่มเติม เพียงแต่ขอให้ใช้สิ่งที่มีอยู่ให้เต็มที่และมีประสิทธิภาพ คือ

1. กรมปศุสัตว์ต้องกำหนดเป็นนโยบายอย่างชัดเจนให้เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่เลี้ยงเป็ดจำนวนมากในภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคเหนือตอนล่าง ให้ความสำคัญในการกำจัดโรคกาฬโรคเป็ดในพื้นที่
2. ฝูงเป็ดที่ขึ้นทะเบียนทุกฝูงต้องได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคกาฬโรคเป็ด
3. ให้ความรู้ที่ถูกต้องในการใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ด และมีการติดตามในพื้นที่
4. มีการกระจายวัคซีนกาฬโรคเป็ดในพื้นที่อย่างเพียงพอ
5. กรณีโรคกาฬโรคเป็ดเกิดระบาดในพื้นที่ต้องกำจัดให้โรคสงบโดยเร็ว

เมื่อทั้ง 5 ข้อได้รับการปฏิบัติอย่างจริงจัง เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดของประเทศไทยจะมีความสุขและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น เจ้าหน้าที่ของกรมปศุสัตว์จะได้รับความไว้วางใจจากเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ด ให้ทำหน้าที่ได้อย่างสมเกียรติให้ความเชื่อมั่นและเป็นที่พึ่งของเกษตรกร สมกับเป็นข้าราชการกรมปศุสัตว์ของประเทศไทย

การปรับปรุงการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม

กัญญา สุวินทรากร[1] วาสนา ภิญโญชนม์[2]
ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน[1] สุจิรา ปาจริยานนท์[2]

บทคัดย่อ

ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรมจำนวน 3 ชุด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 ด้วย growth medium (GM) ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium 0.94%, tryptose phosphate broth 0.295%, bacto peptone 0.5% และ N, N-Bis (2-hydroxyethyl) -2- aminoethane sulfonic acid 10 mM ที่อุณหภูมิ 37^0 ซ เมื่อเซลล์อายุ 7 วัน และเจริญเต็มพื้นที่เพาะเลี้ยง ใส่ working seed ไวรัส WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI และเพาะเลี้ยงด้วย GM ที่มี calf serum 1% ที่อุณหภูมิ 30^0 ซ (ตัดขั้นตอน absorb ไวรัส ที่ 37^0ซ นาน 2 ชั่วโมง) เก็บสต๊อคไวรัสวัคซีนหลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน และนำไปหาปริมาณไวรัส ในการเตรียมวัคซีนเพื่อบรรจุและทำแห้ง ใช้สต๊อคไวรัสวัคซีนผสมกับ stabilizer ในปริมาณเท่ากันโดยคำนวณให้มีปริมาณไวรัสวัคซีนไม่น้อยกว่า 4 log $TCID_{50}$/โด๊ส และทำการทดสอบคุณภาพวัคซีนทางห้องปฏิบัติการทั้ง 3 ชุด พบว่าวัคซีนผ่านตามมาตรฐานการทดสอบโดยมีปริมาณไวรัสวัคซีน 3.7 4.2 และ 3.5 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ และผลในสุกรทดลองพบว่ามีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคดี

การปรับปรุงการผลิตโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี calf serum 1% ในขั้นตอนเพาะเลี้ยงไวรัสและตัดขั้นตอนการ absorbไวรัส สามารถนำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดระยะเวลา ความยุ่งยาก และความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ

คำสำคัญ: CSFV สเตรน WPE$^-$/Th การปรับปรุง อุตสาหกรรม

---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่ายสเตรนไชน่าตั้งแต่ พ.ศ.2518 จนถึง 2553 ในปัจจุบัน วัคซีนชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงมีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่มีข้อจำกัดคือมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากกระต่าย มีขีดจำกัดในการผลิตไม่สามารถผลิตได้มากกว่า 20 ล้านโด๊สต่อปี เนื่องจากปัญหาทางเทคนิคและจำนวนกระต่ายรวมทั้งด้านจริยธรรมและจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองซึ่งควรหาสิ่งทดแทนการใช้สัตว์ นอกจากนี้การหาปริมาณไวรัสวัคซีนต้องใช้สุกรหรือเซลล์ตามวิธี FACCT-2 step (กัญญาและอนุทิน, 2534) ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยากไม่สามารถทำได้ทุกชุดทำให้ยากต่อการควบคุมมาตรฐาน

วาสนาและคณะ (2545) ได้พัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th (วัคซีน WPE$^-$/Th) ในเซลล์ไลน์ FS-L_3 (Sakoda and Fukusho, 1996) โดยใช้อาหารเลี้ยงไวรัสที่มีซีรัมลูกวัว (calf serum, CS) 5% ได้วัคซีนมีคุณภาพตามมาตรฐานให้ความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสุกรทดลอง (วาสนาและคณะ, 2546) แต่ในระดับฟาร์มมีสุกรแพ้วัคซีน 4.7-20% (สุดารัตน์และคณะ, 2546) จึงได้แก้ปัญหาการแพ้วัคซีนโดยใช้อาหารสำเร็จรูปปราศจากซีรัม (serum free medium, SFM) เป็นอาหารเลี้ยงไวรัสวัคซีน เมื่อผลิตวัคซีนได้วัคซีนที่มีคุณภาพมีความปลอดภัยในสุกรทั้งสุกรทดลองและสุกรระดับฟาร์ม (วาสนาและคณะ, 2548) และในโครงการเดียวกันมีโครงการย่อยที่ต้องนำวิธีการผลิตวัคซีนที่แก้ไขการแพ้นี้ ไปทดลองผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรมซึ่งสามารถผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปที่ผ่านตามมาตรฐานมีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในสุกรทดลอง (กัญญาและคณะ, 2548)

ในการผลิตเพื่อจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตและกระบวนการผลิตซึ่งสมควรได้รับการปรับปรุงคือการใช้ SFM และขั้นตอนการผลิตที่การ absorb ไวรัสวัคซีน เนื่องจาก SFM ที่นำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาเรื่องแพ้วัคซีนจากเดิมที่ใช้ CS 5% ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ growth medium (GM) SFM เป็นมีเดียมสำเร็จรูปที่มีคุณภาพดีแต่ไม่ระบุส่วนประกอบและต้องใช้ปริมาณมากรวมทั้งราคาสูงกว่ามีเดียมที่เตรียมขึ้นเองกว่า 5 เท่า จึงเป็นต้นทุนสูงและผูกขาด จากการศึกษาเบื้องต้นของกัญญา (2550) พบว่าเมื่อใช้ 1% CS ใน GM เพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีน ได้ปริมาณไวรัสสูง 7.05-7.40 log ของ 50% tissue culture infective dose/มล. ($TCID_{50}$/มล.) ซึ่งเป็นขนาดที่นำมาผลิตวัคซีนได้เนื่องจากมากกว่า 6 log $TCID_{50}$/มล. (กัญญาและคณะ, 2548) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไวรัส WPE$^-$/Th ด้วย GM ที่มี CS 1% สำหรับผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th ควรเป็นทางเลือกเพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้เนื่องจากเป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 อยู่แล้วเพิ่มเพียง CS 1% ส่วนขั้นตอนการ absorb ไวรัสวัคซีนไม่เหมาะต่อการผลิตจำนวนมากเพราะต้องเปิด-ปิดจุกขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละขวดหลายครั้ง ทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเมื่อใส่ไวรัสวัคซีนที่เข้มข้นแล้วนำเข้าตู้อบที่ 37^0 ซ นาน 2 ชั่วโมง ระหว่างนั้นต้องเกลี่ยทุก 15 นาที ซึ่งทำให้ยุ่งยากและเสียเวลาและจากรายงานการศึกษาเบื้องต้น (กัญญา, 2550) พบว่าปริมาณไวรัสวัคซีนจากการ absorb และไม่ absorb ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นขั้นตอนการ absorb จึงไม่จำเป็น

การศึกษาครั้งนี้เพื่อปรับปรุงจากวิธีการเดิมซึ่งกัญญาและคณะ(2548) ได้ศึกษาไว้โดยเปลี่ยนมีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีนสเตรน WPE$^-$/Th จากเดิม SFM เป็น GM ที่มี CS 1% และตัดขั้นตอนการ absorb ไวรัสวัคซีน แล้วดำเนินการผลิตวัคซีนระดับอุตสาหกรรมจำนวน 3 ชุดๆ ละ 100,000 โด๊ส เป็นวัคซีนสำเร็จรูป ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และในสุกรทดลองเพื่อได้วิธีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรน WPE$^-$/Th: ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ จาก master seed ชุดผลิตวันที่ 4 มิถุนายน 2547 มีปริมาณไวรัส 7.3 log $TCID_{50}$/มล.

เชื้อพิษอหิวาต์สุกร: ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เป็นเชื้อ Bangkok/1950 มีปริมาณไวรัส มล. ละ 8 log ของ 50% pig lethal dose (PLD_{50})

เซลล์ไลน์ FS-L_3: เป็นเซลล์ไตสุกรซึ่งไม่ต้องการซีรัมในการเจริญเติบโตของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ passage ที่ 31 เก็บสต๊อควันที่ 7 มิถุนายน 2547

อาหารเพาะเลี้ยง FS-L_3 : มีส่วนประกอบตาม Sakoda and Fukusho (1996) ใช้เป็นGM ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (MEM) 0.94%, tryptose phosphate broth (TPB) 0.295%, bacto peptone 0.5%, 10 mM N,N-bis (2-hydroxyethyl) 2-aminoethane sulfonic acid (BES), L-glutamine 0.292 มก/มล. และ sodium bicarbonate 2.25 มก/มล.

อาหารเพาะเลี้ยงไวรัส WPE$^-$/Th: GM ที่มี CS 1%

Stabilizer: Lactose 10% Polyvinyl pyrolidone 0.3% ในน้ำกลั่น

ยาปฏิชีวนะ: ประกอบด้วย Penicillin 20,000 ยูนิต/มล. และ Streptomycin 0.1 มก./มล.

สุกร: ปลอดภูมิคุ้มโรคอหิวาต์สุกรอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 45 ตัว

ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติก: flask ขนาด 225 ซม^2 จำนวน 20 ขวด/ชุด

ขวดบรรจุวัคซีน: ขวดแก้วทำแห้งขนาด 6 มล. จำนวน 30,000 ขวด พร้อมจุกยางและฝาแค๊ป

เครื่องมือวิทยาศาสตร์: ตู้อบอุณหภูมิ 37^0 ซ และ 30^0 ซ ตู้อุณหภูมิ -80^0 ซ และถัง liquid nitrogen

วิธีการ

เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3: ใน flask ขนาด 225 ซม^2 โดยเริ่มจากนำเซลล์ที่เก็บใน liquid nitrogen มาเพาะเลี้ยงใน flask ขนาด 25 ซม^2 และขยายอัตรา 1:4 ซึ่งไม่ต่ำกว่า 2.0 x 10^5 เซลล์/มล. (กัญญา, 2551) passage เมื่อเซลล์อายุ 7 วัน ซึ่งเจริญเต็มพื้นที่ ใส่ GM 100 มล. สำหรับ flask ขนาด 225 ซม^2 passage ต่อเนื่องสำหรับผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th ระดับอุตสาหกรรม ขนาด 100,000 โด๊ส จำนวน 3 ชุด (รูปที่1)

การเตรียม Working seed virus: เพื่อสต๊อคไวรัสสเตรน WPE$^-$/Th สำหรับผลิตวัคซีนจำนวน 3 ชุด จากการนำ master seed ไวรัสสเตรน WPE$^-$/Th มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ FS-L_3 จำนวน 2 ขวด ขนาด 225 ซม^2 ตามกัญญา (2551) เมื่อได้เป็น working seed virus บรรจุลงขวดละ 20 มล. เก็บรักษาที่ -80^0 ซ

