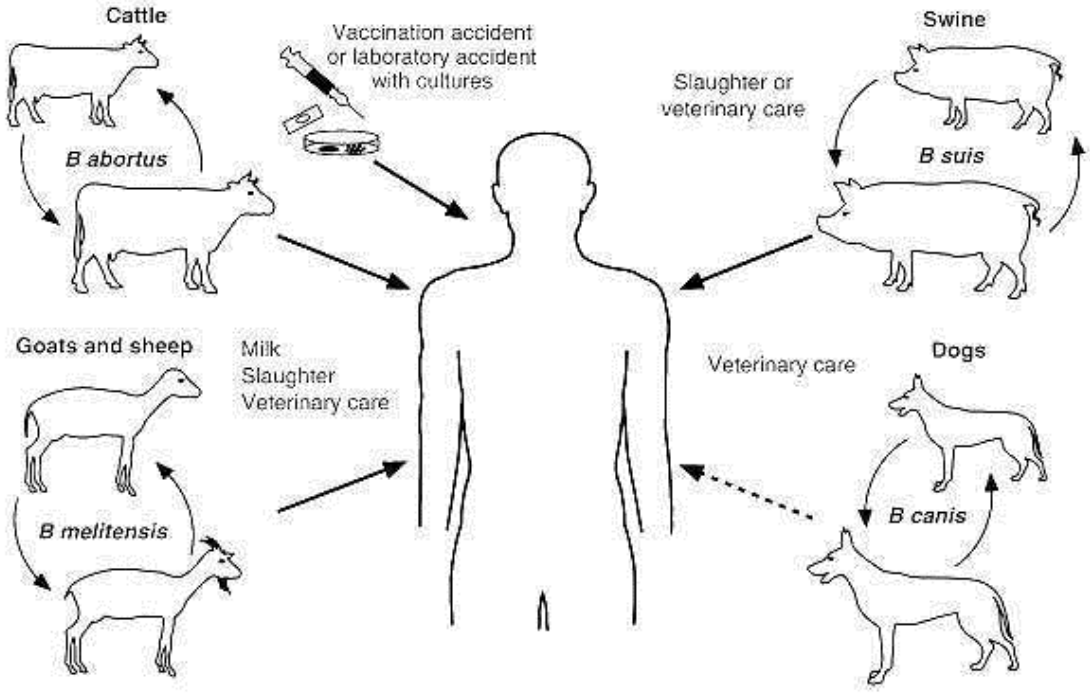
วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 25 ฉบับที่ 1-2 มี.ค. - ก.ย. 2559

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 25 No. 1-2 Mar-Sep 2016



เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858 - 1134

จากปก: การติดต่อของโรคบรูเซลโลซิสจากสัตว์สู่คน

(From Alton, G. G., Jones, L. M. and Angus, R. D. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. Paris, France.)

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 25 ฉบับที่ 1-2 มี.ค. - ก.ย. 2559

สารบัญ

- **จากกองบรรณาธิการ** **6**

- **โรคบรูเซลโลซิส** **7**
  มนยา เอกทัตร์

- **พัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่ให้ความคุ้มโรคสูง: ความคุ้มโรคในโคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีปริมาณแอนติเจนต่างกัน** **24**
  ไชยา สง่าประโคน วรพร ปู่สูงเนิน สุกิจ ประทุมชัย ร่มพฤกษ์ อุดล

- **การศึกษาสภาวะสัตว์อมโรคที่ติดเชื้อด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและกระบือในประเทศไทย** **39**
  วิไล ลินจงสุบงกช ดิลก อ้วนพรมมา เทิดศักดิ์ ญาโน
  ประเสริฐ วงศ์นาค จรรยา สมานิตย์ โสภา สิงคลีบุตร

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 25 No. 1-2 Mar-Sep 2016

Contents

- **The editorial** 6

- **Brucellosis** 7

  Monaya Ekgatat

- **Development of high potent foot and mouth disease vaccine serotype O for cattle: Protection after vaccination with different antigen payload vaccines** 24

  Chaiya Sangaprakhon Woraporn Poosungnoen

  Sukit Prathumchai Romphruke Udon

- **Study on persistent infection with foot and mouth disease virus in cattle and buffaloes in Thailand** 39

  Wilai Linchongsubongkoch Dilok Aunpomma Terdsak Yano

  Prasert Wongnak Janya Sananit Sopha Sinkleebuth

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

---

http://biologic.dld.go.th

วัตถุประสงค์

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

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ที่ปรึกษาบรรณาธิการ	นิเทศ	เลิศลิมชลาลัย	**Advisory board**	Niteth	Lertlimchalalai
บรรณาธิการ	กมลทิพย์	ธัญพิมล	**Editor**	Kamonthip	Thunpimon
หัวหน้ากองบรรณาธิการ	ไชยา	สง่าประโคน	**Editorial director**	Chaiya	Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	วิไล	ลินจงสุบงกช	**Editorial board**	Wilai	Linchongsubongkoch
	จารุณี	สาตรา		Jarunee	Satra
	ธนรัตน์	จานุกิจ		Thanarat	Janukit
	วรพร	ปู่สูงเนิน		Woraporn	Poosungnoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ	เลิศวิมลลักษณ์	**Manager**	Somkiat	Lerdwimonluk

สำนักงาน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 123
โทรสาร 0-4431-5931

กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน

Office: Bureau of Veterinary Biologics,
Pakchong, Nakhonratchasima,
Thailand 30130
Tel. 0-4431-1476 extension 123
Fax. 0-4431-5931

Publications: Twice a year in March and September

จัดพิมพ์โดย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัยอันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ

1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจนโดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์ วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน

1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น

1.4 เรื่องอื่น ๆที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

2. การจัดทำต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ต้องได้รับการอนุมัติให้เผยแพร่จากต้นสังกัด และต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่หรืออยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในสื่ออื่น

2.2 การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

2.2.1 ตัวพิมพ์ ใช้ตัวอักษร Angsana New แบบปกติ ขนาด 15 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น **ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง** ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 17 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น **คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ** เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 15

2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวนไม่เกิน 10 หน้า

2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบนที่ 6.5 ซม. และด้านซ้ายที่ 4.5 ซม. ส่วนด้านขวาและล่างที่ 1.5 ซม.

2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3….. ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติ ขนาด 15

2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทย ทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) คำบรรยายตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
- รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และทำเช่นเดียวกับตาราง แต่คำบรรยายให้เขียนไว้ด้านล่าง

2.2.6 การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) พิมพ์ด้วยตัวเอน เช่น *Escherichia coli* ในกรณีไม่ระบุชื่อสปีชีส์หรือต้องการกล่าวถึงหลายสปีชีส์ เช่น *Salmonella spp.*

3. ต้นฉบับเพื่อพิจารณาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์

3.1 จัดทำต้นฉบับผลงานทางวิชาการ (original manuscript) และสำเนา (photocopied manuscript) อีกจำนวน 3 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ที่ระบุรายละเอียดชื่อผลงาน ชื่อเจ้าของผลงาน และที่อยู่พร้อมเบอร์โทรศัพท์

3.2 ส่งต้นฉบับทั้งหมดพร้อมเอกสารนำส่งถึง

กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 122, 123 โทรสาร 0-4431-5931

3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ

3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน

3.5 ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสาร เจ้าของผลงาน (เฉพาะชื่อแรก) จะได้รับวารสารชีวผลิตภัณฑ์ จำนวน 1 เล่ม พร้อม reprint จำนวน 5 ชุด

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก พิมพ์เป็นเชิงอรรถ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) สั้นได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลองความยาวไม่ควรเกิน 15 บรรทัด ภาษาไทยและภาษาอังกฤษเขียนแยกหน้า

4.4 คำสำคัญ (Key words) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ ไม่เกิน 5 คำสำคัญ โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับผลงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) บรรยายถึงความเป็นมาและวัตถุประสงค์ รวมทั้งควรมีการทบทวนวรรณกรรม (literature review) ประกอบ

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน ควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นชื่อการค้าให้ทำเป็นเชิงอรรถ

4.5.3 ผล (Results) บรรยายผลการทดลองให้เข้าใจง่าย อาจเสนอเป็นตาราง รูปภาพ หรือกราฟ พร้อมคำบรรยายประกอบ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) วิจารณ์ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง เพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น เน้นถึงปัญหาข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง และการนำผลไปใช้ให้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมืออุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

1. <u>วารสารหรือหนังสือ</u> เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิไลและคณะ, 2532; Kumakai *et al*., 1961) กรณี อ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
2. <u>บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน</u> ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น .....similar results (Layton, R. B. and

Weathers, C. C., unpublished data), ...for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)

3. <u>เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ</u> ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (,) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

1) <u>วารสาร</u> ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างถึง เช่น

สายพิณ ขุมทรัพย์ สุรพล ขุมทรัพย์ และจาตุรนต์ พลราช 2544 การเจริญเติบโตของเซลล์ IFFA-3 ชนิดแขวนลอยในมีเดียมที่มีกรดอะมิโนและวิตามินผสมสำเร็จ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 11(1-2): 27-35

Johnson, R. H. and Collings, D. F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a b c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น

Carter, G. R. 1963a. A discussion of recent developments relating to *Pasteurella hemolytica* with special reference to strains pathogenic for cattle. Can. Vet. J. 4(7): 170–174.

Carter, G. R. 1963b. Immunological differentiation of type B and E strains of *Pasteurella multocida*. Can. Vet. J. 4(3): 61–63.

2) <u>หนังสือ</u> ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม พูลเกษ บรรณาธิการ หลักการทำไร่อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ หน้า 141-145

Office International des Epizooties. 2000. Principles of Veterinary Vaccine Production. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 42.

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

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

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

จันทรา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึ่งพิศ ดุลยพัชร์ 2541 อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm 27 มีนาคม 2541

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

“โอ้พระองค์ทรงงานมานานนัก พระทรงพักวรกายในสวรรค์
มวลประชาชาวไทยพร้อมใจกัน อัญเชิญพระองค์ท่านสู่สวรรคาลัยเอย”

ปวงข้าพระพุทธเจ้า ขอน้อมเกล้าน้อมกระหม่อมถวายความอาลัยแด่พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช ด้วยสำนึกในพระมหากรุณาธิคุณหาที่สุดมิได้

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้เป็นปีที่ 25 ฉบับที่ 1-2 มีนาคม-กันยายน 2559 เป็นฉบับรวมเล่มอีกครั้ง เหตุผลที่ล่าช้า เนื่องจากจำนวนผลงานวิจัยและผลงานวิชาการมีน้อย ไม่เพียงพอที่จะตีพิมพ์ลงวารสารได้ ซึ่งทางกองบรรณาธิการต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สำหรับเนื้อหาในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ประกอบด้วยบทความวิชาการ จำนวน 1 เรื่อง คือ โรคบรูเซลโลซิส โดยสัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัตร์ ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญด้านโรคบรูเซลโลซิส และเป็นผู้ก่อตั้งศูนย์อ้างอิงโรคบรูเซลโลซิส โดย OIE ให้การรับรอง ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และมีผลงานวิชาการ จำนวน 2 เรื่อง คือ พัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่ให้ความคุ้มโรคสูง: ความคุ้มโรคในโคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีปริมาณแอนติเจนต่างกัน และการศึกษาสภาวะสัตว์อมโรคที่ติดเชื้อด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและกระบือในประเทศไทย ซึ่งทั้งสองเรื่องนับว่าเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตวัคซีน การป้องกัน และควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นอย่างยิ่ง

กองบรรณาธิการ ขอขอบคุณผู้อ่านและนักวิชาการทุกท่านที่สนใจและให้การสนับสนุนส่งผลงานวิชาการและบทความวิชาการมาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ มา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ

กองบรรณาธิการ

โรคบรูเซลโลซิส

สพ.ญ.มนยา เอกทัตร์
ที่ปรึกษาอธิบดีกรมปศุสัตว์ ด้านโรคบรูเซลโลซิส

ประวัติของโรคบรูเซลโลซิส

บรูเซลโลซิสเป็นโรคที่มีประวัติยาวนาน เริ่มจากแถบเมดิเตอร์เรเนียน Hippocrates (400 B.C.) มีรายงานการป่วยจำนวนมาก ระหว่างศตวรรษที่ 17-18 และเรียกชื่อต่างๆกันตามถิ่นที่พบโรค เช่น Malta fever, Mediterranean fever, Rock fever of Gibraltar, Cyprus fever, Danube fever เป็นต้น

ปี ค.ศ. 1810 (พ.ศ. 2353) Sir William Burnett นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษ เป็นแพทย์คนแรกที่จำแนกชนิดของการเป็นไข้ของลูกเรือในแถบเมดิเตอร์เรเนียน

ปี ค.ศ. 1859 (พ.ศ. 2402) Dr.Jeffery Allen Marston นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษและเป็นผู้ป่วย ได้บันทึกอาการป่วยของตนเองที่เป็นไข้ที่ผิดปกติเป็นเวลา 30-90 วัน

วันที่ 9 กรกฎาคม ค.ศ. 1887 (พ.ศ. 2430) Sir David Bruce นายแพทย์ของกองทัพเรืออังกฤษ ไปปฏิบัติการที่เกาะมอลตา ได้พบเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของ Malta fever โดยการเพาะแยกเชื้อจากม้ามของทหารเรืออังกฤษที่ป่วยและเสียชีวิตเนื่องจากโรคนี้ ได้ตั้งชื่อว่า *Micrococcus melitensis*

ปี ค.ศ. 1895 (พ.ศ. 2438) Professor Dr. L. F. Bernhard Bang สัตวแพทย์ชาวเดนมาร์ก ด้านพยาธิวิทยาและแบคทีเรียวิทยา ได้พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในโค จึงเรียกชื่อว่า *Bacillus abortus (Brucella abortus)* ในขณะที่ทำการศึกษาการแท้งติดต่อในโคของประเทศเดนมาร์กมากกว่าศตวรรษ นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในม้า แกะ แพะ ซึ่งได้รู้จักและตั้งชื่อของโรคนี้ว่า “Bang’s disease”

ปี ค.ศ. 1914 (พ.ศ. 2457) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มลรัฐอินเดียนา Trum ได้แยกเชื้อแบคทีเรีย จากตัวอ่อนของลูกสุกรที่แท้ง จึงเรียกชื่อว่า *B. suis*

ปี ค.ศ. 1920 (พ.ศ. 2463) Dr. Alice Evans นักแบคทีเรียวิทยาชาวอเมริกันได้ค้นพบการเชื่อมโยงของโรคนี้ระหว่างคนและสัตว์ รูปร่างลักษณะและพยาธิสภาพของเชื้อโรคมีลักษณะเหมือนกันมากระหว่าง Bang’s *Bacterium abortus* และ Bruce’s *Micrococcus melitensis* ดังนั้นชื่อของ Sir David Bruce จึงได้นำมาเป็นชื่อสายพันธุ์ของเชื้อ และยังคงใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน

ปี ค.ศ. 1930 (พ.ศ. 2473) ชื่อของโรคเปลี่ยนจาก “Bovine infectious abortion” เป็น“Bang’s disease” และคณะกรรมการสัตวแพทยสมาคมของสหรัฐอเมริกาได้ใช้เชื้อที่มีความรุนแรงต่ำชื่อว่า *B. abortus* strain 19 ผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมโรคบรูเซลโลซิสในโค

ปี ค.ศ. 1934 (พ.ศ. 2477) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ประกาศจัดตั้ง “State Federal Brucellosis Eradication Program” ซึ่งส่วนหนึ่งของโปรแกรมดังกล่าวจะดำเนินการลดจำนวนโคที่เป็นโรค โดยมีการทดสอบโรค การทำลายสัตว์ที่มีผลบวกทางซีรัมวิทยา และการจ่ายค่าชดเชยโดยรัฐบาลในการทำลายสัตว์ แต่พบมีปัญหาค่อนข้างมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1941 (พ.ศ. 2484) จึงได้เริ่มดำเนินการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19 เกือบทั่วประเทศ พร้อมทำเครื่องหมายสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว

ปี ค.ศ. 1953 (พ.ศ. 2496) ในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ Buddle และ Boyes ได้แยกเชื้อ *B. ovis* จากแกะที่เป็น epididymitis

ปี ค.ศ. 1966 (พ.ศ. 2509) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา Carmichael เพาะแยกเชื้อ *B. canis* ได้จากลูกสุนัขที่แท้ง

สาเหตุของโรค

เชื้อ*บรูเซลลา* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างทรงแท่งสั้นและค่อนข้างเกือบกลม (coccobacilli) ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) มีความยาวประมาณ 0.3-2.3 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) และอาศัยภายในเซลล์ (intra-cellular bacteria) บางครั้งอาจพบเชื้อนอกเซลล์ได้ นอกจากเชื้อจะทำให้เกิดการแท้งลูกในสัตว์แล้ว เชื้อ *B. abortus* ที่พบในโค-กระบือ *B. melitensis* ที่พบในแพะ และ *B. suis* ที่พบในสุกร ยังเป็นเชื้อก่อโรคที่มีอันตรายต่อคน โดยทำให้คนที่ติดเชื้อมีไข้สูง หรือมีการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น กระดูก เนื้อเยื่อ และอวัยวะในระบบต่างๆ

ตารางที่ 1 สายพันธุ์เชื้อ*บรูเซลลา*ที่ก่อโรคในสัตว์และคน (OIE, 2009*a*; *Allix *et al.*, 2008)

Species	Biovar/Serovar	Natural Host	Human Pathogen
B. abortus	1-6, 9, (7)*	cattle	yes, moderate
B. melitensis	1-3	goats, sheep	yes, high
B. suis	1,3	swine	yes, high
	2	hare	yes, low
	4	reindeer, caribou	yes, moderate
	5	wild rodents (Russia)	yes, high
B. canis	none	dogs, other canids	yes, low
B. ovis	none	sheep	no
B. neotomae	none	desert wood rat	unknown
B. ceti	-	cetaceans	high ?
B. pinnipedialis	-	pinnipeds	high ?
B. microti	-	voles-foxes (central EU)	unknown

ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ*บรูเซลลา*

จีโนมของเชื้อ*บรูเซลลา* ประกอบด้วยไมโครโซม 2 สาย ขนาด 2.1 และ 1.5 เมกกะเบส ไม่มีพลาสมิด ในเชื้อ*บรูเซลลา*ที่ต่างสายพันธุ์กันจะมีลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่เหมือนกันมากกว่า 95% ทำให้มีการจัดสายพันธุ์ และจำแนกเป็น biovars สำหรับสายพันธุ์อื่นๆที่พบในเวลาต่อมาไม่มีการจัด biovars จากการที่เชื้อ*บรูเซลลา* มีความใกล้ชิดกันมากจึงมีการสันนิษฐานว่าเชื้อในกลุ่มนี้มาจากต้นกำเนิด (stem or progenitor) เดียวกัน และจากการศึกษาเชื้อ*บรูเซลลา* ในแต่ละสายพันธุ์เพื่อดูความหลากหลายทางชีวภาพนั้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Gandara *et al*., 2001) และมีความใกล้ชิดกัน ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จะมีประโยชน์มากในการติดตามเส้นทางการเปลี่ยนแปลงของเชื้อซึ่งจะรวมถึงการมี biovars ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ลักษณะของโคโลนีที่พบเมื่อมีการเพาะแยกเชื้อ การเปลี่ยนแปลงทาง metabolic การเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสี basic fuchsin และ thionin ต้องการ CO_2 และซีรัมในการเจริญเติบโต (การเพาะเชื้อจากตัวอย่างในครั้งแรก) ความไวต่อ *Brucella* bacteriophage และธรรมชาติของเชื้อที่ชอบ host ที่แตกต่างกัน (OIE, 2009*a*) ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้นำมาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อ*บรูเซลลา*