การเตรียมวัคซีน WPE$^-$/Th: ตามวิธีของวาสนาและคณะ (2548) แต่ต่างกันที่การเพาะไวรัสใช้ GM ที่มี CS 1% แทน SFM และตัดขั้นตอนการ absorb ไวรัส คือการเพาะเลี้ยง FS-L_3 ด้วย GM และใช้ไวรัสวัคซีน WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 multiplication of infection (MOI) ใน GM ที่มี CS 1% ตามรูปที่ 2 โดยผลิตแบบ stationary จำนวน 3 ชุด

การผสมวัคซีน (vaccine formulation): นำ vaccine virus stock แต่ละชุดที่ละลายแล้วเจือจางด้วย GM ที่มี CS 1% (แทน SFM) และผสมกับ stabilizer อีก 1 ส่วน ได้เป็นวัคซีนพร้อมบรรจุ (bulk vaccine) ส่วนผสมต้องมีปริมาณไวรัสวัคซีนไม่น้อยกว่า 10^5 $TCID_{50}$/มล. ทำการบรรจุลงขวดทำแห้งขวดละ 1 มล. จำนวนชุดๆละประมาณ 10,000 ขวด เข้าทำแห้งนาน 25 ชม. วัคซีนสำเร็จรูปเก็บรักษาที่ 4^0 ซ ผลิตทั้งหมด 3 ชุด คือ 1/08 2/08 และ 3/08

การทดสอบคุณภาพของวัคซีนสำเร็จรูปทางห้องปฏิบัติการ

ทดสอบคุณลักษณะ (property test): เป็นวัคซีนชนิดแห้ง สีขาวนวล ละลายง่าย และไม่มีสิ่งแปลกปลอม

ทดสอบความเป็นสุญญากาศ (vacuum test): ทดสอบด้วย vacuum tester ต้องมีแสงสีม่วงภายในขวด

ทดสอบความชื้น (moisture test): โดยวิธี Karl Fisher (Council of Europe, 2005) ปริมาณความชื้นไม่เกิน 4%

ทดสอบความปนเปื้อน (sterility test): ทดสอบใน Thioglycollate broth และ Sabouroud broth ต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ทดสอบหาปริมาณไวรัสวัคซีน (virus content test): เจือจางตัวอย่างวัคซีน 10 เท่า โดยลำดับอนุกรม และหาปริมาณไวรัสโดยวิธี immunoperoxidase (สุจิราและคณะ, 2540) วัคซีนต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 2.3 log $TCID_{50}$/โด๊ส (ASEAN,1998)

การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูปในสุกรทดลอง (OIE, 2008)

ทดสอบความปลอดภัย (safety test): ใช้สุกรทดลอง จำนวน 3 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติ (วัคซีน 1 ขวดมี 10 โด๊ส และโด๊สปกติคือ 1 มล.) หลังฉีดวัคซีนสังเกตอาการและบันทึกอุณหภูมิร่างกายเช้าและเย็นนาน 14 วัน สุกรทุกตัวต้องไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ

ทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (potency test): ใช้สุกร 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขนาด 1/40 และ1/160 ของโด๊สปกติ ตามลำดับ หลังจากนั้นอีก 14 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษไวรัสอหิวาต์สุกรขนาดตัวละ 10^5 ของ 50% pig infective dose (PID_{50}) พร้อมสุกรควบคุมจำนวน 2 ตัว สังเกตอาการและบันทึกอุณหภูมิร่างกายเช้าและเย็นนาน 14 วันสุกรที่คุ้มโรคต้องรอดชีวิตโดยไม่แสดงอาการของโรคและคำนวณค่า 50% protective dose (PD_{50}) ต้องไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส

ผล

การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3: นำเซลล์ที่เก็บรักษาใน liquid nitrogen มาเพาะเลี้ยงเซลล์เจริญเติบโตได้ดี เริ่มเพาะ 4.7 X 10^5 เซลล์/มล. เมื่ออายุ 7 วันได้เซลล์ 1.6 X 10^6 เซลล์/มล. ได้ทำการเพิ่มขยายสำหรับผลิต working seed และสำหรับผลิตวัคซีนจำนวน 3 ชุดๆ ละ 20 ขวด flask ขนาด 225 ซม^2

การเตรียม working seed virus: จาก master seed ซึ่งมีปริมาณไวรัส 7.3 log $TCID_{50}$/มล. ได้ working seed virus ที่มีปริมาณไวรัส 7.8 log $TCID_{50}$/มล. บรรจุขวดละ 20 จำนวน 6 ขวด สามารถนำสต๊อคมาใช้ในการผลิตวัคซีนครั้งนี้ได้

การผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสด้วย working seed virus ขนาด 7.8 log $TCID_{50}$/มล. เพาะลงเซลล์ FS-L_3 ด้วยขนาด 0.1 MOI โดยไม่ absorb และใช้อาหารเพาะเลี้ยงไวรัสด้วย GM ที่มี CS 1% จำนวน 3 ชุด เพื่อผลิตวัคซีนได้ vaccine virus stock เป็น 1,850 มล. 1,950 มล. และ 1,600 มล. ตามลำดับ ผลการทดสอบ sterility ไม่พบการปนเปื้อนและมีปริมาณไวรัส 6.5 6.6 และ 6.3 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การเตรียม bulk vaccine จาก vaccine virus stock และผลิตวัคซีนสำเร็จรูป

เนื่องจาก vaccine virus stock มีบางส่วนสูญเสียระหว่างดำเนินการ ส่วนที่นำมาใช้จริงคือ 1,730 มล. 1,930 มล. และ 1,530 มล. ตามลำดับ

ส่วนประกอบใน bulk vaccine แต่ละชุดเพื่อบรรจุขวดทำแห้งชุดละประมาณ 10,000 ขวด โดยคำนวณให้มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 4 log $TCID_{50}$/โด๊ส หรือ 5 log $TCID_{50}$/มล. การผสมประกอบด้วย vaccine virus stock และ GM ที่มี CS 1% 1 ส่วนและ stabilizer 1 ส่วน ทั้งมียาปฏิชีวนะ 1% ทำการผสมแต่ละชุด (ตารางที่ 2) จากนั้นทำการบรรจุ และผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูป จำนวน 3 ชุด คือ ชุด 1/08 2/08 และ3/08

ผลการทดสอบวัคซีนสำเร็จรูปทางห้องปฏิบัติการ

ได้ผลิตวัคซีน WPE$^-$/Th สำเร็จรูปชนิดเชื้อเป็นแบบทำแห้ง จำนวน 3 ชุดคือ 1/08 2/08 และ 3/08 ได้ 103,050 103,000 และ 103,740 โด๊ส ตามลำดับ ทั้ง 3 ชุดผ่านการทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ โดยเป็นวัคซีนแห้งสีขาวนวลละลายง่าย ไม่มีสิ่งแปลกปลอม มีความเป็นสุญญากาศ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ตรวจหาความชื้นพบว่าเป็น 3.55% 3.71% และ 3.13% ตามลำดับ และมีปริมาณไวรัสวัคซีนเป็น 3.7 4.2 และ 3.5 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบวัคซีนสำเร็จรูปในสุกรทดลอง

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน: สุกร 3 กลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด๊สปกติ ของวัคซีนชุด 1/08 2/08 และ 3/08 ตามลำดับ ไม่พบอาการแพ้วัคซีน ไม่มีไข้และไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน: สุกรทดสอบวัคซีนแต่ละชุดที่ฉีดวัคซีนน้อยขนาด 1/40 และ 1/160 ของโด๊สปกติ ให้ความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง มีค่ามากกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งกัญญาและคณะ (2548) ที่ศึกษานำร่องได้ประสบความสำเร็จสามารถเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 และเพาะเลี้ยงไวรัสสเตรน WPE$^-$/Th ในปริมาณมากเพื่อผลิตวัคซีนและได้วัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน แต่มีความไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม คือการใช้ SFM ซึ่งไม่รู้ส่วนประกอบสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีน และขั้นตอนการ absorb ไวรัสวัคซีนนาน 2 ชม. ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้ออื่นเนื่องจากต้องเปิด-ปิดจุกขวดเพาะเซลล์หลายครั้งและเป็นขั้นตอนที่เสียเวลา

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ปรับปรุงวิธีผลิตเพื่อให้เหมาะสมสำหรับระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ GM ที่มี CS 1% เพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีนแทน SFM และตัดขั้นตอนการ absorb ไวรัสวัคซีน วิธีการปฏิบัติคือ ใส่ไวรัสวัคซีนสเตรน WPE$^-$/Th ขนาด 0.1 MOI ใน GM ที่มี CS 1% ในเซลล์ FS-L_3 อายุ 7 วัน และเพาะเลี้ยงในตู้อบ 30^0ซ ส่วนขั้นตอนอื่นทำเช่นเดียวกับกัญญาและคณะ (2548) ผลิตทั้งหมดจำนวน 3 ชุด เมื่อ harvest ได้ vaccine virus stock ที่มีปริมาณไวรัสวัคซีน 6.5 6.6 และ6.3 log $TCID_{50}$/มล. ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าของกัญญาและคณะ (2548) ที่ได้ 6.8 log $TCID_{50}$/มล. แต่กัญญา (2550) พบว่าวิธี absorb จะมีค่าสูงกว่าเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณไวรัสวัคซีนของ vaccine virus stock ที่สูงกว่า 6 log $TCID_{50}$/มล. สามารถนำไป formulation เป็น bulk vaccine เพื่อผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปได้ เนื่องจากตามมาตรฐานวัคซีนสำเร็จรูปกำหนดให้มีปริมาณไวรัสวัคซีนไม่น้อยกว่า 2.3 log $TCID_{50}$/โด๊ส (ASEAN,1998) หรือไม่น้อยกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส (OIE,2008) วัคซีนสำเร็จรูปเป็นวัคซีนทำแห้ง ได้จากการบรรจุ bulk vaccine จำนวน 1 มล. นำไปใช้สำหรับสุกร 10 โด๊ส (1 มล. = 10 โด๊ส) และการคำนวณคาดการณ์ปริมาณไวรัสวัคซีนของวัคซีนสำเร็จรูปคิดจากปริมาณไวรัสวัคซีนของ vaccine virus stock เผื่อสำหรับเจือจางอย่างน้อย 10 เท่า และเผื่อการสูญเสียระหว่างทำแห้งไม่เกิน 1 log (กัญญาและคณะ, 2548) คำนวณให้ได้ปริมาณเชื้อไวรัสวัคซีนไม่ต่ำกว่า 3 log $TCID_{50}$/โด๊ส ดังนั้นปริมาณไวรัสวัคซีนของ vaccine virus stock ทั้ง 3 ชุด สามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนสำเร็จรูปได้

ผลการทดสอบวัคซีนสำเร็จรูปทั้ง 3 ชุดคือ 1/08 2/08 และ 3/08 ทางห้องปฏิบัติการจะได้วัคซีนที่มีคุณลักษณะเนื้อนวลฟู มีความเป็นสุญญากาศ ความชื้นไม่เกิน 4% ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีปริมาณไวรัสวัคซีน 3.7 4.2 และ 3.5 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ สูงกว่ามาตรฐาน (ASEAN,1998; OIE,2008) อนึ่งก่อนเข้าทำแห้งได้เก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณไวรัสวัคซีนทั้ง 3 ชุด พบว่า เป็น 4.1 4.5 และ 3.6 log $TCID_{50}$/โด๊ส ตามลำดับ ดังนั้นความสูญเสียไวรัสวัคซีนระหว่างทำแห้งเพียง 0.1-0.4 log $TCID_{50}$/โด๊ส ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการผลิตต่อไป

สำหรับการทดสอบในสุกรทดลองของวัคซีนทั้ง 3 ชุดได้แก่ การทดสอบความปลอดภัยโดยใช้วัคซีนขนาด 10 เท่า ของโด๊สปกติ พบว่ามีความปลอดภัย สุกรไม่แสดงอาการป่วยหรือผิดปกติใด ส่วนการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (OIE, 2008) ที่ใช้ขนาด 1:40 โด๊สและ 1:160 โด๊ส พบว่าให้ความคุ้มโรคมากกว่า 100 PD_{50}/โด๊ส ซึ่งผ่านตามมาตรฐาน

ดังนั้นการปรับปรุงการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรน WPE$^-$/Th ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน FS-L_3 ในระดับอุตสาหกรรม โดยการใช้ GM ที่มี CS 1% ในขั้นตอนเพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีนสเตรน WPE$^-$/Th แทนการใช้ SFM ซึ่งไม่รู้ส่วนประกอบ มีราคาแพงกว่า และเป็นการผูกขาด ซึ่ง GM นี้ปกติใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 เพื่อเพิ่มจำนวนอยู่แล้ว และปรับปรุงในการตัดขั้นตอน absorb ไวรัสวัคซีน เพื่อลดโอกาสในการปลอมปนจากเชื้ออื่น เมื่อนำไปผลิตวัคซีนระดับอุตสาหกรรมแล้วนำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการและในสุกรทดลองพบว่าเป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพและได้มาตรฐาน ยังขาดเพียงการทดลองนำวัคซีนที่ผลิตนี้ไปใช้กับสุกรในท้องที่เพื่อศึกษาด้านความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนในระดับฟาร์มซึ่งมีจำนวนสุกรมากและสภาพตามที่นำวัคซีนไปใช้จริงซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กัญญา สุวินทรากรและอนุทิน หาญวีระพล 2534 การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไชน่าสเตรนชนิด ผ่านกระต่ายโดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชสารสัตวแพทย์ 21(2): 69-77

กัญญา สุวินทรากร วาสนา ภิญโญชนม์ ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และพิงพันธ์ เจริญสุระสถล 2548 การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับอุตสาหกรรม หนังสือรายงานการวิจัยการปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรน WPE$^-$/Th และการพัฒนาวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กษ. หน้า 32-68

กัญญา สุวินทรากร 2550 เกร็ดความรู้จากการพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 17(1): 23-30

กัญญา สุวินทรากร 2551 การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรในประเทศไทย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กษ. หน้า 37-47

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากร ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ และดุลยทัต คันธวร 2545 การพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาห์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง: รายงานการวิจัยการวิจัยและการพัฒนาวิธีวินิจฉัยควบคุมและป้องกันโรคอหิวาห์สุกรในประเทศไทย จัดพิมพ์โดยสำนักวิจัยและบริการวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 177-213

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ กัญญา สุวินทรากร และสุรพงษ์ อุดมพันท์ 2546 การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาห์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรน WPE$^-$/Th ในลูกสุกรทดลอง: รายงานการวิจัย ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ บางเขน กรุงเทพมหานคร หน้า 59-77

วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงวัฒนโภคิน สุจิรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากร สมโภชน์ ทับเจริญ บัณฑูรย์ ตระการวีระเดช วิวัฒน์ ชุณรักษา อภิเษก กองแก้ว และสมปรียา กองแก้ว 2548 การปรับปรุงคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th หนังสือรายงานการวิจัย

การปรับปรุงคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรนWPE$^-$/Th และการพัฒนาวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กษ. หน้า 6-30

สุจิรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน และวาสนา ภิญโญชนม์ 2540 การใช้โมโนโคนอลแอนติบอดีตรวจระดับแอนติบอดีโรคอหิวาต์สุกรโดยวิธีนิวทราลไลซิงเปอร์ออกซิเดสลิงค์ แอสเซ สัตวแพทยสาร 48(2): 27-33

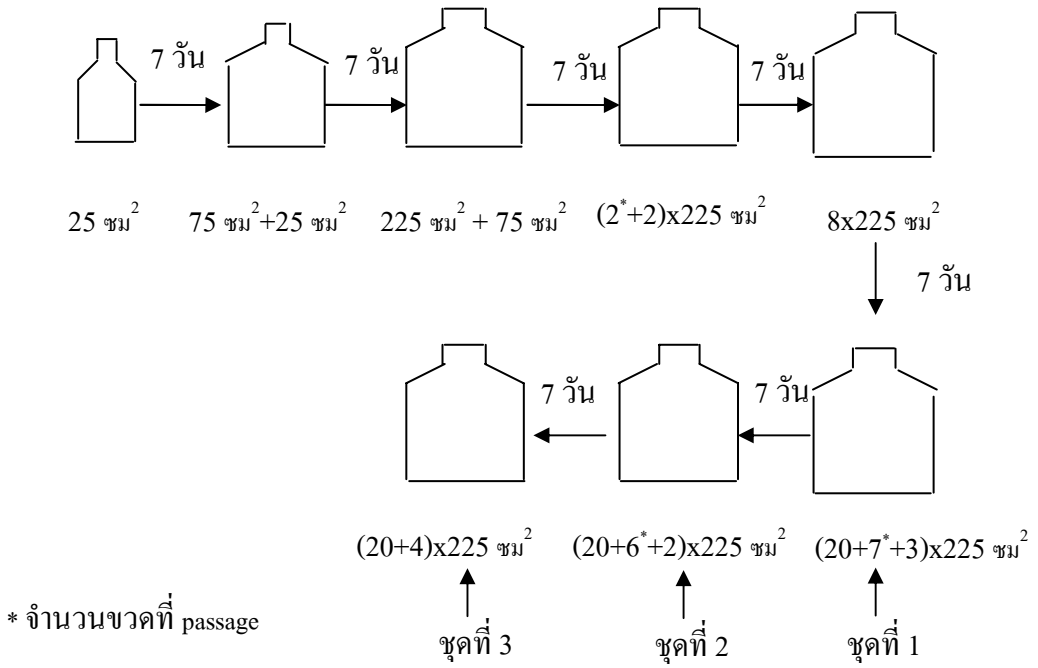
สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน วาสนา ภิญโญชนม์ สันนิภา สุรทัตต์ กัญญา สุวินทรากร ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ สุจิรา ปาจริยานนท์ สุรพงษ์ อุดมพันท์ อังสนา ฮ้อเจริญ บัณฑูรย์ ตระการวีรเดช พิทักษ์พงศ์ คุ้มศิริ ไชยา กฤษณะเกรียงไกร และสมชาติ เขียวคลี่ 2546 การประเมินคุณภาพของวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในระดับฟาร์ม จัดพิมพ์โดย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กษ. หน้า 11-57

ASEAN. 1998. ASEAN standard requirement for swine fever vaccine (cell culture origin). *In* Manual of ASEAN standards for animal vaccines, Livestock publication series No. 2A. Jakarta, Indonesia. pp. 66-67.

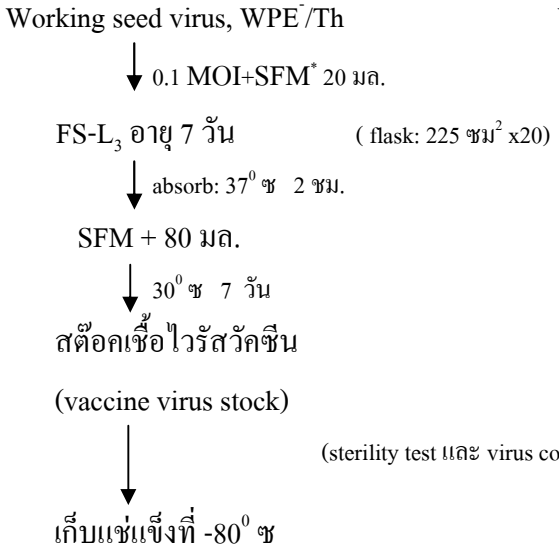
Council of Europe. 2005. Water: Semimicro determination. *In* European pharmacopaeia, 5th ed. Aubin Liguge, France. pp. 130-131.

Office International des Epizooties. 2008. Classical swine fever (hog cholera). *In* Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 4 th ed. Paris, France. Chapter 2.8.3. pp. 1092-1104.

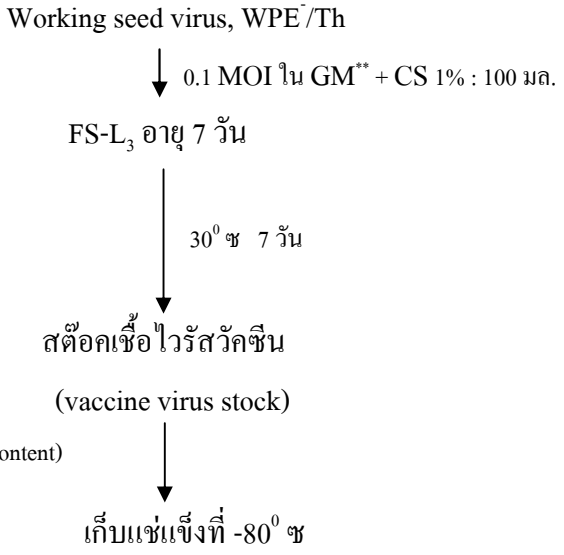
Sakoda, Y. and Fukusho, A. 1996. Establishment and characterization of porcine kidney cell line FS-L_3 which forms unique multicellular domes in serum free culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 34: 53-57.



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L_3 เพื่อผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th จำนวน 3 ชุด



รูปที่ 2 ก. วิธีผลิตไวรัสวัคซีนโดยใช้ SFM และมี absorb



รูปที่ 2 ข. วิธีการผลิตไวรัสวัคซีนโดยใช้ GM + CS 1% และไม่ absorb

(sterility test และ virus content)

* SFM: serum free medium เป็นอาหารสำเร็จรูปไม่มีซีรัม

** GM + CS 1% : growth medium ที่ผสม calf serum 1%

ตารางที่ 1 ปริมาตร vaccine virus stock จำนวน 3 ชุด และผลการทดสอบจากการเพาะเลี้ยงไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรน WPE^-/Th ขนาด 0.1 MOI ในเซลล์ $FS\text{-}L_3$ โดยไม่ absorb และใช้ growth medium ที่มี calf serum 1%

vaccine virus stock (ชุดที่)	ปริมาณสต๊อค (มล.)	ผลการทดสอบ	
		sterility test	virus content
1/08	1,850	-ve	6.5 log $TCID_{50}$/มล.
2/08	1,950	-ve	6.6 log $TCID_{50}$/มล.
3/08	1,600	-ve	6.3 log $TCID_{50}$/มล.

-ve : ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ

ตารางที่ 2 การผสมเป็น bulk vaccine เพื่อเตรียมบรรจุเป็นวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE^-/Th ชุด 1/08 2/08 และ 3/08

ชุด	virus titer (log $TCID_{50}$/มล.)	vaccine virus stock (มล.)	growth medium + calf serum 1% (มล.)	stabilizer + ยาปฏิชีวนะ 1% (มล.)	bulk vaccine	
					ปริมาตร (มล.)	virus titer (log* $TCID_{50}$/มล.)
1/08	6.5	1,730	3,770	5,500	11,000	5.7
2/08	6.6	1,930	3,570	5,500	11,000	5.8
3/08	6.3	1,530	3,970	5,500	11,000	5.4

* เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณปริมาณไวรัสวัคซีนใน bulk vaccine

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงสเตรน WPE$^-$/Th ในห้องปฏิบัติการและในสุกรทดลอง

	รายการทดสอบ	การตัดสิน	ชุด		
			1/08	2/08	3/08
1	คุณลักษณะทั่วไป	ตามมาตรฐาน[1]	✓	✓	✓
2	ความเป็นสุญญากาศ	เป็นสุญญากาศ	✓	✓	✓
3	ปริมาณความชื้น (%)	ไม่เกิน 4%	3.55	3.71	3.13
4	ไม่ปนเปื้อนจากเชื้ออื่น	ไม่พบแบคทีเรียและเชื้อรา	✓	✓	✓
5	ปริมาณไวรัส (log $TCID_{50}$/โด๊ส)[2]				
	5.1 ก่อนทำแห้ง	ไม่ต่ำกว่า 4.0	4.1	4.5	3.6
	5.2 วัคซีนสำเร็จรูป	ไม่ต่ำกว่า 2.5	3.7	4.2	3.5
6	ความปลอดภัย	ไม่แสดงอาการผิดปกติ	✓	✓	✓
7	ความคุ้มโรค (PD_{50}/โด๊ส)[3]	$\geq$ 100	✓	✓	✓
	สรุป		ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
	จำนวนวัคซีนสำเร็จรูป (โด๊ส)		103,050	103,900	103,740