Brucella abortus

เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคบรูเซลโลซิสในโค เชื้อจะอยู่เฉพาะที่ เช่น ที่ต่อมน้ำเหลืองต่างๆ เต้านมและต่อมน้ำเหลืองที่เต้านม และระบบอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเมีย เชื้อ *B. abortus* ทุกสายพันธุ์ รวมทั้ง strain 19 จะทำให้เกิด necrotizing orchitis ในโคเพศผู้และมักเป็นแบบเฉียบพลัน อาจเป็นข้างเดียวหรือสองข้าง ถุงหุ้มอัณฑะบวมและมีการอักเสบที่เยื่อหุ้มทำให้ช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มแคบลง พร้อมทั้งมีเลือดออก และมี fibrinopurulent exudate เกิด necrotic foci ที่ testicular parenchyma นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมสลายของ prostatic epithelium และเมื่อมีการติดเชื้อที่ reproductive tract จะส่งผลทำให้น้ำเชื้อคุณภาพไม่ดี

Brucella melitensis

เชื้อนี้เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคบรูเซลโลซิสในแพะ แกะ ลักษณะของการเกิดโรคในแพะจะคล้ายกับการเกิดโรคในโค ในระยะแรกที่เป็น bacteremic phase ในแพะที่ไม่แสดงอาการของโรค เชื้อมักจะอยู่ที่เต้านมซึ่งจะส่งผลให้เกิด acute mastitis พบ nodule เนื้อเยื่อของเต้านมอักเสบทำให้น้ำนมบางส่วนจับกันเป็นก้อน และส่วนที่เป็นน้ำจะใสๆ การแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งท้องยังคงเป็นลักษณะเฉพาะของการเกิดโรคในแพะ

Brucella ovis

เชื้อ *B. ovis* จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดของสายพันธุ์*บรูเซลลา* แต่มีความสำคัญเพราะเป็นสาเหตุในการเกิด epididymitis ในแกะเพศผู้ การติดต่อของโรคคือทางการผสมพันธุ์ เชื้อ *B. ovis* จะอยู่ที่

epididymis และมักจะอยู่ที่ส่วนปลายทำให้เกิด perivascular edema มี lymphocytes และ monocytes มาอยู่รวมกันที่ peritubular tissue ส่วน neutrophils ทำให้เกิดการอักเสบมีหนอง และในที่สุด epithelial cell จะถูกทำลาย ลูกแกะจากแม่ที่เป็นโรคอาจมีชีวิตอยู่หลังคลอด ส่วนลูกแกะที่ตายจะพบมีการบวมน้ำ และเนื้อเยื่อต่างๆมีการคั่งเลือด ลักษณะที่เฉพาะคือ มีแคลเซียมเกาะที่ฝ่าเท้าและขอบกีบ

Brucella suis

สาเหตุของโรคบรูเซลโลซิสในสุกร คือ *B. suis* ซึ่งลักษณะของการเกิดโรคจะแตกต่างจากการเกิดโรคในโค แพะ และ แกะ เชื้อ *B. suis* จะทำให้เกิดลักษณะ focal granulomatous reactions ซึ่งในระยะต่อมาจะกลายเป็น coagulative necrosis และรอยโรคจะขยายวงกว้างไปที่กระดูกและข้อต่อ การแพร่โรคที่พบบ่อยคือการผสมพันธุ์ ในสุกรเพศผู้ที่เป็นโรคจะเกิด orchitis และ epididymitis พร้อมทั้งปล่อยเชื้อออกมากับน้ำเชื้อสุจิ ในแม่สุกรที่เป็นโรคจะปล่อยเชื้อออกมาในช่องคลอดอาจนานถึง 2 ½ ปี

ลักษณะพิเศษของรอยโรค คือ granulomatous จะมี histocytic และ epithelioid cells ล้อมรอบส่วนตรงกลางมีลักษณะเป็น caseous หรือ coagulative necrosis ห่อหุ้มด้วย fibrous capsule ใน granulomas พบ giant cells เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่ที่ synovial membranes มักพบ exudative purulent หรือ fibrinopurulent arthritis

Brucella canis

เชื้อ *B. canis* เป็นสาเหตุของการแท้ง และ epididymitis ในสุนัข ในเพศผู้ที่ติดโรคจะพบ testicular arthrophy และเป็นหมัน การติดต่อของโรคทางปากนั้นจะมีผลต่อ retropharyngeal lymph nodes และหากติดต่อทางการผสมพันธุ์ก็จะมีผลต่อ superficial inguinal และ iliac lymph nodes ต่อมน้ำเหลืองเหล่านี้จะบวมและขยายใหญ่ ในสุนัขที่มีความไวต่อการติดโรค มีระยะของ bacteremic phase ประมาณ 1-3 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อและอาจนานหลายเดือนถึงหลายปี การติดเชื้อในขณะที่สุนัขตั้งท้องจะพบรกอักเสบ ตัวอ่อนติดเชื้อ และมดลูกอักเสบเรื้อรัง ในตัวอ่อนที่ติดเชื้อจะพบ granulomatous pneumonia เยื่อบุหัวใจอักเสบ ตับอักเสบ และไตอักเสบ ส่วนในเพศผู้หลังจากได้รับเชื้อโดยการกินจะพบถุงอัณฑะบวมหลังจากได้รับเชื้อ ประมาณ 3-5 สัปดาห์

Polysaccharides ของเชื้อ*บรูเซลลา*

Polysaccharides ของเชื้อ*บรูเซลลา* ประกอบด้วย O-Polysaccharides (OPS) มี N-acylated derivatives ของ 4-amino-4, 6-dideoxy-∞-D-manno-pyranosyl และ Polysaccharides ชนิดอื่นๆ คือ Polysaccharides B เป็นชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย และ Native hapten

ส่วนที่เป็น outer membrain protein ของเชื้อจะเป็น protein แอนติเจนที่ให้ภูมิคุ้มกัน หรือเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการชันสูตรโรค แอนติเจนของเชื้อที่ทำให้เกิดการตอบสนองของแอนติบอดีที่สำคัญ คือ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide A, M และ A and M epitopes

เชื้อ *B. abortus, B. melitensis* และ *B. suis* จะประกอบด้วย carbohydrate ที่เหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในการตรวจทางซีรัมวิทยาสำหรับ Smooth *Brucella* จะสามารถใช้แอนติเจน smooth lipopolysaccharide (sLPS) ร่วมกันได้ ส่วนเชื้อ*บรูเซลลา*สายพันธุ์ที่เป็นชนิด Rough strain เช่น *B. ovis* หรือ *B. canis* จะต้องใช้ rough lipopolysaccharide เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ไม่สามารถจะใช้ชนิด sLPS ได้

เชื้อ*บรูเซลลา* ชนิด rough strain จะไม่มี OPS หรือมีในปริมาณที่น้อยมากจึงมักจะมีความรุนแรงน้อยกว่าเชื้อชนิด smooth strain และ complement จะทำลายเชื้อได้โดยง่าย แต่ก็ยังมีบางสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อชนิด rough strain ทำให้เกิดโรคได้ เช่น *B. canis* และ *B. ovis*

ความคงทนของเชื้อ*บรูเซลลา*

เชื้อ*บรูเซลลา*สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในฝุ่นละออง มูลสัตว์ น้ำ น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ดิน เนื้อลูกสัตว์แท้ง และผลิตภัณฑ์จากนม ระยะเวลาที่เชื้อมีชีวิตจะนานมากหรือน้อย จะเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติของสิ่งที่เชื้อปนเปื้อน ปริมาณของเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แสงแดด การปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลชีพอื่นๆ

ตารางที่ 2 ระยะเวลาที่เชื้อ *B. abortus* หรือ *B. melitensis* มีชีวิตในสิ่งต่างๆ

สิ่งที่เชื้ออาศัยอยู่	อุณหภูมิ/สิ่งแวดล้อม	เวลามีชีวิตอยู่รอด
B. abortus		
ผิวหน้าวัสดุแข็ง	<30 °C, แสงแดด	4-5 ชั่วโมง
น้ำประปา	- 4 °C	114 วัน
น้ำในทะเลสาบ	37 °C, pH 7.5	<1 วัน
น้ำในทะเล	8 °C, pH 6.5	>57 วัน
ดิน-แห้ง	~20 °C	<4 วัน
ดิน-เปียกชื้น	<10 °C	66 วัน
ปุ๋ยมูลสัตว์	ฤดูร้อน	1 วัน
มูลสัตว์	ฤดูหนาว	53 วัน
น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์	ในถังที่อุณหภูมิห้อง	49 วัน
น้ำจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์	ในถังที่อุณหภูมิ 12 °C	>8 เดือน
B. melitensis		
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH >5.5	>28 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH 5	<21 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH 4	7 วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	pH <4	<1 วัน

สิ่งที่เชื้ออาศัยอยู่	อุณหภูมิ/สิ่งแวดล้อม	เวลามีชีวิตอยู่รอด
เนยแข็ง (ค่อนข้างนิ่ม)	37 °C	2-3 วัน
โยเกิร์ต	37 °C	2-3 วัน
น้ำนม	37 °C	7-24 ชั่วโมง

ระบาดวิทยาของโรคบรูเซลโลซิสในสัตว์

สาเหตุและการติดต่อ

เชื้อ*บรูเซลลา*ที่เป็นสาเหตุของโรคบรูเซลโลซิสในสัตว์แต่ละชนิดในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน ดังนี้

โค : โรคบรูเซลโลซิสในโคมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *B. abortus* แต่อย่างไรก็ตามโคอาจติดเชื้อ *B. melitensis* ได้ หรือในบางครั้งอาจติดเชื้อ *B. suis* โคและสัตว์ในตระกูลนี้มีการติดต่อของโรคจากสัตว์สู่สัตว์ได้โดยการสัมผัสกับสิ่งต่างๆ ของสัตว์ที่เป็นโรคหลังการแท้งลูก แปลงหญ้าและโรงเรือนอาจมีการปนเปื้อนเชื้อ สัตว์จะติดโรคได้โดยการกิน และติดเชื้อจากถังรีดนมก็อาจเป็นได้โดยการหายใจ ทางเยื่อชุ่ม conjunctiva ทางผิวหนังปนเปื้อน และ ทางเต้านม การนำน้ำนมเหลืองมารวมกันแล้วนำไปเลี้ยงลูกสัตว์แรกเกิดก็จะเป็นทางหนึ่งของการแพร่โรค การติดโรคโดยการผสมพันธุ์พบว่ามีบทบาทค่อนข้างน้อยในทางระบาดวิทยาของโรคบรูเซลโลซิสในโค อย่างไรก็ตามการผสมเทียมอาจจะแพร่โรคได้เช่นกัน ดังนั้นน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมจะต้องรีดจากสัตว์ที่ไม่เป็นโรค ระยะฟักตัวของโรคไม่แน่นอน ในกรณีที่มีการติดโรคในระยะแรกๆ ของการตั้งท้องจะพบว่ามีระยะฟักตัวนาน

แพะ-แกะ : สาเหตุของโรคบรูเซลโลซิสส่วนใหญ่เกิดจาก เชื้อ *B. melitensis* ส่วนเชื้อ *B. ovis* สามารถทำให้เกิดโรคได้ในแกะ การติดเชื้อ *B. melitensis* ในแพะ-แกะ เหมือนกับในโค แต่การติดต่อจากการผสมพันธุ์จะมีบทบาทสำคัญมาก การแพร่โรคจะเกิดโดยการคลุกคลีของสัตว์ในฝูง การรวมฝูงจากหลายเจ้าของ และจากการซื้อสัตว์มาจากแหล่งที่ไม่มีการคัดกรองโรค การใช้พ่อพันธุ์สัตว์ร่วมกันก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการแพร่โรคระหว่างฟาร์มได้ การรวมสัตว์เข้าในฝูงเดียวกันในตลาดค้าสัตว์ หรือการนำสัตว์ไปแสดงโชว์ ในแกะพบว่าพันธุ์ของสัตว์มีส่วนเกี่ยวข้องกับความไวในการติดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งแกะพันธุ์นมจะมีความไวต่อการติดเชื้อ *B. melitensis* มาก

ในแพะมีการปล่อยเชื้อ *B. melitensis* ออกมากับสารคัดหลั่งจากอวัยวะสืบพันธุ์ได้นานมากกว่า 2-3 เดือน ส่วนในแกะประมาณ 3 สัปดาห์ และสามารถพบเชื้อได้ในน้ำนมและน้ำเชื้ออสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแพะจะปล่อยเชื้อได้นาน หรืออาจจะตลอดชีวิต ในลูกสัตว์ที่ได้รับน้ำนมจากแม่ที่เป็นโรคอาจพบเชื้อได้จากมูลของลูกสัตว์

ในแกะ เชื้อ *B. ovis* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่นกันทำให้เกิด epididymitis, orchitis ในตัวผู้ ข้างใดข้างหนึ่งทำให้เป็นหมัน และพบ *B. ovis* ในกวางแดง (ประเทศนิวซีแลนด์) มีการติดต่อจากแกะตัวผู้ตัวหนึ่งไปยังตัวผู้อีกตัวโดยทางอ้อม คือ passive veneral transmission ผ่านทางแกะตัวเมีย จากการทดลองฉีดเชื้อพบระยะฟักตัวอยู่ระหว่าง 3-8 สัปดาห์ แกะตัวผู้สามารถปล่อยเชื้อออกมาเป็นช่วงๆในน้ำเชื้ออสุจิได้นานถึง 2-4 ปี หรืออาจนานกว่านี้ ส่วนการติดโรคจากการปนเปื้อนของเชื้อในแปลงหญ้าไม่มีความสำคัญมากนัก

สุกร : เกิดจากการติดเชื้อ *B. suis* การติดต่อของโรคเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับแม่สุกรที่เพิ่งแท้งใหม่ๆ โดยการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามการติดต่อทางการผสมพันธุ์ก็มีความสำคัญมาก โรคบรูเซลโลซิสอาจมีการนำเข้าฟาร์มได้โดยการใช้พ่อพันธุ์ร่วมกันหรือการซื้อสัตว์ที่เป็นโรคเข้าฟาร์ม ระยะฟักตัวของโรคไม่แน่นอน *B. suis* biovar 1, 3 และ 4 มีความสำคัญและรุนแรงมากในคน ส่วน biovar 2 เป็นสายพันธุ์ที่อันตรายต่อคนเช่นกันแต่ยังมีรายงานการเกิดโรคค่อนข้างน้อย

สุนัข : เกิดจากการติดเชื้อ *B. canis* ที่เป็นปัญหาสำคัญคือมีการปนเปื้อนเชื้อที่บ้านของสุนัขพ่อ-แม่พันธุ์ มีการแพร่โรคโดยการสัมผัสกับลูกสัตว์ที่เพิ่งแท้ง หรืออาหาร และสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนจากการแท้งลูก หรือสารคัดหลั่งต่างๆ การผสมพันธุ์ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญในการแพร่โรค และสัตว์ตัวผู้สามารถจะปล่อยเชื้อในปริมาณที่มากในน้ำเชื้อ ในบางครั้งอาจพบเชื้อในปัสสาวะ และในบางประเทศที่พบเชื้อ *B. canis* ในสุนัขมักจะพบการติดโรคในคน และปรากฏอย่างชัดเจนว่ามีสาเหตุจาก *B. canis* แต่ไม่บ่อยนัก ในสุนัขพบว่าอาจมีโอกาสติดเชื้อ *B. abortus*, *B. melitensis* หรือ *B. suis* จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือแม่สุกรที่แท้ง โดยทั่วไปมักจะติดต่อโดยการกินส่วนต่างๆ จากลูกสัตว์ที่แท้ง หรือรก เชื้อจะถูกปล่อยออกมาซึ่งจะเป็นอันตรายต่อคนและปศุสัตว์อื่นๆได้

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ : โรคบรูเซลโลซิสในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ เริ่มพบโรคในสัตว์น้ำในปี ค.ศ. 1991 ในโลมาที่แท้งลูก ต่อมาได้มีการศึกษาในสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่องและพบว่าสามารถจะติดต่อไปถึงคนได้ รวมทั้งผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ และได้มีการตั้งชื่อเชื้อ*บรูเซลลา* อีก 2 สายพันธุ์ คือ *B. ceti* พบในวาฬ โลมา และนาก อีก 1 ชนิดคือ *B. pinnipedialis* มักพบในแมวน้ำ สิงโตทะเล รอยโรคพบมีความรุนแรงมากที่ central nervous system (CNS) คือ hyperemic meningeal blood vessels การติดต่อมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์บก คือ สามารถติดต่อได้ทาง placenta จากแม่สู่ลูก และเชื้อ*บรูเซลลา*บางสายพันธุ์ในสัตว์น้ำที่เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ จะไม่เป็นอันตรายต่อคน (Foster, 2008; Gonzalez-Barrientos *et al*., 2008) นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อ*บรูเซลลา*ได้จากเนื้อเยื่อปกติทั่วไป โรคบรูเซลโลซิสจะมีผลกระทบมากในสัตว์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีจำนวนน้อยและ

ใกล้สูญพันธุ์ (Maui's dolphin ที่ประเทศนิวซีแลนด์ เหลืออยู่ประมาณ 100 ตัว) เนื่องจากลูกตายเมื่อแรกเกิด สัตว์บกสามารถจะติดเชื้อจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำได้ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นโดยบังเอิญ

การติดต่อของโรคยังมีข้อมูลน้อยมากอาจติดต่อโดยการสัมผัสโดยตรงเช่นเดียวกับสัตว์บก หรือโดยการผสมพันธุ์ เพราะสามารถเพาะแยกเชื้อได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์จำพวก caetacean (โลมา วาฬ และนาก) นอกจากนี้อาจติดต่อได้ทางน้ำนมหรือทางรก ดังนั้นไม่ว่าจะสัมผัสโดยตรงหรือโดยอ้อม สัตว์เหล่านี้ก็จะติดโรคได้ ระยะฟักตัวของโรคยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน

สัตว์ปีก : การเลี้ยงสัตว์ปีกรวมกับโค แพะ แกะ จะทำให้สัตว์ปีกมีโอกาสเป็นโรคบรูเซลโลซิสได้ ซึ่งได้มีการศึกษาในประเทศไนจีเรียโดยศึกษาทางซีรัมวิทยาในไก่ พบให้ผลบวก 2.6-3 % เนื่องจากไก่เหล่านี้ได้สัมผัสกับโค และแพะที่เป็นโรค (Junaidu *et al.*, 2006)

ความแตกต่างของพันธุ์สัตว์ : ความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์สัตว์ เช่น พันธุ์ของโคที่ต่างกัน เมื่อพิจารณาความไวในการติดโรคยังมีข้อมูลที่ไม่ชัดเจน โค แพะ แกะ และสุกร ที่เจริญเติบโตเต็มวัยจะมีความไวในการติดโรคมาก ส่วนในสัตว์ที่มีอายุน้อยๆ มักจะทนต่อโรค ถึงแม้ว่าในฟาร์มที่มีการจัดการฟาร์มดีและความเสี่ยงในการติดโรคมีน้อยมาก อย่างไรก็ตามสัตว์ที่มีโรคแฝง หรือสัตว์ที่ไม่แสดงอาการของโรคก็จะมีโอกาสพบได้ในฟาร์ม ซึ่งเป็นผลมาจากการติดโรคทางรก หรือการติดโรคในระยะแรกที่มีการตกลูก สัตว์เหล่านั้นจะยังคงเป็นโรคไปตลอดชีวิตโดยมีผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาเป็นลบแม้ว่าต่อมาจะมีการแท้งลูก หรือมีการตกลูกตามปกติ ซึ่งเรียกว่า latent infection และสัตว์เหล่านี้อาจจะแสดงอาการของโรคและเป็นแหล่งโรคได้เมื่อเจริญเติบโตเต็มวัย ซึ่งอาจพบได้ในรุ่นลูกประมาณ 5% ของแม่โคที่เป็นโรค สำหรับในแกะมีรายงานการพบ latent infection ดังกล่าว ส่วนปัญหาเหล่านี้ในสัตว์อื่นๆ ยังไม่อาจประมาณได้ การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันนั้นจะมีผลเป็นอย่างมากในสัตว์ที่มีความไวต่อการติดโรค การฉีดวัคซีนในโคด้วย *B. abortus* สเตรน 19 หรือ RB 51 หรือ ฉีดวัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ในแพะ แกะ จะสามารถลดความไวในการติดโรคได้ถึง 1,000 เท่า หรือมากกว่าจากการที่ติดโรคในสายพันธุ์ที่เหมือนกัน วัคซีน *B. abortus* สเตรน 19 ในโคไม่สามารถจะให้ภูมิคุ้มกันต่อต้านเชื้อ *B. melitensis* ได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้วัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ป้องกันโรคในโคมีน้อยมาก ประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเชื้อ *B. melitensis* ในบางพื้นที่ที่พบโรคบรูเซลโลซิสมีอยู่ทั่วไปยังคงไม่มีความชัดเจน สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตวัคซีนจะต้องเชื่อถือได้และมาจากแหล่งขององค์กรระหว่างประเทศ และอาจเป็นไปได้ที่เชื้อ *B. melitensis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้จากภูมิต้านทานที่สร้างขึ้นจากวัคซีนที่ใช้อย่างไรก็ตามความแตกต่างของคุณภาพของวัคซีนจะมีผลต่ออัตราของการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค ในปัจจุบันวัคซีน *B. melitensis* Rev 1 ที่ใช้ในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. melitensis* ในหลายประเทศให้ผลดี มีข้อคำแนะนำในการใช้วัคซีนคือจะใช้ต่อเมื่อไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อในฝูงสัตว์ได้

พยาธิกำเนิด

การติดเชื้อที่ชั้นเยื่อเมือกและต่อมน้ำเหลือง

เชื้อ*บรูเซลลา*เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด intracellular gram negative เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดการอักเสบแบบ granulomatous inflammation ที่ lymphoid tissue หรืออวัยวะที่มีส่วนประกอบของ reticuloendothelial cells ความรุนแรงของการติดเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของเชื้อ อายุ เพศ พันธุ์ ภาวะของระบบสืบพันธุ์ และความต้านทานของสัตว์ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเกาะติดกับผิวของเยื่อเมือกต่างๆ ของร่างกายในลักษณะที่เรียกว่า “niche” หลังจากที่เชื้อ*บรูเซลลา* ผ่านระบบป้องกันของชั้นใต้เยื่อเมือกออกมาได้เชื้อจะกระจายไปตามระบบน้ำเหลืองเข้าไปในต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง พบว่าต่อมน้ำเหลืองดังกล่าวจะขยายตัวขึ้นเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ lymphoid และ reticuloendothelial cells รวมทั้งเซลล์ต่างๆ ที่มาตอบสนอง และจะพบการอักเสบแบบ granulomatous inflammation ซึ่งประกอบด้วย macrophages และ epithelioid cells นอกจากนี้จะพบ neutrophils และ eosinophils รวมกลุ่มอยู่ข้างๆเส้นเลือดในต่อมน้ำเหลืองและใน capsule ที่ห่อหุ้มต่อมน้ำเหลือง เมื่อเชื้อ*บรูเซลลา*เข้าต่อมน้ำเหลืองแต่ไม่ถูกทำลายจะคงอยู่ในร่างกาย (persistence) และผ่านเข้าไปในกระแสเลือดตัวเชื้อจะอาศัยอยู่ใน neutrophils และ macrophages เพื่อเป็นเกราะกำบังป้องกันตัวเองจาก humoral และ cellular mechanism หลังจากนั้นจะกระจายไปทั่วร่างกายเกิดภาวะ bacteremia ในระยะนี้มักจะแยกเชื้อได้จาก lymphoid tissue เต้านม อวัยวะสืบพันธุ์ และอาจเพาะแยกเชื้อได้จาก ไขกระดูก ข้อ ตา และสมอง

การติดเชื้อที่ระบบสืบพันธุ์

การติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศเมียและเพศผู้คาดว่าเป็นผลมาจาก specific tropism ของเชื้อต่อเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ซึ่งมี erythritol ความเข้มข้นสูง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสุกร ซึ่งสาร erythritol จะเป็นตัวเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. abortus* บางตัว ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ และ *B. abortus* strain 19 สาร erythritol จะไม่เร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อของระบบอวัยวะสืบพันธุ์ที่ไม่พบสารนี้ยังคงทำให้เกิดการติดเชื้อ และแท้งได้

การติดเชื้อที่ chorioallantoic membrane

สำหรับในไข่ไก่ฟักที่ติดเชื้อ *B. abortus* จะพบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ที่ mesenchymal, mesothelial, yolk endodermal และเซลล์ตับของไข่ไก่ฟักในส่วนของ rough endoplasmic reticulum เช่นกัน จากตำแหน่งและปริมาณเชื้อในเซลล์ที่แตกต่างกันและจากการที่เชื้ออยู่ที่ phagosomes ของ macrophages เข้าใจกันว่าอาจเนื่องจาก chorionic trophoblasts เป็น metabolically active cells ซึ่งทำให้สามารถสร้างฮอร์โมน และสารคัดหลั่งได้หลายชนิดอันจะส่งผลให้เป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ*บรูเซลลา*

อาการและรอยโรค

สัตว์ที่เป็นโรคบรูเซลโลซิสมักจะไม่แสดงอาการ แต่หากแสดงอาการของโรคจะพบอาการที่เป็นลักษณะเฉพาะแต่ไม่จำเพาะ คือการแท้งลูกหรือการตกลูกก่อนกำหนด และรกค้าง สัตว์ส่วนใหญ่ที่เป็นโรคมักพบมีการแท้งลูกเพียงครั้งเดียว หรืออาจไม่มีการแท้งลูก ในบางพื้นที่อาจไม่พบการแท้งลูก เช่น ในพื้นที่บางส่วนของอาฟริกาพบอาการของโรค คือ พบฝีหนองเป็นส่วนใหญ่ ทั้งในสัตว์ที่เลี้ยงเฉพาะที่และที่เลี้ยงเร่ร่อน ความรุนแรงของโรคบรูเซลโลซิสขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น มีการฉีดวัคซีน อายุ เพศ และการจัดการ เช่น ขนาดของฝูง/ฟาร์ม ความหนาแน่นในฝูง อาการที่พบบ่อยในสัตว์ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนคือสัตว์แท้งลูกพร้อมทั้งปล่อยเชื้อออกมาในปริมาณสูง เชื้อจะอยู่ที่เนื้อเยื่อและสารคัดหลั่งในขณะที่ตั้งท้อง เต้านม และต่อมน้ำเหลืองต่างๆ ที่บริเวณใกล้เคียง

โค กระบือ : โดยทั่วไปโค กระบือ ที่ได้รับเชื้อ *B. abortus* ก่อนการตั้งท้อง และไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคบรูเซลโลซิส จะทำให้เกิดการแท้งลูกในโคในระยะที่สามของการตั้งท้อง ส่วนโคที่ได้รับเชื้อในขณะตั้งท้องซึ่งเป็นระยะที่อันตรายจะพบการแท้งลูกประมาณ 80% ในระยะสัปดาห์ที่สองถึงเดือนที่ห้าหลังจากได้รับเชื้อ โดยเชื้อจะผ่านทางเยื่อชุ่มและจะไปทำให้รกอักเสบ หากมีการแท้งอย่างเฉียบพลันหลังจากได้รับเชื้อจะพบว่าลูกที่แท้งออกมามีลักษณะเป็นปกติ หากลูกตายในท้อง (stillbirth) และไม่สามารถขับออกได้ในระยะเวลาที่ควรจะเป็นจะพบลูกสัตว์เน่าและมีสีคล้ำ ในบางครั้งพบว่าสัตว์แท้งลูกในระยะปลายหรือคลอดได้แต่ลูกตาย หรืออาจคลอดลูกตามปกติแต่ลูกสัตว์อ่อนแอ บ่อยครั้งที่พบว่าสัตว์ที่เป็นโรคมีรกค้าง น้ำนมลด และเต้านมอักเสบ ที่เต้านมจะมีเชื้ออยู่ตลอดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแม่โคจึงทำให้มีการปล่อยเชื้อออกมากับน้ำนมได้ ในสัตว์ที่แท้งลูกแล้ว หลังจากนั้นจะมีระยะที่เป็นหมันชั่วคราวและต่อมาสัตว์จะมีการตั้งท้องได้ตามปกติซึ่งจะมีเพียง 5% เท่านั้นยังคงเป็นหมันต่อไป ในโคส่วนใหญ่จะปล่อยเชื้อออกมาพร้อมกับน้ำนมตลอดชีวิตที่เป็นโรค

แพะ แกะ : สาเหตุหลักของการแท้งลูกในแพะ-แกะ คือ *B. melitensis* มีอาการเช่นเดียวกับโค พบการแท้งลูกในช่วงท้ายของการตั้งท้อง หรืออาจคลอดลูกแล้วลูกตายหลังคลอด หรือลูกอ่อนแอ เชื้อจะผ่านทางเยื่อชุ่มและจะไปทำให้รกอักเสบ และมีรกค้าง ในแพะมักจะพบอาการของข้อและอัณฑะอักเสบ ในแพะตัวเมียไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ และจะนำไปสู่การปล่อยเชื้อไปจนถึงการตั้งท้องในครั้งต่อไป ที่เต้านมจะมีเชื้ออยู่ตลอดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแม่แพะ ทำให้มีการปล่อยเชื้อออกมากับน้ำนมได้เป็นระยะๆ *B. ovis* เป็นสาเหตุที่ทำให้แกะมีการแท้ง รกอักเสบ และลูกตายก่อนคลอดได้เช่นกัน อาการที่สำคัญ คือ ท่อนำน้ำเชื้ออักเสบ (epididymitis) สามารถตรวจพบโรคได้นานถึง 2 ปี หลังจากนั้นอสุจิจะกลับเป็นปกติ การแพร่โรคที่เกิดจากการผสมพันธุ์และจะมีการปล่อยเชื้อได้ยาวนานกว่า 4 ปี คุณภาพของน้ำเชื้อจะต่ำลงอย่างรวดเร็ว และพบเม็ดเลือดขาวในน้ำเชื้อ ในกรณีที่สัตว์ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น การตรวจหาสัตว์ที่ปล่อยเชื้อออกมากับน้ำเชื้อนั้นต้องทำการเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะแยกเชื้อเป็นระยะๆ อย่างต่อเนื่อง

สุกร: สาเหตุของโรค คือ *B. suis* เชื้อมักจะอยู่เฉพาะที่และแตกต่างกัน ซึ่งทำให้การแสดงอาการของโรคแตกต่างไป การแท้งลูกจะพบสูงถึง 80% หากแท้งในระยะแรกๆ ของการตั้งท้องการเพาะแยกเชื้อมักจะไม่พบเชื้อในสิ่งส่งตรวจ และจะทำให้ต้องมีการผสมพันธุ์ซ้ำ พบการเป็นหมันได้ทั้งแบบชั่วคราวและถาวร ในสุกรพ่อพันธุ์พบอัณฑะอักเสบทั้งข้างเดียวและสองข้างซึ่งทำให้สุกรเป็นหมัน อาการอื่นๆ ที่พบ คือ ขาอักเสบ ขาหลังเป็นอัมพาต กระดูกสันหลังอักเสบ (spondylitis) มดลูกอักเสบ และมีฝีเป็นหนองตามที่ต่างๆ ของร่างกาย ระยะฟักตัวตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งแสดงอาการไม่แน่นอน ส่วนการแท้งลูกจะพบได้ในทุกระยะของการตั้งท้อง

ม้า : มีความไวมากต่อการติดเชื้อ *B. abortus* และ *B. suis* อาจเกิดจากการติดเชื้อโดยตรง หรือเกิดจากการติดเชื้อที่บาดแผล อาการที่พบคือ สัตว์มีการอักเสบบริเวณถุงน้ำหล่อเลี้ยงภายในที่อยู่เหนือกระดูกสันหลัง (supraspinous bursa) โดยผนังเริ่มหนา และต่อมาจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า Fistulous Withers หรือ Poll Evil โดยมีหนองและมีของเหลวข้นเต็มในถุงน้ำหล่อเลี้ยง (bursa) และขยายใหญ่ขึ้น ต่อมาจะพบการติดเชื้อของเชื้อฉวยโอกาส ทำให้ bursa แตก หนองไหลออกมา ในที่สุดเป็นแผลเรื้อรังและทำให้ supraspinous bursa พบมีเนื้อตาย ซึ่งในม้าพบเป็นฝีเฉพาะใน bursa เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีอาการอื่นๆ ส่วนการติดเชื้อ *B. melitensis* ในม้ามักไม่ค่อยพบอาการของข้ออักเสบ

สุนัข : การเป็นโรคบรูเซลโลซิสพบว่าสุนัขมีความไวต่อการติดเชื้อ *B. melitensis*, *B. abortus* และ *B. suis* แต่สาเหตุสำคัญของการแท้งลูก คือ *B. canis* ในสุนัขพบการแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งท้อง พร้อมทั้งมีสารคัดหลั่งออกมาจากช่องคลอดตลอดเวลา จะพบเชื้อแบคทีเรียนานถึง 18 เดือน หลังจากได้รับเชื้อ อาการอื่นๆที่พบคือ ลูกตายในท้อง ผสมไม่ติด ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ ท่อนำน้ำเชื้ออักเสบ เนื้อเยื่อหุ้มอัณฑะอักเสบ (periorchitis) และ ต่อมลูกหมากอักเสบ (prostatitis)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ : อาการในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำยังมีข้อมูลน้อยมาก อาการของโรคทางระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของ wild marine mammals การเป็นโรคจะประเมินได้ค่อนข้างยาก การแสดงอาการร่วมกับการพบรอยโรคนั้นพบได้ยากมาก แต่ยังสามารถแยกเชื้อ*บรูเซลลา*ได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำบางสายพันธุ์ และมีรายงานพบโลมาปากขวดได้แท้งลูกที่มีลักษณะคล้ายโรคบรูเซลโลซิส และพบรกอักเสบ นอกจากนี้ยังพบอาการ *Brucella*-associated epididymitis และอัณฑะอักเสบ โลมาที่แสดงอาการ meningoencephalitis อย่างรุนแรง และเรื้อรังจะพบ non suppurative meningitis, periventricular encephalitis และก้านสมองถูกทำลาย ส่วนที่มีอาการในระดับปานกลางจะพบ fibrosis มีเซลล์ lymphocytes, plasma cells และ macrophages เข้ามาแทรก พบการอักเสบของเส้นเลือด ส่วนรอยโรคในอวัยวะอื่นๆนั้น มีเพียงเล็กน้อยและไม่จำเพาะต่อโรค ใน minke whales อาจพบมีแคลเซียมมาเกาะที่อัณฑะ หรือเป็นลักษณะ caseation ซึ่งเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบ chronic purulent หรือ granulomatous orchitis

สัตว์อื่นๆ : การศึกษาโรคบรูเซลโลซิสในสัตว์ป่ายังเป็นปัญหา มีการศึกษาทั้งทางซีรัมวิทยา และชีวโมเลกุลเพื่อทราบถึงชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อ*บรูเซลลา* ซึ่งในการศึกษาจะต้องคำนึงถึงลักษณะของภูมิประเทศที่อาจจะพบลักษณะที่แตกต่างกันได้ เช่น อูฐมักไม่ค่อยแสดงอาการของโรค แต่อูฐที่ติดเชื้อ *B. melitensis* จะปล่อยเชื้อ*บรูเซลลา*ออกมากับน้ำนม และทำให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่รุนแรง ในบางประเทศที่บริโภคน้ำนมอูฐ ในยุโรปพบ *B. suis* biovar 2 โดยมีหมูป่า และกระต่ายป่าเป็นแหล่งรังโรค (Szulowski *et al*., 2008) ส่วนกวางที่ประเทศนิวซีแลนด์ที่ติดโรคบรูเซลโลซิสพบว่าเป็นผลจากการเลี้ยงรวมกับแกะ

โรคบรูเซลโลซิสในคน

โรคบรูเซลโลซิสเป็นโรคระบาดของในสัตว์หลายชนิดพบได้ทั่วโลก สำหรับในคนจะติดโรค โดยการสัมผัส และการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน หรือการติดโรคโดยเหตุบังเอิญหรืออุบัติเหตุ เชื้อที่ก่อโรคและเป็นอันตรายในคน ได้แก่ *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti* และ *B. pinnipedialis* แต่ที่ก่อโรคในคนรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ คือ *B. melitensis* และ *B. suis* และปริมาณของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมากที่ถูกปล่อยออกมาจากสัตว์ที่เป็นโรค