✓ : วัคซีนผ่านมาตรฐานตามเกณฑ์ตัดสิน

[1] : เป็นเค้ก เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีสิ่งปลอมปน

[2] : วัคซีน 1 มล. มี 10 โด๊ส

[3] : 50% pig protective dose

Improvement of large scale production of classical swine fever tissue culture vaccine, WPE$^-$/Th strain

Kunya Suvintarakorn[1] Wasana Pinyochon[2]
Ritluachai Poosungnoen[1] Sujira Parchariyanon[2]

Abstract

Three batches of large scale classical swine fever tissue culture vaccine WPE$^-$/Th strain were produced by growing FS-L_3 cells in growth media (GM) consisting of 0.94% Eagle's minimum essential medium, 0.295% tryptose phosphate broth, 0.5% bacto peptone and 10 mM of N, N-Bis (2-hydroxyethyl) -2-aminoethane sulfonic acid at 37^0 C for 7 days. After confluent monolayer was observed, 0.1 MOI of WPE$^-$/Th in GM containing 1% calf serum was inoculated onto FS-L_3 cells and incubated at 30^0 C (without absorption step). The vaccine stock was harvested after 7-day incubation and determined for virus titer. The vaccine stock was mixed with an equal volume of stabilizer, bottled and freeze dried. The virus content in the vaccine must not less than 4 log $TCID_{50}$/dose. Laboratory testing of vaccine quality showed the vaccine passed standard requirements and the virus content in the vaccines was 3.7 4.2 and 3.5 log $TCID_{50}$/dose respectively. The vaccines were safe and protected against virus challenge in experimental pigs.

The improvement of vaccine production by propagation of the vaccine virus in the medium supplemented with 1% calf serum and no absorption step can be applied for large scale production which will reduce production cost, time and contamination.

Key words: classical swine fever, tissue culture vaccine, WPE$^-$/Th, improvement, industry

---

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Department of livestock Development, Pakchong, Nakhonratchasima, 30130

[2] National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok, 10900

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและการควบคุมป้องกันโรค

(Haemorrhagic Septicaemia and control measures)

สพ.ญ.รัชนี อัตถิ[1]

บทนำ

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียหรือโรคคอบวมเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงโค กระบือ ในประเทศไทย เมื่อเกิดโรคในสัตว์ที่ไม่เคยมีภูมิคุ้มกันโรคมาก่อนสัตว์จะแสดงอาการป่วยรุนแรง การแพร่โรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาไม่ได้ผลดีทำให้จำนวนสัตว์ป่วยและตายสูง ระดับความสูญเสียจากการเกิดโรคขึ้นกับสภาพของสัตว์ พื้นที่การเลี้ยงและการป้องกันโรค ดังนั้นการควบคุมป้องกันโรคจึงมีความสำคัญ ปัจจุบันยังคงพบการระบาดของโรคซึ่งมักเป็นในสัตว์ที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน นักวิชาการเกษตรกรผู้เลี้ยงและผู้เกี่ยวข้องจึงควรตระหนักถึงความสำคัญของโรคนี้ การเรียบเรียงบทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียสำหรับผู้ที่สนใจ ประกอบด้วยข้อมูลพื้นฐาน สถานการณ์โรคและมาตรการควบคุมป้องกันโรคที่เป็นปัจจุบัน

ความรู้เรื่องโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียเป็นโรคระบาดสัตว์ตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 เป็นโรคระบาดชนิดรุนแรงทั้งในระยะเฉียบพลัน และระยะเรื้อรัง ของโคและกระบือ พบการระบาดส่วนใหญ่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ อัฟริกา และพบบ้างในยุโรปตอนใต้และตะวันออกกลาง ลักษณะเฉพาะของโรคคือ สัตว์มีไข้สูง เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด หายใจหอบ คอบวมและตายภายในเวลาไม่ถึง 24 ชั่วโมง หลังจากแสดงอาการ กระบือมีความไวรับต่อโรคมากกว่าโค สัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ สุกร แพะ แกะ ช้าง ม้า ลา อูฐ กวาง ฯลฯ ติดเชื้อได้เช่นกัน แต่พบน้อยและอาการของโรคไม่รุนแรงเท่าในโคและกระบือ

<u>สาเหตุ</u>

เกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2 และ E:2 เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe ติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น หรือแท่งสั้นค่อนข้างกลม ขนาด 0.2-0.4 x 0.6-2.5 μm ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เชื้อที่อยู่ในร่างกายสัตว์ เช่น ในเนื้อเยื่อ สารคัดหลั่ง หรือเชื้อจากการเพาะเลี้ยงใหม่ๆมักจะอยู่เป็นเซลเดี่ยว หรือเป็นคู่ มีรูปร่างเป็น coccobacilli มีแคปซูล ซึ่งย้อมดูได้ด้วยสี ย้อมแคปซูลทั่วไป เช่น India ink หรือ Maneval staining และเชื้อติดสีเข้มที่หัวและท้าย เมื่อย้อมด้วยสีแกรม หรือ methylene blue (รูปที่ 1)

การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *Pasteurella multocida* มี 3 วิธี ดังนี้

1) Indirect hemagglutination test แบ่ง capsular antigen เป็น 5 ชนิด คือ A, B, D, E และ F

2) Agglutination test แบ่ง somatic antigen เป็น 11 ชนิด คือ 1-11

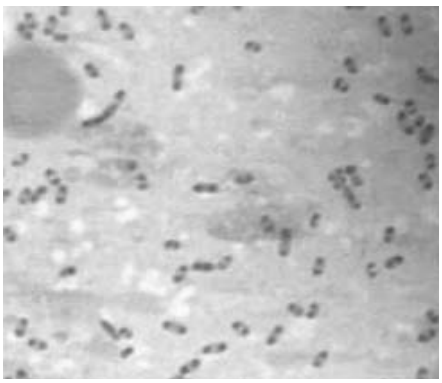
---

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

3) Agar gel precipitation test แบ่ง somatic antigen เป็น 16 ชนิด คือ 1-16

ปัจจุบันนิยมใช้วิธีที่ 3) Agar gel precipitation test ในการจำแนกชนิดของ somatic antigen และการเรียกชื่อซีโรไทป์ จะเรียกชนิดของ capsular antigen ก่อนตามด้วยชนิดของ somatic antigen

ในทวีปเอเชียเชื้อก่อโรคเป็นซีโรไทป์ B:2 เท่านั้นส่วนในทวีปอัฟริกาพบทั้งซีโรไทป์ B:2 และ E:2 บางครั้งจึงเรียกซีโรไทป์ B:2 เป็น Asian type และเรียก ซีโรไทป์ E:2 เป็น African type นอกจากนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 มีรายงานในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และออสเตรเลียพบว่า ซีโรไทป์ B:3, B:4 และ B:3,4 สามารถก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียได้ในโค และในสัตว์ป่า เช่น กวาง (elk และ fallow) และวัวกระทิง โดยแสดงอาการเหมือนโค และกระบือที่ติดเชื้อในซีโรไทป์ B:2 และ E:2



รูปที่ 1 lung impression smear จากกระบือตายด้วยโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ย้อมสี methylene blue พบเชื้อ *Pasteurella multocida* ติดสีเข้มที่หัวและท้าย

<u>การติดต่อ</u>

โรคนี้ติดต่อได้จากการสัมผัสโดยตรงระหว่างสัตว์สุขภาพดี และสัตว์ป่วย หรือสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค การรับเชื้อโดยการกินหรือการหายใจเอาเชื้อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของสัตว์

1. แหล่งก่อโรค

1.1 เชื้อที่อยู่นอกร่างกายสัตว์

เชื้อ *Pasteurella* spp. มีชีวิตอยู่นอกร่างกายสัตว์ได้ไม่นาน ยกเว้นในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง เชื้อจึงจะมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น มีการทดลองใส่เชื้อในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่นาน 2-3 สัปดาห์ และมีการทดลองในทำนองเดียวกันแต่ใส่เชื้อในดินโคลนจากนาข้าวแล้วให้ดินโคลนนั้นถูกแสงแดด พบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่ได้เพียง 2-3 ชั่วโมง และอีกการทดลองหนึ่งใส่เชื้อในโคลนจากปลักควาย หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงไม่พบเชื้อมีชีวิต สำหรับสิ่งรองนอน หรือหญ้าในแปลงที่ได้รับเชื้อใหม่ๆอาจเป็นแหล่งก่อโรคได้ แต่ยังไม่มีรายงานการยืนยันการพบเชื้อ

1.2 เชื้อที่อยู่ในร่างกายสัตว์

ซากสัตว์ที่ตกลงในแม่น้ำหรือทางน้ำไหลจะพาเอาเชื้อไปเป็นแหล่งแพร่ระบาดอย่างดี เชื่อกันว่า

เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในเนื้อเยื่อสัตว์ และพบเชื้อมีชีวิตอยู่ในซากสัตว์ที่ตายได้นาน 2-3 วัน ดังนั้นถ้าไม่มีการกำจัดซากสัตว์อย่างถูกต้อง ซากสัตว์เหล่านั้นก็เป็นแหล่งก่อโรคได้

1.3 สัตว์ที่เป็นพาหะ

การระบาดของโรคอาจเกิดขึ้นเมื่อมีการนำสัตว์ที่เป็นพาหะโรคหรือสัตว์ที่ติดเชื้อแอบแฝงโดยไม่แสดงอาการเข้ามาอยู่ในฝูง เมื่อสัตว์มีความต้านทานลดลงด้วยสาเหตุต่างๆ เช่น ความเครียดจากการขนส่งหรือการเปลี่ยนแปลงของอากาศอย่างกะทันหัน เชื้อซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณ nasopharynx และต่อมทอนซิล ก็จะมีความรุนแรงขึ้นและถูกขับออกมาทางสารคัดหลั่งจากจมูกและปากทำให้สัตว์ปกติติดเชื้อได้

2. ทางติดเชื้อในสัตว์

สัตว์มีการติดเชื้อทางธรรมชาติโดยการหายใจหรือการกิน ซึ่งต้องใช้เชื้อจำนวน 10^7-10^{12} CFU จึงจะทำให้สัตว์เป็นโรคได้ แต่จากการทดลองสเปรย์เชื้อเข้าทางจมูกและการให้กินไม่สามารถระบุจำนวนเชื้อที่ทำให้สัตว์แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงต่างๆได้ การทดลองให้สัตว์เป็นโรคด้วยการฉีดเชื้อเข้าใต้ผิวหนังด้วยปริมาณเชื้อระหว่าง 10^4-10^7 CFU จะให้ผลคงที่กว่า และพบว่าการติดเชื้อทางการหายใจและทางปากทำให้ระยะเวลาของการเป็นโรคยาวนานกว่าการติดเชื้อโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ซึ่งก่อให้เกิดโรคอย่างรวดเร็ว ระยะเวลาเป็นโรคสั้นและไม่ค่อยพบวิการหรือพยาธิสภาพ

<u>อาการในโค และกระบือ</u>

ซึม มีไข้สูง ไม่กินอาหาร มีน้ำมูกน้ำลายไหล เมื่อมีอาการหนักขึ้น สัตว์จะล้มลงนอน เคลื่อนไหวร่างกายลำบาก หายใจลำบาก แสดงอาการหอบ คอบวมซึ่งเป็นอาการเฉพาะของโรคนี้ เนื่องจากมีการบวมน้ำจากใต้คางปไปถึงหน้าอก (รูปที่ 2) บางครั้งลามไปถึงบริเวณไหล่และขาหน้าทั้งสองข้าง โดยเฉพาะกระบือซึ่งมีความไวต่อโรคมากกว่าโค มักพบการบวมที่ลามเป็นบริเวณกว้าง นอกจากนี้อาจพบบ้างที่มีการบวมน้ำทุกส่วนของร่างกาย ส่วนใหญ่สัตว์ตายอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน หลังแสดงอาการ โรคมักเกิดในพื้นที่ที่การลี้ยงสัตว์เป็นลักษณะปล่อยตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อสัตว์เป็นโรคมักจะไม่ทันเห็นอาการป่วย แต่จะพบหรือได้รับรายงานการตายอย่างกะทันหัน

รูปที่ 2 กระบือเป็นโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียมีอาการหายใจลำบาก คอบวม และตาย

<u>ระยะฟักตัวของโรค</u>

ประมาณ 2-3 วัน ทั้งนี้อาจเร็วกว่านี้ขึ้นกับทางติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายสัตว์

ระยะเวลาของการเป็นโรค

ช่วงเวลาที่สัตว์แสดงอาการของโรคมีความแตกต่างกันขึ้นกับทางติดเชื้อ

มีการทดลองศึกษาระยะฟักตัวและระยะเวลาการเป็นโรคในลูกโค อายุ 4-10 เดือน และกระบือ อายุ 7-12 เดือน โดยให้ติดเชื้อด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังและให้ทางธรรมชาติ พบมีความแตกต่างดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระยะฟักตัวและระยะเวลาของการเป็นโรคในสัตว์ที่ได้รับเชื้อโดยทางต่างๆ

ทางติดเชื้อ	ระยะฟักตัว	ระยะเวลาเป็นโรค
การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	1-14 ชั่วโมง	2-3 ชั่วโมง
การกิน	24-30 ชั่วโมง	14-19 ชั่วโมง
ทางเดินหายใจ	ไม่มีข้อมูล	25-110 ชั่วโมง
การสัมผัสทางธรรมชาติ	46-80 ชั่วโมง	19-70 ชั่วโมง

การดำเนินของโรค

อาจแบ่งตามลักษณะอาการที่แสดงเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1:

สัตว์เริ่มมีไข้ ซึม ไม่กินอาหาร อุณหภูมิร่างกายสูง 40-41 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิจะสูงอยู่ตลอดระยะเวลาเป็นโรค ยกเว้นในช่วงสุดท้าย หรือ 2-3 ชั่วโมง ก่อนตาย อุณหภูมิร่างกายจะลดลงต่ำกว่าระดับปกติ

ระยะที่ 2:

เป็นอาการทางระบบหายใจ สัตว์ป่วยเริ่มหายใจเร็ว 40-50 ครั้งต่อนาที หายใจลำบาก มีน้ำมูก น้ำลายไหล คอบวมบริเวณใต้ขากรรไกร ในช่วงแรก น้ำมูกใส และระยะท้ายน้ำมูกจะขุ่นขึ้นและเป็นหนองไหลออกมา

ระยะที่ 3:

สัตว์จะนอนหมอบ หายใจหอบแรงขึ้น เริ่มล้มตัวลงนอน และแสดงอาการต่างๆในระยะสุดท้ายของอาการ septicemia ส่วนใหญ่สัตว์ตาย 100 %

ความรุนแรงของโรค แบ่งเป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. ชนิดเฉียบพลันมาก (Peracute)

การดำเนินของโรคทั้ง 3 ระยะ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยสัตว์ป่วยมีอาการ น้ำมูก น้ำตาไหล หายใจขัด มีไข้สูง ไม่กินอาหาร เยื่อเมือกสีแดงเข้มและอาจมีเลือดออก มีการบวมน้ำบริเวณคอ หัว ทรวงอก อวัยวะสืบพันธุ์ และบริเวณทวารหนัก ล้มลงนอนและตายภายใน 12-24 ชั่วโมง หลังแสดงอาการ

2. ชนิดเฉียบพลัน (Acute)

สัตว์ป่วยมีอาการทางปอด คือหายใจขัดและแสดงอาการปอดบวม บางตัวอาจแสดงอาการท้องร่วง มีเลือดปน นอกจากนี้มีไข้สูง ไม่กินอาหาร สัตว์จะตายภายใน 2-3 วัน

3. ชนิดเรื้อรัง (Chronic)

สัตว์ป่วยชนิดเรื้อรังพบได้ในสัตว์ที่เคยได้รับวัคซีนแต่ความต้านทานโรคไม่สูงพอ สัตว์ป่วยจะมีฝีที่ปอดและอาจมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 เดือน จึงตาย ไม่ค่อยพบว่ากระบือเป็นโรคชนิดเรื้อรัง

อาการในช้าง

ช้างติดโรคเฮโมรายิกเซพติซีมียได้ เคยมีรายงานการพบช้างป่าในประเทศศรีลังกาป่วยและตายด้วยโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียครั้งแรกในปี พ.ศ. 2508 และต่อมาในปี พ.ศ. 2525 ซึ่งการเกิดโรคทั้งสองครั้งพบเมื่อมีอุบัติการเกิดโรคในโคและกระบือ โดยเชื้อที่ตรวจพบเป็นซีโรไทป์เดียวกัน ช้างเลี้ยงจึงมีความเสี่ยงต่อการติดโรคนี้จากโค กระบือได้เช่นกัน โดยเฉพาะช้างเลี้ยง ที่อยู่ในแหล่งที่มีโค และกระบือเป็นโรค การติดเชื้ออาจมาจากแหล่งน้ำซึ่งโค และกระบือเป็นโรคแพร่เชื้อสู่แหล่งน้ำ

ช้างที่ติดเชื้อจะมีอาการป่วยกะทันหัน เช่น มีไข้สูง บวมบริเวณลำคอ ลิ้นและปากบวม หายใจลำบาก น้ำลายไหลยืด บางครั้งมีอาการท้องผูก อุจจาระมีมูกเลือด ลูกช้างที่เป็นโรคมีอัตราการตายสูงกว่าช้างที่โตเต็มที่

อาการในคน

การติดเชื้อในคนพบน้อยมากส่วนใหญ่คนติดเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์อื่นจากการถูกสัตว์เลี้ยง เช่น แมว ข่วนหรือกัด ซึ่งส่วนใหญ่พบการติดเชื้อในต่างประเทศ

สำหรับประเทศไทย มีรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรคชนิดเดียวกับโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย คือซีโรไทป์ B:2 ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 ผู้ป่วยมีอาการไข้ ไอ ปวดศีรษะ ปัสสาวะน้อย เหนื่อยหอบ ซึม ปวดตามตัว ต่อมาเหนื่อยหอบมากขึ้น อาเจียน กระสับกระส่าย เหงื่อออกมาก มีจ้ำเลือดตามตัว และเสียชีวิตหลังจากเข้ารับการรักษา 4 วัน

การวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นเมื่อมีรายงานการระบาดของโรคที่สงสัยว่าเป็นเฮโมรายิกเซพติซีเมีย สามารถประเมินได้จากอาการของสัตว์ พยาธิสภาพหรือรอยโรคจากการผ่าซากรวมถึงข้อมูลทางระบาดวิทยา เช่น อัตราการป่วยและอัตราการตาย เพราะการวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วมีความสำคัญและจำเป็นต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในระยะแรก อย่างไรก็ตามจะต้องมีการเก็บตัวอย่างตามชนิดและวิธีการที่เหมาะสม นำส่งห้องปฏิบัติการที่ใกล้และรวดเร็วที่สุดเพื่อการเพาะแยกเชื้อก่อโรคเป็นการยืนยันการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้อง

การตรวจวินิจฉัยโรค แบ่งเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. การตรวจวินิจฉัยทางคลินิก

การวินิจฉัยโดยอาศัยจากอาการเฉพาะของโรค ประกอบกับพยาธิสภาพหรือรอยโรคจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ คอบวม น้ำมูกน้ำลายไหล หายใจลำบาก มีไข้สูง เมื่อผ่าซากสัตว์ตายจะพบรอยโรคที่ชัดเจน คือ บวมน้ำใต้ผิวหนัง มีจุดเลือดออก หัวใจห้องล่าง ที่ปอดมีเลือดคั่งและถ้าสัตว์ป่วยนานจะพบเนื้อปอดแข็งตัว เห็นปอดแยกเป็นกลีบชัดเจน ผนังกั้นระหว่างกลีบปอดหนาตัว นอกจากนี้ในการวินิจฉัยโรคมีความจำเป็นต้องใช้ ข้อมูลด้านระบาดวิทยา ได้แก่ อัตราการเกิดโรค อัตราการตาย ชนิดและ อายุสัตว์ ท้องที่เกิดโรค ฤดูกาล ประวัติการฉีดวัคซีน รวมทั้งข้อมูลที่อาจเป็นสาเหตุโน้มนำการเกิดโรค เช่น สภาพอากาศเปลี่ยนแปลง และการเคลื่อนย้ายสัตว์ เป็นต้น

นอกจากนี้ต้องวินิจฉัยแยกแยะจากโรคอื่นที่มีอาการคล้ายกัน โดยเฉพาะโรคที่สัตว์มีอาการเฉียบพลันรุนแรง ตายกะทันหัน ได้แก่ แอนแทรกซ์ รินเดอร์เปสต์ และแบลคเลก เป็นต้น หรือกรณีที่สัตว์ตายจากสาเหตุอื่นไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น ถูกงูกัด หรือรับสารพิษ เป็นต้น ในกรณีที่มีอาการทางระบบหายใจต้องวินิจฉัยแยกจากการติดเชื้อ *Pasteurella* spp. สายพันธุ์อื่นที่ไม่ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย เช่น เชื้อ *Pasteurella hemolytica* ซึ่งจะต้องตระหนักเสมอว่าสัตว์ที่ติดเชื้อที่ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่มีอาการ subacute pneumonic form ในระยะสุดท้ายจะมีอาการ septicemia ซึ่งในซีโรไทป์อื่นไม่ค่อยพบอาการนี้

2. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป ใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อจากเนื้อเยื่อสัตว์และจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวเคมีและการตรวจทางซีรัมวิทยา สำหรับวิธี ที่ไม่ใช่วิธีทางซีรัมวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุลนั้น ใช้ในกรณีที่มีการรายงานโรคล่าช้า ขาดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ข้อมูลการตรวจระดับแอนติบอดีในซีรัมสัตว์ที่รอดชีวิตจากการเป็นโรคก็อาจใช้ในการวินิจฉัยโรคได้เช่นกัน

สิ่งสำคัญในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ให้ผลถูกต้องคือ การเก็บและส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ

<u>การเก็บตัวอย่าง</u> :

เนื้อเยื่อ อวัยวะหรือเลือด จากการผ่าซากสัตว์ตายควรเก็บทันทีที่ผ่าซากหรือเก็บจากสัตว์ตายใหม่ๆเพื่อป้องกันหรือลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ให้มีน้อยที่สุด โดยเฉพาะเลือด ควรเจาะจากหัวใจหรืออาจเจาะจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ก็ได้

กรณีที่ไม่สามารถผ่าซากหรือเก็บตัวอย่างเลือดทันทีที่สัตว์ตาย สามารถวินิจฉัยจากตัวอย่างเลือดได้แม้ว่าจะเก็บเลือดจากสัตว์ที่ตายแล้วนาน 24 ชั่วโมง โดยสามารถลดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยการนำเลือดไปฉีดในหนูขาวก่อน และอีกวิธีหนึ่งคือ การเก็บตัวอย่างกระดูกส่วนที่เป็นท่อน หรือ long bone ซึ่งนำมาเพาะหาเชื้อได้แม้ว่าสัตว์ตายแล้ว 2-3 วัน หรือแม้แต่เมื่อสัตว์ถูกฝังแล้วก็ตาม

<u>การนำส่งตัวอย่าง</u> :

การเก็บและการนำส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการควรให้อยู่ในที่เย็น ใน Transport medium ที่เหมาะสม แต่ถ้าไม่สามารถหาได้ในท้องที่ ต้องรีบนำส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการเร็วที่สุด เพราะเชื้อ *Pasteurella multocida* อยู่นอกร่างกายสัตว์ได้ไม่นาน และเชื้อที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* มักเจริญได้เร็วกว่าทำให้กลบหรือลดการเจริญของเชื้อ *Pasteurella multocida*