อาการที่พบเริ่มแรกจะพบว่าป่วยมีไข้แบบเฉียบพลัน (acute) หรือเป็นไข้แบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute) และต่อมาจะมีไข้เป็นช่วงๆ หรือเป็นไข้ขึ้นๆลงๆ มึน ซึม อ่อนเพลีย เหงื่อออกมาก หนาวสั่น ปวดข้อ น้ำหนักลด และปวดตามร่างกายทั่วไป ถ้าหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอาการยังคงเป็นอยู่นานอาจเป็นสัปดาห์หรือเดือน อาการจะพบได้ในทุกระบบของร่างกาย อาจพบตับ ม้าม และ/หรือต่อมน้ำเหลืองบวมโต เริ่มจากมีอาการเฉียบพลันแล้วในระยะต่อมาจะเข้าสู่ระยะเรื้อรังเป็นลักษณะ “chronic fatigue syndrome” และ relapse การชันสูตรโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ*บรูเซลลา*จะต้องใช้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อ*บรูเซลลา* หรือตรวจการตอบสนองที่จำเพาะต่อเชื้อ

คนมักจะติดโรคเนื่องจากการสัมผัส และการบริโภคผลิตภัณฑ์นมที่ปนเปื้อน การเกิดโรคในคนอาจจะมีประโยชน์ คือจะเป็นเครื่องชี้นำว่ามีการติดเชื้อในฝูงสัตว์ และอาจจะเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังโรค ในการพิจารณาว่าเกิดโรคเฉพาะที่ หรือเกิดที่บริเวณใดจะเป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะจะเกี่ยวเนื่องไปถึงแหล่งผลิตอาหารว่าใช้วัตถุดิบจากภายในประเทศ หรือนำเข้าจากต่างประเทศ และเชื้อเหล่านี้ที่ก่อโรคและเป็นอันตรายได้ในคน

ระบาดวิทยาของโรคบรูเซลโลซิสในคน

พยาธิกำเนิด

เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล เยื่อเมือก เยื่อตาขาว ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ แม้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10-100 เซลล์ ก็สามารถก่อโรคได้ แต่มีระยะฟักตัวนาน 1-8 สัปดาห์ การที่เชื้อมี LPS หุ้มทำให้

ไม่ก่อให้เกิดหนองเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ จึงเป็นเหตุให้ไม่มีไข้สูง เมื่อเชื้อเข้าร่างกายแล้วจะมีเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear และ macrophages เข้ามาทำลายเชื้อ แต่เชื้อสามารถหลบเข้าสู่ระบบทางเดินน้ำเหลือง และเพิ่มจำนวนได้อย่างดีที่ไต ตับ ม้าม เต้านม ข้อต่อ โดยจะพบลักษณะที่เป็นก้อน granuloma โดยเฉพาะที่ม้าม และ ตับ โรคจะแพร่ในลักษณะเฉพาะที่และแบบแพร่กระจาย การกำจัดเชื้อจำเป็นต้องใช้การตอบสนองของ lymphocytes ชนิด Th1 ร่างกายสร้างแอนติบอดี IgM ก่อน และสามารถตรวจพบแอนติบอดีในระดับต่ำๆ ได้นานหลายเดือน และในระยะต่อมาแอนติบอดี ชนิด IgG จะเกิดขึ้นตามหลังและอยู่ได้ค่อนข้างนาน และอาจไม่พบเมื่อหายจากโรค การตรวจพบว่ามีระดับของ IgG อยู่นานหรือมีระดับที่เพิ่มขึ้นอีกจะเป็นการบ่งบอกถึงการเป็นโรคเรื้อรังหรือการกลับเป็นซ้ำ (relapse) ไม่หายขาดจากโรค ความไวในการติดโรคของคนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน การติดต่อ ปริมาณของเชื้อ และสายพันธุ์ของเชื้อ

แหล่งรังโรค

แหล่งรังโรคคือสัตว์ที่เป็นโรค ชนิดสัตว์ที่สำคัญคือสัตว์ที่เป็นแหล่งอาหารของคน เช่น โค แพะ แกะ สุกร รวมถึงสัตว์อื่นๆด้วย ซึ่งไม่มีความสำคัญมากนัก เช่น กระบือไบซัน กระบือ อูฐ สุนัข ม้า กวางเรนเดียร์ และจามรีหรือวัวป่าขนยาว แต่สัตว์เหล่านี้จะมีความสำคัญมากขึ้นโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีโรคในปัจจุบันนี้ได้พบโรคบรูเซลโลซิสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น วาฬ โลมา แมวน้ำ และอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคกับผู้ที่ประกอบอาชีพและสัมผัสกับเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ป่วนโรคเหล่านี้ได้ ปัจจัยเสี่ยงและความรุนแรงของโรคนั้นจะต้องพิจารณาถึงสายพันธุ์ของเชื้อ*บรูเซลลา*ที่ได้สัมผัสหรือติดโรค ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ไปถึงชนิดสัตว์ที่เป็น host และเป็นแหล่งรังโรค

B. melitensis เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานเป็นสาเหตุของการเกิดโรคบรูเซลโลซิสในคน เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงและเฉียบพลันมากกว่าสายพันธุ์อื่น

B. abortus พบคนติดโรคจากโค โรคบรูเซลโลซิสในโคยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อ*บรูเซลลา*ในน้ำนมที่มีปริมาณมาก และประกอบกับในขณะที่มีการแท้งลูกหรือการคลอดลูกของสัตว์ที่เป็นโรคแม้เพียงหนึ่งตัวก็จะทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้อย่างเป็นวงกว้าง

เชื้อ *B. suis* พบติดในคนแต่พบในวงจำกัดมากกว่าเชื้อ *B. melitensis* และ *B. abortus* ส่วนมากจะมีความสำคัญเฉพาะพื้นที่และเป็นแหล่งรังโรคของคน

B. canis พบการเกิดโรคในสุนัขหลายประเทศ และมักจะเกี่ยวข้องในคนแต่จะมีอาการเพียงเล็กน้อย

เชื้อ*บรูเซลลา* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ ทำให้เกิดโรคในคนได้ โดยเฉพาะผู้ที่ล่าสัตว์เหล่านี้จะเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงมากเมื่อบริโภคเนื้อดิบๆ และนำหนังมาห่อหุ้มร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผู้ที่มีความเสี่ยงอีกคือ สัตวแพทย์ นักสัตววิทยา ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ชาวประมง และผู้ที่ประกอบอาชีพดูแลสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ หรือผู้ที่แสดงโชว์ร่วมกับสัตว์

ในสัตว์ป่าหลายชนิดพบการติดเชื้อ*บรูเซลลา*แต่ไม่มีรายงานว่าเป็นแหล่งรังโรคในคน

การติดต่อของโรคบรูเซลโลซิสในคน

การติดต่อในคนมีหลายทาง คือ ทางผิวหนังที่มีบาดแผล หรือรอยถลอก ทางเยื่อชุ่มของตา หายใจฝุ่นละอองที่ปนเปื้อน ดื่มน้ำนมหรือบริโภคผลิตภัณฑ์ของนมที่ปนเปื้อนเชื้อและ ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ การกินอาหารที่เตรียมจากไขกระดูกของสัตว์ที่เป็นโรคและปรุงไม่สุก และการให้เลือด หรือการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ หรือเพศสัมพันธ์ แต่โอกาสน้อยมาก

การติดต่อในคนสามารถติดต่อได้หลายทางดังได้กล่าวแล้ว นอกจากนี้ยังแบ่งลักษณะของการติดต่อได้ดังนี้

ก. การติดต่อระหว่างคน-คน
ข. การติดเชื้อจากการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม
ค. การติดเชื้อโดยอาชีพ
ง. การติดเชื้อผ่านทางอาหาร

การติดโรคบรูเซลโลซิสจากการเดินทาง

นักท่องเที่ยวหรือนักธุรกิจผู้ที่เดินทางไปยังพื้นที่ที่มีโรคระบาดอาจติดโรคได้ซึ่งมักจะติดโดยการดื่มนมที่ไม่มีการพาสเจอร์ไรส์ หรือบริโภคผลิตภัณฑ์จากนม ผู้เดินทางอาจมีการซื้อเนยแข็งหรือผลิตภัณฑ์จากนมนำเข้ามาประเทศของตนแล้วทำให้เกิดการติดโรคของคนในครอบครัว หรือทำให้คนอื่นๆในสังคมนั้นมีโอกาสติดโรคไปด้วยโดยการบริโภค การติดโรคจากต่างประเทศนั้นโดยส่วนใหญ่จะพบแถบอเมริกาเหนือหรือยุโรปทางเหนือและพบเป็นโรคบรูเซลโลซิสชนิดเฉียบพลัน

ปัจจัยเกี่ยวกับฤดูกาล

ในประเทศที่มีสภาพอากาศอบอุ่น หรือหนาวจะมีการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลจะมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคบรูเซลโลซิสชนิดเฉียบพลันซึ่งส่วนใหญ่จะพบในช่วงฤดูไบไม้ผลิ และฤดูร้อน ซึ่งเป็นการประจวบเหมาะที่สัตว์มีการคลอดลูกและแท้งสูง ซึ่งจะเป็นผลให้มีโอกาสสูงในการสัมผัสสัตว์ในฟาร์ม หรือการดื่มนมที่ปนเปื้อนเชื้อ อิทธิพลของฤดูกาลสำหรับโรคบรูเซลโลซิสในแพะแกะจะเห็นได้ชัดเจนมากกว่าในโค สำหรับประเทศในพื้นที่เขตร้อน และใกล้เขตร้อน สัตว์มีการผสมพันธุ์ตลอดทั้งปีจึงไม่มีฤดูกาลเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคบรูเซลโลซิส

อายุและเพศ

ในประเทศอุตสาหกรรม หรือประเทศที่มีสุขอนามัยในการป้องกันการติดโรคผ่านทางอาหาร ดังนั้นการเป็นโรคบรูเซลโลซิสที่ติดโรคโดยอาชีพ พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นเพศชายที่มีอายุระหว่าง 20-45 ปี มักมีสาเหตุจาก *B. abortus* และ *B. suis* ส่วนในพื้นที่ที่มีสาเหตุของโรคจาก *B. melitensis* เป็นส่วนใหญ่จะพบว่าในการปฏิบัติทั้งทางด้านการตลาดและการขายผลิตภัณฑ์นมของแพะ-แกะ มาตรการ

ในการควบคุมดูแลด้านสุขอนามัยทำได้ยากมาก ในสถานการณ์เช่นนี้ประชากรทั้งหมดจะมีความเสี่ยง และมักจะพบคนเป็นโรคที่ส่วนใหญ่จะเป็นเพศหญิง และเด็ก ส่วนในนักท่องเที่ยวผู้ใหญ่เจริญวัยที่มีอายุไม่มากมักจะสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนและจะไม่แสดงอาการของโรคอย่างเฉียบพลัน

อาวุธทางชีวภาพ

ประเทศสหรัฐอเมริกาได้นำเชื้อ *B. melitensis* และ *B. suis* มาพัฒนาและทดลองเพื่อใช้เป็นอาวุธชีวภาพโดยการทำให้เชื้อมีการคงสภาพในลักษณะที่เป็นละอองน้ำ มีปริมาณของเชื้อน้อยแต่ทำให้เกิดโรคได้และอยู่ในรูปที่เหมาะสมกับการใช้เป็นอาวุธ เชื้อเหล่านี้ได้จากแหล่งธรรมชาติในหลายพื้นที่ในโลก หน่วยงานที่รับผิดชอบทั้งทางด้านสุขภาพของคนและทางสัตวแพทย์จะต้องระมัดระวังและตระหนักถึงความเป็นไปได้ที่สิ่งเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งรังโรค

อาการแทรกซ้อนในระบบต่างๆของร่างกายคนที่เป็นโรคบรูเซลโลซิส

โรคบรูเซลโลซิสพบว่าเป็นแบบเฉียบพลันประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ที่ติดเชื้อทั้งหมด และมีระยะฟักตัวประมาณ 2-3 สัปดาห์ นอกเหนือจากนี้พบว่าแสดงอาการเป็นระยะตั้งแต่สัปดาห์จนถึงเดือน และเป็นอาการที่ไม่บ่งบอกอย่างชัดเจน ในตอนเช้าผู้ป่วยไม่มีอาการของโรคแต่จะเริ่มแสดงอาการในช่วงบ่ายเป็นต้นไป อาการในคนที่ติดเชื้อ *B. melitensis* พบอ่อนเพลีย 95% เป็นไข้ 93% ปวด 91% เหงื่อออกมาก 87% ปวดข้อและหลัง 86% หนาวสั่น 82% และปวดศีรษะ 81%

นอกจากมีอาการดังกล่าวแล้วยังพบอาการแทรกซ้อนในระบบต่างๆของร่างกายได้อีกในระบบต่างๆ เช่น กระดูกและข้อต่อ กระเพาะอาหารและลำไส้ ตับ น้ำดีและท่อน้ำดี ทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์และอวัยวะขับปัสสาวะ หัวใจและหลอดเลือด ประสาท ผิวหนัง และตา

โรคบรูเซลโลซิสเรื้อรัง

ผู้ป่วยที่เป็นโรคมานานอาจพบหลายระบบร่วมกัน ดังนั้นหลายองค์กรได้ให้คำจำกัดความของคำว่า “โรคบรูเซลโลซิสเรื้อรัง หรือ chronic brucellosis” นี้เป็นชื่อใช้กับผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคเป็นเวลานาน 12 เดือน หรือมากกว่า โดยนับตั้งต้นจากการชันสูตรแล้วว่าเป็นโรค ซึ่งเมื่อใช้หลักเกณฑ์นี้แล้วจะสามารถจัดกลุ่มอาการของโรคบรูเซลโลซิสเรื้อรังได้ 3 แบบ คือ 1) Relapse 2) อาการเฉพาะที่ชนิดเรื้อรัง และ 3) การพักฟื้นไข้ล่าช้า

โรคบรูเซลโลซิสในเด็ก

การวินิจฉัยโรคในเด็กในระยะแรกๆ การคาดการณ์ในเด็กพบยากมาก แต่ในขณะนี้ทุกคนได้ตระหนักแล้วว่าโรคบรูเซลโลซิสพบในคนได้ทุกอายุ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีการติดเชื้อ *B. melitensis* สูง การติดต่อและอาการแทรกซ้อนต่างๆ เหมือนกับผู้ใหญ่จึงควรจะได้ตระหนักว่าอาจมีสาเหตุจากโรคนี้ได้

เอกสารอ้างอิง

Allix, S., G., Le Carrou, M., Thiebaud, D., Albert, L. L., Perrett, C. E., Dawson, P., Groussaud, E. J., Stubberfield, M. S., Koylass, A. M., Whatmore and B. Garin-Bastuji. 2008. *Brucella abortus* biovar 7: phenotypic and molecular evidence. *In* Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p 146.

Alton G. G. and Forsyth J. R. L. 1996. Brucella. *In* Samuel Baron (ed.), Medical Microbiology, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston. Texas. pp. 365-369.

Foster, G. 2008. Oceans of *Brucella* – An Overview of Marine Mammal Brucellosis. *In* Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 55.

Gandara, B., Merino, A. L., Rogel, M. A. and Martinez-Romero, E. 2001. Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 39(1): 235-240.

Gonzalez-Barrientos, C. R., Morale, J. A.and Domingo, M. 2008. Pathological assessment in small cetaceans stranded on the Pacific coast of Costa Rica with special emphasis on the diagnosis of *Brucella* and *Morbillivirus*. *In* Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 57.

Junaidu, A. U., Salihu, M. D., Ahmed, F., Ambursa, M. A. and Gulumbe, M. L. 2006. Brucellosis in Local Chickens in North Western Nigeria. Int. J. of Poultry Sc. 5(6): 547-549.

Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C. M., de Miguel, M. J., Munoz, P. M., Blasco, J. M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckaert, A., Ferreira, A. C., Cardoso, R., Correa de Sa, M. I., Walravens, K., Albert, D. and Garin-Bastuji, B. 2008. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Speices, including the Vaccine Strains. J. Clin. Microbiol. 46(10): 3484-3487.

Nielsen, K. and Duncan, J. R. (editors) 1990. Animal Brucellosis. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 453.

Office International des Epizooties. 2009***a***. (adopted May 2009) Bovine Brucellosis. *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th ed. OIE. Paris, France. pp. 624-659.

Office International des Epizooties. 2009***b***. (adopted May 2009). Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th ed. OIE. Paris, France. p. 10.

Office International des Epizooties. 2009***c***. (adopted May 2009). Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th ed. OIE. Paris, France. p. 9.

Office International des Epizooties. 2009***d***. (adopted May 2009). Porcine Brucellosis. *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th ed. OIE. Paris, France. p. 7.

Szulowski, K., Iwaniak, W., Pilaszek, J. and Murat, J. 2008. Wild boars and hares as reservoirs of *Brucella suis* biovars 2 in Poland. *In* Abstract of Brucellosis 2008 International Conference, 10-13 September. Royal Holloway College, University of London, UK. p. 137.

The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. Brucellosis. Available from http://www.cfsphiastate.edu/DiseaseInfo/ppt/Brucellosis.ppt

พัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่ให้ความคุ้มโรคสูง: ความคุ้มโรคในโคภายหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีปริมาณแอนติเจนต่างกัน

ไชยา สง่าประโคน[1] วรพร ปู่สูงเนิน[1] สุกิจ ประทุมชัย[1] ร่มพฤกษ์ อุดล[2]

บทคัดย่อ

พัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ ที่ให้ความคุ้มโรคสูง ชนิดโมโนวาเลนท์ โดยการผสมวัคซีนให้มีปริมาณแอนติเจน 146S ไทป์โอ (O_{189}) ต่างกัน คือ 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส โดยใช้อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลเป็นแอดจูแวนท์ นำไปทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในโคทดลองและทดสอบหาแอนติบอดีโดยวิธี virus neutralization (VN) test และ 3ABC non-structural protein test (3ABC-NSP)ในห้องปฏิบัติการ พบว่า วัคซีนทุกตำรับมีความปลอดภัย และตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP และในการทดสอบความคุ้มโรคโดยการหา 50% protective dose (PD_{50}) ในโค พบว่า ให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 12, 24, 18 และ 12 PD_{50} ตามลำดับ และวัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีได้ภายใน 7 วัน หลังฉีดวัคซีน ขณะที่วัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6 ไมโครกรัม/โด๊ส ใช้เวลา 10-14 วัน

ดังนั้นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ โค กระบือ แพะ แกะ ชนิดโมโนวาเลนท์ไทป์โอ (O_{189}) ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S เท่ากับ 9 ไมโครกรัม/โด๊ส จึงมีความเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เพื่อควบคุมการระบาดของโรคในพื้นที่ได้

คำสำคัญ: ปริมาณแอนติเจน 146S ความคุ้มโรค วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย เป็นโรคระบาดที่มีความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในสัตว์เศรษฐกิจ ซึ่งทำให้ประเทศไทยไม่สามารถส่งสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังประเทศที่ไม่มีการระบาดของโรคได้ ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นประจำทุกปี คือ ไทป์โอ และ เอ ส่วนไทป์เอเชียวัน ไม่พบการระบาด การป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ คือ วิธีการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และมีการบริหารจัดการฟาร์มที่ดี สำหรับการสร้างภูมิคุ้มกันคือการฉีดวัคซีนให้ครอบคลุมประชากรสัตว์ที่มีให้มากที่สุด ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงมีโครงการรณรงค์การฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยในโค-กระบือ ในพื้นที่ปีละ 2 ครั้ง และในโคนมปีละ 3 ครั้ง ให้ครอบคลุมไม่น้อยกว่า 80% ของประชากรสัตว์ทั่วประเทศ เพื่อกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยให้หมดไปจากประเทศภายในปี พ.ศ. 2563 โดยการพยายามสร้างเขตปลอดโรคที่มีการฉีดวัคซีนเขต 2 ซึ่งอยู่ระหว่างการขอรับรองจากองค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organization for Animal Health, OIE) และจะสร้างเขตปลอดโรคที่ไม่มีการฉีดวัคซีนในเขต 8 และ 9 ในลำดับต่อไป

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S ของไทป์โอ 6 ไมโครกรัม/โด๊ส ทั้งนี้วัคซีนที่ผลิตระหว่างปี 2551-2557 ให้ความคุ้มโรคต่อไทป์โอ เฉลี่ยเท่ากับ 4.245 PD_{50} จากการทดสอบโดยการฉีดเชื้อพิษทับโคที่ได้รับวัคซีนขนาดต่างๆ เป็นไปตามมาตรฐาน OIE (2009) ที่ระบุว่าวัคซีนเพื่อใช้ฉีดในการป้องกันโรคเป็นประจำ ต้องให้ความคุ้มโรคต่อไทป์ที่ผลิตไม่น้อยกว่า 3 PD_{50} และวัคซีนที่สามารถควบคุมและหยุดยั้งการระบาดของโรคที่เกิดจากทั้งเชื้อที่เป็น homologous strain และ heterologous strain ได้ (Brehm *et al*., 2008; Cox *et al*., 2006; Rodriguez and Gay, 2011, Golde *et al*., 2005) ควรมีความคุ้มโรคสูงไม่น้อยกว่า 6 PD_{50} และต้องสามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีหรือคุ้มโรคได้เร็ว ไม่ทำให้สัตว์เกิดอาการหรือวิการของโรคภายใน 4-7 วัน (Doel, 1999; OIE, 2009; Nagendrakumar *et al*., 2011)

จากปัญหาการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยในปี 2558-2559 ทั้งในโคนม โคเนื้อ และสุกร อย่างต่อเนื่อง จึงมีแนวความคิดในการปรับปรุงการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ที่ให้ความคุ้มโรคสูงมากกว่า 6PD_{50} โดยการเพิ่มปริมาณแอนติเจน 146S สำหรับใช้ในการควบคุมการระบาดของโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โคพันธุ์พื้นเมือง ไม่จำกัดเพศ อายุไม่น้อยกว่า 6 เดือน สุขภาพแข็งแรง จำนวน 76 ตัว เป็นโคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนหรือเคยติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี virus neutralization test (VNT) และตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี non-structural protein test (NSP test)

วัคซีน

ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียสที่ผสมอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลเป็นแอดจูแวนท์สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดโมโนวาเลนท์ไทป์โอ ตามวิธีการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 4 ตำรับๆ ละ 20 ลิตร (1,000 โด๊ส) ให้มีปริมาณแอนติเจน 146S เท่ากับ 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส

การทดสอบความปลอดภัย (Safety test)

ใช้โคทดลอง 8 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆละ 2 ตัว ฉีดวัคซีนแต่ละตำรับเข้าใต้ผิวหนัง จำนวน 2 เท่าของโด๊สปกติ สังเกตการแพ้วัคซีนทั้งทางระบบ (systemic) และเฉพาะที่ (local) อาการและวิการของโรค เป็นเวลา 14 วัน (OIE, 2009)

เจาะเลือดโคทดลอง 6 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 4, 7, 10, 14 และ 21 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี VNT และ NSP test

การทดสอบความคุ้มโรค (potency test)

ทดสอบโดยการหา PD_{50} ตามวิธีของ OIE โดย

แบ่งโคทดลองเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 17 ตัว ฉีดวัคซีนตำรับละ 15 ตัว โดยฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังแบบลดโด๊ส เริ่มจาก 1:1 (ฉีด 2 มล.) จำนวน 5 ตัว, 1:4 (ฉีด 0.5 มล.) จำนวน 5 ตัว และ 1:16 (ฉีด 0.125 มล.) จำนวน 5 ตัว และโคอีก 2 ตัว ไม่ต้องฉีดวัคซีนเป็นตัวควบคุม

เจาะเลือดโคทดลอง 7 ครั้ง ก่อนฉีดวัคซีนและหลังฉีดวัคซีน 4, 7, 10, 14 และ 20 วัน และหลังฉีดพิษทับ 8 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี VNT และ NSP test

- การฉีดพิษทับ

หลังฉีดวัคซีน 21 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอที่เป็น homologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน ที่มีความรุนแรง 10,000 CID_{50} (50% cattle infectious dose)/ตัว ที่ลิ้นของโค (intradermo-lingual route) สังเกตอาการ วัดอุณหภูมิ และตรวจดูวิการทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน (OIE, 2009) สัตว์ที่มีความคุ้มโรคจะไม่เกิดวิการที่เท้า เช่น ตุ่มน้ำใสที่กีบเท้าบริเวณ coronary band และพื้นกีบ นำจำนวนสัตว์ที่ไม่เกิดวิการไปคำนวณหาความคุ้มโรคโดยวิธี Karber method (Kaber, 1931) มีหน่วยเป็น PD_{50}

การตรวจทางซีรัมวิทยา (Serological test)

Virus neutralization test (VNT)

ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (OIE, 2009) โดยนำซีรัมที่ต้องการตรวจสอบมา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัสปริมาตรที่เท่ากับซีรัม คือ 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีความรุนแรง 100 $TCID_{50}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 5% CO_2 Incubator หลังจากนั้นเติม secondary lamb kidney cells หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คำนวณค่า log VNT titer ตามวิธีของ Karber (1931) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2009) กำหนดไว้ว่า

- ค่า log VNT titer < 1.20 หรือ 1/16 แปลผล เป็นลบ (negative)
- ค่า log VNT titer ≥ 1.20 (1/16) – 1.50 (1/32) ให้ทดสอบซ้ำ ถ้า ≥ 1.20 แสดงว่าเป็นบวก (positive)
- ค่า log VNT titer ≥ 1.65 หรือ 1/45 แปลผล เป็นบวก

Non-structural protein test (NSP test)

ตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC-NSP ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งผลิตในเชิงพาณิชย์[1] ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (2554) โดยการเจือจางซีรัมที่ต้องการตรวจ และซีรัมควบคุมเป็น 1:5 ใน plate ที่ coat ด้วย 3ABC monoclonal antibody ซึ่งถูกจับด้วย 3ABC protein FMDV ที่มีความจำเพาะกัน ที่มากับชุดตรวจสอบ เขย่าให้เข้ากัน วางค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) ล้างด้วย PBS pH 7.2 แล้วเติม conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติม stop solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่า percentage inhibition (PI) ซึ่งถ้า

- ค่า PI < 50% แปลผลเป็นลบ คือ ไม่มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV
- ค่า PI ≥ 50% แปลผลเป็นบวก คือ มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดี

[1] PrioCHECK® FMDV NS, Switzerland

ผล

การทดสอบความปลอดภัย

วัคซีนทุกตำรับที่ผลิตมีความปลอดภัยในโคทดลองโดยไม่พบการแพ้วัคซีนทั้งทางระบบ systemic และ local คือไม่พบอาการตัวสั่น น้ำลายไหล ตัวเกร็ง หรือช็อค การบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด ไม่พบอาการและวิการของโรคปากและเท้าเปื่อย มีระดับแอนติบอดีดังรูปที่ 1 และไม่มีแอนติบอดีต่อ NSP

การทดสอบความคุ้มโรค

ผลความคุ้มโรคของวัคซีนในกลุ่มโคที่ฉีดวัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส หลังฉีดพิษทับ เท่ากับ 12, 24, 18 และ 12 PD_{50} ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และพบว่าโคทดลองจำนวน 36 ตัว จาก 47 ตัวที่คุ้มโรค มีระดับแอนติบอดี (logVNT) $\geq$1.2 คิดเป็น 77% และมีระดับแอนติบอดี $<$1.2 จำนวน 11 ตัว คิดเป็น 23% ขณะที่โคที่ไม่คุ้มโรค จำนวน 10 ตัว มีโคที่มีระดับแอนติบอดี $\geq$1.2 จำนวน 2 ตัว คิดเป็น 20% และมีระดับแอนติบอดี $<$1.2 จำนวน 8 ตัว คิดเป็น 80% ทั้งนี้ตัวอย่างที่มีระดับแอนติบอดี (log VNT) อยู่ระหว่าง 1.2 – 1.5 ได้ทำการทดสอบซ้ำแล้ว

ผลการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (logVNT) ต่อไทป์ O_{189} ที่เกิดจากการฉีดวัคซีนแต่ละขนาดโด๊ส พบว่า เมื่อฉีดวัคซีนในขนาดโด๊ส 1:1 (2 มล.) (รูปที่ 1B) วัคซีนตำรับ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมาเป็นวัคซีนตำรับ 12 ไมโครกรัม/โด๊ส และ 9 ไมโครกรัม/โด๊ส ตามลำดับ ซึ่งมีระดับแอนติบอดี $\geq$ 1.2 ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน ขณะที่วัคซีนตำรับ 6 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย $\geq$ 1.2 หลังฉีดวัคซีน 14 วัน การฉีดวัคซีนในขนาดโด๊ส 1:4 (0.5 มล.) (รูปที่ 2C) วัคซีนตำรับ 6, 9 และ 12 ไมโครกรัม/โด๊ส มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย $\geq$ 1.2 ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน โดยวัคซีนตำรับ 9 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยดีที่สุด ขณะที่วัคซีนตำรับ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย $<$ 1.2 จนถึงวันฉีดพิษทับ สำหรับการฉีดวัคซีนในขนาดโด๊ส 1:16 (0.125 มล.) (รูปที่ 2D) วัคซีนตำรับ 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย $\geq$ 1.2 วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน และวัคซีนทุกตำรับจะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย $\geq$ 1.2 วันที่ 10 หลังฉีดวัคซีน โดยวัคซีนตำรับ 12 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยดีที่สุด รองลงไปเป็นวัคซีนตำรับ 9, 18 และ 6 ไมโครกรัม/โด๊ส โดยมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย เท่ากับ 1.605$\pm$0.630, 1.555$\pm$0.590, 1.500$\pm$0.653 และ1.355$\pm$0.344 ตามลำดับ และวันฉีดพิษทับวัคซีนตำรับ 12 ไมโครกรัม/โด๊ส จะมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยดีที่สุด รองลงไปเป็น 9, 18 และ 6 ไมโครกรัม/โด๊ส โดยมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย เท่ากับ 1.668$\pm$0.621, 1.445$\pm$0.640, 1.404$\pm$0.650 และ 1.320$\pm$0.293 ตามลำดับ

และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ (4 มล.) และโด๊สปกติ (2 มล.) (รูปที่ 1A และรูปที่ 2) ในวันที่ 7 หลังฉีด พบว่า วัคซีน 6 ไมโครกรัม/โด๊ส ต้องฉีด 2 เท่าของโด๊สปกติ (ปริมาณแอนติเจน 146S รวมเท่ากับ 12 ไมโครกรัม) จึงจะให้การสร้างแอนติบอดีสูง

≥1.2 คือ 1.575±0.106 สำหรับการฉีดโด๊สเดียวจะไม่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่เพียงพอในการป้องกันโรคได้ เท่ากับ 1.005±0.49 ส่วนวัคซีน 9 ไมโครกรัม/โด๊ส การฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ (ปริมาณแอนติเจน 146S รวมเท่ากับ 18 ไมโครกรัม) จะมีการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีสูงกว่าฉีดวัคซีนเพียงโด๊สเดียวคือ 1.700±0.177 และ 1.320±0.499 ตามลำดับ ขณะที่วัคซีน 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส การฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จะไม่มีความแตกต่างกับการฉีดวัคซีนเพียงโด๊สเดียว ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP (ตารางที่ 2) ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกตลอดการทดสอบ (ก่อนฉีดพิษทับ) แต่หลังฉีดพิษทับ 8 วัน มีโคที่ให้ผลบวก จำนวน 11 ตัว จากโคที่ฉีดวัคซีนและตัวควบคุม จำนวน 65 ตัว คิดเป็น 16.92% ให้ผลลบจำนวน 54 ตัว คิดเป็น 83.08% โดย เป็นโคที่ฉีดวัคซีน จำนวน 6 ตัว จากโคทั้งหมดที่ฉีดวัคซีน 57 ตัว (ฉีดทั้งหมด 60 ตัว แต่มีตาย 3 ตัว)คิดเป็น 10.53% ซึ่งเป็นโคที่ให้ความคุ้มโรค จำนวน 3 ตัว และไม่คุ้มโรค จำนวน 3 ตัว สำหรับโคตัวควบคุม(control) มีโคที่ให้ผลบวก จำนวน 5 ตัว จาก 8 ตัว คิดเป็น 62.50%

วิจารณ์

วัคซีนที่ผลิตขึ้นมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมและหยุดยั้งการระบาดของโรคในพื้นที่ ที่เรียกว่า Emergency vaccine หรือ high potency vaccine เป็นวัคซีนซึ่งต้องให้ความคุ้มโรคสูงไม่น้อยกว่า 6 PD_{50} (OIE, 2009) ให้ความคุ้มโรคได้เร็ว ภายใน 4-7วัน (Doel *et al*., 1994; Golde *et al*., 2005; Rodriguez and Gay, 2011) ไม่ให้สัตว์เกิดอาการหรือวิการ สร้างภูมิคุ้มกัน (แอนติบอดี)ได้สูง ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว (single vaccination) หรือโด๊สเดียว และต้องสามารถป้องกันสัตว์ไม่ให้เกิดโรคจากทั้ง homologous และ heterologous strains ได้ (Nagendrakumar *et al*., 2011)

จากการทดสอบความคุ้มโรค (ตารางที่ 1) พบว่าการใส่แอนติเจน 146S ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจาก 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส ไม่ได้ทำให้ความคุ้มโรค (ปริมาณ PD_{50}) เพิ่มขึ้นมากตามอย่างที่คาดหวัง โดยมีความคุ้มโรคเท่ากับ 12, 24, 18 และ 12 PD_{50} ตามลำดับ ในการทดลองนี้ปริมาณแอนติเจน 146S 9 ไมโครกรัม/โด๊ส ให้ความคุ้มโรคสูงสุด (คุ้มโรค 100%, 100% และ 80% จากการฉีดวัคซีน 2, 0.5 และ 0.125 มล./ตัว ตามลำดับ) รองลงมาคือ ปริมาณแอนติเจน 146S 12 ไมโครกรัม/โด๊ส (คุ้มโรค 100%, 80% และ 80% จากการฉีดวัคซีน 2, 0.5 และ 0.125 มล./ตัว ตามลำดับ) ซึ่งการฉีดวัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 9 ไมโครกรัม/โด๊ส ปริมาตร 0.5 มล./ตัว ให้ผลทดสอบความคุ้มโรคดีกว่าวัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 12 ไมโครกรัม/โด๊ส ทำให้เมื่อคำนวณปริมาณความคุ้มโรค (ปริมาณ PD_{50}) จึงได้สูงกว่า จะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณแอนติเจนให้มากขึ้นไม่ได้ทำให้ความคุ้มโรคเพิ่มตามไปด้วย แต่จะสัมพันธ์กับความคุ้มโรคที่ค่าหนึ่งที่เหมาะสม (Rweyemamu *et al*., 1984; Doel, 1999; Pay and Hingley, 1987; Pay and Hingley, 1992; Alkan *et al*., 2008) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cox และคณะ (2010) โดยได้เปรียบเทียบการฉีดวัคซีนที่มีปริมาณ

แอนติเจนต่างกัน 5 เท่า พบว่าให้ความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามหากจะนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการผลิตวัคซีนจะต้องศึกษาระยะความคุ้มโรคก่อนดำเนินการทดสอบการผลิตซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และการทดสอบความบริสุทธิ์ว่าวัคซีนไม่กระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีต่อ NSP โดยฉีดวัคซีนซ้ำไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง (OIE, 2009)

และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีน 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส ในขนาดโด๊สปกติ (2 มล.) จากการทดสอบความคุ้มโรค (n=5) พบว่า ภายใน 4-7 วัน วัคซีนสามารถกระตุ้นให้โคสร้างแอนติบอดีสูง ≥1.2 logVNT เท่ากับ 20% (1/5 ตัว), 60% (3/5 ตัว), 60% (3/5 ตัว) และ 80% (4/5 ตัว) ตามลำดับ ซึ่งวัคซีน 18 ไมโครกรัม/โด๊ส ให้ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยดีที่สุด (รูปที่ 1B) สำหรับวันที่ 20 หลังฉีดวัคซีน พบว่าวัคซีน 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส มีโคที่ให้แอนติบอดี ≥1.2 เท่ากับ 60% (3/5 ตัว), 60% (3/5 ตัว), 100% (5/5 ตัว) และ 80% (4/5 ตัว) ตามลำดับ ซึ่งวัคซีน 12 ไมโครกรัม/โด๊ส ให้ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยดีที่สุด (ตารางที่ 1, รูปที่ 1B) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีกับความคุ้มโรคของทุกตำรับวัคซีน โคที่มีระดับแอนติบอดี ≥1.2 จำนวน 38 ตัว และ <1.2 จำนวน 19 ตัว จาก 57 ตัว พบว่าโคที่มีระดับแอนติบอดี ≥1.2 จะคุ้มโรค จำนวน 36 ตัว ไม่คุ้มโรค จำนวน 2 ตัว คิดเป็น 95% และ 5% ตามลำดับ ขณะที่โคที่จะมีระดับแอนติบอดี <1.2 จะคุ้มโรค จำนวน 11 ตัว ไม่คุ้มโรค จำนวน 8 ตัว คิดเป็น 58% และ 42% ตามลำดับ ดังนั้นระดับแอนติบอดีสามารถประเมินแนวโน้มความคุ้มโรคได้ แต่ต้องยืนยันด้วยการฉีดพิษทับ และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ (4 มล.) และโด๊สปกติ (2 มล.) (รูปที่ 2) ในวันที่ 7 หลังฉีด พบว่า วัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6 ไมโครกรัม/โด๊ส ต้องฉีด 2 เท่าของโด๊สปกติ (ปริมาณแอนติเจน 146S รวมเท่ากับ 12 ไมโครกรัม) จึงจะให้การสร้างแอนติบอดีสูง≥1.2 คือ 1.575±0.106 สำหรับการฉีดโด๊สเดียวจะไม่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีที่เพียงพอในการป้องกันโรคได้ เท่ากับ 1.005±0.49 ส่วนวัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 9 ไมโครกรัม/โด๊ส การฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ (ปริมาณแอนติเจน 146S รวมเท่ากับ 18 ไมโครกรัม) จะมีการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีสูงกว่าฉีดวัคซีนเพียงโด๊สเดียวคือ 1.700±0.177 และ 1.320±0.499 ตามลำดับ ขณะที่วัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส การฉีดวัคซีนเป็น 2 เท่าของโด๊สปกติ จะไม่มีความแตกต่างกับการฉีดวัคซีนเพียงโด๊สเดียวในการกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีเพื่อป้องกันโรคซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Doel และคณะ (1994) พบว่าภายใน 8 วัน จะตรวจพบแอนติบอดีในระดับต่ำ แต่สัตว์คุ้มโรคจากการฉีดพิษทับในวันที่ 4 หลังฉีดวัคซีน เป็นผลจาก IgM และ IgG โดย IgM จะขึ้นสูงสุดวันที่ 8 และ IgG จะขึ้นสูงสุดวันที่ 14 หลังฉีดวัคซีน และระดับแอนติบอดีขึ้นกับปริมาณแอนติเจนในวัคซีน (Rweyemamu *et al*., 1984; Pay and Hingley, 1987; Pay and Hingley, 1992)