มีรายงานว่าการเก็บตัวอย่างจากการทำสวอปจากเลือด ถ้าเก็บภายใน 6 ชั่วโมง หลังสัตว์ตายสามารถ เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 4 วัน และเก็บในตู้เย็นได้นาน 1 สัปดาห์ นำมาเพาะเชื้อได้ แต่ถ้าเก็บนานกว่า 24 ชั่วโมง จะมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ตัวอย่าง long bone ต้องล้าง ทำความสะอาดเอาส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆออกให้หมด

<u>การป้องกันและควบคุมโรค</u>

1. การป้องกันในประเทศหรือพื้นที่ที่เกิดโรคเป็นประจำ (endemic area)

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียเป็นโรคที่สามารถควบคุมและป้องกันได้โดยการใช้วัคซีน แต่คุณสมบัติของเชื้อก่อโรคที่มีความสามารถในการมีชีวิตรอดนอกตัวสัตว์และมีความต้านทานต่อสารเคมีบางชนิด การป้องกันโรคใน endemic area จึงควรดำเนินการ ดังนี้

1.1 ฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรคเป็นประจำ ควรฉีดวัคซีนในช่วงเวลา ก่อนถึงฤดูกาลที่มีการระบาดของโรคเพื่อให้สัตว์มีระดับภูมิคุ้มกันโรคสูงในช่วงที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมากที่สุด สำหรับประเทศไทยกำหนดให้ฉีดวัคซีนเป็นประจำทุกปีในช่วงฤดูฝน

1.2 จัดระบบการรายงานโรค ต้องรายงานโรคแก่ผู้เกี่ยวข้องและรับผิดชอบโดยเร็วที่สุด เพื่อดำเนินการควบคุมโรคอย่างรวดเร็ว

1.3 ให้การประชาสัมพันธ์และความรู้แก่เกษตรกรเกี่ยวกับการจัดการด้านสุขภาพพื้นฐานและ การป้องกันโรคด้วยการฉีดวัคซีนสัตว์เป็นประจำ เพื่อให้เกิดความร่วมมือที่ดี และเป็นการระวังโรค

1.4 มีมาตรการป้องกันการเคลื่อนย้ายสัตว์

ในพื้นที่ที่เป็น endemic area สัตว์เป็นจำนวนมากเป็นตัวอมโรค และมักเป็นสาเหตุของการ แพร่เชื้อให้สัตว์ตัวอื่น ขณะที่สัตว์ในพื้นที่ที่ไม่เคยเกิดโรค หรือสัมผัสกับเชื้อก่อโรค (non-endemic area) และอาจไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อนจะไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคเลย สัตว์พวกนี้จะมีความไวต่อเชื้อสูง หากได้รับการสัมผัสเชื้อก็มักจะทำให้เกิดเป็นโรค มีอาการรุนแรงและแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรฉีดวัคซีนสัตว์ที่มาจากพื้นที่ non-endemic area อย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนนำสัตว์เข้ามารวมกับสัตว์ใน endemic area

2. การควบคุมเมื่อเกิดโรคระบาด

เมื่อเกิดการระบาดขึ้นมีความจำเป็นต้องควบคุมไม่ให้การแพร่กระจายของโรคโดย ดำเนินการฉีดวัคซีนตามโปรแกรม

ควรฉีดวัคซีนสัตว์ที่เสี่ยงต่อการติดโรค โดยส่วนใหญ่เพื่อให้การสร้างภูมิคุ้มโรคเกิดเร็วทันการ สามารถควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายต่อไป ควรใช้วัคซีนชนิดบรอทแบคเทอรินหรือวัคซีนชนิดอะลัม ไม่ว่าจะเป็นชนิดตกตะกอนหรือ ผสมอะลัมเจล Dr. M.C.L. De Alwis ผู้เชี่ยวชาญโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียได้แนะนำให้ฉีดบรอทแบคเทอรินและวัคซีนชนิดน้ำมันพร้อมกันแต่คนละข้าง อย่างไรก็ตามควรระวังการเกิดแพ้วัคซีนจากเอ็นโดทอกซินของเชื้อโดยเฉพาะจากบรอทแบคเทอริน จึงควรอยู่ในวิจารณญาณของเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบ

3. การแยกและรักษาสัตว์ที่สัมผัสเชื้อและแสดงอาการป่วยแล้ว

รักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างโดยเร็วที่สุดเมื่อพบสัตว์เริ่มแสดงอาการ ซึ่งจะเห็นได้เร็วในฟาร์มที่มีการจัดการและควบคุมดี เมื่อสัตว์ป่วยได้รับการรักษาหายแล้ว มักจะสร้างภูมิคุ้มโรคตามธรรมชาติซึ่งจะคงอยู่เป็นเวลานาน จึงไม่จำเป็นต้องฉีดวัคซีนซ้ำให้กับสัตว์ป่วยดังกล่าว

4. การแยกและรักษาสัตว์ที่สัมผัสเชื้อหรือคาดว่าสัมผัสเชื้อแล้วแต่ยังไม่แสดงอาการป่วย

สัตว์กลุ่มนี้ได้แก่สัตว์ที่อยู่รวมฝูงหรือสัมผัสกับสัตว์ป่วยหรือใช้แหล่งน้ำแหล่งอาหารร่วมกับสัตว์ป่วย โดยเชื่อว่าสัตว์ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ซึ่งอาจเป็นเพราะร่างกายสามารถกำจัดการติดเชื้อได้ การให้วัคซีนในสัตว์กลุ่มนี้อาจทำให้เกิดการระบาดของโรคตามมาได้ จึงยังไม่ควรฉีดวัคซีนให้กับสัตว์กลุ่มนี้ทันที แต่ควรรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ครั้งและเฝ้าระวังการพบสัตว์ป่วยเพิ่ม หากเลยช่วงระยะเวลาฟักตัวของโรค คือประมาณ 24-48 ชั่วโมงแล้ว จึงค่อยดำเนินการฉีดวัคซีนเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มโรค

5. ตรวจวัดอุณหภูมิร่างกายทันทีในสัตว์ฝูงที่มีการสัมผัสกับสัตว์ติดเชื้อ หากเป็นไปได้ควรวัดทุกเช้า และรักษาทันทีที่พบสัตว์มีไข้

6. สังเกตหรือจับตามองหาสัตว์ที่เจ็บป่วยทุกวัน
7. งดการเคลื่อนย้ายสัตว์
8. ผ่าพิสูจน์ซากและวินิจฉัยโรคเบื้องต้นเมื่อพบสัตว์ตาย
9. ส่งตัวอย่างตรวจในห้องปฏิบัติการที่อยู่ใกล้ที่สุดโดยเก็บและส่งอย่างที่เหมาะสมถูกต้อง
10. จัดการกับซากสัตว์โดยการเผาหรือฝังลึกๆ ไม่ให้สัตว์อื่น เช่น สุนัข นำซากสัตว์ซึ่งเป็นแหล่งเชื้อกระจายไปยังพื้นที่อื่นๆ
11. จัดการกับอาหาร สิ่งปูนอน หรือวัสดุต่างๆ ที่คาดว่าถูกปนเปื้อนเชื้อโดยการแยกหรือฝังเช่นเดียวกับการกำจัดซากสัตว์

วัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย

วัคซีนเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการป้องกันโรค วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียมีทั้งที่เป็นวัคซีนเชื้อตายและเชื้อเป็น และยังแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ตามรูปแบบของวัคซีน สารแอดจูแวนท์ และเทคโนโลยีการผลิต ในปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นวัคซีนเชื้อตาย ส่วนวัคซีนเชื้อเป็นนั้นมีการศึกษาวิจัย แต่ยังไม่มีการใช้แพร่หลาย ยกเว้นในประเทศเมียนมาร์ที่เป็นต้นแบบของการวิจัยวัคซีนเชื้อเป็น

<u>วัคซีนเชื้อตาย</u> แบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. วัคซีนชนิดบรอทแบคเทอริน

เป็นวัคซีนไม่ผสมสารแอดจูแวนท์ ซึ่งประกอบด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่ถูกฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนใหญ่การผลิตวัคซีนโดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฆ่าด้วยฟอร์มาลินแล้วนำมาใช้เป็นวัคซีนเลย จึงเรียกชื่อวัคซีนชนิดนี้ว่า บรอทแบคเทอริน วัคซีนนี้มีข้อดีที่สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มโรคได้เร็วมีประโยชน์ในกรณีที่มีการระบาดและต้องการควบคุมโรคอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือระยะของภูมิคุ้มโรคสั้นประมาณ 6 สัปดาห์ เท่านั้น นอกจากนี้วัคซีนอาจทำให้เกิดการแพ้รุนแรงจนมีอาการช็อคและตายได้เนื่องจากพิษของเอ็นโดท็อกซินในวัคซีน หากโค กระบือได้รับวัคซีนที่มีเชื้อปริมาณมาก

2. วัคซีนชนิดผสมอะลัม

ประกอบด้วยแบคเทอรินผสมกับโปแตชอะลัม หรือผสมกับอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล วัคซีนนี้ให้ความคุ้มโรคไม่เกิน 6 เดือน และวัคซีนยังมีโอกาสทำให้เกิดการแพ้ได้

3. วัคซีนชนิดน้ำมัน

เป็นวัคซีนประกอบด้วยบรอทแบคเทอรินผสมสารแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันอยู่ในรูปของอิมัลชัน ซึ่งให้ความคุ้มโรคสูงกว่าวัคซีนชนิดอื่น โดยให้ความคุ้มโรคได้นานถึง 1 ปี การเตรียมวัคซีนชนิดน้ำมันในปัจจุบันมีการพัฒนาที่ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้มีการพัฒนาแอดจูแวนท์ชนิดสำเร็จรูปพร้อมผสมและนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนอิมัลชันชนิดต่างๆซึ่งการเตรียมง่ายและทำให้วัคซีนมีความหนืดลดลง ฉีดง่ายขึ้น

<u>วัคซีนเชื้อเป็น</u>

วัคซีนประกอบด้วยเชื้อมีชีวิตมักจะให้ภูมิคุ้มกันโรคยาวนานกว่าวัคซีนเชื้อตาย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในวัคซีนเชื้อเป็นสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในร่างกายสัตว์ได้ จึงมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้นานกว่า มี

ความพยายามในการศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดเชื้อเป็นด้วยเทคนิคและรูปแบบวัคซีนที่แตกต่างกันหลายชนิดเป็นเวลานานแล้วจนถึงปัจจุบัน แต่ก็ยังไม่มีการนำมาใช้เพื่อการป้องกันโรคหรือผลิตเป็นการค้าเหมือนวัคซีนเชื้อตาย วัคซีนเชื้อเป็นเหล่านี้ ได้แก่

1. วัคซีนผลิตจากเชื้อสเตรนที่แตกต่างจากสเตรนก่อโรค หรือเป็น Heterotypic live vaccine

เชื้อพันธุ์เป็น *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B: 3,4 ซึ่งมีความรุนแรงและก่อโรคในกวาง แต่ไม่รุนแรงในโคและกระบือ วัคซีนชนิดนี้ยังอยู่ระหว่างการทดลองเกี่ยวกับการความปลอดภัยของการใช้วัคซีนในพื้นที่โดยมีการใช้วัคซีนชนิดนี้ในประทศเมียนมาร์เท่านั้น

2. วัคซีนผลิตจากเชื้อกลายพันธุ์ชนิด Streptomycin-dependent mutant

เชื้อพันธุ์เป็น *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B ที่ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในโคและกระบือซึ่งทำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี *N*-methyl-*N*'-nitro-*N* -nitrosoguanidine ทำให้ความรุนแรง เชื้อลดลง เพาะเลี้ยงและเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินเท่านั้น โดยมีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคเมื่อทดลองในหนูขาวและกระต่าย จากการทดลองในโคและกระบือในประเทศศรีลังกา พบว่าการผลการให้ความคุ้มโรคดีเฉพาะในกระบือ ส่วนโคให้ผลไม่แน่นอน จะต้องฉีดด้วยปริมาณเชื้อสูงและยังไม่มีรายงานการให้ความคุ้มโรคในระยะยาว จึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้

3. วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อกลายพันธุ์ชนิด *aroA* mutant

เชื้อพันธุ์เป็น *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B ซึ่งทำให้กลายพันธุ์โดยตัดชิ้นส่วน ยีน *aroA* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase ที่จำเป็นต่อขบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนของแบคทีเรีย มีการทดลองวัคซีนเชื้อเป็นชนิดนี้พบว่ามีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคจากการฉีดเชื้อพิษทับในลูกโค ที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้งเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ และ 8 และในโคอายุ 6-9 เดือน และมีคุณสมบัติในการให้ความคุ้มโรคข้ามกันได้

การรักษา

การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะยาที่ออกฤทธิ์กว้างให้ผลดีในการรักษาโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย แต่การรักษาจะได้ผลเฉพาะในสัตว์ที่ติดเชื้อระยะแรกเท่านั้น โคและกระบือที่เป็นโรคส่วนใหญ่เกิดจากการเลี้ยงที่ขาดการจัดการด้านสุขาภิบาลที่ดีหรือการเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติ การตรวจพบโรคจึงมักพบในสภาวะที่สัตว์มีแสดงอาการของโรคผ่านระยะแรกไปแล้ว จึงทำให้ดูเหมือนการรักษาจะไม่ค่อยได้ผลแม้ว่าจะใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมก็ตาม ดังนั้นการรักษาสัตว์ป่วยเป็นโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่มีประสิทธิภาพ สัตว์ป่วยควรได้รับการรักษาโดยเร็วที่สุด ก่อนที่จะแสดงอาการเฉพาะของโรค จะทำให้สัตว์ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้นและลดการแพร่เชื้อของสัตว์ป่วยด้วย

1. การรักษาด้วยยา

มีการแนะนำให้ใช้ ยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนนิซิลิน แอมพิซิลิน เอนโรฟลอกซาซิน นีโอมัยซิน ออกซีเตตราซัยคลิน นอกจากนี้ยาประเภทซัลโมนาไมด์ เช่น ซัลฟาไดมิดีน ก็ให้ผลการรักษาที่ดีเช่นกัน แต่เนื่องจากต้องให้ยาในปริมาณสูงและให้ทางเส้นเลือดไม่สะดวกสำหรับสัตว์ใหญ่ ดังนั้น การใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นทางเลือกแรกในการรักษา

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Pasteurella multocida* ก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในประเทศแถบเอเชียมักไม่ค่อยพบยกเว้นสเตรนของประเทศไทยมีการดื้อยาสเตรปโตมัยซินบ้าง อาจสรุปได้ว่ายาปฏิชีวนะที่เหมาะสมทั้งในแง่คุณภาพและราคา ที่ควรใช้ในการรักษาโรคในโคและกระบือ ได้แก่ เพนนิซิลิน แอมพิซิลิน และออกซีเตตราซัยคลิน ความไวของยาต่อเชื้ออาจแตกต่างกันในแต่ละประเทศขึ้นกับสภาวะการใช้ยาปฏิชีวนะ ของแต่ละประเทศ ควรที่จะมีการศึกษาความไวของยาต่อเชื้อในท้องที่เพื่อเป็นข้อมูลการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาและการให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายสัตว์ที่เป็น carrier ได้ เพราะเชื้ออยู่ในส่วนของ crypt ของทอนซิลซึ่งการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเข้าไม่ถึง

2. การรักษาด้วยแอนติซีรัม

ยังไม่เคยมีรายงานการรักษาที่ได้ผล ถึงแม้จะเคยมีการทดลองใช้ไฮเปอร์อิมมูนซีรัมปริมาณ 60-200 มล. ในการรักษากระบือตั้งแต่ก่อนติดเชื้อ 6 ชั่วโมง ไปถึงหลังติดเชื้อ 18 ชั่วโมง

สถานการณ์โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียและมาตรการป้องกันโรคในประเทศไทย

<u>สถานการณ์โรค</u>

การระบาดของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในประเทศไทยระยะแรกๆก่อน พ.ศ. 2506 มีสัตว์ตายปีละนับพันตัว Dr. R.V.S. Bain ผู้เชี่ยวชาญจากมหาวิทยาลัยซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเคยเป็นผู้เชี่ยวชาญที่สอนการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียให้แก่ข้าราชการไทยที่ อ. ปากช่อง ระบุว่าแต่ละปีมีโคและ กระบือตายด้วยโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียมากกว่า 10,000 ตัว และเมื่อใช้วัคซีนในการควบคุมป้องกันโรคทำให้การระบาดของโรคและจำนวนสัตว์ที่ตายในแต่ละปีลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังพบการเกิดโรคระบาดอยู่ทุกปี การระบาดส่วนใหญ่มักเกิดในฝูงสัตว์ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันแก่สัตว์เป็นประจำ เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจากปัจจัยต่างๆ จึงทำให้เชื้อโรคที่เดิมมีอยู่ในร่างกายสัตว์ที่เป็นพาหะโรคมีการแพร่ออกมาสู่ภายนอกตัวสัตว์ทางน้ำมูกน้ำลาย จึงทำให้เกิดการติดเชื้อไปยังตัวอื่นรวมทั้งตัวที่เป็นพาหะเองก็แสดงอาการป่วยเช่นกัน

แม้ว่าข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในประเทศไทยเกี่ยวกับการระบาดของโรคแต่ละปีไม่เพียงพอที่จะระบุมูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรคนี้ได้ แต่จากรายงานผลการตรวจยืนยันเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2552 พบโคกระบือ ป่วยตายจากการติดเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2 ทุกปี และเกิดโรคในจังหวัดของภาคต่างๆ ยกเว้นภาคกลาง (ตารางที่ 2)

การระบาดในปี พ.ศ. 2551 ช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน เป็นการระบาดใหญ่ครั้งล่าสุด เกิดโรคระบาดในจังหวัดนราธิวาส ทำให้โคและกระบือ ในพื้นที่ 6 หมู่บ้าน ใน ตำบลปูโยะ อำเภอสุไหงโก-ลก จังหวัดนราธิวาส ที่เจ้าของเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งในป่าพรุโต๊ะแดง ที่มีพื้นที่กว้างกว่า 1 แสนไร่ เกิดอาการป่วยและล้มตายลงอย่างต่อเนื่องจำนวน 127 ตัว กรมปศุสัตว์ดำเนินการโดยประกาศให้พื้นที่ อำเภอสุไหงโก-ลก เป็นเขตภัยพิบัติของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียของโคและกระบือ และฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ในพื้นที่ใกล้เคียง และดำเนินการตามมาตรการที่ระบุในระเบียบเฝ้าระวัง ป้องกันและควบคุมโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2547 ในหมวด 2 ภาวะเกิดโรค

ระบาด จึงทำให้สามารถหยุดการแพร่กระจายโรคในวงกว้างได้อย่างรวดเร็ว และจนถึงปัจจุบัน (เดือนกรกฎาคม 2553) ยังไม่พบการระบาดใหญ่อีกเลย

การเป็นโรคในสัตว์อื่น พบว่า เดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ช้างในจังหวัดเชียงใหม่ 1 เชือก ป่วยตายด้วยอาการเป็นไข้ ซึม กินอาหารน้อย คอบวม แต่ไม่มีผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามผู้ที่เกี่ยวข้องกับการดูแลรักษาช้างมีคำเตือนให้เจ้าของและผู้เลี้ยงช้างเฝ้าระวังโรคโดยสังเกตอาการป่วยของช้างโดยเฉพาะในช่วงที่มีอากาศเปลี่ยนแปลง เพราะมีช้างเลี้ยงที่ตายด้วยอาการคล้ายกับโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียไม่น้อยกว่าปีละ 5 เชือก เพื่อจะได้รักษาทันท่วงทีหรือบางครั้งอาจฉีดวัคซีนป้องกันก็ได้

ตารางที่ 2 การตรวจพบเชื้อก่อโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในตัวอย่างส่งตรวจจากจังหวัดต่างๆ ระหว่าง พ.ศ. 2546-2552

	จังหวัด	ปี พ.ศ.						
		2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552
ภาคเหนือ	เชียงใหม่	/	/		/			/
	เชียงราย	/						
	น่าน			/	/			
	พะเยา	/						
	แม่ฮ่องสอน		/			/		
	ลำพูน			/				
ภาคใต้	นครศรีธรรมราช			/				
	นราธิวาส						/	
	สงขลา	/						
	ฉะเชิงเทรา						/	
	ชลบุรี			/				
	ปราจีนบุรี							/
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	มหาสารคาม						/	
	อุบลราชธานี						/	
ภาคตะวันตก	กาญจนบุรี			/				
	ราชบุรี	/						
	สระแก้ว						/	

(แหล่งข้อมูล: สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ)

<u>มาตรการป้องกันโรค</u>

มาตรการป้องกันและควบคุมโรคของกรมปศุสัตว์เมื่อพบสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียจะดำเนินการตามระเบียบเฝ้าระวัง ป้องกันและควบคุมโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2547 ในหมวด 2 ภาวะเกิดโรค

ระบาด ซึ่งมีมาตรการเพิ่มเติมที่สำคัญนอกจากการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ การเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยยืนยันแล้วประกอบด้วย การควบคุมโรคในฝูงสัตว์ป่วย การควบคุมโรคในสัตว์ที่อยู่ในรัศมี 1 กิโลเมตร และระหว่าง 1 ถึง 5 กิโลเมตรรอบจุดเกิดโรคระบาด ด้วยการฉีดวัคซีน ดังนี้

1. การควบคุมโรคในฝูงสัตว์ป่วย

สัตว์ที่แสดงอาการป่วย ให้ฉีดยาปฏิชีวนะและรักษาตามอาการ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความไวต่อเชื้อ หากเป็นไปได้ควรเป็นยาที่มีความไวต่อเชื้อที่เพาะแยกได้จากการระบาด ซึ่งขณะนี้ยาที่ใช้ได้ผลดี ได้แก่ ดอกซีซัยคลิน ซัลฟาไตรเมโทรพริม และเซฟาโลสปอริน สำหรับสัตว์ร่วมฝูงที่ไม่แสดงอาการ ฉีดยาปฏิชีวนะให้สัตว์ร่วมฝูงสัตว์ป่วยโดยให้ปริมาณยาอยู่ในระดับรักษาเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และฉีดวัคซีนหลังจากฉีดยาปฏิชีวนะครั้งแรก 3 วัน

2. การควบคุมโรคในสัตว์ที่อยู่ในรัศมี 1 กิโลเมตรรอบจุดเกิดโรคระบาด

ฉีดยาปฏิชีวนะและวัคซีนพร้อมกันในวันแรกโดยเริ่มดำเนินการจากพื้นที่รอบนอกเข้าหาจุดเกิดโรค

3. การควบคุมโรคในสัตว์ที่อยู่ในรัศมีระหว่าง 1-5 กิโลเมตร

ฉีดวัคซีนสัตว์ในพื้นที่โดยเริ่มดำเนินการจากพื้นที่รอบนอกเข้าหาจุดเกิดโรค

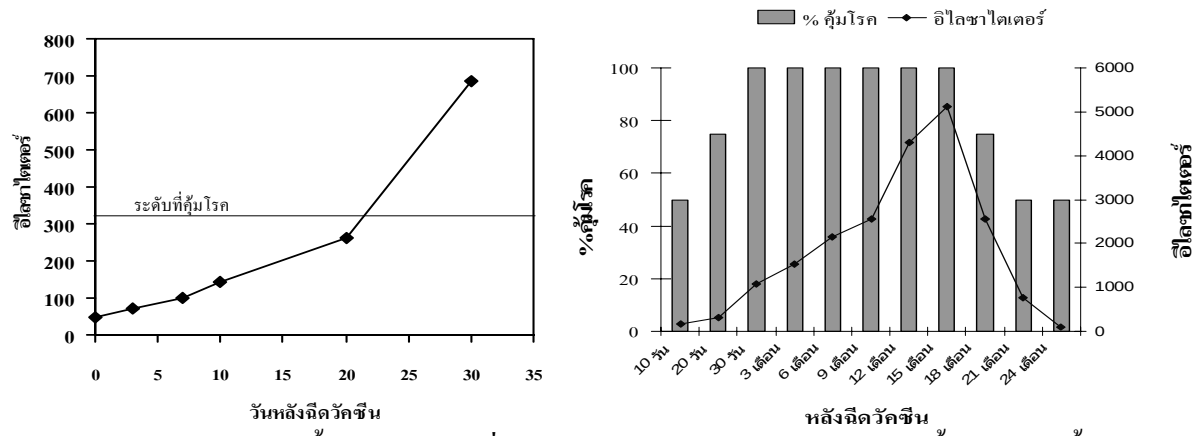
<u>วัคซีนป้องกันโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ใช้ในประเทศไทย</u>

วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่ใช้ในประเทศทั้งหมดเป็นวัคซีนที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เป็นวัคซีนเชื้อตายรูปแบบอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ผลิตจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ซีโรไทป์ B:2,5 สเตรนท้องถิ่น ใช้สำหรับฉีดโค และกระบือ อายุ 4 เดือนขึ้นไป โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 1 มล. สัตว์จะมีความคุ้มโรคหลังจากฉีดวัคซีน 3 สัปดาห์และมีความคุ้มโรคนานไม่น้อยกว่า 12 เดือน จากการทดลองให้วัคซีนเพียงครั้งเดียว (รูปที่ 3) การป้องกันโรคจึงกำหนดให้ฉีดวัคซีนโคและกระบือปีละครั้ง

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จและข้อควรระวังในการใช้วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ดังนี้

1. การเก็บรักษาวัคซีน

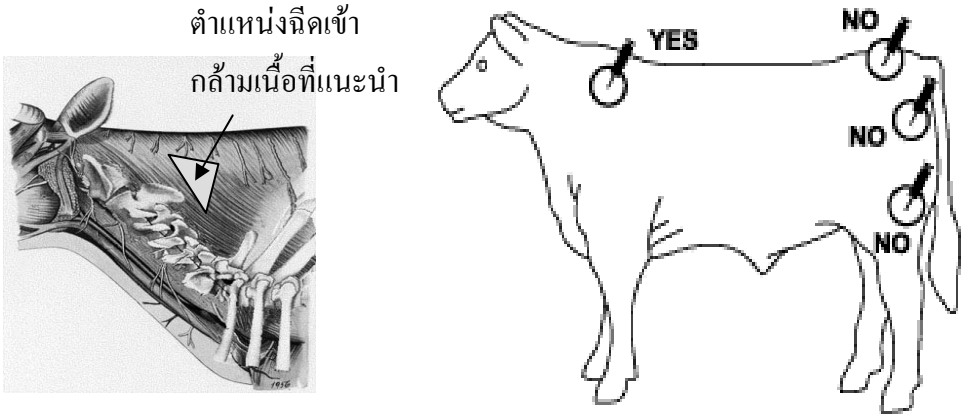
วัคซีนชนิดน้ำมันต้องเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2-8°ซ เท่านั้น เพราะจะทำให้สภาพที่เป็นอิมัลชันเสียโดยเกิดการแยกชั้นระหว่างส่วนของเชื้อกับส่วนของน้ำมัน ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลงและที่สำคัญจะทำให้สัตว์เกิดการแพ้วัคซีนรุนแรงได้ ควรนำออกจากตู้เย็นเพื่อให้อุณหภูมิวัคซีนเท่ากับอุณหภูมิห้องเมื่อจะฉีดวัคซีนเท่านั้น



รูปที่ 3 ความคุ้มโรคต่อการฉีดเชื้อพิษทับในโคที่ได้รับวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพียงครั้งเดียว

2. การฉีดวัคซีน

วัคซีนอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันอาจทำให้บริเวณที่ฉีดบวม การฉีดวัคซีนต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อลึก โดยใช้เข็มที่มีขนาดและความยาวเหมาะสมกับขนาดของสัตว์ ส่วนใหญ่ใช้เข็มเบอร์ 18 หรือ 16 ความยาว 1-1 ½ นิ้ว ตำแหน่งฉีดที่เหมาะสมคือบริเวณสามเหลี่ยมที่กล้ามเนื้อคอ (รูปที่ 4) ควรหลีกเลี่ยงการฉีดที่ส่วนท้ายของโค กระบือ และไม่ควรฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ภายใน 45 วันก่อนส่งโรงฆ่า



รูปที่ 4 ตำแหน่งฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อในโคบริเวณสามเหลี่ยมที่คอ

3. กำหนดการฉีดวัคซีน

ควรฉีดวัคซีนพร้อมกันทั่วประเทศในช่วงเวลาก่อนฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีอัตราเสี่ยงการเป็นโรคสูง หรือในช่วงปลายฤดูฝนก่อนเข้าฤดูหนาว เพราะอากาศเปลี่ยนแปลงทำให้สัตว์เกิดความเครียดและมีความไวต่อเชื้อ สำหรับจำนวนครั้งของการฉีดวัคซีนในแต่ละปีขึ้นกับระยะความคุ้มโรคของวัคซีนที่ใช้ ซึ่งวัคซีนชนิดน้ำมันปัจจุบันให้ความคุ้มโรคนาน 1 ปี จึงกำหนดการฉีดวัคซีนปีละครั้ง แต่ถ้าใช้วัคซีนชนิดอะลัมซึ่งมีระยะคุ้มโรคไม่เกิน 6 เดือน ต้องฉีดวัคซีนปีละ 2 ครั้ง

4. จำนวนสัตว์ที่ฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์มากที่สุดเท่าที่จะทำได้จะช่วยให้การควบคุมและป้องกันโรคประสบความสำเร็จ โดยทั่วไปควรฉีดวัคซีนให้ได้อย่างน้อย 70% ของจำนวนสัตว์ในประเทศหรือมากกว่า สำหรับประเทศไทย กรมปศุสัตว์กำหนดให้ฉีดวัคซีนกระบือ 100% ทั่วประเทศ และฉีดวัคซีนโค 100% ในพื้นที่เสี่ยงที่เคยพบโรคในระยะเวลา 3 ปี นับจากปัจจุบัน

การผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในแต่ละปีจึงผลิตตามจำนวนสัตว์ที่อยู่ในเกณฑ์ต้องฉีดวัคซีนดังกล่าว เช่นใน พ.ศ. 2550 ประมาณการใช้วัคซีนจากจำนวนกระบือ 1.7 ล้านตัว โค 0.17 ล้านตัว และเตรียมไว้เป็นวัคซีนสำรองกรณีฉุกเฉิน ประมาณ 0.6 ล้านโด๊ส รวมทั้งสิ้น 2.5 ล้านโด๊ส และโดยเฉลี่ย มีการเบิกใช้วัคซีนปีละ 3.1 ล้านโด๊ส ระหว่าง พ.ศ. 2548 ถึง 2552 (ตารางที่ 3)

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงโค กระบือในบางพื้นที่เป็นการเลี้ยงแบบปล่อยทุ่ง ไม่มีคอก โค กระบือหากินตามป่า โดยเฉพาะในภาคใต้ ทำให้การฉีดวัคซีนไม่สามารถครอบคลุมจำนวนสัตว์ตามที่กำหนด จึงยังคงพบการระบาดของโรคทุกปี

ตารางที่ 3 จำนวนวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียที่จำหน่ายเพื่อใช้ในประเทศ ระหว่าง พ.ศ. 2548-2552

พ.ศ.	จำนวนวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย ที่จำหน่าย (โด๊ส)
2548	3,983,850
2549	2,378,100
2550	2,405,100
2551	2,420,100
2552	4,461,360
เฉลี่ย	**3,129,702**

(แหล่งข้อมูล: ฝ่ายการตลาด สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์)

การกำจัดโรค

การกำจัดโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียให้หมดไปจากประเทศนั้นทำได้ยากและยังไม่มีประเทศใน endemic area ประสบความสำเร็จในการกำจัดโรค เนื่องจากมีสัตว์ที่อมโรคอยู่เป็นจำนวนมาก สัตว์เหล่านี้มีการติดเชื้อแบบแอบแฝง พร้อมที่จะแพร่โรคได้เมื่อมีปัจจัยเสี่ยงเช่น การเปลี่ยนแปลงอากาศความเครียดจากการเคลื่อนย้ายสัตว์หรือการทำงานหนักรวมทั้งสภาพการเลี้ยงที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลที่ดี ในประเทศอินโดนีเซียซึ่งเคยพยายามกำจัดโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในเกาะลอมบอก ซึ่งมีจำนวนโค กระบือประมาณ 300,000 ตัว ด้วยการฉีดวัคซีนให้ครอบคลุมจำนวนสัตว์มากที่สุด และประเมินผลด้วยการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและวิธีทางซีรัมวิทยา แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโรคให้หมดไปจากเกาะได้

สรุป

โรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในประเทศไทยยังคงเป็นโรคระบาดร้ายแรงที่สำคัญ เพราะทำให้สัตว์ที่เป็นโรคแสดงอาการรุนแรงและตาย โดยเฉพาะเมื่อสัตว์ติดเชื้อไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน จะแสดงอาการป่วยแบบเฉียบพลัน จำนวนสัตว์ป่วยและตายในฝูงจะสูง การรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะจะให้ผลดีในสัตว์ติดเชื้อที่ยังไม่แสดงอาการ ดังนั้นการป้องกันโรคที่ดีที่สุดคือการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างความต้านทานโรคแก่สัตว์ตามกำหนด และการดำเนินการตามมาตรการควบคุมป้องกันโรคอย่างเคร่งครัดกรณีเกิดโรคระบาด

เอกสารอ้างอิง

รัชนี อัตถิ วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา นิเทศ เลิศลิมชลาลัย และวันชัย ตีรถะวรวรรณ 2544 การประเมินความคุ้มโรคของวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันในโค สัตวแพทยสาร 52 (1-2): 23-30

วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา รัชนี อัตถิ และวันชัย ตีรถะวรวรรณ 2542 การพัฒนาการผลิตวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันเพื่ออุตสาหกรรม 3. การทดลองใช้วัคซีนในท้องที่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 9 (1-2): 7-18

Abeynayake, P., Wijewardana, T.G. and Thalagoda, S.A. 1993. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates. *In* B.E. Patten, T.L. Spencer, R.B. Johnson, D. Hoffmann and L. Lehane (eds). Pasteurellosis in production animals. An international workshop held at Bali, Indonesia, 10-13 August 1992. ACIAR Proceedings No. 43. pp. 193-196.

Bain, R.V.S., DeAlwis, M.C.L., Carter, G.R. and Gupta, B.K. 1982. Haemorrhagic septicaemia. FAO Animal production and health paper no. 33. FAO, Rome.

Carter, G. R. 1990 Dignosis of haemorrhagic septicaemia. *In* G.R. Carter, A.C. Kibor and L. Pesti (eds.), Veterinary diagnostic bacteriology – A manual of laboratory procedures for selected diseases of livestock. FAO animal production and health paper No. 81. pp. 49-75.

De Alwis, M.C.L. 1999. Vaccines. *In* Haemorrhagic septicaemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

Heddleston, K.L., Gallagher, J.E. and Roberts, P.A. 1972 Fowl cholera. Gel Diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16: 925-936.

Maneval, W.E. 1941. Stanining bacteria and yeasts with acide dyes. Stain Technol.16:13-19.

Namioka, S. and Murata, M. 1961. Serological studies on*Pasteurella multocida*. I: A simplified method for capsular typing of the organisms. Cornell Veterinarian, 51. 498-507.

OIE, 2008. Hemorrhagic septicemia. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 739-751. Available from: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.12_HS.pdf [Accessed 8 July 2010].