จากตารางที่ 2 ไม่พบแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP หลังฉีดวัคซีนจนถึงวันฉีดพิษทับ แสดงว่าไม่มีการติดเชื้อระหว่างการทดลอง และหลังฉีดพิษทับ 8 วัน พบโคที่ให้ผลบวกทั้งหมดจำนวน 11 ตัว เป็นโคฉีดวัคซีน จำนวน 6 ตัว จาก 57 ตัว หรือคิดเป็น 10.53% และโคกลุ่มควบคุมจำนวน 5 ตัว จาก 8 ตัว หรือคิดเป็น 62.50% และถ้าดูที่ความคุ้มโรค พบว่ามีโคที่คุ้มโรคแต่ให้ผลบวก จำนวน 3 ตัว จาก 11 ตัว ที่ให้ผลบวก หรือคิดเป็น 27.27% ขณะที่โคที่ไม่คุ้มโรคให้ผลบวก จำนวน 8 ตัว จาก 11 ตัวที่ให้ผลบวก หรือคิดเป็น 72.73% ทั้งนี้การให้ผลบวกต่อ NSP เมื่อมีการติดเชื้อจะต้องใช้เวลา 8-10 วัน จึงจะเริ่มทดสอบได้ซึ่งไม่ได้ให้ผลบวก 100% แต่เปอร์เซ็นต์จะเพิ่มขึ้นเมื่อนานขึ้น ซึ่งการฉีดวัคซีนไม่ได้ป้องกันการติดเชื้อแต่ช่วยป้องกันไม่ให้เป็นโรคหรือเป็นแต่ไม่รุนแรง รักษาง่าย หายไว (Diego *et al*., 1997)

ทั้งนี้จากการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในโคเนื้อและโคนม ในพื้นที่จังหวัดลพบุรี สระบุรี และนครราชสีมา ในเดือนตุลาคม 2558 ถึง กุมภาพันธ์ 2559 ซึ่งเป็นการแพร่ระบาดจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์โอ และจากข้อมูลที่ได้ศึกษาในครั้งนี้ได้มีการนำวัคซีนชนิดโมโนวาเลนท์ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S ไทป์ O_{189} เท่ากับ 9 ไมโครกรัม/โด๊ส ไปฉีดในพื้นที่ที่เกิดการระบาดดังกล่าว พบว่าสามารถยับยั้งการระบาดของโรคอย่างได้ผล ไม่มีการเพิ่มจำนวนสัตว์เป็นโรค (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) แต่การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่ครบสมบูรณ์ของกระบวนการทดสอบคุณภาพวัคซีน ซึ่งจะต้องศึกษาระยะเวลาคุ้มโรค (duration of immunity) อายุการเก็บรักษาวัคซีน (keeping quality) ความคุ้มโรคข้ามสเตรน เพื่อการวางแผนในการกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยให้หมดไปจากประเทศไทย

สรุป

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ (O_{189}) ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 9 ไมโครกรัม/โด๊ส มีความเหมาะสมในการผลิตเป็น high potency vaccine ที่สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันได้เร็วและให้ความคุ้มโรคสูง สำหรับใช้ในการควบคุมป้องกัน ยับยั้งการระบาดและกำจัดโรคให้หมดจากประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย กรมปศุสัตว์

ขอขอบคุณคณะกรรมการพัฒนาวิชาการ คณะกรรมการสัตว์ทดลอง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ สัตวแพทย์หญิงสมใจ กมลศิริพิชัยพร ผู้อำนวยการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (2558 ในขณะนั้น) ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำในครั้งนี้ เจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ได้ช่วยเหลือในการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสัตว์ทดลอง การทดสอบตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ(Viral neutralization test, VNT) และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิง

โรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจ Non-structural protein (NSP) test

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. 2554. วิธีทดสอบ เรื่อง การตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non structural protein ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย(Detection of antibody to 3ABC non structural protein of foot and mouth disease virus), RRL-T-004 ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ Vol. 3 Rev. 0 : 1-15.

Alkan, M., Gucan, S., Sarac, M. F., Gultekin, Y., Arslan, A., Uzunlu, E., Akyuz, S. and Aynagoz, G. 2008. Development of a foot-and-mouth disease vaccine potency test without conduction animal challenge experiment.The Global control of FMD-Tools, Ideas and ideals. Erice, Italy 14-17 October 2008. Appendix 28: 181-186. www.fao.org/ag/againfo/../ does/../ APPENDIX_ 28.pdf (Accessed 26 July 2014).

Brehm, K. E., Kumar, N., Thulke, H. H. and Haas, B. 2008. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. Vaccines 26(13): 1681-1687.

Cox, S. J., Carr, B. V., Parida, S., Hamblin., P. A., Prentice, H., Charleston, B., Paton, D. J. and Barnett, P. V. 2010. Longevity of protection in cattle following immunisation with emergency FMD A22 serotype vaccine from the UK strategic. Vaccine 28: 2318-2322.

Cox, S. J., Voyce, C., Parida, S., Reid, S. M., Hamblin, P. A., Hutchings, G., Paton, D. J. and Barnett, P. V. 2006. Effect of emergency FMD vaccine antigen payload on protection, subclinical infection and persistence following direct contact challenge of cattle. Vaccine 24: 3184-3190.

De Deigo, M., Brocchi, E., Mackay, D. K. J. and De Simone, F. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as an diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. Arch. Virol. 142: 2021-2033.

Doel, T. R. 1999. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine 17: 1767-1771.

Doel, T. R., Williams, L. and Barnett, P.V. 1994. Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: Rate of immunity and implications for the carrier state.Vaccine 12(7): 592-600.

Golde, W. T., Paceco, J. M., Duque, H., Doel, T., Penfold, B., Ferman, G. S., Gregg, D. R. and Rodriguez, L. L. 2005. Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days:Use in emergency outbreak response. Vaccine 23: 5775-5782.

Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive fur Expermentelle Pathologie Pharmarkologie. 162: 480-483.

Nagendrakumar, S. B., Srinivasan, V. A., Madhanmohan, M., Yuvaraj, S., Parida, S., Di Nrdo, A., Hutchings, G. and Paton, D. J. 2011. Evaluation of cross-protection between O_1 Manisa and O_1 Campos in cattle vaccinated with foot-and-mouth disease virus vaccine incorporating different payload of inactivated O_1 Manisa antigen. Vaccines 29: 1906-1912.

Office International des Epizooties (OIE). 2009. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed. OIE. Paris, France. pp. 1-29.

Parida, S. 2009. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. Expert Reviews Vaccines. 8(3): 347-365.

Pay, T. W. and Hingley, P. J. 1987. Correlation of 140S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines.Vaccines 5(1): 60-64.

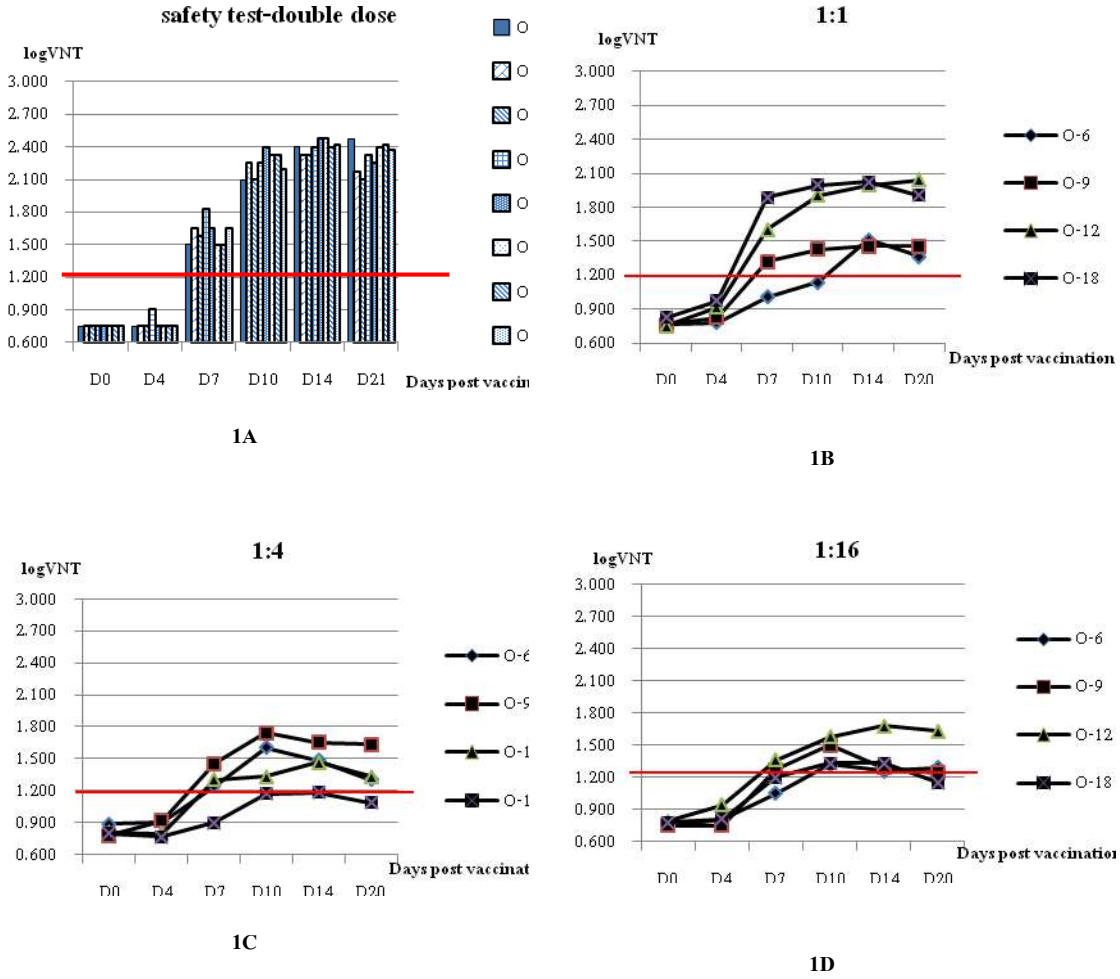
Pay, T. W. and Hingley, P. J. 1992. Foot-and-mouth disease vaccine potency tests in cattle : the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge. Vaccines 10:669-706.

Rodriguez, L. L and Gay, C. G. 2011. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot-and-mouth disease. Vaccines 10(3): 377-387.

Rweyemamu, M. M., Black, L., Boge, A., Thorne, A. C. and Terry, G. 1984. The relationship between the 140S antigen dose in aqueous foot-and-mouth disease vaccines and the serum antibody response of cattle. J. Biol. Stand 12: 111-120.

ตารางที่ 1 ความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส และระดับแอนติบอดี (logVNT) 20 วัน หลังฉีดวัคซีน

ปริมาณแอนติเจน 146S (ไมโครกรัม/โด๊ส)	ระดับแอนติบอดี (logVNT) 20 วัน หลังฉีดวัคซีน/ความคุ้มโรค						ความคุ้มโรค (PD_{50})
	โด๊ส วัคซีน 1 : 1	ผลความคุ้มโรค	โด๊ส วัคซีน 1 : 4	ผลความคุ้มโรค	โด๊ส วัคซีน 1 : 16	ผลความคุ้มโรค	
6	1.050	ไม่คุ้มโรค	1.650	คุ้มโรค	1.650	คุ้มโรค	12
	0.900	คุ้มโรค	1.125	คุ้มโรค	1.050	ไม่คุ้มโรค	
	1.875	คุ้มโรค	1.050	คุ้มโรค	1.050	ไม่คุ้มโรค	
	1.650	คุ้มโรค	1.425	คุ้มโรค	1.200	คุ้มโรค	
	1.350	คุ้มโรค	1.275	ไม่คุ้มโรค	1.500	คุ้มโรค	
ค่าเฉลี่ย	**1.365±0.405**		**1.305±0.241**		**1.290±0.273**		
9	0.750	คุ้มโรค	2.550	คุ้มโรค	0.750	ไม่คุ้มโรค	24
	1.575	คุ้มโรค	0.750	คุ้มโรค	2.325	คุ้มโรค	
	2.100	คุ้มโรค	1.275	คุ้มโรค	0.900	คุ้มโรค	
	0.750	คุ้มโรค	1.650	คุ้มโรค	1.350	คุ้มโรค	
	2.100	คุ้มโรค	1.950	คุ้มโรค	0.900	คุ้มโรค	
ค่าเฉลี่ย	**1.455±0.678**		**1.635±0.680**		**1.245±0.644**		
12	2.250	คุ้มโรค	1.875	คุ้มโรค	0.750	ไม่คุ้มโรค	18
	1.725	คุ้มโรค	1.500	คุ้มโรค	2.550	คุ้มโรค	
	2.025	คุ้มโรค	0.750	คุ้มโรค	2.550	คุ้มโรค	
	2.325	โคตายหลังฉีดพิษทับ 2 วัน	0.875	ไม่คุ้มโรค	1.200	คุ้มโรค	
	1.875	คุ้มโรค	1.650	คุ้มโรค	1.125	ไม่คุ้มโรค	
ค่าเฉลี่ย	**2.040±0.251**		**1.330±0.493**		**1.635±0.853**		
18	1.575	คุ้มโรค	1.500	คุ้มโรค	1.950	คุ้มโรค	**12**
	0.750	ไม่คุ้มโรค	0.750	ไม่คุ้มโรค	0.750	คุ้มโรค	
	2.400	คุ้มโรค	0.900	คุ้มโรค	0.975	คุ้มโรค	
	2.250	คุ้มโรค	1.200	คุ้มโรค	1.275	ไม่คุ้มโรค	
	2.550	คุ้มโรค	x	โคตายหลังฉีดวัคซีน 12 วัน	0.825	ไม่คุ้มโรค	
ค่าเฉลี่ย	**1.905±0.746**		**1.088±0.333**		**1.155±0.489**		

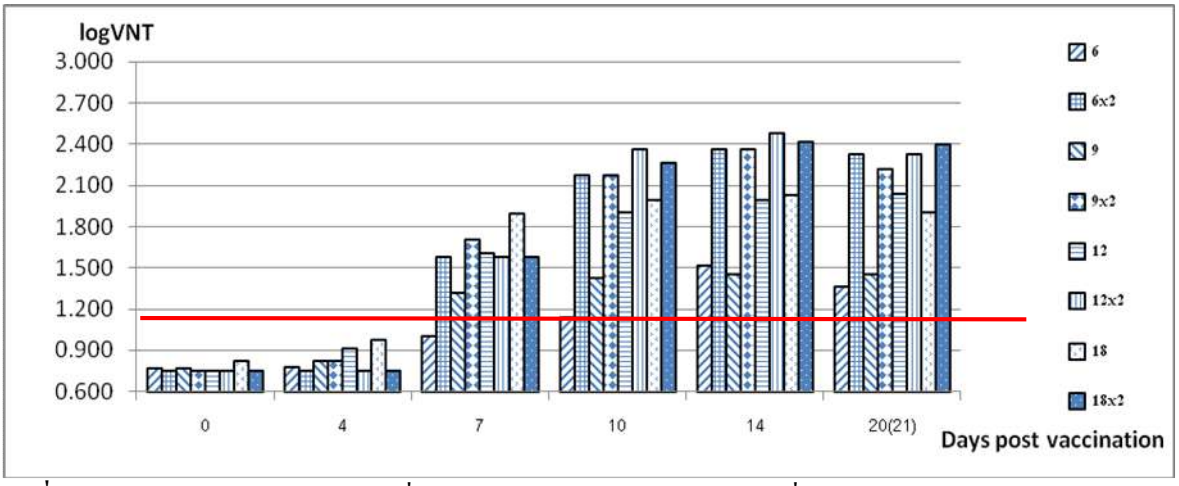


รูปที่ 1 แสดงระดับแอนติบอดี (log VNT) ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ 0, 4, 7, 10, 14 และ 21 วัน หลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส โดยฉีดวัคซีนตำรับละ 4 มิลลิลิตรต่อตัว (รูปที่ 1A) จากการทดสอบความปลอดภัย และระดับแอนติบอดีเฉลี่ย ที่ 0, 4, 7, 10, 14 และ 20 วัน หลังการฉีดวัคซีนแต่ละตำรับแบบลดโด๊ส 1:1 (2 มล.), 1:4 (0.5 มล.) และ 1:16 (0.125 มล.) (รูปที่ 1B, 1C และ 1D ตามลำดับ) จากการทดสอบความคุ้มโรค

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP หลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส

ปริมาณแอนติเจน 146S (ไมโครกรัม/โด๊ส)	การได้รับวัคซีน	จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก(positive) / จำนวนสัตว์ทั้งหมด							ความคุ้มโรคของสัตว์ที่ให้ผลบวก
		Do	D4	D7	D10	D14	D20	D29*	
6	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/14[1]	P
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	
9	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	nP, nP
12	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	3/14[2]	P, P, nP
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	nP
18	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/14[3]	0/14[3]	2/14[3]	nP, nP
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	nP, nP
รวม	ฉีดวัคซีน	0/60	0/60	0/60	0/60	0/59	0/59	6/57	P =3/6
	ตัวควบคุม	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	5/8	nP =3/6
เปอร์เซ็นต์	ฉีดวัคซีน	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10.53%	50%
	ตัวควบคุม	0%	0%	0%	0%	0%	0%	62.50%	50%

หมายเหตุ – [1] โคตายวันที่ 8 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลได้ [2] โคตายวันที่ 2 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้
[3] โคตายหลังฉีดวัคซีน 12วัน P = คุ้มโรค (protected) nP = ไม่คุ้มโรค (non protected)
* หลังฉีดพิษทับ 8 วัน



รูปที่ 2 ระดับแอนติบอดี (log VNT) เฉลี่ยหลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์โอ ที่มีปริมาณแอนติเจน 146S 6, 9, 12 และ 18 ไมโครกรัม/โด๊ส จากการทดสอบความคุ้มโรค (ฉีดวัคซีน 2 มล., n=5/ชุดวัคซีน) และการทดสอบความปลอดภัย (ฉีดวัคซีน 4 มล., n=2/ชุดวัคซีน)

Development of high potent foot and mouth disease vaccine serotype O for cattle: Protection after vaccination with different antigen payload vaccines

Chaiya Sangaprakhon[1] Woraporn Poosungnoen [1] Sukit Prathumchai[1] Romphruke Udon[2]

Abstract

The objective of this study is to develop high potent foot and mouth disease (FMD) vaccine, serotype O_{189}, for cattle comprised of different the 146S antigen payloads (6, 9, 12 and 18 µg/dose) in the aluminum hydroxide gel adjuvant. All the vaccine formulations were tested for safety and potency in cattle, including antibody detection by virus neutralization (VN) test and 3ABC non-structural protein (NSP) test**.** It was found that all vaccine formulation were safe and antibody against 3ABC-NSP was not detected in all vaccinated cattle. For the potency test, each vaccine formulation (6, 9 , 12 and 18 µg/dose) gave 12, 24, 18 and 12 PD_{50} respectively. In addition, the vaccines with 146S antigen payloads of 9, 12 and 18 µg/dose induced neutralizing antibody titers in cattle 7 days after vaccination whereas it was 10-14 days for a low payload of 6 µg/dose. The results suggest that FMD vaccine, serotype O_{189}, at 146S antigen payload of 9 µg/dose was appropriated for being the high potent FMD vaccine, serotype O_{189}, for FMD outbreak control in cattle.

Key words : antigen payload, protection, foot and mouth disease vaccine, type O

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

[2] Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

Study on persistent infection with foot and mouth disease virus in cattle and buffaloes in Thailand

Wilai Linchongsubongkoch[1] Dilok Aunpomma[2] Terdsak Yano[3]
Prasert Wongnak[4] Janya Samanit[5] Sopha Singkleebuth[5]

Abstract

The persistent infection with foot and mouth disease in cattle and buffaloes were studied. Samples of oesophageal-pharyngeal (OP) fluid or probang were collected from the pharyngeal region using a probang cup. A total 205 of probang and 226 serum samples from infected cattle and buffaloes were collected through sequential sampling during 2 to 19 months post infection with foot and mouth disease virus (FMDV). The probang samples were used to detect FMDV by virus isolation (VI)/ELISA typing and realtime RT-PCR (rRT-PCR). The serum samples were used to determine antibody to FMDV type O, A and Asia1 using liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) in parallel with the detection of antibody to 3ABC non structural protein of FMDV using blocking ELISA (NSP-ELISA) to differentiate between infected and vaccinated animals. The result of the tests of the probang samples collected at 2, 5, 11, and 19 months post infection (M/PI) from cattle following FMDV infection with type A were all found to be negative by VI/ELISA typing and rRT-PCR. It was concluded that the cattle were considered as non-carrier state. While probang samples collected from buffaloes following the FMDV infection with type O at 3, 6 and 11 M/PI were found 6.1 % (2/33) positive by VI/ELISA typing and 6.1% (2/33) positive by rRT-PCR at 3 months post infection. Those two buffaloes were confirmed as being FMDV persistent infected animals or carriers by intermittent recovery of type O virus in OP fluid. For the LP ELISA results, the cattle infected with FMDV type A were mostly seropositive to all 3 serotypes, (titer >1.9 (log) or 1:80). The LP ELISA titer to type A were 28/28 (100%) at 2 months post infection (M/PI), 28/30 (93.33%) at 5 M/PI, 24/25 (96%) at 11 M/PI and 20/41(48.8%) at 19 M/PI. The NSP-ELISA also showed very high positive results for the same periods: 75%, 56.7%, 76% and 61%, respectively. In the infected buffaloes, the LP ELISA were 31/42 (73.8%) seropositive to type O at 3 M/PI, 12/35 (34.2%) at 6 M/PI and 17/25 (68%) at 11 M/PI. The NSP-ELISA found the high of positive results for the same periods: 66.7%, 52% and 76%, respectively. Mass vaccination with trivalent vaccine of O, A and Asia1 was practiced regularly

after the disease outbreak, as a consequence, high antibody titer to all 3 serotypes were obtained in those animals.

Keywords: Foot and mouth disease, persistent infection, LP ELISA, real time RT-PCR

[1] Consultant of Department of Livestock Development, National Institute of Animal Health, Bangkok

[2] Veterinary Research and Development Center (Upper Northeastern Region), Department of Livestock Development, KhonKaen

[3] Faculty of Veterinary Medicine, Chiang-Mai University, Meung, Chiang-Mai

[4] Yasothon Provincial Livestock Office, Meung , Yasothon.

[5] Regional Reference Laboratory for FMD in Southeast Asia, Pakchong, Nakhonratchasima

Introduction

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease that occurs in both domestic and wild cloven-hoof animals such as cattle, buffalo, pig, sheep, goat, elephant and deer, each species varies in its susceptibility to infection and clinical disease. Currently, serotypes O and A are endemic in Thailand, but type Asia1 has not been found in the country since 1998. The transmission of the disease is by direct contact, indirect contact and animal movement. The virus is present in tissue, natural secretions (saliva, milk and semen) and excretions (sweat, urine and feces) of infected animals for up to 4 days before clinical signs of the disease become apparent (Donaldson and Ferris, 1980); Hyslop, (1965). Donaldson *et al*., (1987) reported that the most common route of infection of ruminant is via the respiratory tract through inhalation of airborne virus and pig is more susceptible to FMDV infection by the oral route than ruminant.

FMD is characterized by lameness, anorexia, pyrexia, salivation, reduced milk production in lactating animals and weight loss. Clinical disease may develop in 2-14 days after infection depending on the virus dose and the FMD virus can be located in the pharyngeal region in infected animals. Both vaccinated and unvaccinated animals exposed to the virus may become persistently infected without showing clinical signs (Woodbury, 1996). An animal with persistent of FMD virus after recover is called a "carrier". It is possible to recover infectious FMD virus for up to 28 days after infection (Sutmoller and Gaggero, 1966). The virus replicates in the mucosa of the pharynx and the dorsal surface of the soft palate and can be recovered from oesophageal-pharyngeal scraping using a probang sampling cup (Burrows,1966; Van Bekkum *et al*., 1966). Carrier animals may serve as reservoirs of infection and obstruct disease control programs. The duration of carrier state varies and is probably host species and virus strain dependent. Cattle have been shown to carry the virus for 2.5 years after infection (Hedger, 1970), sheep for up to 9 months (McVicar and Sutmoller, 1969) and goats for up to 4 months (Singh, 1977) . Pigs appear to eliminate detectable FMDV from the oropharynx within 28 days of infection (Van Bekkum, 1973; Panina *et al*., 1988) and are considered as non-carrier of FMDV. African buffaloes have been shown to excrete the virus for at least 5 years (Hedger and Candy, 1971).

Diagnosis of persistent FMDV infection is by isolation of FMDV in oesophageal- pharyngeal scraping collected from animals infected with FMD virus. This has shown that the primary lamb kidney cells or primary bovine thyroid cells are the most sensitive for *in vitro* assay for detection of FMDV (Snowdon, 1966) and for subsequent ELISA typing of the virus in harvested supernatant (Roeder and Le Blanc Smith, 1987). Presently, the molecular techniques for the diagnosis of the carrier state in probang

samples, polymerase chain reaction using both conventional RT-PCR (House and Mayer *et al*., 1993; Donn *et al*., 1994) and real time RT-PCR (rRtT-PCR) (Callahan *et al*., 2002) are the most sensitive assays for the detection of the FMDV specific 3D gene. Simultaneously, the serological assay for detection of antibody to FMDV structural protein in exposed animal has improved the detection of FMDV carrier by using the virus neutralization (VN) test (Rewmmanu *et al*., 1987) and the liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) test (Hamblin *et al*., 1986 ; Linchongsubongkoch and Janukit, 1994). In addition, Bermann *et al*. (1993) reported that the serological assay to detect the antibody to the non structural protein of FMDV was significant prolonged in persistently infected cattle. A newly developed indirect ELISA technique for specific IgA detection in saliva (Archetti *et al*.,1995) can be used for identification of vaccinated cattle which has been infected with FMDV. It has been demonstrated that there is significantly higher level of FMDV specific IgA in carrier than in non-carrier cattle (Salt et al., unpublished paper). Verin *et al.*, 2012 (unpublished paper) studied FMDV persistence in Asian swamp buffaloes in Southeast Asia (SEA), probang samples collected at eight months post infection from buffaloes infected with FMDV in the Lao PDR and Myanmar were investigated by virus isolation/ELISA typing and by rRT-PCR, the results were found 14% positive. Saliva samples were tested by IgA-ELISA and serum samples were tested by non structural protein ELISA (NSP-ELISA). The results showed a higher detection rate (32.7%) of persistent animals compared to virus isolation and rRT-PCR (10% to 14%). According to Verin et al., there have been very few studies of FMDV persistence in cattle and buffalos in SEA, and none in Thailand. The objectives of our research were to study persistent infectionof FMDV in cattle and buffaloes in Thailand and the duration of persistent infection. The oesophageal-pharyngeal fluid (OP) or probang and serum samples used in this study were collected from cattle and buffaloes with sequential sampling done from 2 to 19 months post infection with FMDV.

Materials and methods

Experimental design and animals

A total 112 samples of oesophageal-pharyngeal or probang fluid and 124 blood samples were sequentially collected at 2, 5, 11 and 19 months post infection (M/PI). The samples were from cattle in Chiang Mai province which had been infected with FMDV type A.

A total 93 oesophageal-pharyngeal fluid samples and 102 blood samples were sequentially collected at 3, 6 and 11 months post infection from buffaloes in Yasothon province which had been infected with FMDV type O.

Oesophageal-pharyngeal fluid (OP) or probang samples

The OP samples were collected using a probang cup and scraping tissue and mucosa at the oropharynx, particularly the dorsal surface of the soft palate. OP samples were placed in plastic tubes containing 5 ml of 0.08M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.6, containing antibiotics and 1% bovine serum albumin. The samples were kept on wet ice in the field and then on dry ice during transportation to the laboratory where they were stored at-80^{o}C in a deep freezer. Each probang cup was disinfected with 1:200 speedyne (3% Iodine W/V) and washed completely with fresh water then rinsed in 0.08M PBS before re-use.

Virus isolation

The OP samples were treated with daifon (trichlorotrifluoroetane) at an equal volume, mixed well and clarified by centrifugation (3,500 rpm, 15 min). The treated OP supernatant fluid was inoculated onto primary lamb kidney cells for 1 to 3 passages. Cytopathic effect (CPE) was observed, then the cell culture supernatant fluid was separated into two parts, The first was used for FMDV identification by ELISA typing as described by Roder and Le Blanc Smith (1987) and the second was used to detect the FMDV specific 3D gene by rRT-PCR using the method described by Zhang and Alexandersen (2003).

ELISA typing

An indirect sandwich ELISA was used for detecting and typing of FMDV in the OP and virus isolation samples as described by Roder and Le Blanc Smith (1987). Plates were coated with three types of rabbit antisera (O, A and Asia1) and normal rabbit serum in a coating buffer. They were kept overnight at 4^{o}C, then washed with PBS. The test samples and control antigens were prepared by two-fold dilution into 1:1, 1:2 and 1:4. Samples were dispensed into the appropriate wells on plates which were then incubated at 37^{o}C for 1 hour. The plates were then washed with PBS.

The three types of guinea pig antisera (O, A and Asia1) and normal guinea pig were added to the corresponding wells and incubated at 37^{o}C for 1 hour. Anti guinea pig immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase was added and incubated at 37^{o}C for 30 minutes, then the plates were washed with PBS. TMB substrate solution was added to all the wells and proceed for 20 minutes at room temperature then the reaction was stoped by adding an acid stopper solution (1N H_2SO_4) to each well. Optical densities

(OD) were read using a Multiskan ELISA Reader at a wavelength of 450 nm. The typing result was read by the mean OD values greater than 0.2 defined as positive in which serotype when compared to the corresponding control antigen.

Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

Serum samples were used to determine antibody titer to structural protein of FMDVtypes O, A and Asia1 by LP ELISA. Serum was diluted into two fold dilution series and then a fixed concentration of reference antigen was reacted. The antibody titer was determined as the reciprocal of the final dilution of serum which giving 50% end point of Optical Density (OD) mean value of control antigen (Ca) where the OD reading at range 1.0-1.5. The interpretation of the serum was calculated as the percent inhibition (%PI) as described by Hamblin et al. (1986) and Linchongsubongkoch and Janukit, (1994).

3ABC non structural protein of FMDV, PrioCHECK® FMDV-NS

A commercial NS test kit, ELISA produced by Prionic Lelystad B.V., The Netherlands was used to detect the antibody to 3ABC non structural protein (3ABC-NSP) of FMDV by the indirect blocking ELISA method for differentiating between infected and vaccinated animal. The test procedure was described followed the instructions of the manufacturer.

Real time RT-PCR (rRT-PCR)

The viral RNA was extracted from the probang samples using Trozol® LS (Invitrogen™, USA) according to the manufacture's instruction. The extracted RNA used in the reverse transcription (RT) reaction changed RNA into cDNA using enzyme reverse transcriptase following the method described by Thongtha *et al*. (2008). cDNA can be stored at -20°C and then used in rRT-PCR. A set of rRT-PCR primer and probe was used for detecting all serotypes of FMDV at the 3D gene region. The probe labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end and the quencher tetramethy rhodamine (TAMRA) at the 3' end was used in an amplification reaction as described by Callahan *et al*. (2002). The primer and probe sequences are shown in Table 1.

The rRT-PCR reaction was carried out using LighCycler®480 (Roche Germany). The 20 µl reaction mix (total volume) in real-time included 10 ul of 2X reaction buffer, 0.5 µl each of the forwar primer, reverse primer and probe (Sigma-Proligo, Singapore), 6.5 µl DEPC water and 2 µl of RNA template. The tube was then placed into a real time PCR machine (LighCycler®480 (Roche Germany). Amplification was done according to the following temperature cycle: pre-incubation at 95°C for 10 minutes, amplification at 95°C for 10 seconds and at 60°C for 40 seconds (45 cycles) then cooled at 40°C

for 30 seconds. The crossing point (Cp) value for each sample was designed from the point at which fluorescence crossed a threshold line. Standard curve was calculated by using LighCycler®480 Software.

Results

The results of probang and serum testing are shown in Tables 2, 3 and figure 1-9 respectively.

Discussion and conclusion

This study of FMDV persistent infection in dairy cattle and buffaloes was carried out in Chiang Mai and Yasothon provices of Thailand during 2008 to 2010. For dairy cattle, a total 112 probang samples (OP fluid) and 124 serum samples were sequentially collected following infection with FMDV type A from dairy farm in Chiang Mai province at 2, 5, 11, and 19 months post infection. The results of probang test found that all cattle were negative by virus isolation/ELISA typing and rRT-PCR (Table 2). Thus it was concluded that dairy cattle were considered as being in a non-carrier stage. The serology test of serum samples by the measurement of antibody titer to structural protein of FMDV type O, A and Asia1 by LP ELISA and the detection of antibody to 3ABC non structural protein by NSP-ELISA to differentiate between infected and vaccinated animals were shown in Figures 1-7, respectively. The LP ELISA results in dairy cattle infected with FMDV type A in Chiang Mai province showed high antibody titer to FMDV type O, A and Asia1. Antibody titer greater than 1.9 (log) or 1:80 was considered seropositive. The LP ELISA titer to type A was 28/28 (100%) seropositve at 2 months post infection (M/PI) (Figure 1), 28/30 (93.33%) at 5 M/PI (Figure 2), 24/25 (96%) at 11 M/PI (Figure 3) and 20/41 (48.8%) at 19 M/PI (Figure 4) respetively. The NSP-ELISA also showed very high positive results, 75%, 56.7%, 76% and 61%, respectively, for those periods as shown in Figure 8. This study indicates that dairy cattle, after recovery from FMDV infection could be considered as in a non-carrier stage. There were several possible reasons for factors that could have affected this result. First, to prevent the inactivated of live virus in OP fluid that effected for isolation. Therefore, it was recommended that probang samples must be kept in dry ice or at-80^{o}C during collection and transportation to the laboratory. Second, it was possible that the infected animals were not continuously producing and eliminating virus in their excretions (Archetti *et al*.,(1995). Third, the animals could have received multiple vaccinations after the disease outbreak which would neutralize the virus, making it impossible for the virus to replicate in the laryngeal area of the infected animals.

For buffaloes, a total of 93 probang and 102 serum samples were collected from buffaloes in Yasothon province following FMDV type O infection at 3, 6 and 11 months post infection. The result of probang tests found that 6.1% (2/33) were positive by virus isolation/ELISA typing and 6.1% were positive by rRT-PCR at 3 months post infection. These buffaloes were confirmed as FMDV persistent infected or carrier by the intermittent recovery of type O virus in OP fluid. These results were similar to a study by Sutmoller and Gaggero (1966) which reported finding isolated virus in OP fluid from both infected animals and vaccinated animals at 4 months and 6 months after infection. Probang samples collected at 6 and 11 months post infection were all negative by both tests, (Table 3). Serology results in buffaloes infected with FMDV type O in Yasothon province demonstrated that the LP ELISA titer to type O was 31/42(73.8%) seropositive at 3 M/PI (Figure 5), 12/35 (34.2%) at 6 M/PI (Figure 6) and 17/25 (68%) at 11 M/PI (Figure 7). The NSP-ELISA showed very high positive results at 66.7%, 52% and 76%, respectively, for those periods as shown in Figure 9.

In this study, the high antibody titer to FMDV 3 serotypes were obtained in infected animals, due to multivaccination with trivalent vaccine after the FMD outbreak, with vaccination continuing at 6 month intervals. Because of that, the recovery of virus in OP fluid would not be detected as the virus was neutralized by antibody from the vaccination (Salt *et al*.,1996). There were only 2 buffaloes which could be classified as carrier animals where the FMD virus could be detected in OP samples at 3 months post-infection which might depend on the presence of FMDV in infected cell in the oesophageal-laryngeal fluid (Salt *et al*.,1996), although the NSP-ELISA demonstrated high positive results in both cattle and buffaloes from 2 to 19 months post infection (Sorensen et al., 1998 ; Verin *et al*. unpublished data). Other research studies on the duration of carrier state in host species and virus strains have reported virus recovery in cattle up to 2.5 years post-infection (Hedger, 1970), in sheep and goats up to 9 months post infection (Mc Vicar and Sutmoller, 1969), and in Asian swamp buffaloes up to at least 20 months post infection (Verin *et al*., unpublished data). Although saliva samples were collected from all animals in this study, the specific IgA detection assay was not done due to limited laboratory facilities locally and lack of budget to submit those samples to the World Reference Laboratory, United Kingdom, for analysis.

In conclusion, cattle infected with FMDV type A were considered as being in a non carrier state, seropositive to type A from 48-100% and NSP positive from 56-76%. The buffaloes infected with FMDV type O, 6.1% were considered as being in a carrier state at 3 months post infection, seropositive to type O

from 34-73% and NSP positive from 52-76%. Although the duration of carrier status has not been conclusively determined, NSP positive status could be detected upto 19 months post infection.

Acknowledgements

The authors wish to thank staffs of Regional Reference Laboratory (RRL) for their help in preparing probang samples, buffers, tissue cultures, media and participation in the implementation of this study. Special thanks to Dr. Narong Kaenkaew, Maejo Dairy Cooperative, Chiang Mai, for his kind assistance in collecting blood and probang samples, to Mrs. Chaisuree Suphavilai, Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, for her kind assistance in collecting blood samples, to Dr. Suvichai Rojanasthien, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, and Dr. Nutveroj Boochapat, Chief of Yasothon Provincial Livestock Office, Yasothon and his staff for their kind support of this study. The authors wish to thank Mr. Umnuay Wongkhan, the owner of the dairy cattle farm, for his kind support in providing all the dairy cattle for this study. The authors would like to give special thanks to Mr. Sangsak Raksasuk and Miss Orapin Chanjirakitti, Biogenomed Co., Ltd., Thailand for their kind contribution in testing the probang samples by real time RT-PCR and for consultation in the analysis of the results. Finally, the authors would like to thank Dr. Lamar G. Robert, Chiang Mai University, Chiang Mai for English proofreading of the manuscript.

References

Archetti, I. L., Amadori, M., Donn, A., Salt, J. and Lodetti, E. 1995. Detection of foot and mouth Disease virus infected cattle by assessment of antibodyresponse in oro-pharyngeal fluids. J. Clin. Microbiol. 33: 79-84.

Bergmann, I. E., de Mello, P. A., Neitzert, E., Beck, E. and Gomes, I. 1993. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered non-structural viral antigens. Am. J. Vet. Res. 54: 825–831.

Burrows, R. 1966. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. J. Epidemiol. and Infect. 64: 81-90.

Callahan, J. D., Brown, F., Osorio, F. A., Sur, J. H., Kramer, E., Long, G. W., Lubroth, J., Ellis, S. J., Shoulars, K. S. and Gaffney, K. 2002. Use of a portable real-time reverse transcriptase polymerssae chain reaction assay for rapid detectionn of foot and mouth disease virus. J. of Amer. Vet. Med. Assoc. 220:1636-1642.

Donaldson, A. I., Gibson, C. F., Oliver, R., Hamblin, C. and Kitching, R. P. 1987. Infection of cattle :By airborne foot and mouth disease virus: minimal dose with O and SAT2 strains. Res. Vet. Sci. 43:339-346.

Donaldson, A. I and Ferris, N. P. 1980. Sites and release of airborne foot and mouth disease virus from infected pigs. Res. Vet. Sci. 29: 315-319.

Donn, A., Marin, L. A. and Donaldson, A. I. 1994. Improved detection of persistent foot and mouth disease virus infection in cattle by polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 49: 179-186.

Hamblin, C., Barnett, I. T .R and Hedger, R. S. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. I. Development and method of ELISA . Journal of Immunological Methods. 93: 115-121.

Hedger, R. S. 1970. Observations on the carrier state and related antibody titers during an outbreak of foot and mouth disease. J. Hyg. 68: 53-60.

Hedger, R. S. and Candy, J. B. 1971. The survival of foot and mouth disease virus in African buffalo with non-transference of infection to domestic cattle. Res. Vet. Sci. 16; 182-185.

Hyslop, N. St. G. 1965. Airborne infection with the virus of foot and mouth disease virus, J. Comp Pathol. 75: 119-126.

House, C. and Mayer, R. F. 1993 . The detection of foot and mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. J. Virol. Methods. 43:1-6.

Linchongsubongkoch, W. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference, Dusit Resort and Polo Club, Petchaburi province. 62-72.

Mc Vicar, J. W. and Sutmoller, P. 1969. Sheep and goats as foot and mouth disease carriers.Proc. Mtg. US Livestock San Assoc. 72: 400-416.

Panina, G. F., Amadori, M., Massirio, I., Pavesi, M. and Perini, S. 1988. Persistence of foot and mouth disease virus (FMDV) infection in pigs. Report of the 56th general Session of OIE, Paris (GS 17/C54).May .Appendix X.

Roder, P. L. and Le Blanc Smith, P. M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis . Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

Rweyemamu, M. M., Booth, J. C., Head, M. and Pay, T. W. F. 1987. Microneatralization tests for serology typing and subtyping of foot and mouth disease virus strain. J. of Hyg.Camb. 81: 107-123.

Salt, J. S., Mulcahy, G. and Kitching, R. P. 1996. Isotype-specific antibody respeonse to foot and mouth disease virus in sera and secretions of carrier and non-carrier cattle. Epidemiol. Infect. 117: 349-360.

Singh, P. P. 1977. Studies on foot and mouth disease in goats with special reference to the distribution of virus and carrier status. Ph.D. Thesis, Agra University. India.

Sutmoller, P. and Gaggero, A. 1966. Foot and mouth disease carriers. Vet. Rec. 77: 968-969.

Snowdon, W. A. 1966. Growth of foot and mouth disease virus in monolayer culture of calf thyroid cells. Nature. 210: 1079-1080.

Sorensen, K. J., Hansen, C. M., Madsen, E. S. and Madsen, K. G. 1998. Blocking ELISAs using the FMDV non structural proteins 3D, 3AB and 3ABC produced in the baculovirus expression system. The Veterinary Quartery. 20: S17-20.

Thongtha, P., Linchongsubongkoch, W. and Thongtha, R. 2008. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus field outbreak in Thailand during 2005-2007. Thai-NIAH eJournal (May-Auggust): 18-27.

Van Bekkum, J. G., Straver, P. J., Bool, P. H. and Frenkel, S. 1966. Further information on the persistence of infective foot and mouth disease virus in cattle exposed the virulent virus strains. Bull. Off. Int. Epiz. 65: 1945-1965.

Van Bekkum, J. G. 1973. The carrier state in foot and moth disease.In. Pollard M. (Ed), Proc. 2nd. Int. Conf. on FMD; Gustav Stern Foundation. Inc., New York. Pp. 45-50.

Woodbury, E. L. 1996. A review of the possible mechanisms for the persistence of foot and Mouth disease virus. Epidem. Inf. 114: 1-13.

Zhang, Z. and Alexandersen, S. 2003. Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot and mouth disease virus by real time RT-PCR assay. J. of Vet.Methods. 111: (2) 95-100.

Table 1 Primer and probe sequences for detection of FMD virus in real time RT-PCR

Name	Sequence (5'- 3')	Target gene
Forward primer	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA	3D
Reverse primer	GCGAGTCCTGCCACGGA	3D
Probe	(FAM)-TCCTTTGCACGCCGTGGGAC-(TAMRA)	3D

Table 2 Result of ELISA typing, virus isolation rRT-PCR of OP or probang samples collected from cattle at 2, 5, 11 and 19 months post infected with FMDV type A

Sample/time of collection	VI/ELISA typing positive/total	r RT-PCR result positive/total	Results
2 months post infected (n=20)	0/20	0/20	Non carrier
5 months post infected (n=28)	0/28	0/28	Non carrier
11 months post infected (n=25)	0/25	0/25	Non carrier
19 months post infected (n=39)	0/39	0/39	Non carrier

Remark: VI = virus isolation, OP = oesophageal-pharyngeal fluid, n = number of sample

Table 3 Result of ELISA typing, virus isolation rRT-PCR of OP or probang samples collected from buffaloes at 3, 6 and 11 months post infected with FMDV type O

Sample/time of collection	VI/ELISA typing positive/total	r RT-PCR result positive/total	Results
3 months post infected (n=33)	0/20	0/20	Non carrier
6 months post infected (n=35)	0/28	0/28	Non carrier
11 months post infected (n=25)	0/25	0/25	Non carrier

Remark: VI = virus isolation, OP = oesophageal-pharyngeal fluid, n = number of sample

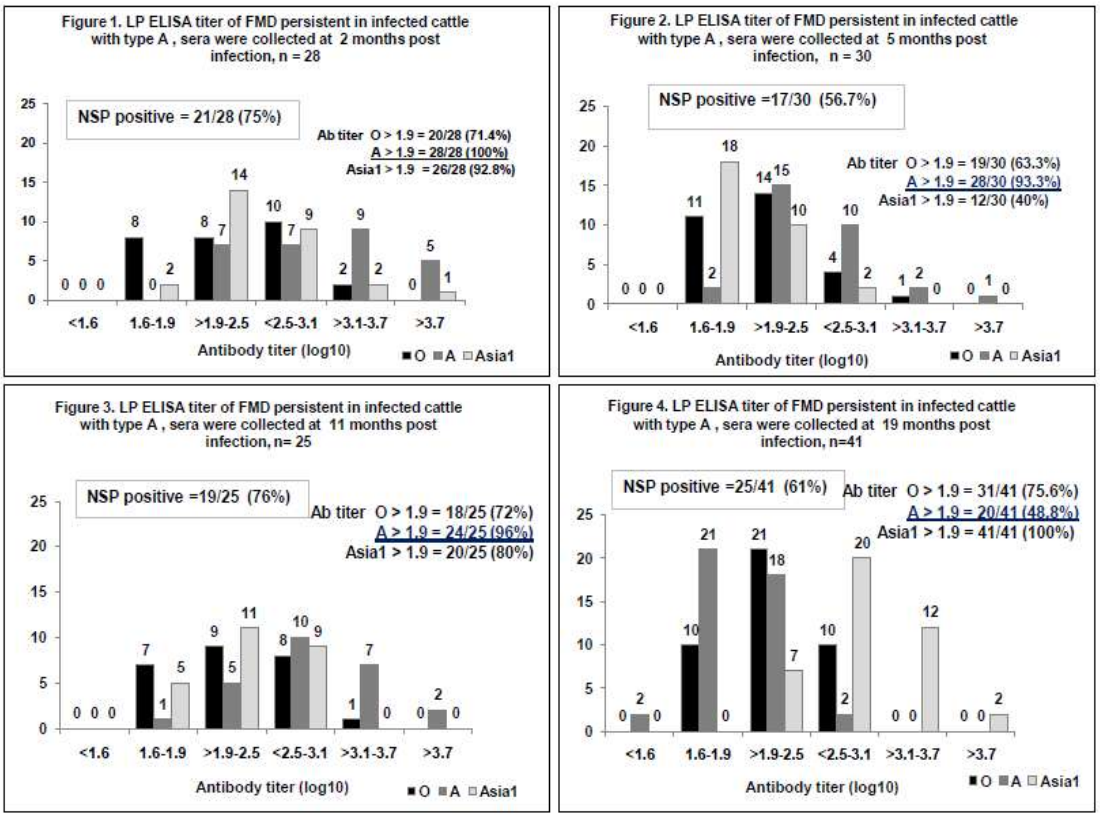
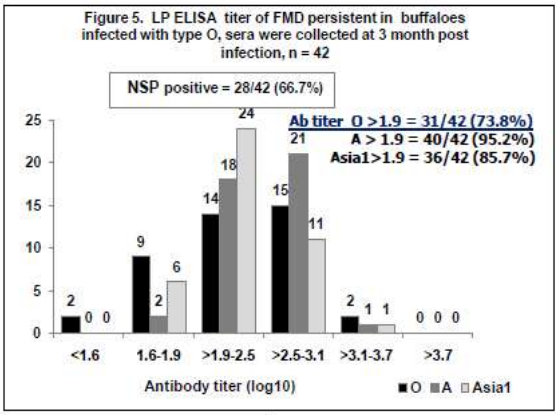
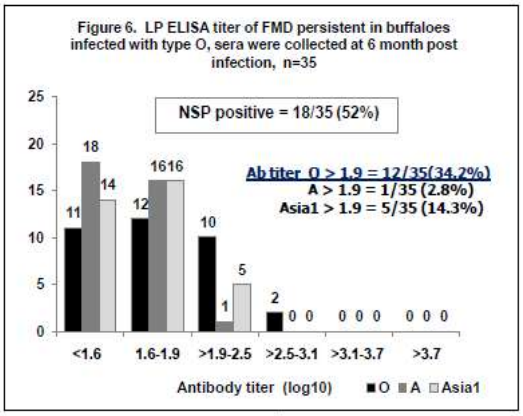


Figure 1, 2, 3 and 4 Results of serology testing using LP ELISA (O, A and Asia1) and NSP-ELISA in persistent FMDV infected cattle. Serum samples were collected at 2, 5, 11 and 19 months post infection.





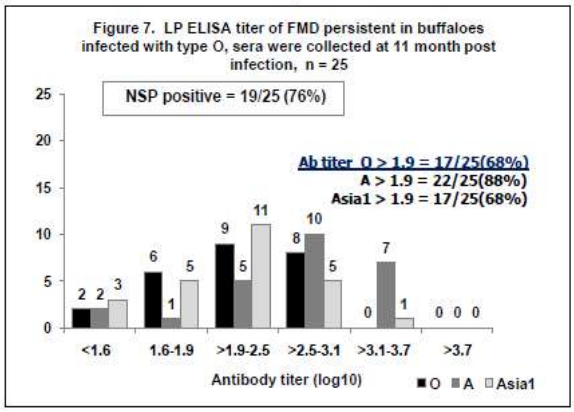
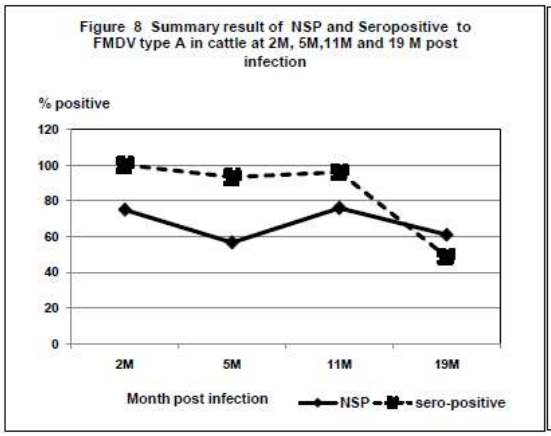
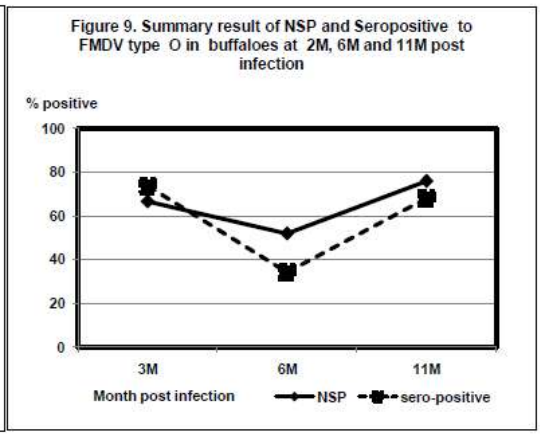


Figure 5, 6 and 7 Results of serology tests using LP ELISA and NSP-ELISA in persistent FMDV infected buffaloes. Serum samples were collected at 3, 6 and 11 months post infection.





Figures 8 and 9 Summary of NSP positive and seropositive results to FMDV type A and O in infected cattle and buffaloes. Antibody titers greater than 1.9 (log) or 1:80 were defined as seropositive.

การศึกษาสภาวะสัตว์อมโรคที่ติดเชื้อด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในโคและกระบือในประเทศไทย

วิไล ลินจงสุบงกช[1] ดิลก อ้วนพรมมา[2] เทิดศักดิ์ ญาโน[3]
ประเสริญ วงศ์นาค[4] จรรยา สมานิตย์[5] โสภา สิงคลีบุตร[5]

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาสภาวะสัตว์อมโรคที่ติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในโคและกระบือโดยเก็บตัวอย่างบริเวณจากหลอดอาหารส่วนต้น oesophageal- laryngeal (OP) fluid หรือ probang จำนวน 205 และซีรัมจำนวน 226 ตัวอย่างในช่วง 2-19 เดือนภายหลังการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากโคในจังหวัดเชียงใหม่และกระบือในจังหวัดยโสธร ตัวอย่าง probang จะดำเนินการตรวจหาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี virus isolation (VI)/ELISA typing และ real time RT-PCR (rRT-PCR) ตัวอย่างซีรัมจะดำเนินการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 ด้วยวิธี LP ELISA ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC นอนสตรัคเจอร์โปรตีนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี NSP-ELISA เพื่อแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อและสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน ผลการตรวจตัวอย่าง probang ในโคที่ระยะ 2, 5, 11 และ 19 เดือนภายหลังการติดเชื้อพบว่า VI/ELISA typing และ rRT-PCR ได้ผลลบทั้งหมด แสดงว่าโคฝูงนี้ไม่มีสภาวะเป็นสัตว์อมโรคหรือพาหะของโรค (non-carrier state) ในขณะที่ตัวอย่าง probang จากกระบือตรวจพบ VI/ELISA typing ได้ผลบวก 6.1% (2/33)และ rRT-PCRได้ผลบวก 6.1% (2/33) ที่ระยะ 3 เดือนภายหลังการติดเชื้อ แสดงว่ามีสภาวะเป็นสัตว์อมโรคหรือพาหะของโรค(carrier state) และได้ผลลบทั้งหมดในช่วงระยะ 6 และ 11 เดือนภายหลังการติดเชื้อ ผลการตรวจ LP ELISA จากซีรัมในโคที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสไทป์ A พบว่าในผล seropositive ทั้ง 3 ไทป์ (titer>1.9 log หรือ >1:80) LP ELISA ต่อไทป์ A เท่ากับ 28/28 (100%), 28/30 (93.33%), 24/25 (96%) และ 20/41 (48.8%) ที่ระยะ 2, 5, 11 และ 19 เดือนภายหลังการติดเชื้อ ผลของ NSP-ELISA พบว่าให้ผลบวกเท่ากับ 75%, 56.7%, 76% และ 61% ตามลำดับ ส่วนผลการตรวจ LP ELISA จากซีรัมกระบือที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสไทป์ O พบ seropositive ต่อไทป์ O เท่ากับ 31/42 (73.8%), 12/35 (34.2%) และ 17/25 (68%) ที่ระยะ 3, 6 และ 11 เดือนภายหลังการติดเชื้อ ผลของ NSP-ELISA พบว่าให้ผลบวกเท่ากับ 66.7%, 52% และ 76% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และAsia1 มีระดับค่อนข้างสูงทั้ง 3 ไทป์ เนื่องจากสัตว์ได้รับการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด 3 ไทป์ อย่างสม่ำเสมอเป็นประจำทุกปีทำให้ตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวอยู่ในระดับค่อนข้างสูง

คำสำคัญ: โรคปากและเท้าเปื่อย สภาวะสัตว์อมโรค LP ELISA, real time RT-PCR

[1] ผู้เชี่ยวชาญโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ขอนแก่น

[3] คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

[4] สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดยโสธร กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ยโสธร

[5] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา