วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 27 ฉบับที่ 1-2 มีนาคม-กันยายน 2561

สารบัญ

- **จากกองบรรณาธิการ** 5

- **การเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด** 6
  วีรชาย ปู่สูงเนิน คณิตา ภาสะฐิติ

- **ความคุ้มโรคข้ามกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ซีโรไทป์ A สเตรนต่างๆ** 15
  ไชยา สง่าประโคน วรพร ปู่สูงเนิน วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์ ร่มพฤกษ์ อุดล

- **ระบาดวิทยาทางโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554** 28
  วิไล ลินจงสุบงกช โรเนลโล อะบีลา ปณิธาน ทองทา

- **การประเมินคุณภาพตัวอย่างต่อผลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการ** 44
  วิไล ลินจงสุบงกช กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย อมรรัตน์ ชุณศาสตร์
  สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ อรงกรณ์ พันธุมาตร จรรยา สมานิตย์ ชาลีนี ดีแปลง

- **การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ** 55
  ดิถี ประเสริฐสุวรรณ กังวาน จึงธีระพานิช

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 27 No. 1-2 March-September 2018

Contents

- The editorial 5

- Preparation of fowl cholera vaccine for injection with duck plague vaccine 6
  Weerachai Poosungnoen Kanita Bhasathiti

- Cross protection of foot and mouth disease vaccine serotype A for cattle 15
  Chaiya Sangaprakhon Woraporn Poosungnoen Worapong Sriwilairit Romphruke Udon

- Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus in Southeast Asia during 2004-2011 28
  Wilai Linchongsubongkoch Ronello Abila Panithan Thongtha

- Evaluation of sample quality effecting to the foot and mouth disease laboratory diagnostic results 44
  Wilai Linchongsubongkoch Kingkarn Boonsuya Seeyo
  Amornrat Choonnasard Sahawatchara Ungvanijban
  Arongkorn Panthumart Janya Samanit Chalinee Deepang

- The preparation of virulent duck plaque virus from SPF chicken embryo fibroblast 55
  Ditee Prasertsuwan Kungwan Jungtheerapanich

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	เชาวฤทธิ์	บุญมาทิต	**Advisory board**	Chaowarit	Bunmatid
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 1123 โทรสาร 0-4431-5931	**Office:**	Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima, Thailand 30130 Tel. 0-4431-1476 extension 1123 Fax. 0-4431-5931
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ เดือนมีนาคม และกันยายน	**Publications:**	Twice a year in March and September

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 TH SarabunPSK แบบปกติ ขนาด 16 ชื่อหัวข้อใหญ่ เช่น **ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง** ใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น **คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ** เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา ขนาด 16

2.2.2 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ใช้กระดาษ A4 พิมพ์หน้าเดียว จำนวน 10-14 หน้า

2.2.3 การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ ด้านบน ด้านซ้าย ด้านขวาและด้านล่างที่ 2.54 ซม.

2.2.4 การลำดับหน้า ใช้หมายเลข 1,2,3...... ที่กึ่งกลางหน้า ด้านบน และใช้ตัวอักษรปกติ ขนาด 16

2.2.5 ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ จัดพิมพ์แยกหน้าเฉพาะ และจัดวางหลังเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ตาราง ระบุเลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) ให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด ถ้าตารางมีความยาวเกิน 1 หน้า ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ) 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 1123 โทรสาร 0-4431-5931

3.3 ไม่ส่งคืนต้นฉบับ

3.4 ต้นฉบับที่ส่งให้พิจารณาจะมีใบตอบรับให้เจ้าของผลงาน และจะแจ้งผลการพิจารณาให้ทราบภายใน 2 เดือน

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

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี

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

World Organisation for Animal Health (OIE). 2017. Fowl cholera. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. p. 740.

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) <u>เว็บไซต์</u> ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ (ถ้ามี) แหล่งที่มาและวันที่เข้าถึง เช่น

จันทรา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพึ่งพิศ ดุลยพัชร์ 2541 อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา <u>http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm</u> 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 <u>http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx</u> [Accessed 10 January 2006].

จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ เราได้ทำการปรับปรุงรูปเล่มวารสารใหม่ โดยเปลี่ยนรูปแบบและเพิ่มขนาดตัวอักษร ทำให้วารสารมีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้ผู้อ่านได้รับความสะดวกและความชัดเจนในการอ่านมากยิ่งขึ้น สำหรับเนื้อหาในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ประกอบด้วยผลงานวิชาการ จำนวน 5 เรื่อง ได้แก่ เรื่องการเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด เรื่องความคุ้มโรคข้ามกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ซีโรไทป์ A สเตรนต่างๆ เรื่องการเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ เรื่องระบาดวิทยาทางโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554 และเรื่องการประเมินคุณภาพตัวอย่างต่อผลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นผลงานของสัตวแพทย์หญิงวิไล ลินจงสุบงกช ผู้เชี่ยวชาญด้านวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย และเป็นผู้ริเริ่มและจัดทำวิธีการทดสอบของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ให้ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025:2005 ปัจจุบันท่านดำรงตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญ OIE และที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย และเป็นผลงานจากนักวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้อ่านและนักวิชาการที่สนใจและให้การสนับสนุนงานด้านวิชาการด้วยการส่งผลงานวิชาการและบทความวิชาการที่เป็นประโยชน์มาเผยแพร่ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ และขอเชิญชวนให้ส่งผลงานวิชาการเข้ามามากๆ เพื่อให้วารสารฉบับหน้าและฉบับต่อไปได้ตีพิมพ์ให้ได้ปีละ 2 ฉบับตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ
กองบรรณาธิการ

การเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด

วีรชาย ปู่สูงเนิน[1] คณิตา ภาสะฐิติ[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด โดยใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์กำจัดฟอร์มาลินที่มีอยู่ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้ พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2% และ 3% สามารถกำจัดฟอร์มาลินได้ และเมื่อนำวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่กำจัดฟอร์มาลินแล้วมาเป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ดไปทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรค 100% ต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่และเชื้อกาฬโรคเป็ด จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2% เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้กำจัดฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้ สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในเป็ดทดลองได้ตามมาตรฐาน OIE และ ASEAN

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ วัคซีนกาฬโรคเป็ด โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* และโรคกาฬโรคเป็ด (duck plague) เกิดจากเชื้อ Herpesvirus เป็นโรคติดต่อร้ายแรงพบในไก่ เป็ด ห่าน ไก่งวง สัตว์ปีกอื่นๆ ทุกอายุสัตว์ ในสัตว์ที่มีอายุมากพบว่ามีอัตราการป่วยและตายสูงกว่าสัตว์อายุน้อย ในช่วงฤดูร้อนหรือช่วงเปลี่ยนฤดูกาลจะมีการระบาดมากที่สุด การฉีดวัคซีนให้สัตว์จึงเป็นวิธีการสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Zander *et al*., 1997)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์แนะนำให้ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เข็มแรกในเป็ดอายุ 8-12 สัปดาห์ เข็มที่ 2 อายุ 16 สัปดาห์ และฉีดซ้ำทุก 3 เดือน ส่วนวัคซีนกาฬโรคเป็ด แนะนำให้ฉีดเข็มแรกในเป็ดอายุ 3-4 สัปดาห์ เข็มที่ 2 อายุ 10-12 สัปดาห์ เข็มที่ 3 อายุ 24 สัปดาห์ และฉีดซ้ำทุก 6 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) การฉีดวัคซีนทั้งสองชนิดให้แก่เป็ดจะต้องฉีดแยกกัน ทำให้เกษตรกรผู้ใช้สิ้นเปลืองเวลา และสัตว์เครียดง่าย ทำให้เกิดปัญหาตามมา เช่น เป็ดกินอาหารได้น้อย ปริมาณไข่ลดลง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกาฬโรคเป็ดสำหรับป้องกันโรคทั้งสองชนิด (นิคมและคณะ, 2529) นอกจากนี้สุวรรณีและวันชัย (2537) ได้ทดลองผลิตและทดสอบวัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ดในเป็ด จากวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นที่อ่อนกำลังลงแล้ว (attenuated vaccine) รวมกับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อ (inactivate) โดยผ่านขบวนการพาสเจอไรส์เซชันแล้วนำมารวมกันผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง เพื่อสะดวกในการใช้ป้องกันทั้งโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกาฬโรคเป็ด ซึ่งวัคซีนรวมที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน (OIE, 2012) แต่เนื่องการจากการผลิตวัคซีนรวมดังกล่าวมีขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยากและหากจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตในรูปแบบอุตสาหกรรมต้องปรับปรุงหรือเพิ่มเติมอุปกรณ์การผลิต รวมทั้งต้องนำแอนติเจนมารวมกันก่อนการทำแห้งและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้ง

ปัจจุบันมีการใช้วัคซีนรวมในสุนัข โดยใช้วัคซีนชนิดน้ำเป็นตัวทำละลายวัคซีนชนิดดูดแห้ง เช่น วัคซีนรวม 5 โรค Canigen® DHPPi/L และ Vanguard® HTLP 5/L ประกอบด้วย Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus type 2 , Canine Parvovirus และ Canine Parainfluenza virus เป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง และมีวัคซีนชนิดน้ำประกอบด้วย *Leptospira interrogans* ซีโรวาร์ canicola และ *Leptospira interrogans* ซีโรวาร์ icterohaemorrhagiae เป็นตัวทำละลาย ใช้ป้องกันโรคไข้หัดสุนัข ตับอักเสบ ลำไส้อักเสบ พาราอินฟลูเอนซ่าและเลปโตสไปโรซิส ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดน้ำ สามารถใช้ร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่อยู่ในรูปดูดแห้งได้ โดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตเป็นวัคซีนเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อด้วย 0.3% ฟอร์มาลิน แต่มีรายงานว่า 0.2% ฟอร์มาลิน สามารถฆ่าเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดได้ (Fan *et al*., 2009) ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวัคซีนกาฬโรคเป็ด จึงจำเป็นต้องลดปริมาณฟอร์มาลินในวัคซีน อหิวาต์เป็ด-ไก่ลง เพื่อให้สามารถใช้ร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) เนื่องจากเป็นสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดฟอร์มาลินได้ดี และไม่ทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ต่อวัคซีนเปลี่ยนไป (National Research Council, 1981)

วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อหาปริมาณโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่เหมาะสมที่สามารถกำจัดหรือลดปริมาณฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด แล้วนำไปทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่

1. เตรียม formalinized broth bacterin ของเชื้อ *Pasteurella multocida* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่น ในขวดเริ่มต้น ปริมาตร 4 ลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth ในสภาพมีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะในถังเฟอร์เมนเตอร์ ขนาด 400 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ความเร็วรอบใบพัด 150 รอบต่อนาที นาน 9 ชั่วโมง เติม 0.3% ฟอร์มาลินโดยปริมาตร เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างบรอทแบคเทอรินจำนวน 5 ตัวอย่างๆละ 2 ลิตร

2. หาปริมาณโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่เหมาะสม สำหรับกำจัด (neutralization) ฟอร์มาลิน โดยเตรียมสารละลาย 10% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เป็น stock solution จากการละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 100 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 0.5%, 1%, 2% และ 3% โดยผสม 10% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาตร 25, 50, 100 และ 150 มล. ในบรอทแบคเทอรินที่เตรียมจากข้อ 1. ปริมาตร 500 มล. ตามลำดับ ทำการทดลองในขั้นตอนนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้วัคซีน 3 ชุดการผลิต

3. ทดสอบหาปริมาณฟอร์มาลินด้วยวิธี Hantzsch’s test (Nash, 1953) โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลินจากความเข้มข้น 0.1% ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04% และ 0.05% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 2 หลอด เจือจางตัวอย่างบรอทแบคเทอรินจากข้อ 2. ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ปริมาณฟอร์มาลินอยู่ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยดูดตัวอย่างบรอทแบคเทอรินปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดใส่หลอดทดลองที่จะทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลอด เติมสารละลาย Ammonium acetate buffer หลอดละ 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร สร้างกราฟสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลินนำค่า OD ที่วัดได้จากตัวอย่างบรอทแบคเทอรินเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. นำตัวอย่างบรอทแบคเทอรินจากข้อ 2. ที่ผสมกับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นที่กำจัดฟอร์มาลินได้หมดมาผลิตเป็นวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ให้มีปริมาณเชื้อไม่น้อยกว่า 1×10^{9} CFU/โด๊ส (0.5 มล.) ขนาดบรรจุขวดละ 200 โด๊ส

วัคซีนกาฬโรคเป็ด

ตัวอย่างวัคซีนกาฬโรคเป็ด ชุดที่ 7/58 ขนาดบรรจุขวดละ 200 โด๊ส มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ fifty percent tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)/โด๊ส (0.5 มล.)

สัตว์ทดลอง

เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ คละเพศ อายุ 8 สัปดาห์ ไม่เคยได้รับวัคซีนและไม่เคยเป็นโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ดมาก่อน ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี จำนวน 90 ตัว

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

การทดสอบความปลอดภัย

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 1 มล. โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่เจือจางด้วยน้ำยาละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด และกลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด โดยวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด

สังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เป็ดทดลองทุกตัวต้องไม่พบการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและวิการของโรค ทั้งอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (ASEAN secretariat, 1998; OIE, 2012)

การทดสอบความคุ้มโรค

แบ่งเป็ดทดลองเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขาตัวละ 0.5 มล. ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่เจือจางด้วยน้ำยาละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด โดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ฉีดวัคซีน หลังจากฉีดวัคซีนเป็นเวลา 14 วัน นำเป็ดทดลองมาฉีดเชื้อพิษทับเข้ากล้ามเนื้อขา ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 5 ฉีดพิษทับด้วยเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อ ไม่ต่ำกว่า 100 fifty percent lethal dose (LD_{50}) ตัวละ 1 มล. กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 6 ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดปริมาณ 100 LD_{50} ตัวละ 1 มล. จากนั้นสังเกตอาการและนับจำนวนเป็ดตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งเป็ดที่ได้รับวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ต้องรอดอย่างน้อย 70% และเป็ดกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (OIE, 2012) ในขณะที่เป็ดที่ได้รับวัคซีนกาฬโรคเป็ดต้องรอดอย่างน้อย 90% และไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด และเป็ดกลุ่มควบคุมตายทั้งหมดจึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (ASEAN secretariat, 1998)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินหลังถูกกำจัดด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์โดยใช้ Z-value test (Dunn's test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

การทดสอบหาปริมาณฟอร์มาลิน

ผลการทดสอบหาค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินที่เหลือในตัวอย่างบรอทแบคเทอริน พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินหลังถูกกำจัดด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.5% และ 1% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 2% และ 3% และกลุ่มที่ไม่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โดยกลุ่มที่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.5% กับ 1% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และกลุ่มที่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 2% กับ 3% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตารางที่ 1)

การทดสอบคุณภาพวัคซีน

การทดสอบความปลอดภัย

วัคซีนทุกกลุ่มมีความปลอดภัยในเป็ดทดลอง โดยไม่พบการแพ้วัคซีนทั้งทางระบบ systemic และ local ไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและวิการทั้งอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด

การทดสอบความคุ้มโรค

ผลการทดสอบความคุ้มโรค กลุ่มที่ฉีดวัคซีน ให้ความคุ้มโรค 100% ทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่มที่ 1-4) และไม่มีอาการหรือความผิดปกติใดๆที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5 และ 6) เป็ดทดลองทั้งหมดตายภายใน 14 วัน (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตในปัจจุบันเป็นวัคซีนเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อด้วย 0.3% ฟอร์มาลินและไม่ได้มีการกำจัดฟอร์มาลินที่เหลืออยู่ แม้ว่าปริมาณฟอร์มาลินที่เหลืออยู่มีค่าตามมาตรฐาน คือ ไม่เกิน 0.5% (European Pharmacopoeia, 1997) แต่มีรายงานว่า 0.2% ฟอร์มาลินสามารถฆ่าเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดได้ (Fan *et al*., 2009) และฟอร์มาลินถือว่าเป็นสารก่อมะเร็งจึงต้องมีการกำจัดให้เหลือน้อยที่สุด ผู้วิจัยได้เลือกใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ เนื่องจากเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการกำจัดฟอร์มาลินส่วนเกินได้ดีและไม่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของวัคซีนเปลี่ยนไป (National Research Council, 1981) จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินในกลุ่มที่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.5% และ 1% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่ไม่ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ แต่ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินระหว่างความเข้มข้น 0.5% กับ 1% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังนั้นในการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อเป็นวัคซีนชนิดเดียว สามารถเลือกใช้ 0.5% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถลดปริมาณฟอร์มาลินได้ แต่หากต้องการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ เพื่อเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนชนิดอื่นๆ เช่น วัคซีนกาฬโรคเป็ด หรือวัคซีนชนิดอื่นที่อาจได้รับผลกระทบจากฟอร์มาลิน หรือไม่ต้องการให้มีปริมาณฟอร์มาลินหลงเหลืออยู่ในวัคซีน อาจเลือกใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2% หรือ 3% ก็ได้ เนื่องจากสามารถกำจัดฟอร์มาลินได้หมดและให้ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับทุกกลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sotoodehnihnia and Aarabi (1988) ที่ใช้ 0.5% ฟอร์มาลินฆ่าเชื้อในวัคซีนแบลคเลก แล้วใช้ 3% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์กำจัดปริมาณฟอร์มาลิน จากนั้นนำมาทำเป็นวัคซีนรวมกับวัคซีนแอนแทรกซ์ชนิดสปอร์มีชีวิต พบว่าโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถกำจัดฟอร์มาลินได้หมดและไม่มีผลต่อจำนวนสปอร์มีชีวิตในวัคซีนแอนแทรกซ์

วัคซีนที่เตรียมขึ้นมาจากวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เชื้อตายชนิดน้ำ และวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยใช้วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด เช่นเดียวกับงานวิจัยต่างๆ ได้แก่ Edmund and William (1991) ได้ศึกษาการทำวัคซีนชนิดมัลติวาเลนท์ในสุนัข โดยผลิตวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งจากไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ Canine distemper virus, Infectious canine hepatitis virus, Canine adenovirus type 2, Canine parainfluenza virus และ Canine parvovirus แล้วใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira canicola* และ *Leptospiraictero haemorrhagiae* เป็นตัวทำละลายพบว่าวัคซีนรวมให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อจุลชีพทุกชนิดได้ และในคนมีการศึกษาการใช้วัคซีนรวมที่ผลิตจากแบคทีเรียและไวรัส เช่น Poovorawan *et al*. (1997) ศึกษาการฉีดวัคซีนรวมโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน (แบคทีเรีย) ก่อน แล้วฉีดวัคซีนโรคไวรัสตับอักเสบบี เปรียบเทียบกับการฉีดวัคซีนรวม 4 โรค คือ โรคคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ซึ่งผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้งแล้วใช้วัคซีนโรคไวรัสตับอักเสบบีเป็นตัวทำละลาย พบว่าการฉีดวัคซีนรวม 4 โรค ให้ภูมิคุ้มกันสูงและยาวนานกว่าการฉีดแยกเข็มกัน ดังนั้นประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ช่วยเพิ่มความสะดวกในการฉีด การจัดเก็บ และการขนส่งวัคซีนรวมทั้งช่วยประหยัดแรงงานและงบประมาณ

สรุป

โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 2% เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้กำจัดฟอร์มาลินในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้หมด สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายวัคซีนกาฬโรคเป็ด มีความปลอดภัยและให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ได้ตามมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียน เพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นิคม ชัยศิริ เกรียงศักดิ์ พูนสุข และเกรียงศักดิ์ สายธนู 2529 วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่และกาฬโรคเป็ด 8. ภูมิคุ้มกันโรคในเป็ดหลังจากฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ และวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดวัคซีนรวมและการฉีดพร้อมกันในการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 13 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพฯ หน้า 60-61

สุวรรณี ท้วมแสง และวันชัย ตีรถะวรวรรณ 2537 การทดสอบวัคซีนรวมอหิวาต์เป็ด-ไก่ และกาฬโรคเป็ด ตอนที่ 1 ขบวนการผลิต และประสิทธิภาพวัคซีนรวม เวชชสารสัตวแพทย์ 24(1): 43-53

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2557 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ ศูนย์สื่อสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ หน้า 12

ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for inactivated fowl cholera vaccine. *In* Manual of ASEAN standard for animal vaccine, Livestock publication series 2A, 2nd ed. Penehar Swadaya, Indonesia. pp. 22-23.

Edmund, P. B. and William, H. K. 1991. Multivalent canine distemper virus vaccine. Available from http://www.google.com/patents/US5000951 [Accessed 4 August 2014].

European Pharmacopoeia. 1997. Vaccines for veterinary use. Published in accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No.50). p. 1702.

Fan, S., Li, H., Shi, D. and Kang, K. 2009. Safety and protection experiments of inactivated vaccine against duck plague. Chin. J. Prev. Vet. Med. 31(7): 553-557.

Nash, T. 1953. Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzschreaction. Biochem. J. 55(3): 416-421.

National Research Council (U.S.). 1981. Formaldehyde and other aldehydes/Committee on Aldehydes, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Assembly of Life Sciences, National Research Council, National Academy Press. Washington, D.C., USA. pp. 20-35.

Poovorawan, Y., Theamboonlers, A., Sanpavat, S., Chumdermpadetsuk, S., Safary, A. and Vandepapeliere, P. 1997. Long-term antibody persistence after booster vaccination with combined tetravalent diphtheria tetanus, whole-cell Bordetella pertussis and hepatitis B vaccine in healthy infants. Ann. Trop. Paediatr. 17(4): 301-308.

Sotoodehnihnia, A. and Aarabi, I. 1988. Neutralization of excess formalin by sodium metabisulfite in combined anthrax and clostridial vaccine.Arch. Inst. Razi. 38(39): 89-91.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2017. Fowl cholera. *In* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th ed. OIE. Paris, France. pp. 740-746.

Zander, D. V.,Bermudez, A. J. and Mallison, E. T. 1997. Principle of disease prevention: diagnosis and control. Diseases of Poultry, 10thed. Iowa State University Press. Iowa, USA. pp. 21-25.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลินที่เหลือในตัวอย่างบรอทแบคเทอรินหลังการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มที่	% ความเข้มข้น โซเดียมเมตาไบซัลไฟ	% ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอร์มาลิน
1	0%	$0.28±0.01^{a}$
2	0.5%	$0.07±0.04^{ab}$
3	1%	$0.01±0.02^{ab}$
4	2%	0^{b}
5	3%	0^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความคุ้มโรคหลังการฉีดวัคซีนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	วัคซีน	% ความคุ้มโรค (จำนวนสัตว์คุ้มโรค/จำนวนสัตว์ทั้งหมด)	
		อหิวาต์เป็ด-ไก่	กาฬโรคเป็ด
1	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่	100% (10/10)	-
2	วัคซีนกาฬโรคเป็ด	-	100% (10/10)
3	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด	100% (10/10)	-
4	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่ฉีดร่วมกับวัคซีนกาฬโรคเป็ด	-	100% (10/10)
5	ไม่ฉีดวัคซีน	0% (0/10)	-
6	ไม่ฉีดวัคซีน	-	0% (0/10)

Preparation of fowl cholera vaccine for injection with duck plague vaccine

Weerachai Poosungnoen [1] Kanita Bhasathiti [1]

Abstract

The preparation of fowl cholera vaccine for injection with duck plaque vaccine, using sodium metabisulfite to neutralize formalin in fowl cholera vaccine, before dissolve of duck plaque vaccine was studied. The results showed that concentration (w/v) of sodium metabisulfite at 2% and 3% were neutralized the formalin. The fowl cholera vaccine with 2% sodium metabisulfite was used as diluent for duck plaque vaccine to evaluate safety and potency in Khaki Campbell ducks. The vaccine was safe and protected (100%) both fowl cholera and duck plaque disease. In conclusion, 2% sodium metabisulfite was the minimum concentration that can neutralize the formalin and can be use as diluent to duck plaque vaccine and be administered with safety and completely prevent the fowl cholera and duck plaque disease in experimental ducks met the OIE and ASEAN requirements.

Keywords: fowl cholera vaccine, duck plague vaccine, sodium metabisulfite

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

ความคุ้มโรคข้ามกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ซีโรไทป์ A สเตรนต่างๆ

ไชยา สง่าประโคน[1] วรพร ปู่สูงเนิน[1] วรพงษ์ ศรีวิไลฤทธิ์[1] ร่มพฤกษ์ อุดล[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความคุ้มโรคข้ามกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโคกระบือ แพะ แกะ ซีโรไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{ลพบุรี/2012}$ ที่ใช้อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลเป็นแอดจูแวนท์ นำไปทดสอบความคุ้มโรคภายหลังการฉีดวัคซีนสเตรนละ 15 ตัวๆ ละ 2 มิลลิลิตร ในวันที่ 21 หลังฉีดวัคซีน โดยแบ่งโคทดลองที่ฉีดวัคซีนในแต่ละสเตรนออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว แล้วฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$ หรือ $A_{สกลนคร/97}$ หรือ $A_{ลพบุรี/2012}$ ที่เป็น homologous strain และ heterologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน สังเกตอาการและตรวจดูวิการ เป็นเวลา 8 วัน พบว่า วัคซีนสเตรน $A_{118/87}$ ให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 100%, 50% และ 0% วัคซีนสเตรน $A_{สกลนคร/97}$ ให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 100%, 100% และ 40% และวัคซีนสเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$ ให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 100%, 75% และ 80% ต่อเชื้อพิษทับ $A_{118/87}$, $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{ลพบุรี/2012}$ ตามลำดับ ดังนั้นไวรัสสเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$ จะสามารถให้ความคุ้มโรคข้ามต่อสเตรน heterologous ได้ดีกว่า $A_{118/87}$ และ $A_{สกลนคร/97}$

คำสำคัญ: ความคุ้มโรคข้าม วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์เอ

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย เกิดจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Virus, FMDV) อยู่ในสกุล (Genus) Apthovirus ตระกูล (Family) Picornaviridae ซึ่งเป็น RNA virus ก่อให้เกิดโรคในสัตว์กีบที่เป็นทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า ในปัจจุบันมี 7 ซีโรไทป์ คือ O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 และ Asia1 ซึ่งในแต่ละซีโรไทป์ ยังมีชนิดย่อย (subtype) รวม 64 subtypes ดังนี้ ซีโรไทป์ O มี 11 subtype (O_1-O_{11}), ซีโรไทป์ A มี 32 subtype (A_1-A_{32}), ซีโรไทป์ C มี 5 subtype(C_1-C_5), ซีโรไทป์ Asia1 มี 3 subtype ($As_{1/1}$-$As_{1/3}$) และซีโรไทป์ SAT1, SAT2, SAT3 มี 6, 3 และ 4 subtype ตามลำดับ (Rweyemamu, 1984) โดยแต่ละซีโรไทป์จะไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามกัน

ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นประจำทุกปี คือ ซีโรไทป์ O และ A ในขณะที่ซีโรไทป์ Asia1 ไม่พบการระบาด โดยซีโรไทป์ O จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) ระหว่างเชื้อไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนและเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ พบว่า มีความสัมพันธ์กัน (r>0.4) (Udon and Linchongsubongkoch, 2006; Udon *et al*., 2008) แสดงว่าวัคซีนที่ผลิตสามารถป้องกันการระบาดของโรคได้โดยส่วนใหญ่ สำหรับซีโรไทป์ A พบว่ามีการเปลี่ยนคุณสมบัติอยู่เสมอ มีหลายสเตรนที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เช่น $A_{Nakornpathom/87}$ หรือเรียก $A_{132/87}$ เป็นสเตรนที่มีการระบาดก่อนปี พ.ศ. 2540 และเมื่อเกิดการระบาดในโคที่จังหวัดสกลนครในปี พ.ศ. 2540 ซึ่งเชื้อมีคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาต่างออกไป ตั้งชื่อเป็น $A_{Sakolnakorn/97}$ หรือเรียก $A_{สกลนคร/97}$ ต่อมาเกิดการระบาดที่จังหวัดสระบุรีในปี พ.ศ. 2545 ได้จำแนกเป็นสเตรนใหม่คือ $A_{Saraburi/87}$ หรือเรียก $A_{118/87}$ ต่อมาระหว่างปลายปี พ.ศ. 2555 ถึงต้นปี พ.ศ. 2556 พบการระบาดของโรคที่จังหวัดลพบุรี มีการเก็บวิการและซีรัมมาตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) พบว่า เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไป (Udon and Kamolsiripichaiporn, 2012) จึงได้ส่งตัวอย่างให้ World Reference Laboratory (WRL) ตรวจสอบเพิ่มเติม พบว่า มีความใกล้เคียงกับ $A_{22/Iraq/64}$ มากกว่า $A_{132/87}$, $A_{สกลนคร/97}$หรือ $A_{118/87}$ แต่มีลำดับ (sequence) ของ neucleotide อยู่ในกลุ่ม Asia topotype เดียวกันและได้ตั้งชื่อใหม่เป็น $A_{ลพบุรี/2012}$ และจากการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนชนิด monovalent-$A_{ลพบุรี/2012}$ มีความคุ้มโรค 18.20PD_{50} (50%Protective dose)/dose ในโคต่อเชื้อ $A_{ลพบุรี/2012}$ ที่ใช้เป็น homologous challenge strain (สมเกียรติ และคณะ, 2556) ซึ่งมากกว่าที่ OIE (2012) กำหนด (≥3PD_{50}/dose) และสามารถใช้ในการควบคุมโรคเมื่อเกิดการระบาดได้ (≥6PD_{50}/dose)

จากการรายงานการศึกษาของ Brehm และคณะ (2008) โดยการฉีดวัคซีนซึ่งเป็น high potency vaccine ที่ผลิตจาก $A_{22\ Irak/64}$, $A_{Iran/96}$ และ $A_{Iran/99}$ พบว่า เมื่อฉีดพิษทับโดยใช้ homologous strain จะให้ความคุ้มโรค ≥32 PD_{50}/dose ในทุกสเตรนวัคซีน ขณะที่ความคุ้มโรคของวัคซีน $A_{22\ Irak/64}$ โดยใช้ heterologous strain $A_{Iran/96}$ และ $A_{Iran/99}$ จะให้ความคุ้มโรค เท่ากับ 6.06 และ 3.84 PD_{50}/dose ตามลำดับ วัคซีน $A_{Iran/96}$ ให้ความคุ้มโรคต่อ heterologous strain $A_{22\ Irak/64}$ และ $A_{Iran/99}$ เท่ากับ 8.0 และ 10.56 PD_{50}/dose ตามลำดับ ส่วนวัคซีน $A_{Iran/99}$ ให้ความคุ้มโรคต่อ heterologous strain $A_{22\ Irak/64}$ และ $A_{Iran/96}$ เท่ากับ 13.93 และ 18.38 PD_{50}/dose ตามลำดับ สำหรับความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) จากการทดสอบโดยวิธี Virus neutralization test (VNT) พบว่า $A_{22\ Irak/64}$ มีความแตกต่าง (r_1<0.3; OIE, 2012; Rweyemamu, 1984) กับ $A_{Iran/96}$ และ $A_{Iran/99}$ โดยมีค่าเท่ากับ 0.09 และ 0.04 ตามลำดับ ถ้าเป็น $A_{Iran/96}$ ก็มีความแตกต่างกับ $A_{22\ Irak/64}$ และ $A_{Iran/99}$ โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.12 ตามลำดับ และถ้าเป็น $A_{Iran/99}$ ก็มี

ความแตกต่างกับ $A_{22\ Irak/64}$ และ $A_{Iran/96}$ โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.23 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Konig and Peres-Filgueia (2011) โดยใช้ $A_{Iran/96}$ เป็น vaccine strain และใช้ $A_{22\ Irak/64}$ เป็น challenge strain โดยทดสอบซ้ำ (n=5) ในสัตว์ทดลอง (n=75) พบว่า วัคซีนดังกล่าวให้ความคุ้มโรค ระหว่าง 0.5-3.48 PD_{50}/dose (เฉลี่ย 1.03 PD_{50}/dose) ซึ่งแสดงว่า ค่าความสัมพันธ์อาจไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับในบางสเตรนจึงต้องทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับในสัตว์เป้าหมาย

การสร้างภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละซีโรไทป์จะไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามกัน (cross-protection) แต่ในซีโรไทป์เดียวกันแต่ต่างสเตรนอาจให้ความคุ้มโรคข้ามกันได้บ้าง (Rweyemamu, 1978; Rweyemamu, 1984; Rweyemamu and Hingley, 1984; OIE, 2012; Konig and Peres-Filgueia, 2011) เช่น เมื่อเกิดการระบาดของ $A_{ลพบุรี/2012}$ ปี 2554-2555 ที่จังหวัดลพบุรี สระบุรี ที่มีคุณสมบัติต่างจาก $A_{118/87}$ และ $A_{สกลนคร/97}$ บ้าง ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวฉีดวัคซีนชนิดไตรวาเลนท์ ที่มี $A_{118/87}$ ไว้ แต่ไม่สามารถป้องกันโรคได้ กรมปศุสัตว์จึงให้ผลิตวัคซีน monotype $A_{สกลนคร/97}$ สำหรับฉีดเพื่อควบคุมและหยุดยั้งการระบาดของโรค ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) ก่อนที่จะมีการผลิต monovalent $A_{ลพบุรี}$ สำเร็จ แสดงว่า ถึงแม้เชื้อไวรัสจะมีความแตกต่างกันทางซีรัมวิทยาหรือต่างสเตรนกัน ก็ยังสามารถให้ความคุ้มโรคข้ามสเตรนกันได้บ้าง แต่จะไม่ครอบคลุมทั้งหมดถ้าจะให้วัคซีนมีความคุ้มโรคกับเชื้อที่ต่างสเตรนกันด้วยต้องใช้ high potency vaccine หรือถ้าใช้วัคซีนปกติที่ใช้ฉีดป้องกันโรคเป็นประจำ ก็ต้องมีการฉีดกระตุ้น (booster) หลังจากฉีดเข็มแรกเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มโรคให้สูงขึ้น (OIE, 2012)

ดังนั้น สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) จึงจะศึกษาความคุ้มโรคข้ามกันที่เกิดจากวัคซีนซีโรไทป์ สเตรน $A_{118/87}$, $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{ลพบุรี/2012}$ โดยวิธีฉีดพิษทับ เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการใช้แอนติเจนไวรัสเพื่อผลิตวัคซีน สำหรับใช้ในการป้องกันควบคุมการระบาดของโรคและกำจัดโรคให้หมดไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเควียสที่ผสมอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลเป็นแอดจูแวนท์สำหรับโคกระบือ แพะ แกะ ชนิดโมโนวาเลนท์ A ตามวิธีการของ สทช. ตำรับละ 20 ลิตร จำนวน 3 ตำรับ คือ

- ตำรับที่ 1 วัคซีน สเตรน $A_{118/87}$
- ตำรับที่ 2 วัคซีน สเตรน $A_{สกลนคร/97}$
- ตำรับที่ 3 วัคซีน สเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$

โดยแต่ละตำรับมีปริมาณแอนติเจน (146S particles) เท่ากับ 3 µg/dose แบ่งบรรจุขวดละ 20 โด๊ส (40 มิลลิลิตร) เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส รอการทดสอบต่อไป

สัตว์ทดลอง

ใช้โคพันธุ์พื้นเมือง ไม่จำกัดเพศ อายุไม่น้อยกว่า 6 เดือน และไม่เกิน 8 เดือน สุขภาพแข็งแรง จำนวน 57 ตัว เป็นโคที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนหรือเคยติดเชื้อ ตรวจโดยวิธี Non-structural protein (NSP) test และตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีโดยวิธี Virus neutralization test (VNT) และ Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)

การทดสอบความปลอดภัย (Safety)

ใช้โคทดลอง 2 ตัว/ตำรับ (รวม 6 ตัว) ฉีดวัคซีนแต่ละตำรับ จำนวน 2 เท่าของโด๊สปกติ สังเกตการแพ้วัคซีนทั้งทางระบบ (systemic) และเฉพาะที่ (local) อาการและวิการของโรค เป็นเวลา 14 วัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558ก; OIE, 2012) เจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีน, หลังฉีดวัคซีน 4, 7, 10 และ 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี VNT และ LP ELISA และตรวจการติดเชื้อโดยวิธี NSP test ทั้งนี้โคทั้งหมดให้เลี้ยงต่ออีก 7 วัน (รวมเป็น 21 วัน) แล้วทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมเป็น homologous serum สำหรับการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี VNT และ LP ELISA ต่อไป

การทดสอบความคุ้มโรค (Potency)

- แบ่งโคทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 17 ตัว (รวม 51 ตัว) แล้วฉีดวัคซีนให้แก่สัตว์ตัวละ 2 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนัง ตำรับละ 15 ตัว อีก 6 ตัว ไม่ฉีดวัคซีน เป็นกลุ่มควบคุม
- เจาะเลือดโคทดลอง จำนวน 7 ครั้ง ดังนี้ ก่อนฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 4, 7, 10, 14, 20 วัน (ก่อนฉีดพิษทับ) และหลังฉีดพิษทับ 8 วัน เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี VNT และ LP ELISA และตรวจการติดเชื้อโดยวิธี NSP test
- การฉีดพิษทับ หลังฉีดวัคซีน 21 วัน ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอที่เป็น homologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน และเชื้อที่เป็น heterologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน ที่มีความรุนแรง 10,000 CID_{50} (50% cattle infectious dose/ตัว) ที่ลิ้นของโค (intradermo-lingual route) สังเกตอาการ วัดอุณหภูมิ และตรวจดูวิการทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2558ข; OIE, 2012) สัตว์ที่มีความคุ้มโรคจะไม่เกิดวิการ เช่น ตุ่มน้ำใสที่กีบเท้าบริเวณ coronary band และพื้นกีบ นำจำนวนสัตว์ที่ไม่เกิดวิการไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค ซึ่งต้องมีความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 75% เมื่อฉีดพิษทับด้วย homologous strain กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน

การตรวจทางซีรัมวิทยา (Serological test)

1. <u>Virus neutralization test (VNT)</u>

ตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2555ค; OIE, 2012) โดยนำซีรัมที่ต้องการตรวจสอบหาระดับแอนติบอดีมา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ใน flat-bottomed microplate และ neutralize ด้วยไวรัส ปริมาตรที่เท่ากับซีรัม คือ 50 µl ซึ่งมีความรุนแรง 100 $TCID_{50}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 5% CO_2 Incubator หลังจากนั้นเติม secondary lamb kidney cells หลุมละ 150 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect, CPE) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คำนวณค่า log VNT titer ตามวิธีของ Karber (1931) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2012) กำหนดไว้ว่า ถ้าค่า log VNT <1.20 (ไตเตอร์ 1/16) แปลผล เป็นลบ ค่า log VNT ≥ 1.20 แปลผล เป็นบวก

2. <u>Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA)</u>

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Indirect double antibody sandwich ELISA (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2554ก) โดยการ coat rabbit anti-FMDV ลงใน flat-bottom microplate เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C แยกเตรียม virus-serum mixture ใน U-bottom microplate แยกแต่ละไทป์โดยเจือจางซีรัมแบบ 2-fold dilution แล้วเติมไวรัสที่มีความเข้มข้นคงที่ (เมื่ออ่านค่า 50% ของ OD_{max} ที่ 450nm. มีค่า = 1.5 จากการทำ antigen titration) ลงในซีรัม

ควบคุมและตัวอย่างซีรัมที่จะทดสอบซึ่งทำเป็น dilution ไว้ ด้วยปริมาตรเท่ากันคือ 50 µl นำไปเขย่าค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นถ่ายสารละลาย virus-serum mixture จาก U-bottom microplate ไปยัง flat-bottom microplate ซึ่ง coat rabbit anti-FMDV และล้างด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) แล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม Guinea pig anti-FMDV serum นำไปเขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS หลังจากนั้นเติม anti guinea pig IgG-HRP conjugate เขย่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วเติม substrate หลุมละ 100 µl ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของ substrate ด้วย 1M H_2SO_4 หลุมละ 50 µl นำไปอ่านค่า Optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่าแอนติบอดีตามวิธีของ Hamblin และคณะ (1986) ซึ่งตามมาตรฐาน OIE (2012) กำหนดไว้ว่า ถ้า ค่า log ELISA $\leq$1.60 (ไตเตอร์ 1/40) แปลผล เป็นลบ และ ค่า log ELISA $\geq$ 1.90 (ไตเตอร์ 1/80) แปลผล เป็นบวก

3. <u>Non-structural protein test (NSP test)</u>

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อส่วน 3ABC ของ NSP ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปซึ่งผลิตในเชิงพาณิชย์[1] ขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบดำเนินการตามคู่มือของผู้ผลิต (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2554ข) 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 เติม conjugate หลุมละ 100 µl วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติม substrate หลุมละ 100 µl วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติม stop solution หลุมละ100 µl นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย ELISA reader นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณค่า percentage inhibition (PI) ซึ่งถ้า ค่า PI $<$ 50% แปลผล เป็นลบคือ ไม่มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV และ ค่า PI $\geq$ 50% แปลผล เป็นบวกคือ มีแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP of FMDV

ผล

วัคซีนทั้ง 3 ตำรับที่ผลิต (โมโนวาเลนท์ $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร}/97}$ และ $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$) มีความปลอดภัยในโคทดลอง โดยไม่พบการแพ้วัคซีนทั้งทางระบบ systemic และ local ไม่พบอาการและวิการของโรคปากและเท้าเปื่อย รวมทั้งไม่กระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีต่อ NSP และจากการทดสอบหาระดับระดับแอนติบอดีโดยวิธี VNT ต่อไวรัสทั้ง 3 สเตรน ได้ค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีสูงมากกว่า 1.20 logVNT ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน (รูปที่ 1A, 1C และ 1E) และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี LP ELISA ได้ค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีสูงมากกว่า 1.90 logELISA ต่อไวรัสทั้ง 3 สเตรน ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน เช่นกัน (รูปที่ 1B, 1D และ 1F)

การทดสอบความคุ้มโรคข้ามของวัคซีนโมโนวาเลนท์ $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร}/97}$ และ $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ พบว่าสเตรน $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ ให้ความคุ้มโรคข้ามสเตรน (heterologous) ได้ดีกว่าสเตรน $A_{118/87}$ และ $A_{\text{สกลนคร}/97}$ (ตารางที่ 1) สำหรับระดับแอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนในกลุ่มสัตว์ทดสอบความคุ้มโรคทั้ง 3 สเตรน โดยวิธี VNT (รูปที่ 2A, 2C และ 2E) พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (n=15) ต่อไวรัสไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร}/97}$ และ $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ จะต่ำกว่า 1.20 logVNT ยกเว้นการฉีดวัคซีน $A_{118/87}$ จะให้ระดับแอนติบอดีต่อไวรัส $A_{118/87}$ สูงกว่า

[1] PrioCHECK® FMDV NS, Switzerland

1.20 logVNT ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน แต่ระดับแอนติบอดีไม่สูงมากนักเฉลี่ยประมาณ 1.30 logVNT ขณะที่วิธี LP ELISA (รูปที่ 2B, 2D และ 2F) พบว่าวัคซีนทั้ง 3 สเตรน มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสทั้ง 3 สเตรนได้ดีและมากกว่า 1.90 logELISA หรือ 1/80 ตั้งแต่วันที่ 7 หลังฉีดวัคซีน สูงสุดวันที่ 10 หลังฉีดวัคซีน แล้วลดลงแต่ยังสูงมากกว่า 1.90 logELISA ในวันฉีดพิษทับ

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกตลอดการทดสอบ (ก่อนฉีดพิษทับ) แต่หลังฉีดพิษทับ 8 วัน มีตัวอย่างจากโคที่ฉีดวัคซีนที่ให้ผลบวก จำนวน 10 ตัว จากโคทั้งหมดที่เหลือหลังฉีดพิษทับ 41 ตัว คิดเป็น 24.39% โดย 1 ใน 10 ตัว มีความคุ้มโรค สำหรับโคตัวควบคุม (control) มีโคที่ให้ผลบวก จำนวน 2 ตัว จาก 6 ตัว คิดเป็น 33.33% (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากผลการทดสอบความคุ้มโรค จะเห็นว่า วัคซีนสเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$ ให้ความคุ้มโรคครอบคลุมต่อการฉีดพิษทับด้วยไวรัสสเตรนเดียวกัน (homologous strain) ได้ 80% คือคุ้มโรคในโค 4 ตัว จาก 5 ตัว ที่ฉีดวัคซีน 1 โด๊ส และยังป้องกันโรคข้ามสเตรน (heterologous strain) คือ สเตรน $A_{118/87}$ และ $A_{สกลนคร/97}$ ด้วยโดยให้ความคุ้มโรคต่อ $A_{118/87}$ และ $A_{สกลนคร/97}$ เท่ากับ 100% และ 75% ตามลำดับ ซึ่งให้ความสามารถในการป้องกันโรคได้ ≥75% ตามมาตรฐานที่ OIE กำหนด (OIE, 2012) รองลงมาเป็นวัคซีนสเตรน $A_{สกลนคร/97}$ จะสามารถป้องกันโรคที่เกิดจาก $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{118/87}$ ได้ 100% แต่ป้องกันไวรัสสเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$ ได้ 40% ต่ำกว่ามาตรฐาน ขณะที่วัคซีนสเตรน $A_{118/87}$ สามารถป้องกันเชื้อที่เป็น homologous strain เท่านั้น ป้องกันโรคที่เกิดจาก $A_{สกลนคร/97}$ ได้ 50% แต่ไม่สามารถป้องกันสเตรน $A_{ลพบุรี/2012}$ ได้เลย (ตารางที่ 1) แต่เมื่อดูที่ระดับแอนติบอดี พบว่าการทดสอบด้วยวิธี VNT และ LP-ELISA มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 2) โดยวิธี VNT เฉพาะการฉีดวัคซีนสเตรน $A_{118/87}$ เท่านั้นที่ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสสเตรน $A_{118/87}$ ≥1.2 logVNT ส่วนการฉีดวัคซีน $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{ลพบุรี/2012}$ ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสทั้ง 3 สเตรนต่ำกว่า 1.2 logVNT จนถึงวันฉีดพิษทับ ขณะที่การทดสอบโดยวิธี LP-ELISA ระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสทั้ง 3 สเตรนสูงกว่า 1.90 logELISA แสดงว่าสัตว์ต้องคุ้มโรคได้คือไม่เกิดโรค แต่จากการฉีดพิษทับพบว่าไม่สามารถป้องกันโรคได้ แต่ถ้ามีการฉีดวัคซีน double dose (รูปที่ 1) พบว่า วัคซีนทั้ง 3 สเตรน จะกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าระดับที่ป้องกันโรคได้ทั้ง 3 สเตรน คล้ายคลึงกันทั้งจากการทดสอบโดยวิธี VNT และ LP-ELISA ซึ่งจะได้ศึกษาหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นและเปรียบเทียบกันต่อไป ทั้งนี้จากการตรวจสอบหาระดับภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีจากสัตว์ป่วยในพื้นที่และสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดสอบความปลอดภัย (safety) และความคุ้มโรค (potency) โดยวิธี VNT และ LP-ELISA เช่น ตัวอย่างซีรัมโคป่วยจากจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และสระบุรี เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยแล้วว่าเกิดจากซีโรไทป์ A พบว่า มีระดับแอนติบอดีต่อทั้ง $A_{118/87}$, $A_{สกลนคร/97}$ และ $A_{ลพบุรี/2012}$ ในระดับสูงทั้งหมดทั้งสองวิธี (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์)

ดังนั้นการใช้ระดับแอนติบอดีจากวิธี VNT และ ELISA มาใช้ในการตัดสินว่าสัตว์ที่มีระดับแอนติบอดีสูงๆ ต้องมีความคุ้มโรคด้วยนั้น ไม่ถูกต้องเสมอไป เพราะยังมีสัตว์บางตัวที่เป็นโรคได้ หรือการหาความสัมพันธ์ (r-value) ระหว่างเชื้อไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนกับเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ Rweyemamu (1984) ได้แนะนำให้ทำการรวม (pool) ซีรัมที่ใช้เป็น homologous serum มาใช้ในการหาความสัมพันธ์แทนการใช้เฉพาะตัว (individual serum) เพื่อลดความผิดพลาด ทั้งนี้ยังมีการศึกษาของ Brehm และคณะ (2008) โดยการฉีด high potency vaccine ที่ผลิตจาก $A_{22\ Irak/64}$, $A_{Iran/96}$ และ $A_{Iran/99}$ ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กันทางซีรัมวิทยาโดยวิธี

VNT (r-value<0.3) แล้วฉีดพิษทับโดยใช้ homologous strain ชนิดเดียวกับที่ผลิตวัคซีนและที่ต่างจากวัคซีน (heterologous strain) พบว่า ถ้าค่า r มีความสัมพันธ์กันมากขึ้น ความคุ้มโรค (PD_{50} value) ก็เพิ่มขึ้นด้วย ขณะที่ Konig and Peres-Filgueia (2011) ใช้ $A_{Iran/96}$ เป็น vaccine strain และใช้ $A_{22\ Irak/64}$ เป็น challenge strain ซึ่งไวรัสทั้ง 2 สเตรน มี r-value<0.3 โดยทดสอบซ้ำ (n=5) ในสัตว์ทดลอง (n=75) พบว่าวัคซีนดังกล่าวให้ความคุ้มโรค ระหว่าง 0.5-3.48 PD_{50}/dose (เฉลี่ย 1.03 PD_{50}/dose) ซึ่งแสดงว่าค่าความสัมพันธ์อาจไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับในบางสเตรนจึงจำเป็นต้องทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับในสัตว์เป้าหมายเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ศึกษาต่อไป

สรุป

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A สเตรน $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ ให้ความคุ้มโรคข้ามได้ดีกว่า $A_{118/87}$ และ $A_{\text{สกลนคร}/97}$ มีความเหมาะสมที่จะใช้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ เพื่อใช้ในการควบคุม ป้องกัน ยับยั้งการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย กรมปศุสัตว์ ที่ได้อนุมัติเงินทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้บริหารของหน่วยงานต้นสังกัดของผู้วิจัย ได้แก่ น.สพ.อยุทธ์ หรินทรากร อธิบดีกรมปศุสัตว์ และน.สพ.นิเทศ เลิศลิมชลาลัย ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

ขอขอบคุณคณะกรรมการพัฒนาวิชาการ คณะกรรมการสัตว์ทดลอง ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และสัตวแพทย์หญิงสมใจ กมลศิริพิชัยพร ผู้อำนวยการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำในครั้งนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ได้ช่วยเหลือในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจนการวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2554ก วิธีทดสอบ เรื่องการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวร้โรคปากและเท้าเปื่อย (Measurement of antibody titer of foot and mouth disease virus), RRL-T-002 ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ Vol. 4 Rev. 0: 1-17

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2554ข 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 ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ Vol. 3 Rev. 0: 1-15

สมเกียรติ เพชรวานิชกุล สมเกียรติ ศรีพิสุทธิ์ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย และวิไล ลินจงสุบงกช 2556 การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ A Lopburi/2012 วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 22(1): 25-36

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2555ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ (Safety test of FMD vaccine for cattle), SOP-QCF-043 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-4

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2555ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบความคุ้มโรควัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ (Potency test of FMD vaccine for cattle), SOP-QCF-045 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-5

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2555ค มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน: การทดสอบVirus neutralization test, SOP-QCF-038 ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-6

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

Doughty, W. J., Lunt, R. A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L. J. and Kongton, A. 1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Eqiz. 14(3): 547-555.

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

Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive fur Expermentelle Pathologie Pharmarkologie. 162: 263-272.

Konig, G. and Peres-Filgueia, M. 2011. FMD Cross-protection, Vaccine-matching and Vaccine Banks: Challenges and Opportunities. Buenos Aires, Argentina, June 15th-16th. 1-12.

Rweyemamu, M. M. 1978. The selection of vaccine strains of foot and mouth disease virus. Br. Vet. J. 134: 63-67.

Rweyemamu, M. M. 1984. Antigen variation in foot-and-mouth disease: studied based on the virus neutralization reaction. J. Biol. Stand. 12(3): 323-337.

Rweyemamu, M. M. and Hingley, P. J. 1984. Foot and mouth disease virus strain differentiation: analysis of the serological data. J. Biol. Stand. 12: 225-229.

Samuel, A. R., Ouldridge, E. J., Arrowsmith, A. E. M., Kitching, R. P. and Knowles, N. J. 1990. Serological analysis of type O isolated of FMD from the middle East 1981-88. Vaccine. 8: 390-395.

Udon, R. and Kamolsiripichaiporn, S. 2012. Study of relationhip of FMD type A vaccine strains and type A field isolated strains from the central and northern parts of Thailand in 2011. Thai-NIAH e-Jornal. 7(2): 87-95.

Udon, R. and Linchongsubongkoch, W. 2006. Antigenic variation of foot and mouth disease virus field outbreak in Thailand and South East Asia region during 2004-2005. J. Thai. Med. Assoc. 57(1): 15-23.

Udon, R., Aunpromma, D. and Thongtha, P. 2008. Study on serological correlation of foot and mouth disease virus isolated from Thailand, Cambodia, Laos PDR and Vietnam during 2006-2007. Thai-NIAH e-Journal. 3(1): 52-60.

World Organization for Animal Health (OIE). 2012. Foot and Mouth Disease. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 145-173.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความคุ้มโรคข้ามกันของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ซีโรไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร/97}}$ และ $A_{\text{ลพบุรี/2012}}$

ชนิดของเชื้อพิษทับ	วัคซีน Mono $A_{118/87}$				วัคซีน Mono $A_{\text{สกลนคร/97}}$				วัคซีน Mono $A_{\text{ลพบุรี/2012}}$			
	จำนวนสัตว์ฉีดวัคซีน	จำนวนสัตว์คุ้มโรค	จำนวนสัตว์ไม่คุ้มโรค	% ความคุ้มโรค	จำนวนสัตว์ฉีดวัคซีน	จำนวนสัตว์คุ้มโรค	จำนวนสัตว์ไม่คุ้มโรค	% ความคุ้มโรค	จำนวนสัตว์ฉีดวัคซีน	จำนวนสัตว์คุ้มโรค	จำนวนสัตว์ไม่คุ้มโรค	% ความคุ้มโรค
$A_{118/87}$	5	5	0	100	5	5	0	100	4[1]	4	0	100
$A_{\text{สกลนคร/97}}$	4[2]	2	2	50	5	5	0	100	4[3]	3	1	75
$A_{\text{ลพบุรี/2012}}$	5	0	5	0	5	2	3	40	5	4	1	80

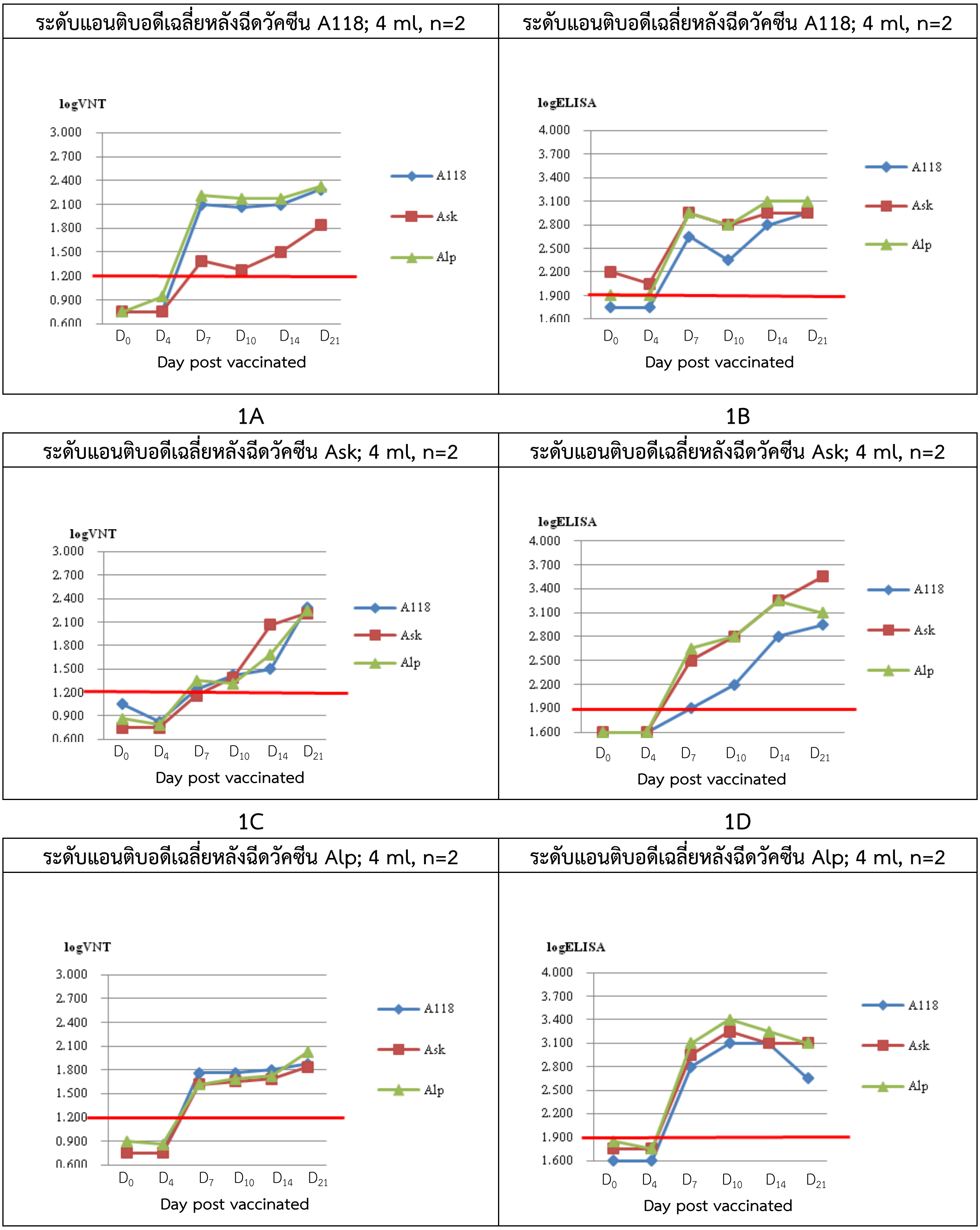
หมายเหตุ [1] โคตายวันที่ 4 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้ [2] โคตายวันที่ 5 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้ [3] โคตายหลังฉีดพิษทับ 1วัน อ่านผลไม่ได้

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ 3ABC-NSP หลังการฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะแกะ ไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร/97}}$ และ $A_{\text{ลพบุรี/2012}}$ และการฉีดพิษทับ

วัคซีน	การได้รับวัคซีน	จำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก (positive) / จำนวนสัตว์ทั้งหมด								
		Do	**D4**	**D7**	**D10**	**D14**	**D20**	**D29-$A_{118/87}$**	**D29-$A_{\text{สกลนคร/97}}$**	**D29-$A_{\text{ลพบุรี/2012}}$**
Mono $A_{118/87}$	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/4[1]	1/4[2] (nP)	2/5 (nP,nP)
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	-	-
Mono $A_{\text{สกลนคร/97}}$	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/5 (P)	0/5	5/5 (nP)
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	-	1/2 (nP)	-
Mono $A_{\text{ลพบุรี/2012}}$	ฉีดวัคซีน	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/4[3]	0/4[4]	1/5 (nP)
	ตัวควบคุม	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	-	-	1/2 (nP)
รวม	ฉีดวัคซีน	0/45	0/45	0/45	0/45	0/45	0/45	1/13	1/13	8/15
	ตัวควบคุม	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/2	1/2	1/2
เปอร์เซ็นต์	ฉีดวัคซีน	0%	0%	0%	0%	0%	0%	7.69%	7.69%	53.3%
	ตัวควบคุม	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%

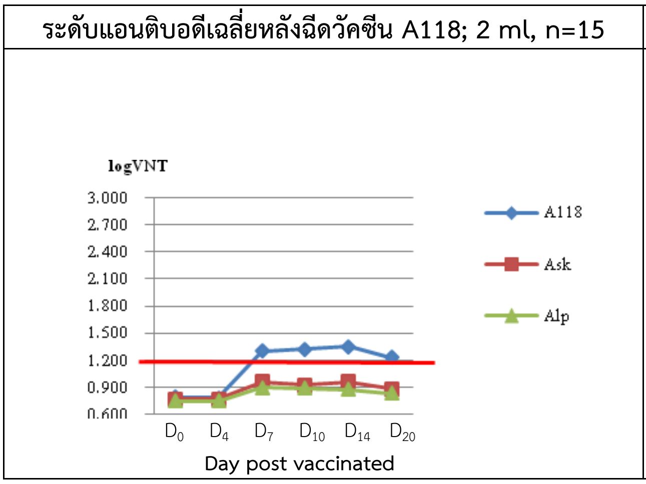
หมายเหตุ [1] โคตายวันที่ 7 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลได้ [2] โคตายวันที่ 5 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้ [3] โคตายวันที่ 4 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้ [4] โคตายวันที่ 1 หลังฉีดพิษทับ อ่านผลไม่ได้

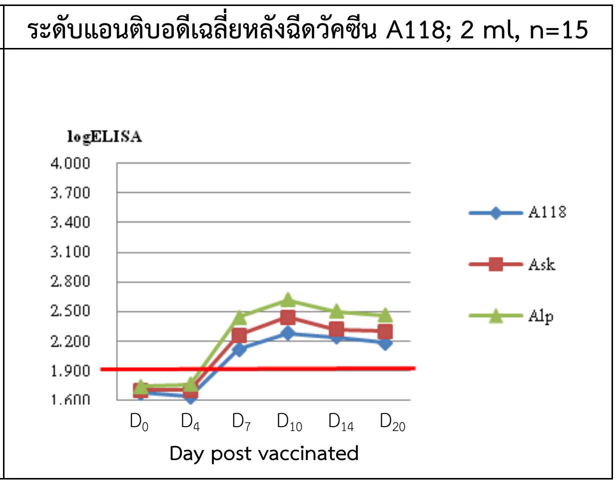
P = Protect(คุ้มโรค) nP = non protect (ไม่คุ้มโรค)



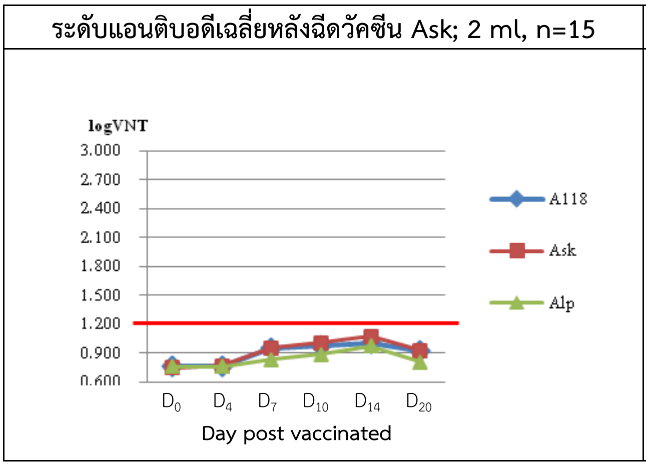
1E 1F

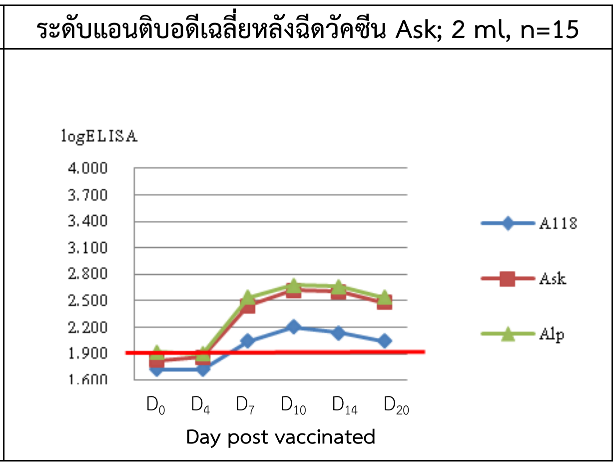
รูปที่ 1 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (logVNT & log LP ELISA) วันที่ 0, 4, 7, 10, 14, 21 หลังฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร}/97}$ และ $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ โดยฉีดวัคซีน 4 มิลลิลิตรต่อตัว (จากการทดสอบ Safety test)



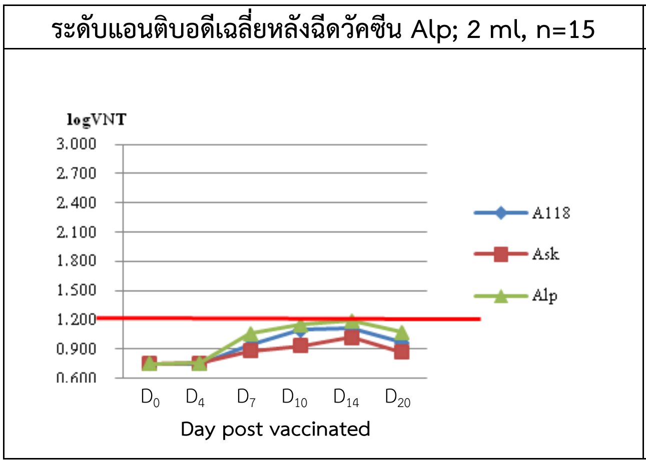


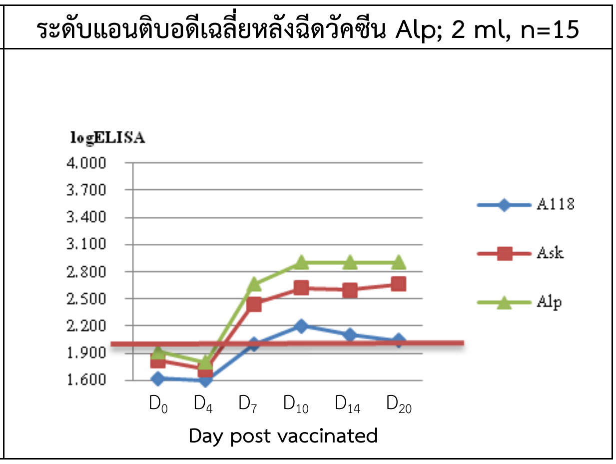
2A 2B





2C 2D





2E 2F

รูปที่ 2 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีเฉลี่ย (logVNT & log LP ELISA) วันที่ 0, 4, 7, 10, 14, 20 หลังฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ ไทป์ A สเตรน $A_{118/87}$, $A_{\text{สกลนคร}/97}$ และ $A_{\text{ลพบุรี}/2012}$ โดยฉีดวัคซีน 2 มิลลิลิตรต่อตัว (จากการทดสอบ Potency test)

Cross protection of foot and mouth disease vaccine serotype A for cattle

Chaiya Sangaprakhon[1] Woraporn Poosungnoen[1]
Worapong Sriwilairit[1] Romphruke Udon[2]

Abstract

The objective of this study is testing of cross protection of foot and mouth (FMD) vaccine serotype A for cattle. We were produced three formulation of monovalent vaccine serotype A strain $A_{118/87}$, $A_{sakon\ nakorn/97}$, $A_{lopburi/2012}$ with the aluminum hydroxide gel adjuvant. Each vaccine formulation were vaccinated 2 ml of vaccine per cattle (15 cattle) and 2 control not vaccinated (3 strain used 51 cattle; 45 cattle for vaccinated and 6 cattle for control). After 20 days of vaccinated, the cattle in each vaccine formulation were separated to 3 group (5 cattle per group) and were taken them into 3 negative pressure control room (each room had 17 cattle were 3 group of 5 vaccinated cattle from $A_{118/87}$, $A_{sakon\ nakorn/97}$, $A_{lopburi/2012}$ and 2 control). In the morning, the cattle were injected with the challenged virus (homologous vaccine strain) strain $A_{118/87}$ or $A_{sakon\ nakorn/97}$ or $A_{lopburi/2012}$ and observed sign and lesions of disease for 8 days. Found that the vaccine strain $A_{118/87}$ had protected 100%, 50% and 0%, vaccine strain $A_{sakon\ nakorn/97}$ had protected 100%, 100% and 40% and the vaccine strain $A_{lopburi/2012}$ had protected 100%, 75% and 80% for $A_{118/87}$, $A_{sakon\ nakorn/97}$ and $A_{lopburi/2012}$ respectively. Therefore, the virus strain $A_{lopburi/2012}$ was appropriated for vaccine formulation for control the FMD serotype A outbreak in Thailand.

Keywords: cross-protection, foot and mouth disease vaccine, serotype A

[1] Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130
[2] Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130

ระบาดวิทยาทางโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554

วิไล ลินจงสุบงกช[1] โรเนลโล อะบีลา[2] ปณิธาน ทองทา[3]

บทคัดย่อ

การตรวจสอบทางระบาดวิทยาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างพื้นที่ที่ระบาดในกลุ่มภูมิภาคเอเชียตะวันออกแฉียงใต้ โดยวิธี sequencing ที่ส่วนของยีน VP1 เพื่อหาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสที่ระบาดในภูมิภาคในช่วง 8 ปีย้อนหลัง (พ.ศ. 2547-2554) รวมทั้งสิ้นจำนวน 289 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นไวรัสไทป์ โอ เอ และเอเชียวันจากประเทศไทย กัมพูชา ลาว พม่าและเวียดนาม ผลการวิเคราะห์ซึ่งแสดงเป็น phylogentic tree พบว่าไวรัสไทป์โอที่ระบาดในปี พ.ศ. 2547 จัดอยู่ในกลุ่ม SEA/Mya-98 และ PanAsia ในช่วงปี พ.ศ. 2548-2549 พบว่าไวรัสแบ่งได้ 3 กลุ่มได้แก่ SEA/Mya-98, PanAsia และ Cathay ส่วนในปี พ.ศ. 2550-2552 พบไวรัสจัดอยู่ในกลุ่ม SEA/Mya-98 และในปี พ.ศ. 2553-2554 พบไวรัสจัดอยู่ในกลุ่ม SEA/Mya-98 และ PanAsia สำหรับไวรัสไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทย กัมพูชา ลาว และเวียดนาม พบว่าจัดอยู่เพียงกลุ่มเดียวคือ ASIA/Sea-97 นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาไวรัสไทป์เอเชียวันที่ระบาดในประเทศพม่าปี พ.ศ. 2548 และเวียดนาม ปี พ.ศ. 2549 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวคือ SEA/Group IV การตรวจสอบครั้งนี้สรุปได้ว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอและเอเชียวัน ในขณะที่ไทป์โอ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังนี้ ตรวจพบสายพันธุ์ Cathay ในประเทศไทยและเวียดนามในปี พ.ศ. 2548 ตรวจพบสายพันธุ์ PanAsia และ SEA/Mya-98 ในเวียดนามปี พ.ศ. 2550 และไทยในปี พ.ศ. 2550-2552 การตรวจสอบทางระบาดวิทยาโมเลกุลไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์ในการสอบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่ได้และใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคระบาดในพื้นที่ปัจจุบัน และยังเป็นการช่วยแนะนำการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดทำแผนยุทธศาสตร์การควบคุมและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ให้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: โรคปากและเท้าเปื่อย ไฟโลเจนเนติค ทรี เอเชียตะวันออกเฉียงใต้

[1] ผู้เชี่ยวชาญ OIE และที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ

[2] OIE Sub Regiona Representation for Southeast Asia กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ

[3] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Introduction

Foot and mouth disease, a highly contagious disease of cloven-hoofed animals, is important in Southeast Asia region. Serotypes O, A and Asia1 are considered endemic in Thailand and neighboring countries, causing significant economic losses primarily due to lower production of affected animals and subsequent constraints upon international trading. Rapid diagnosis and epidemiological surveillance of FMD plays an important role in the prevention of disease spread and detection of emergence new strains (Knowles *et al*., 2005) and to ensure that appropriate vaccines are selected for use against circulating field viruses in the region. Standard ELISA typing tests for type identification of field samples (Roeder and Le Blance Smith, 1987) and other serological assays including virus neutralization (VN) (Rweyemamu, 1978), liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Hamblin *et al*.,1986) in parallel with non structural protein ELISA (NSP ELISA) (Linchongsubongkoch *et al*., 2004) can be used to support disease surveillance and sero-monitoring of vaccinated and infected animals. In addition, the antigenic relationship between FMD field viruses and reference virus vaccine strains has been investigated. The VN (Doughy *et al*., 1995) and LP ELISA (Linchongsubongkoch *et al*., 2008) were used to investigate the antigenic variation. The tests can give basic information on serological relationship (r-value) between viruses causing an outbreak and the reference vaccine strain and that will useful for selecting the appropriate virus strain for vaccine production. Simultaneously, a nucleotide sequencing was used to study genetic relationships by comparing field viruses isolates and vaccine strains. This investigation can provide basic molecular epidemiological information on the disease that can be very useful for tracing to the origin of virus causing outbreak (Linchongsubongkoch *et al*., 2003). FMD serotype O, A and Asia1 have been found and endermic in the Southeast Asia region, serotype O and A were dominant in most countries in this region, (Gleeson, 2002). FMD serotype Asia1 has not been found in Thailand since 1998, but it became outbreak in Myanmar in 2005 and Vietnam in 2005-2006 (RRL report, data not published). The most important factors that contribute to these disease outbreaks and spread of FMDV were animal movements, either inside the countries or across international borders. Therefore, cooperation among the international agencies and laboratories is essential and provides valuable information regarding the disease situation and epidemiological information in order to support the control and eradicate of FMD in this region. The recently recognized foot and mouth disease (FMD) OIE Reference Laboratory for FMD (RRL) in Pakchong, Thailand, performs FMD diagnosis for countries in Southeast Asia (SEA) and OIE member countries. During the past 8 years (2004-2011), totally 818 samples consist of epithelium tissue and virus isolation fluid were submitted to RRL annually, the diagnostic results were type O = 363, A = 242, Asia1 = 7 and no virus detected (NVD) = 206 (RRL

reported, data not published). Those samples were from Cambodia, Lao PDR, Myanmar, Vietnam and Thailand and then samples were selected for further investigation and strain characterisation by antigenic variation for vaccine matching and sequencing for molecular epidemiology information. Therefore, aim of this study was to investigate the strain characterization focusing on genetic variation of FMD field isolates virus causing outbreak in the SEA region in order to enhance the effectiveness of FMD control and eradication programme to meet the achieve FMD freedom with vaccination by 2020 and maintain freedom in free countries and zones.

Materials and methods

FMD viruses

Epithelium samples from FMD infected animals (cattle, buffaloes and pigs) submitted to the Regional Reference Laboratory (RRL) for serotype identification using standard antigen detection ELISA typing and the virus isolation test by inoculating onto primary lamb kidney cell for 2-3 passages and then in BHK-21 cell lines for 4 or 5 passages. After virus isolation, then cell culture supernatant fluid was again confirmed by antigen typing test as described by Roeder and Le Blanc Smith (1987). Totally 273 FMD isolate viruses serotype O, A and Asia1 from Cambodia, Lao PDR, Myanmar, Vietnam and Thailand causing outbreaks in the region during 2004-2011 were used in this study.

Reverse transcription (RT) and PCR

RNA extraction was under taken from culture fluid by using TRIzol® LS reagent (Invitrogen™, USA) according to manufacturer’s protocol. Subsequently cDNA synthesis and RT-PCR amplification was carried out as described by Knowles and Samuel (1994) and Linchongsubongkoch et al. (2000). Oligonucleotide primers for RT-PCR and sequencing used in this study were for type O, O-1D-ROD1/ NK61, for type A, 1C-612/NK61 and for type Asia1,1C-505/NK61 (WRLFMD, UK). The VP1-RT-PCR product bands of serotype O, A and Asia1 at 720 bp, 813 bp and 914 bp respectively, were identified by 1.2% agarose gel electrophoresis compared with 100 bp DNA standard marker (Promega, USA). Oligonucleotide primer was listed in table 1.

Sequencing analysis and Phylogenetic tree analysis

The amplified cDNA fragments were purified by using QIA quick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) as recommended by the manufacturer. Cycle sequencing reactions were performed using Big-Dye® terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA). Samples were sequenced using reverse sequencing primer NK72 and forward primer used according to type O, A and Asia1 as described above. Sequencing reactions were performed using ABI 310 Genetic Analyzer V.3.1 (Applied Biosystems, USA). Sequences from those

isolate viruses were compared to complete VP1 gene segment being 639, 636 and 633 nucleotide in length for type O, A and Asia1 respectively as described by Knowles and Samuel (2003). Complete VP1 sequence alignment were generated using GENETYX-WIN software (Software developed, Japan) and phylogenetic neighboring-joining trees were constructed using MEGA 3.1 (Kumer *et al*., 2004)

Results

Diagnostic result of sample submission to the Regional Reference Laboratory from Cambodia, Lao PDR, Myanmar, Vietnam and Thailand during 2004-2011 was shown figure 1. The seuencing results were summaried in table 2. The phylogenetic tree analysis of type O, A and Asia1 were shown in figure 2, 3, 4, 5 and 6 respectively.

1. Phylogenetic tree analysis of serotype O viruses

The sequence of 639 bp VP1 segment of viruses serotype O during 2004-2011 were clustered into three topotypes, namely SEA/Mya-98 strain, ME-SA/PanAsia strain and Cathay. Tracing back to the history outbreak in each year, it was demonstrated that viruses in 2004 was clustered into two topotypes, SEA/Mya-98 strain in samples submitted from Thailand, Myanmar and ME-SA/PanAsia strain was found in sample from Cambodia by the same year. While the viruses causing outbreak in Thailand, Lao PDR and Vietnam in 2005-2006 was grouped into three topotypes, SEA/Mya-98, ME-SA/PanAsia and Cathay (figure 2). During 2007-2011, the phylogenetic tree of viruses from those countries were found only one topotype of SEA/Mya-98 in that period of study (Figure 3).

2. Phylogenetic tree analysis of serotype A viruses

The sequence of 636 bp VP1 segment of viruses type A from Thailand, Lao PDR and Vietnam was shown in figure 4 and 5. A large number of viruses from Thailand in 2004-2011, Cambodia 2008, Lao PDR 2007 and Vietnam 2008-2010 were analyzed, the phylogenetic tree of those viruses were clustered into one topotype of ASIA/Sea-97 strain, this results indicated that no any genetic variation was found in this study.

3. Phylogenetic tree analysis of serotype Asia1 viruses

The complete sequence of 633 bp VP1 genome of viruses serotype Asia1 from Myanmar 2005 and Vietnam 2006 were shown in figure 6. Phylogenetic tree of viruses were clustered in SEA topotype Group IV as described by Valarcher at al. (2009). Asia1 virus, MYA 1/2006 from Myanmar was outbreak in Loikaw district in July 2005, an outbreak was under control and no virus spreading. Furthermore, Asia1 virus was outbreak in Vietnam in 2006-2007, but there was four samples submitted to OIE Reference Laboratory, Thailand only in 2006, VIT 1/2006, VIT2/2006, VIT 3/2006 and VIT4/2006 which collected from Khanh Hao and

Lao Cai in 2005 and 2006. However, Thailand has not been found Asia1 virus since 1998, and recently since 2011, no any Asia1 virus has been found in this region (data not published).

Conclusion and discussion

Molecular epidemiology of FMDV at the VP1 segment of type O, A and Asia1 in SEA region were investigated, mainly those samples were from Thailand, Cambodia, Lao PDR and Vietnam during 2004-2011. It was found that phylogenetic tree of type O in figure 2 indicated viruses from Thailand in 2004 was defined as SEA/Mya-98 strain (Knowles *et al*., 2005), while viruses from Vietnam in 2005-2006 was grouped into three topotype of SEA/Mya-98 strain, ME-SA/PanAsia and Cathay. This result was corresponding to Abdul-Hamid *et al*. (2011) and Huang *et al*. (2001). Interestingly, Cathay topotype was also found in Thailand by end of 2005 and it was disappear since then. Pattern of Cathay topotype spread into country due to imported of piglet from neighboring country, therefore, a rapid strengthening of animal movement and increase herd immunity became an importance for control measure to stop disease outbreak. A continuing studying of VP1 sequence has been carried out year by year in order to updating the molecular epidemiological information of virus causing outbreak in SEA region. FMD type O viruses in 2010-2011 showed a genetic relationship and grouped into two topotype of SEA/Mya-98 strain and ME-SA/PanAsia as shown in Figure 3, and also the similarly sequence results was confirmed by WRL, UK. Unfortunately, no viruses from Malaysia involved in this study, due to no sample submission to RRL at that period. According to report described by Abdul-Hamid *et al*. (2011) and Khounsy *et al*. (2008), O/PanAsia 2 was found in viruses from Malaysia in 2003-2006 which was different from O/PanAsia from Thailand, Cambodia, Vietnam and Lao PDR in Figure 2. Although, a genetic variation has been found in type O viruses in this region year by year, this would be an indicator of pattern of FMD viral spread or movement in country and internationally. Simultaneously, an antigenic variation of FMD type O by determining the r-value or vaccine matching has been carried out, Linchongsubongkoch *et al*. (2008) reported that virus type O causing outbreak in SEA region during 2004 up to 2011 indicated the serological relationship was close related to virus vaccine strain. Hence, vaccine could be protect and effective for controlling FMD in this region. However, phylogenetic tree of type A from Thailand, Lao PDR, Cambodia and Vietnam was carried out during 2004-2008 as shown in figure 4 and in 2010-2011 in figure 5 respectively. A large number of viruses from those countries were clustered into one topotype of ASIA/Sea-97 strain (Thongtha and Linchongsubongkoch, 2006). This study indicated that no genetic variation occurred in type A. In contrast, an highly antigenic variation of FMD type A was found, resulting from the r-value demonstrated poor matching to virus vaccine strain (Linchongsubongkoch *et al*., 2008), therefore, selection of new seed

virus vaccine strain has been made in several time during the past 8 years, such as A118/87, A/Sakolnakorn/97. Furthermore, phylogenetic tree of type Asia1 causing outbreak in Myanmar 2005 and Vietnam 2006 was clustered as SEA topotype Group IV (Valarcher *et al*., 2009) as shown in figure 6, this lineage appear to be restricted to Southeast Asia and might have persisted in some area in this region. There has been reported that no Asia 1 outbreak in Thailand since 1998 and no report of Asia1 in SEA region since 2007 up to the period of study (OIE-SRR report, data not published). By mean time, an antigenic relationship type Asia1 was also investigated, r-value result indicated the serology relationship was close related to virus vaccine strain of Thai/Asia1/85 which was classified as Asia1/Shamir (WRL, Pirbright Institute, data not published). Hence, this antigenic characterization would be useful and need to regularly investigate parallel with genomic characterization to ensure that virus vaccine strain has shared antigenic similarly with field virus. In conclusion, a genetic variation study provides an important molecular epidemiological information of FMD causing outbreak in SEA region in the past 8 years, this information would be help in disease control measure, strategic planning and enhancing the effectiveness of FMD control and eradication programme to meet the achieve FMD freedom with vaccination by 2020 and maintain freedom in free countries and zones.

Acknowledgements

The authors wish to thank Miss. Janya Samanit, Mrs. Rattanee Thangtha and other RRL staff for their help and participation in the successful implementation of this study. We wish to thank all Head of FMD National Laboratories in Cambodia, Lao PDR, Myanmar and Vietnam for their kind cooperation in submission samples to the Reference Laboratory for diagnosis and strain chsaracterisation.

References

Abdul-Hamid, N. F., Hussein, N. M., Wadworth, J., Radford, A. D., Knowles, N. J. and King, D. P. 2011. Phylogeography of foot and mouth disease virus type O and A in Malaysia and surrounding countries. Infect. Genet. Evol. 11(2): 320-328.

Doughty, W. J., Runt, R. A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L. J. and Kongthon, A. 1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 14(3): 547-555.

Gleeson, L. J. 2002. A review of the status of foot and mouth disease in Southeast Asia and approaches to control and eradication. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 21(3): 465-475.

Huang, C. C., Lin, Y. L., Huang, T. S., Tu, W. J., Lee, S. H., Jong, M. H. and Lin, S. Y. 2001. Molecular characterization of foot and mouth disease virus isolated from ruminants in Taiwan in 1999-2000. Vet. Micro. 81: 193-205.

Khounsy, S., Conlan, J. V., Gleeson, L. J., Westbury, H. A., Colling, A., Paton, D. J. and Knowles, N. J., Ferris, N. P., Blacksell, S. D. 2008. Foot and Mouth disease in Lao People's Democratic Republic.: A review of recent outbreak and lessons from control programme. Rev. Sci. Tech. Off. Epiz. 27(3): 839-849.

Knowles, N. J. and Samuel, A. R. 1994. Polymerase chain reaction amplification and cycle sequencing of the 1D (VP1) gene of foot and mouth disease viruses. In: Report of the Session of Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease. Vienna, Austria. 19-22 Sep. 45-53.

Knowles, N. J. and Samuel, A. R. 2003. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus. Virus Res. 91(1): 65-80.

Knowles, N. J., Samuel, A. R., Davies, P. R., Midgley, R. J. and Valarcher, J. F. 2005. Evolution and spread of a pandemic strain of foot and mouth disease virus type O. Emerg. Infect. Dis. 55: 5-13.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA 3. Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment, Breif Bioinfom. 5(2): 150-163.

Linchongsubongkoch, W. 2003. Recent FMD characteristic in Thailand. Proceeding of the 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. pp. 9-15.

Linchongsubongkoch, W., Aunpomma, D. and Thongtha, P. 2004. The use of various non structural ptotein kits to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 55(2): 21-29.

Linchongsubongkoch, W., Janikit, T., Rumlumdoan, S. and Phusirimongkol, A. 2000. The use of molecular biological techniques for the diagnosis and epidemiological study of foot and mouth disease in Thailand. Proceedings of a final Research Co-ordination meeting. IAEA TECDOC-1150. pp. 113-118.

Linchongsubongkoch, W., Udon, R. and Samanit, J. 2008. Antigenic evolution of foot and mouth disease virus strains in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 59: 80-89.

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. 1978. The selection of vaccine strains of foot and mouth disease virus. Br. Vet. J. 134: 63-67.

Thongtha, P. and Linchongsubongkoch, W. 2006. Molecular epidemiology analysis of foot and mouth disease virus type A field outbreak in Thailand during 2004-2005. Thai NIAH eJournal. (May-August 2006): 44-54.

Valarcher, J. F., Knowles, N. J., Zakharov, V., Sherbakov, A., Zhang, Z., Shang, Y. J., Liu, X. T., Sanyal, A., Hemadri, D., Tosh, C., Rasool,T. J., Rodriguez, L., Beckham, T. R., Linchongsubongkoch, W., Ferris, N. P., Roeder, P. L. and Paton, D. J. 2009. Multiple origins of a foot and mouth disease virus serotype Asia1 outbreak, 2003-2007. Emerg. Infect. Dis. 15: 1046-1051.

Table 1. List of Oligonucleotide primers and product bands for RT-PCR and sequencing.

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

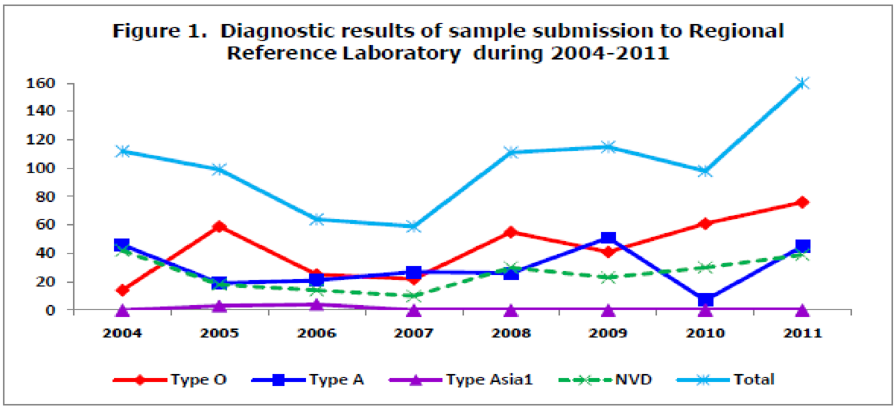


Figure 1. Diagnostic results of sample submission to Regional Reference Laboratory during 2004-2011.

Table 2. Summary of FMDV isolate viruses used for sequencing analysis during 2004-2011.

Year	Serotype	Topotype	Country				
			Thailand	Cambodia	Lao PDR	Myanmar	Vietnam
2004	O	SEA- Mya98	2	-	-	5	-
		ME-SA		1	-	-	-
	A		9	-	-	-	-
2005	O	SEA- Mya98	-	-	-	1	4
		ME-SA	-	-	-	-	3
		Cathay	5	-	-	-	3
	A	Asia	5	-	-	-	-
	Asia1	Gr. IV	-	-	-	1	-
2006	O	SEA	3	-	-	3	4
		ME-SA	-	2	3	1	-
		Cathay	-	-	-	-	1
	A	Asia	28				
	Asia1	Gr. IV	-	-	-	-	4
2007	O	SEA	11	-	9	1	-
	A	Asia	7		16		-
2008	O	SEA	9	-	5	2	-
	A	Asia	19	1	-	-	17
2009	O	SEA	23	-	1	1	-
	A	Asia	5				15
2010	O	SEA	2	-	2	-	5
	A	Asia	10	-	-	-	-
2011	O	SEA	3	-	-	-	-
	A	Asia	37	-	-	-	-
Total = 289			178	4	36	15	56

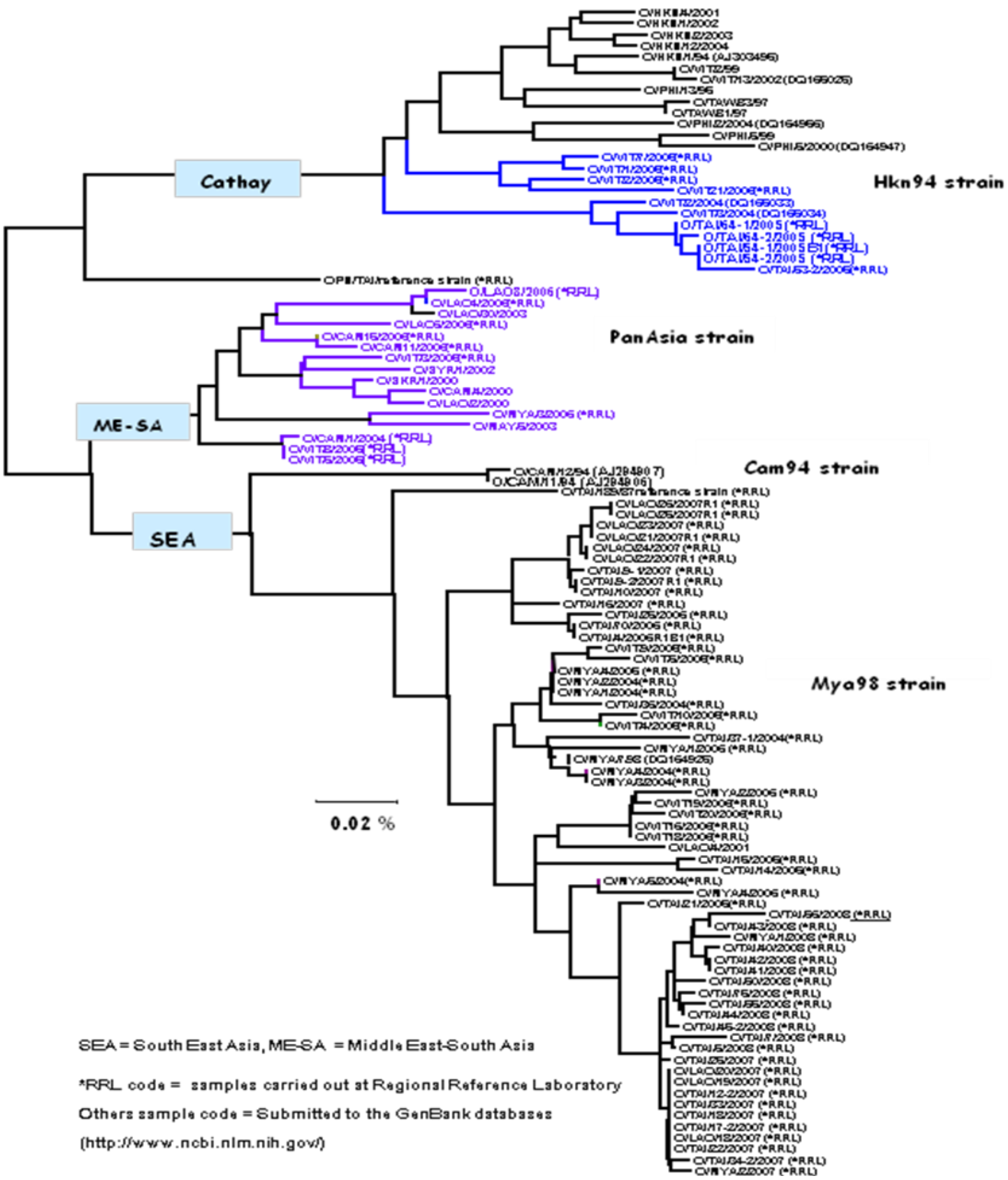


Figure 2. Phylogenetic tree showing serotype O, sample from Thailand, Cambodia, Lao PDR, Myanmar and Vietnam during 2004-2008. Phylogenetic tree was clustered into three topotype of SEA/Mya-98 strain, Pan-Asia strain and Cathay/Hkn-94 strain.

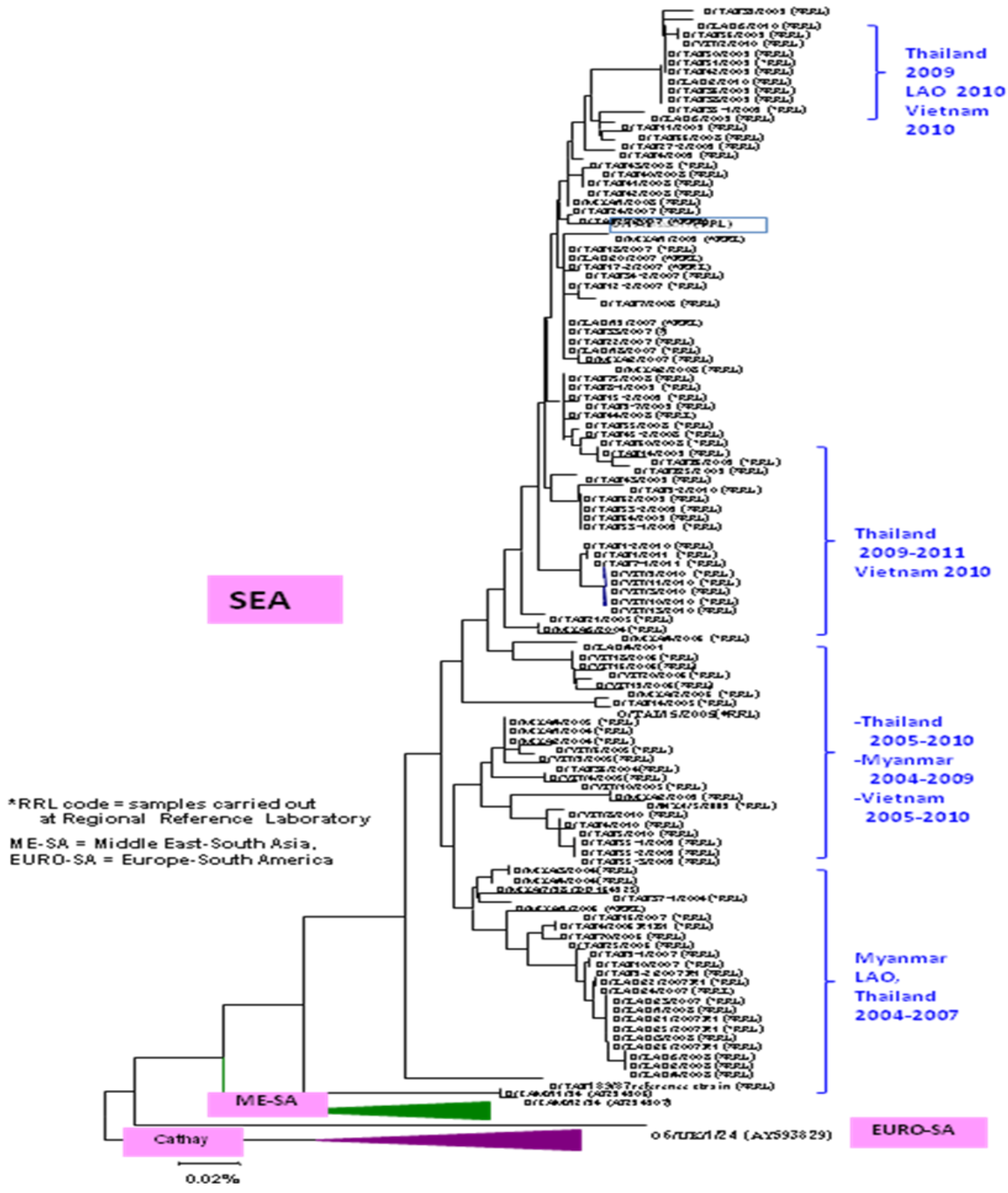


Figure 3. Phylogenetic tree showing serotype O sample from Thailand, Lao PDR and Vietnam during 2009-2011. Phylogenetic tree was clustered into one topotype of SEA/Mya-98 strain.

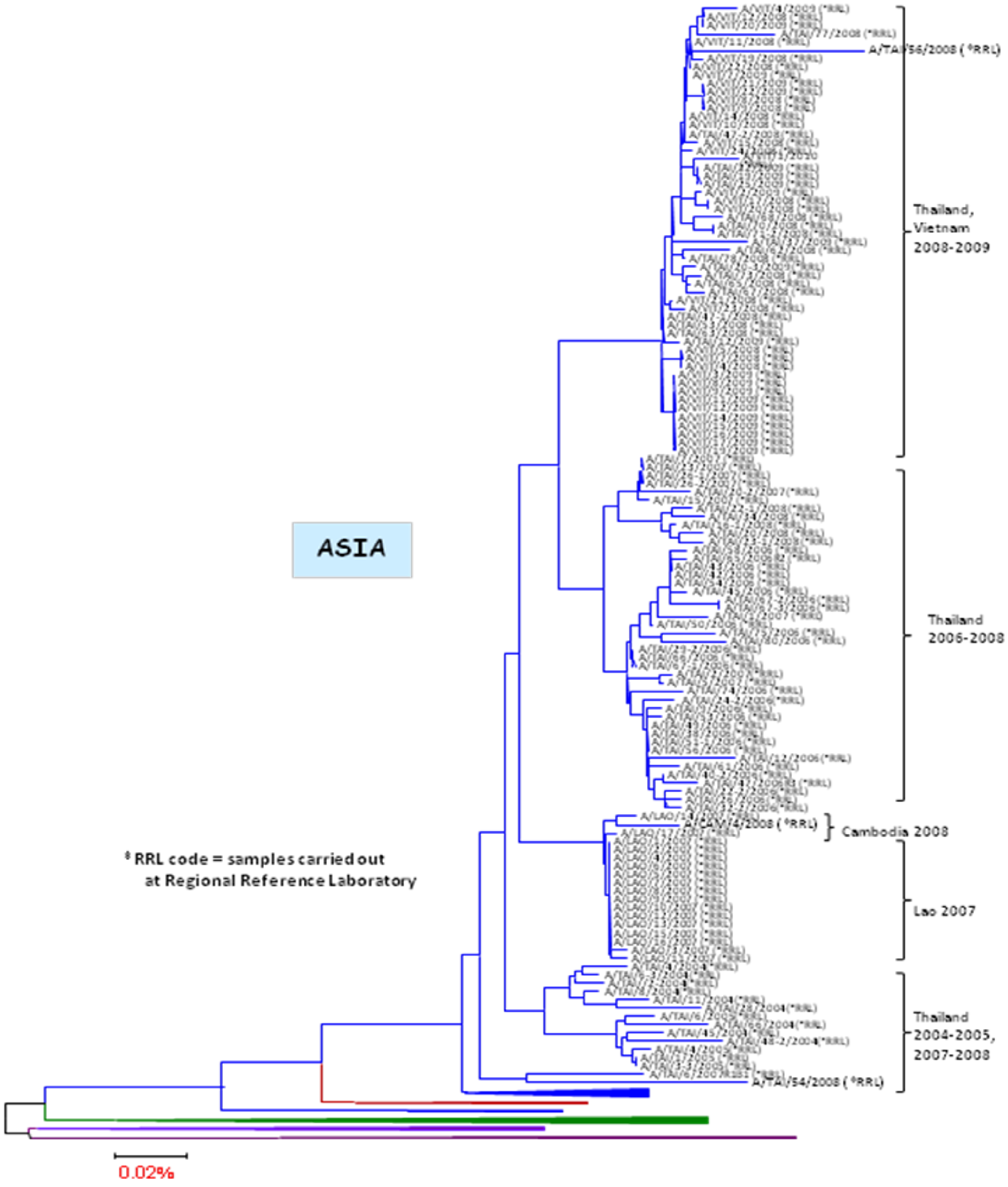


Figure 4. Phylogenetic tree showing serotype A, sample from Thailand, Cambodia, Lao PDR and Vietnam during 2004-2009. Phylogenetic tree was clustered into one topotype of ASIA/Sea-97 strain.

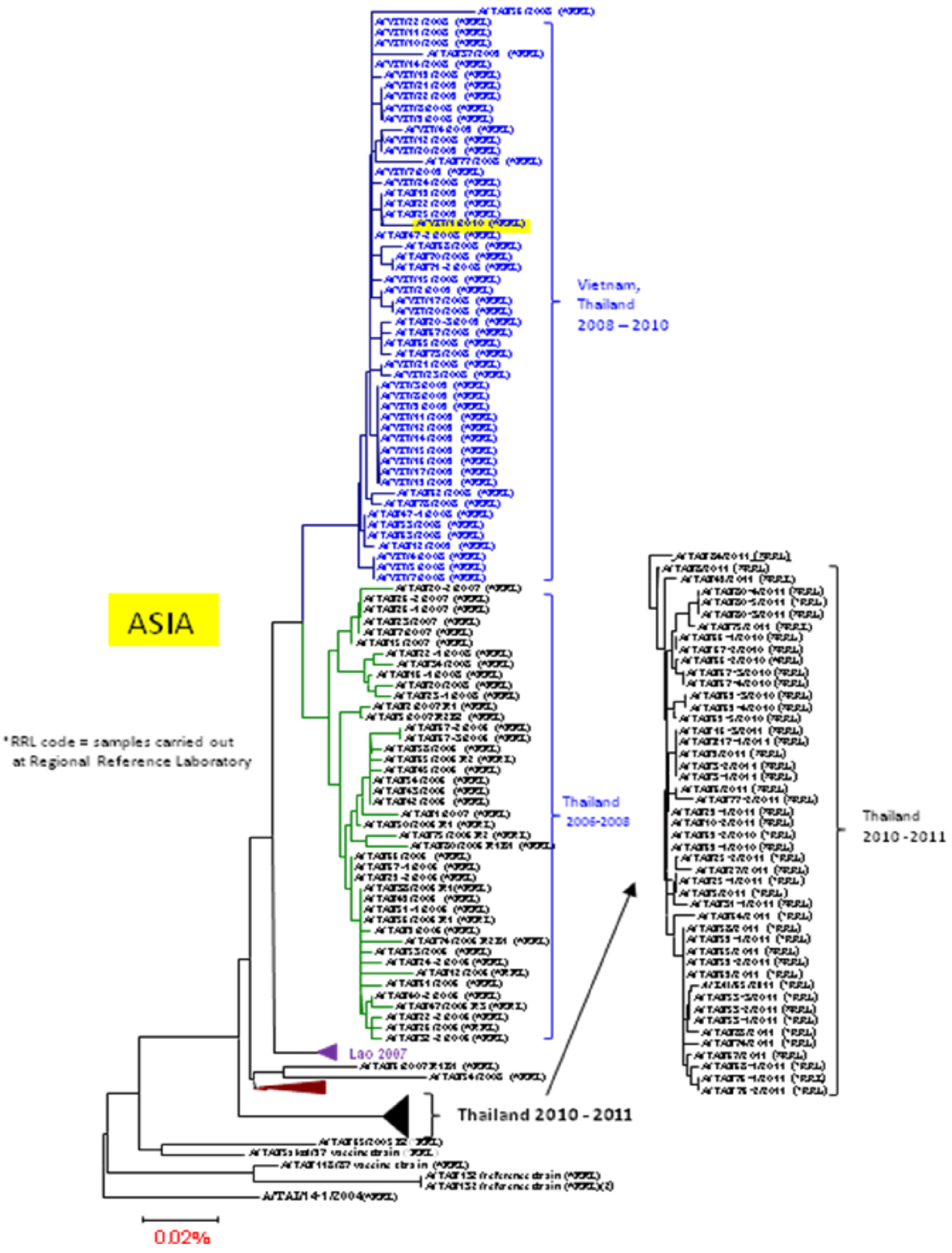


Figure 5. Phylogenetic tree showing serotype A, sample from Thailand and Vietnam during 2010-2011. Phylogenetic tree was clustered into one topotype of ASIA/Sea-97 strain.

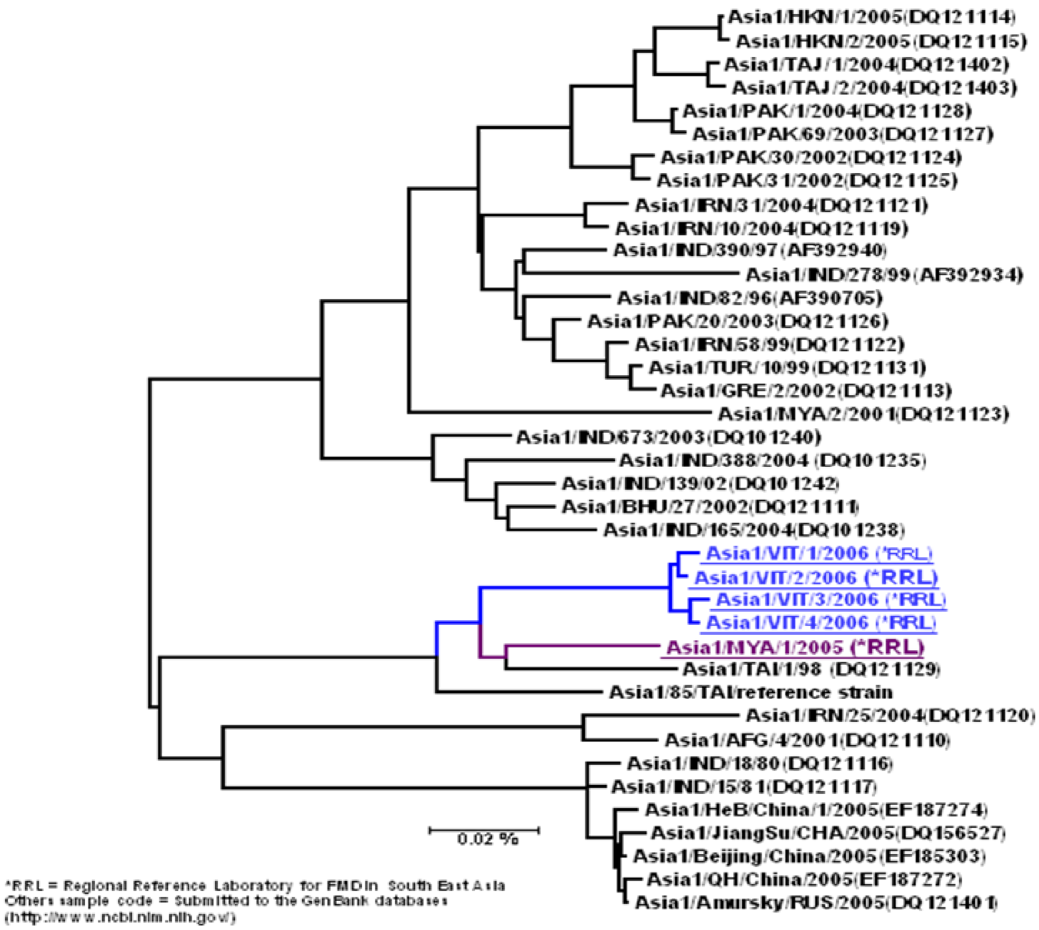


Figure 6. Phylogenetic tree showing serotype Asia1, sample from Myanmar and Vietnam in 2005 and 2006. Phylogenetic tree was clustered into one topotype of ASIA/Group IV

Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus in Southeast Asia during 2004-2011

Wilai Linchongsubongkoch[1] Ronello Abila[2] Panithan Thongtha[3]

Abstract

The molecular epidemiology of foot and mouth disease viruses (FMDV) causing field outbreaks in Southeast Asia (SEA) were investigated by nucleotide sequencing of the VP1 encoding region in order to determine the extent of genetic variation of viruses in the region. During the past 8 year (2004-2011), totally 289 samples of filed isolates encompassing virus types O, A and Asia1 from Thailand, Cambodia, Lao PDR, Myanmar and Vietnam have been studied. Phylogenetic analysis demonstrated that type O field isolates which caused outbreaks in 2004 was SEA/Mya-98 strain and the PanAsia, while the viruses causing outbreaks in 2005-2006 was grouped into three topotypes, SEA/Mya-98, PanAsia and Cathay. During 2007-2009 only one topotype of SEA/Mya-98 was found, as well as the PanAsia and SEA/Mya-98 was found again in 2010-2011. Serotype A field isolates in Thailand, Cambodia, Lao PDR and Vietnam clustered as only one topotype of Asia/Sea-97. Furthermore, type Asia1 field isolate from Myanmar in 2005 and Vietnam in 2006 were defined as SEA/group IV. In conclusion, the field outbreak viruses indicated that no significant genomic variation has occurred in type A and Asia1. Whereas genomic variation of type O was found as Cathay topotype in Thailand and Vietnam in 2005. However, PanAsia and SEA/Mya-98 from Vietnam were found in 2010 and Thailand in 2010-2011. This molecular epidemiological investigation provides an useful information for tracing the origin and pattern of viruses causing outbreaks in the field. In addition, this study could be used to support the epidemiological information of recent field outbreak in helping the recommendation of using an appropriate vaccine for the control and prevention and also to enhance the efficacy of the strategic planning for FMD control and eradication in SEA region.

Keywords: FMDV, phylogenetic tree, Southeast Asia

[1] FMD Expert and Consultant of Department of Livestock Development, National Institute of Animal Health, Bangkok.

[2] OIE Sub Regional Representation for Southeast Asia, Department of Livestock Development, Bangkok.

[3] Bureau of Veterinary Biologics, Department of Livestock Development, Pakchong, Nakhonratchasima.

การประเมินคุณภาพตัวอย่างต่อผลการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการ

วิไล ลินจงสุบงกช[1] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[2] อมรรัตน์ ชุณศาสตร์[2]
สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ[2] อรงกรณ์ พันธุมาตร[2] จรรยา สมานิตย์[2] ชาลีนี ดีแปลง[2]

บทคัดย่อ

ศึกษาการประเมินคุณภาพตัวอย่างที่เก็บจากสัตว์ป่วยในพื้นที่มีผลต่อการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี Initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจในช่วงปี 2006-2008 และช่วงปี 2013-2016 รวมทั้งสิ้น 1,104 ตัวอย่าง การประเมินและวิเคราะห์ผลโดยแบ่งกลุ่มคุณภาพตัวอย่างเป็น 3 ระดับ คือ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ผลสรุปโดยภาพรวมพบว่าคุณภาพตัวอย่างระดับ Good ให้ผลบวกเฉลี่ยโดยวิธี initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR เท่ากับ 61.75%, 94.7% และ 97.1% ตามลำดับ คุณภาพตัวอย่างระดับ Fair ให้ผลบวกเฉลี่ยด้วยการทดสอบทั้ง 3 วิธีเท่ากับ 47%, 73.5% และ90.9% ตามลำดับ คุณภาพตัวอย่างระดับ Poor ให้ผลบวกเฉลี่ยด้วยการทดสอบทั้ง 3 วิธี เท่ากับ 24.3%, 53.3% และ 74.8% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีคุณภาพระดับ Good คือเก็บเนื้อเยื่อขนาดมากกว่า 1 กรัม จะส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคได้ผลสูงกว่าตัวอย่างที่มีคุณภาพระดับ Fair คือขนาดเนื้อเยื่อ 0.4-1.0 กรัม ในทางตรงกันข้ามคุณภาพตัวอย่างระดับ Poor คือขนาดเนื้อเยื่อน้อยกว่า 0.4 กรัม จะมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยทำให้ได้ผลค่อนข้างต่ำ จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์ด้วย virus isolation ซึ่งต้องใช้เวลานาน ส่งผลกระทบต่อการควบคุมโรคและการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมซึ่งต้องกับชนิดไวรัสที่ระบาดในพื้นที่นั้นๆ แสดงว่าคุณภาพตัวอย่างมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยโดยตรง การศึกษาครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์ต่อเจ้าหน้าที่ในพื้นที่และหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ ทำให้ได้ข้อมูลวิทยาศาสตร์และองค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ประกอบการวางแผนการเก็บตัวอย่างในพื้นที่และจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและปลอดภัยตามหลัก biosafety and biosecurity เพื่อป้องกันการรั่วไหลและแพร่กระจายไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: คุณภาพตัวอย่าง โรคปากและเท้าเปื่อย ELISA typing virus isolation RT-PCR

[1] ผู้เชี่ยวชาญ OIE และที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ
[2] ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อง่ายและรวดเร็วในสัตว์กีบคู่ ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกรและสัตว์ป่าบางชนิด เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์อย่างมหาศาล สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Aphthovirus มีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ โอ (O) เอ (A) ซี (C) เอเชียวัน (Asia1) แซทวัน (SAT1) แซททู (SAT2) และแซททรี (SAT3) ประเทศไทยพบระบาดในปัจจุบันมี 2 ชนิดคือ โอและเอ ไวรัสแต่ละชนิดไม่ทำให้เกิดความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน (cross immunity) สัตว์ป่วยจะมีอาการซึม มีไข้ ในรายที่เป็นอย่างเฉียบพลันอาจมีไข้สูง เบื่ออาหาร มีน้ำลายไหล เกิดเม็ดตุ่มใสบนเยื่อลิ้นและภายในช่องปาก กระพุ้งแก้มและอุ้งเท้า หลังเกิดตุ่มใสภายใน 24 ชั่วโมง เม็ดตุ่มจะแตกและเกิดการลอกของเนื้อเยื่อที่ลิ้นและเยื่อบุภายในช่องปาก หลังจากนั้น 2-5 วันเชื้อไวรัสจะแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย จะพบตุ่มใสและแผลบริเวณอุ้งเท้าและไรกีบ ระยะนี้สัตว์จะเริ่มเดินขากระเผลก (วิไล ลินจงสุบงกช, 2551) ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบรอยโรคที่บริเวณเต้านมและหัวนม ในโคนมจะหยุดการสร้างน้ำนม (Burrows *et al.*, 1981) ส่วนในสุกรนอกจากพบตุ่มใสในบริเวณเยื่อลิ้น ไรกีบหรือรอบบริเวณ coronary band แล้ว ยังอาจพบรอยโรคบริเวณเหนือจมูก หรือ snout (Terpstra, 1972) อัตราการเกิดโรคสูงในสัตว์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อ แต่อัตราการตายจะต่ำ พบว่าสัตว์อายุน้อยจะมีอัตราการตายสูง ในรายที่ตายอย่างเฉียบพลันจะพบกล้ามเนื้อหัวใจเกิด necrosis จะเห็นลักษณะเป็นลายสีขาวบนกล้ามเนื้อหัวใจเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า tiger heart (Alexandersen *et al.*, 2003) ในแพะและแกะจะไม่แสดงอาการให้เห็นรอยโรคอย่างชัดเจน แต่อาจพบตุ่มแผลภายในลิ้นหรือบริเวณภายในช่องปากและที่อุ้งกีบแต่ไม่รุนแรง การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยโดยสังเกตจากอาการอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ เพราะไม่สามารถบ่งบอกหรือจำแนกชนิดไวรัสได้ จำเป็นต้องตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ ปัจจุบันการตรวจหาไวรัสและจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) การเพิ่มปริมาณไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isplation) และการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR (Callahan *et al.*, 2002) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein (Mackay *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบที่ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง ดังนั้นการเก็บตัวอย่างที่ดีและมีคุณภาพ ได้แก่ การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือตุ่มน้ำใส (vesicular fluid) ในตำแหน่งหรือบริเวณรอยโรคที่มีไวรัสอยู่และเก็บในช่วงที่สัตว์เริ่มแสดงอาการใหม่ๆ เริ่มมีตุ่มใสหรือแผลที่ลิ้น (fresh lesion) รวมถึงการบรรจุหีบห่อเพื่อจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการอย่างปลอดภัยตามหลัก biosafety and biosecurity ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วในการตอบผล บางครั้งการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยในพื้นที่พบว่าเก็บตัวอย่างจากรอยโรคได้ในปริมาณน้อยมากหรือการเก็บล่าช้า เนื่องจากแผลหรือรอยโรคกำลังหายสนิท ส่งผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี ELISA typing ซึ่งอ่านผลเบื้องต้นโดยตรงไม่ได้ จำเป็นต้องเพิ่มวิธีการทดสอบโดยการผ่านเชื้อลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงหรือ virus isolation และตรวจยืนยันด้วย ELISA typing อีกครั้ง ซึ่งต้องใช้เวลานานมากขึ้นในการตอบผล ทำให้เกิดผลกระทบต่อประสิทธิภาพการควบคุมและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยในพื้นที่ นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย การบรรจุหีบห่อและการจัดส่งตัวอย่างยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่ ไม่ให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสในขณะเก็บตัวอย่างหรือสัมผัสสัตว์ป่วยและยังต้องคำนึงถึงมาตรการณ์การป้องกันไม่ให้เกิดโอกาสเสี่ยงต่อการรั่วไหล

ของไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมในขณะขนส่งหีบห่อตัวอย่างจากต้นทางไปสู่ปลายทางเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพตัวอย่างที่เก็บจากสัตว์ป่วย โดยแบ่งเป็นระดับต่างๆ ได้ 3 ระดับ ได้แก่ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และ ปริมาณน้อย (Poor) จะมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการมากน้อยเพียงใด

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเก็บตัวอย่างและจัดส่งตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อจัดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ตำแหน่งหรือบริเวณที่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อได้คือในโค-กระบือ ควรเก็บที่ ตุ่มใส (vesicle fluid) หรือแผลที่เยื่อลิ้น (tongue epithelium) เยื่อบุภายในช่องปาก แผลที่กีบและซอกกีบ ในสุกรบริเวณที่เก็บได้คือตุ่มใสหรือแผลที่ลิ้น แผลบริเวณดั้งจมูก (snout) บริเวณไรกีบ (coronary band) และซอกกีบ ตัวอย่างเหล่านี้ควรเก็บเนื้อเยื่อในลักษณะเป็นชิ้นปริมาณไม่ควรต่ำกว่า 1 กรัม ถ้าเห็นว่าเก็บเนื้อเยื่อจากตัวหนึ่งๆ ได้น้อยควรเก็บจากตัวอื่นเพิ่มด้วยและแยกขวดเป็นตัวๆไป เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในขวดที่มี 50% กลีเซอร์รีนบัพเฟอร์ (50% glycerine buffer) ใส่น้ำยาให้ท่วมเนื้อเยื่อให้มากที่สุด ปิดจุกให้แน่นและปิดทับด้วยเทปกันน้ำยารั่วไหล ทำเครื่องหมายขวดให้ชัดเจน ห่อทับด้วยกระดาษหลายๆ ชั้น ใส่ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันการรั่วไหลหรือแตกชำรุด จากนั้นนำใส่กระติกน้ำแข็ง รีบนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด กรณีที่ต้องนำส่งทางไปรษณีย์ให้ห่อทับด้วยกระดาษหลายๆ ชั้น เพื่อป้องกันการแตกและการรั่วไหลระหว่างการขนส่ง บรรจุลงกล่องหรือภาชนะที่แข็งแรงไม่แตกง่าย (Kitching and Donaldson, 1987) พร้อมบันทึกประวัติสัตว์ป่วยบรรจุลงในหีบห่อ หลังจากนั้นใช้น้ำยาฆ่าเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพ เช่น 0.25% speedyne หรือ 0.5% glutaraldehyde (พยนต์ และคณะ, 2543) เช็ดบริเวณรอบๆกล่องหรือหีบห่อเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสี่ยงในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมขณะขนส่ง ดังแสดงในรูปที่ 1

การแบ่งระดับคุณภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อ

การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย ที่จัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บจากรอยโรคบริเวณเยื่อลิ้น ไรกีบและอุ้งกีบ ในบางครั้งพบว่าตัวอย่างที่ส่งจากต่างประเทศจะส่งในรูปน้ำสกัดจากเนื้อเยื่อ (tissue extraction fluid) หรือน้ำยาไวรัส (virus isolation fluid) เป็นต้น ส่วนตัวอย่างจากประเทศไทยที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดเป็นตัวอย่างจากเนื้อเยื่อทั้งสิ้น ในการศึกษาครั้งนี้ทำการแบ่งลักษณะคุณภาพตัวอย่างได้เป็น 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2

การตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะทำการชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อก่อนเพื่อแยกสกัดไวรัสออกจากเนื้อเยื่อและเตรียมเป็นสารละลายแขวนลอย 10% suspension โดยใช้ 0.04 M Phospate buffer saline (PBS) จากนั้นแบ่งตัวอย่างสารละลายเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 นำตัวอย่างสารละลายไปตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Initial ELISA typing ตามวิธีการของ Roeder and Le Blanc Smith (1987)

ส่วนที่ 2 นำตัวอย่างสารละลายไปเพิ่มปริมาณไวรัสโดยผ่านบนเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธี virus isolation (House and Yedloutschnig, 1982) และทำการตรวจยืนยันอีกครั้งด้วยวิธี ELISA typing

ส่วนที่ 3 นำตัวอย่างสารละลาย ไปตรวจหาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในส่วนของ 3D gene ด้วยวิธี real time RT-PCR ตามวิธีการของ Callahan *et al.* (2002)

การประเมินคุณภาพตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมตัวอย่างเนื้อเยื่อและน้ำยาไวรัส ที่ส่งจากต่างประเทศ และประเทศไทย ไปยังห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้หลังผ่านการตรวจจำแนกชนิดไวรัสเบื้องต้น (initial ELISA typing) และเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) และ RT-PCR เป็นที่เรียบร้อยแล้ว นำข้อมูลทั้งหมดทำการประมวลผลและวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละของผลบวก (% positive) ของการทดสอบด้วย 3 วิธี ดังกล่าว นำมาเปรียบเทียบกับคุณภาพตัวอย่างที่ระดับต่างๆ ได้แก่ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการรวบรวมตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 1,104 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นกลุ่มระดับ good = 434 ตัวอย่างหรือ 39.3% ระดับ Fair = 438 ตัวอย่าง หรือ 39.7% และระดับ Poor = 232 ตัวอย่าง หรือ 21%รายละเอียดตัวอย่างที่นำมาศึกษามีดังนี้

- ตัวอย่างจากประเทศไทยและต่างประเทศ ได้แก่ ประเทศกัมพูชา ลาว พม่า และเวียดนาม ช่วงระหว่างปี 2006-2008 ซึ่งเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อและน้ำยาไวรัส จำนวน 183 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากประเทศไทย ช่วงปี 2013-2016 จำนวน 921 ตัวอย่าง

ผล

การประเมินคุณภาพตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ทั้งในและต่างประเทศ และจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อจุดประสงค์ในการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัส ด้วยวิธี Initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บจากรอยโรคสัตว์ป่วย มีส่วนน้อยมากที่เป็นตัวอย่างในลักษณะของเหลว คือ น้ำสกัดจากเนื้อเยื่อหรือน้ำยาไวรัส ทำการวิเคราะห์หา % positive ของทั้ง 3 วิธี เมื่อเทียบคุณภาพตัวอย่างที่ระดับปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ดังแสดงในรูปที่ 3-8 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์

การประเมินคุณภาพตัวอย่างที่เก็บจากรอยโรคสัตว์ป่วยในพื้นที่ด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อส่งตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ โดยวิธี Initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจในช่วงปี 2006-2008 และช่วงปี 2013-2016 รวมทั้งสิ้น 1,104 ตัวอย่าง การประเมินและวิเคราะห์ผลโดยแบ่งกลุ่มคุณภาพตัวอย่างเป็น 3 ระดับ คือ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2 สรุปผลได้ดังนี้ ตัวอย่างในช่วงปี 2006-2008 เป็นตัวอย่างจากต่างประเทศและประเทศไทย พบว่าตัวอย่างจากต่างประเทศในกลุ่มคุณภาพระดับ good, fair และ poor ให้ผลบวกโดย initial ELISA typing เท่ากับ 87.5%, 78.57%, 64.7% และ virus isolation เท่ากับ 75%, 75.5%, 76.5% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างจากประเทศไทยให้ผลบวกต่อทั้ง 3 ระดับโดย initial ELISA typing เท่ากับ 75%, 67.4%, 44.44% และ virus isolation เท่ากับ 80%, 70%, 55.56% ตามลำดับ (รูปที่ 3) ในช่วงนี้ไม่มีการนำวิธี RT-PCR มาทดสอบ

ตัวอย่างดังกล่าว เนื่องจากอยู่ในขั้นตอนการทดลองวิจัยและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

ในช่วงปี 2013-2016 จะเป็นการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ป่วยที่เก็บจากพื้นที่ในประเทศไทยทั้งหมด ให้ผลดังนี้ ตัวอย่างในปี 2013 ให้ผลบวกต่อคุณภาพตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ โดย initial ELISA typing เท่ากับ 55.3%, 47.4%, 5.3% virus isolation เท่ากับ 89.5%, 82.2%, 26.7% และ RT-PCR เท่ากับ 97.4%, 94.7%, 83.3% ตามลำดับ (รูปที่ 4)

ตัวอย่างในปี 2014 ให้ผลบวกต่อคุณภาพตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ โดย initial ELISA typing เท่ากับ 46.8%, 36.8%, 17.8% virus isolation เท่ากับ 82.3%, 78.9%, 64.4% และ RT-PCR เท่ากับ 96.8%, 93.4%, 84.4% ตามลำดับ (รูปที่ 5)

ตัวอย่างในปี 2015 ให้ผลบวกต่อคุณภาพตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ โดย initial ELISA typing เท่ากับ 51.1%, 26.5%, 5.6% virus isolation เท่ากับ 85.4%, 66.7%, 46.3% และ RT-PCR เท่ากับ 95.6%, 86.3%, 61.1% ตามลำดับ (รูปที่ 6)

ตัวอย่างในปี 2016 ให้ผลบวกต่อคุณภาพตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ โดย initial ELISA typing เท่ากับ 54.8%, 25.3%, 7.7% virus isolation เท่ากับ 97%, 67.4%, 50% และ RT-PCR เท่ากับ 98.5%, 89.5%, 70.5% ตามลำดับ (รูปที่ 7)

สรุปโดยภาพรวมเมื่อนำผลการศึกษาคุณภาพตัวอย่างทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย พบว่าค่าเฉลี่ยของผลบวกต่อคุณภาพตัวอย่างระดับ Good, Fair และ Poor ในช่วงปี 2006-2008 และ 2013-2016 ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 8 ดังนี้ คุณภาพตัวอย่างระดับ Good ให้ผลบวกเฉลี่ยโดย initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR เท่ากับ 61.75%, 84.7% และ 97.1% หรือ 61-97% ตามลำดับ คุณภาพตัวอย่างระดับ Fair ให้ผลบวกเฉลี่ยด้วยการทดสอบทั้ง 3 วิธีเท่ากับ 47%, 73.5% และ 90.9% หรือ 47-91% ตามลำดับ คุณภาพตัวอย่างระดับ Poor ให้ผลบวกเฉลี่ยด้วยการทดสอบทั้ง 3 วิธี เท่ากับ 24.3%, 53.3% และ 74.8% หรือ 24-75% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่ากรณีการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีคุณภาพและมีปริมาณมาก (Good) คือเก็บเนื้อเยื่อมีขนาดมากกว่า 1 กรัม จะส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคได้ผลสูงกว่าตัวอย่างที่มีคุณภาพระดับปานกลาง (Fair) คือขนาดเนื้อเยื่อ 0.4-1.0 กรัม ในทางตรงกันข้ามคุณภาพตัวอย่างระดับปริมาณน้อย (Poor) คือขนาดเนื้อเยื่อน้อยกว่า 0.4 กรัม จะมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยทำให้ได้ผลค่อนข้างต่ำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าคุณภาพตัวอย่างมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยโดยตรงโดยเฉพาะวิธี initial ELISA typing ซึ่งปกติจะใช้เวลาในการทดสอบและอ่านผลได้ภายใน 6 ชั่วโมงเท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) และตรวจยืนยันอีกครั้งด้วย ELISA typing ซึ่งวิธีนี้อาจต้องใช้เวลานานถึง 1-2 สัปดาห์ ทำให้การรายงานผลการทดสอบล่าช้า ส่งผลกระทบต่อการปฏิบัติงานในพื้นที่ทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคให้สงบได้อย่างรวดเร็ว ส่วนวิธีทดสอบ RT-PCR เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วแต่ไม่สามารถบ่งบอกหรือจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ วิธีนี้ใช้ประกอบการสนับสนุนการทดสอบเท่านั้น ในทางปฏิบัติจำเป็นต้องใช้วิธี ELISA typing เป็นหลักที่สามารถบ่งบอกและจำแนกชนิดไวรัสได้อย่างถูกต้องซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานหรือ gold standard (OIE, 2012) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคที่ให้ความไว ความถูกต้องและได้ผลรวดเร็ว เป็นสิ่งสำคัญต่อการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมและถูกต้องตรงกับชนิดไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ในขณะนั้น เพื่อให้การใช้วัคซีนสำหรับฉีดป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการวิเคราะห์และประเมินคุณภาพตัวอย่างต่อผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์ต่อเจ้าหน้าที่ในพื้นที่และหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ เพราะได้ข้อมูลวิทยาศาสตร์และ

องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ประกอบการวางแผนการเก็บตัวอย่าง การบรรจุหีบห่อ และการขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและปลอดภัยตามหลัก biosafety and biosecurity (วิไล ลินจงสุบงกช, 2557) หากมีการนำไปใช้ปฏิบัติในพื้นที่ได้จะสามารถช่วยแก้ปัญหาการเก็บตัวอย่างที่ไม่มีคุณภาพหรือล่าช้า และยังได้รับความรู้เกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องและปลอดภัย เพื่อป้องกันการรั่วไหลและแพร่กระจายไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาและประเมินคุณภาพตัวอย่างครั้งนี้มีข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากรอยโรคสัตวป่วยหรือสงสัยว่าป่วยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย คือ ควรเก็บตัวอย่างในลักษณะเพิ่งเริ่มแสดงอาการป่วยใหม่ๆ ในขณะมีตุ่มใสหรือแผลที่เยื่อลิ้นระยะนี้จะพบปริมาณไวรัสจำนวนมากหรือคุณภาพระดับ Good ซึ่งจะได้ผลการทดสอบตั้งแต่ 62- 97% positive (ตารางที่ 2 และรูปที่ 8) หากรอให้สัตว์เดินขากระเผลก อาจจะล่าช้าไป การเก็บเนื้อเยื่อจากอุ้งกีบค่อนข้างยาก ได้ปริมาณน้อย (คุณภาพระดับ Poor) และมีปริมาณไวรัสน้อย ย่อมส่งผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยได้ คือได้ผลเพียง 24-75% positive เท่านั้น จำเป็นต้องเพิ่มวิธีการทดสอบด้วยวิธี virus isolation จะใช้เวลานานถึง 1-2 สัปดาห์ อีกประการหนึ่งที่ควรพึงระวังคือการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาแผลที่รอยโรคด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน หรือน้ำยาเจนเชี่ยน ไวโอเล็ต ก่อนการเก็บตัวอย่างนั้น วิธีนี้จะมีผลกระทบต่อการตรวจวินิจฉัยโรคโดยตรง เนื่องจากน้ำยาดังกล่าวจะไปฆ่าหรือทำลายไวรัส (live virus) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเหล่านั้นทำให้มีปริมาณ live virus หลงเหลืออยู่น้อยมาก ส่งผลโดยตรงต่อการทำ virus isolation และกระทบต่อการทดสอบอาจไม่ได้ผลหรือต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบนานกว่าปกติ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาการประเมินขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการจัดเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ มีเดียมและวัสดุอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่าง ขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการ National FMD Laboratory จากประเทศกัมพูชา ลาว พม่า และเวียดนามในการให้ความร่วมมือจัดส่งตัวอย่างน้ำยาไวรัสไปยังศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยในช่วงทำการศึกษา ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และเจ้าหน้าที่หน่วยเซลล์จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ในการสนับสนุน primary lamb kidney cell สำหรับงาน virus isolation ทำให้การดำเนินงานศึกษาครั้งนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

พยนต์ สินสุวงค์วัฒน์ วิไล ลินจงสุบงกช ธนรัตน์ จานุกิจและสุนันท์ ร่มลำดวน 2543 ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆในการฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26: 85-93

วิไล ลินจงสุบงกช 2551 คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ หน้า 1-50

วิไล ลินจงสุบงกช 2557 การเก็บ การบรรจุหีบห่อและการจัดส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างปลอดภัยตามหลัก biosafety และ biosecurity วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 23(1-2): 29-36

Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. and Garland, M. 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot and mouth diease. J. Comp. Pathol. 129: 1-36.

Burrows, R., Mann, J. A., Garland, A. J. M., Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease virus in cattle. J. Comp. Patho. 91: 599-609.

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

House, J. A and Yedloutschnig, R. J. 1982. Sensitivity of seven different types of cell cultures to three serotypes of foot and mouth disease virus. Can. J. comp. Med. 46: 186-189.

Kitching, R. P. and Donaldson, A. I. 1987. Collection and transportation os specimens for vesicular virus investigation. Rev. sci. tech. off. Int. epiz. 6(1): 263-272.

Linchongsubongkoch, L. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference. pp. 62-72.

Mackey, D. K. J., Forsyth, M. A., Davies, P. R. and Salt, J. S. 1998. Antibody to the non structural protein of foot and mouth disease virus in vaccinated and animal exposed to infection. Vet. Q. 20: 9-11.

Roeder and Le Blanc Smith. 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.

Terpstra, C. 1972. Pathogenesis of foot and mouth disease in experimental pigs. Bull. Off. Int. Epizoot. 77(5): 859-874.

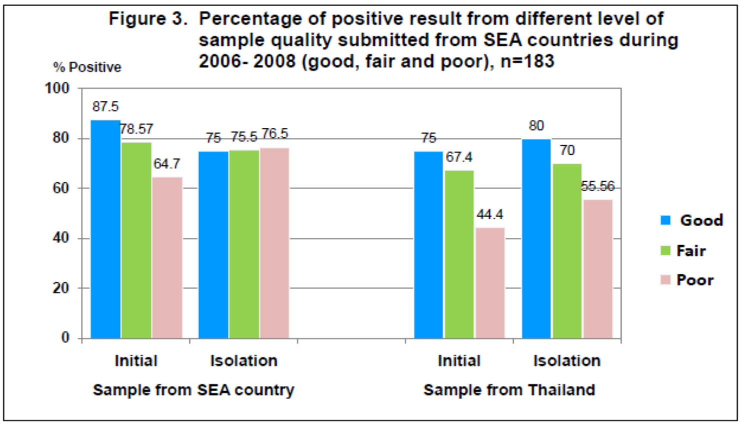
World Organisation for Animal Health (OIE). 2012. Foot and Mouth Disease. *In* Manaul of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE. Paris, France. pp. 145-153.

ตารางที่ 1 การแบ่งระดับคุณภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อ และน้ำยาไวรัส (virus isolation fluid) โดยแบ่งแยกเป็น 3 ระดับได้แก่ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor)

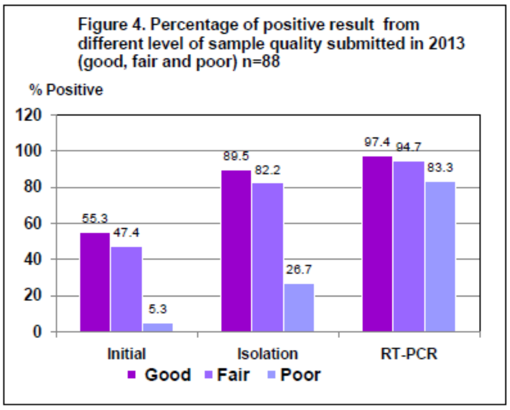
คุณภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อ			**คุณภาพตัวอย่างน้ำยาไวรัส**		
ปริมาณมาก (Good)	ปริมาณปานกลาง (Fair)	ปริมาณน้อย (Poor)	ปริมาณมาก (Good)	ปริมาณปานกลาง (Fair)	ปริมาณน้อย (Poor)
น้ำหนักเนื้อเยื่อมากกว่า 1 กรัม	น้ำหนักเนื้อเยื่อ 0.40-1 กรัม	น้ำหนักเนื้อเยื่อน้อยกว่า 0.40 กรัม	ปริมาตรน้ำยาไวรัสมากกว่า 1 ซีซี	ปริมาตรน้ำยาไวรัส 0.40-1 ซีซี	ปริมาตรน้ำยาไวรัสน้อยกว่า 0.40 ซีซี

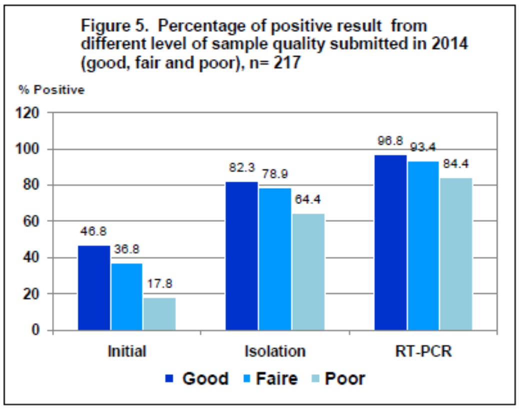
รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสัตว์ป่วยและภาชนะการบรรจุหีบห่อที่แข็งแรงสามารถป้องกันการแตกหรือการรั่วไหลขณะขนส่ง

รูปที่ 2 ภาพปริมาณตัวอย่างเนื้อเยื่อ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor)

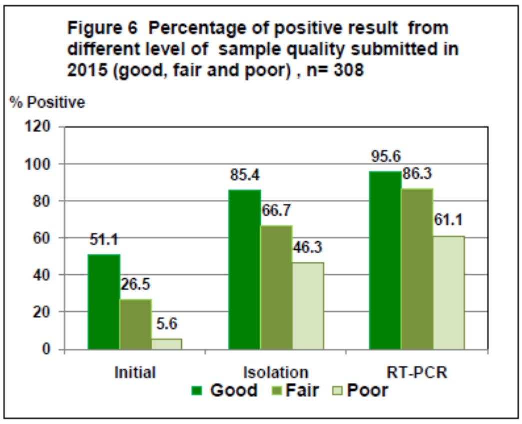


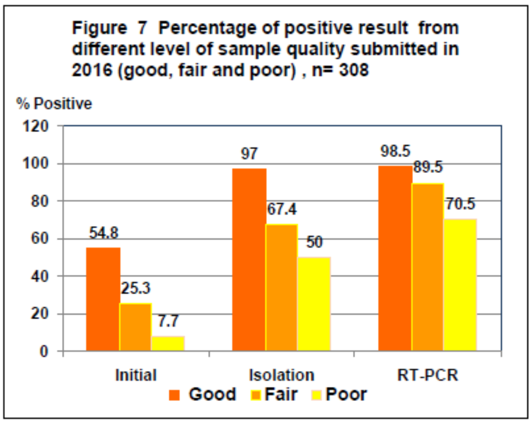
รูปที่ 3 ผลร้อยละของผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี Initial ELISA typing และ virus isolation ของตัวอย่างที่มีคุณภาพต่างๆกัน 3 ระดับ คือปริมาณมาก ปริมาณปานกลางและปริมาณน้อย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่จัดส่งจากประเทศไทยและต่างประเทศ (กัมพูชา ลาว พม่า และเวียดนาม) ช่วงระหว่างปี 2006-2008 (ตัวอย่างในช่วงนี้ไม่ได้ทำการทดสอบ RT-PCR)





รูปที่ 4 และ 5 ผลร้อยละของผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี Initial ELISA typing , virus isolation และ RT-PCR ของตัวอย่างที่มีคุณภาพต่างๆ กัน 3 ระดับ คือ ปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากประเทศไทย ช่วงปี 2013 และ 2014



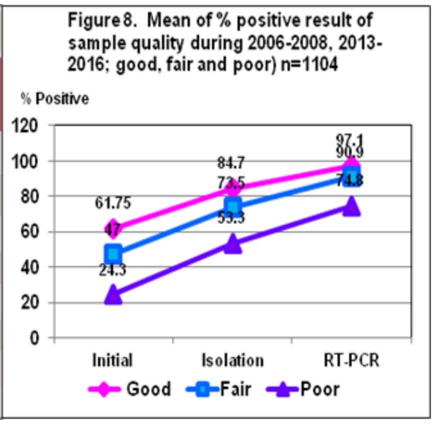


รูปที่ 6 และ 7 ผลร้อยละของผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี Initial ELISA typing , virus isolation และ RT-PCR ของตัวอย่างที่มีคุณภาพต่างๆ กัน 3 ระดับ คือปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากประเทศไทย ช่วงปี 2015 และ 2016

Table 2 . แสดงค่าเฉลี่ย % positive ต่อคุณภาพตัวอย่างระดับ Good, Fair และ Poor, n= 1104

Collecting year	Good quality (% positive)			Fair quality (% Positive)			Poor quality (% Positive)		
	Initial	VI	RT-PCR	Initial	VI	RT-PCR	Initial	VI	RT-PCR
2006-2008	81.3	77.5	ND	73	72.8	ND	54.6	66	ND
2013	55.3	89.5	97.4	47.4	82.2	94.7	5.3	26.7	83.3
2014	46.8	82.3	96.8	36.8	78.9	93.4	17.8	64.4	84.4
2015	51.1	85.4	95.6	26.5	66.7	86.3	5.6	46.3	61.1
2016	54.8	97	98.5	25.3	67.4	89.5	7.7	50	70.5
Mean	61.75	84.7	97.1	47	73.5	90.9	24.3	53.3	74.8

Initial = Initial typing , VI = Virus isolation



ตารางที่ 2 และรูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยร้อยละของผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี Initial ELISA typing, virus isolation และ RT-PCR ของตัวอย่างที่มีคุณภาพต่างๆกัน 3 ระดับ คือปริมาณมาก (Good) ปริมาณปานกลาง (Fair) และปริมาณน้อย (Poor) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่จัดส่งจากประเทศไทย ช่วงปี 2006-2008 และ 2013-2016

Evaluation of sample quality effecting to the foot and mouth disease laboratory diagnostic results

Wilai Linchongsubongkoch[1] Kingkarn Boonsuya Seeyo[2] Amornrat Choonnasard[2]
Sahawatchara Ungvanijban[2] Arongkorn Panthumart[2] Janya Samanit[2] Chalinee Deepang[2]

Abstract

Collection of field samples from infected animals effecting to the foot and mouth disease laboratory diagnotic results were studied and evaluated by initial ELISA typing, virus isolation and RT-PCR methods. Total 1,104 samples which colletected during the year 2006-2008 and 2013-2016 were used for this study. The samples were divided into 3 level of quality; good, fair and poor, all samples were diagnosed by those 3 methods. The results were demonstrated as percentage positive (% positive) in each quality level. In overall summary results found that the sample quality at good level gave the mean positive results by initial ELISA typing, virus isolation and RT-PCR were 61.75%, 84.7% and 97.1%, respectively. Sample quality at fair level gave the mean positive results by 3 methods were 47%, 73.5% and 90.9%, respectively. Sample quality at poor level gave the mean positive results by 3 methods were 24.3%, 53.3% and 74.8%, respectively. Interestingly, collecting of tissue samples in good quality and quantity, exproximately more that 1.0 gram would be enhanced the efficacy of diagnostic results than the sample quality at fair level (approximately, 0.4-1.0 gram). In contrast, sample quality at poor level (approximately less than 0.4 gram) would be effected to the diagnostic result in low % positive, hence it was nescessary to perform the virus isolation that would be delayed in reporting. In this study demostrated that poor quality of sample would be direct effected to the diagnostic result, disease control and vaccine selection which would be used the right serotype as current outbreak in the field. In conclusion, this evaluation study would be useful to the field veterinarians and the Department of Livestock Development Offices in supporting the scientific information and knowledge about the sample collection in good quality as well as the packing, shipping of sample to the laboratory under the biosafety and biosecurity principle in preventing the viral leaking or distributing to the environment.

Keywords: sample quality, foot and mouth disease, ELISA typing, virus isolation, RT-PCR

[1] OIE Expert and FMD consultant of Department of Livestock Development, National Institute of Animal Health, Bangkok

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

การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ

ดิถี ประเสริฐสุวรรณ[1] กังวาน จึงธีระพานิช[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงสำหรับใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ดจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดในเป็ดทดลองพันธุ์กากี-แคมป์เบล เก็บซีรัมในวันที่ 4 และ 5 มาเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ หาปริมาณไวรัสในเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 10 วัน และนำไวรัสในวันที่ให้ปริมาณไวรัสสูงสุดมาเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 2 ครั้ง เช่นเดียวกับ passage แรก แล้วนำไวรัสแต่ละ passage ในวันที่ได้ปริมาณไวรัสสูงสุดไปหาความรุนแรงในเป็ดทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสที่ได้ พบว่าไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน passage ที่ 1 และ 2 จะมีปริมาณไวรัสสูงสุดที่ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. ขณะที่ passage ที่ 3 อยู่ที่ $10^{4.71}$ $TCID_{50}$/มล. ในวันที่ 5-6 และความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลอง เท่ากับ $10^{5.17}$, $10^{5.80}$ และ $10^{4.50}$ LD_{50}/มล. ตามลำดับ สรุปได้ว่า ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เตรียมจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ passage ที่ 1-3 มีปริมาณไวรัสในเซลล์ ($TCID_{50}$) และมีความรุนแรง (LD_{50}) ในเป็ดทดลองใกล้เคียงกัน สามารถใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในการเตรียมเชื้อพิษทับได้

คำสำคัญ: ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรง เซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ ปริมาณไวรัส

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคกาฬโรคเป็ด (duck plague หรือ duck virus enteritis) เกิดจากเชื้อ Herpesvirus เป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันและสามารถติดต่อได้อย่างรวดเร็ว (Sandhu and Leibovitz, 1997) ทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกจำพวกเป็ดห่านและหงส์เมื่อเกิดการระบาดของโรคแล้วจะทำให้สัตว์มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงได้ถึง 100% (อุราศรี, 2542) ในฝูงเป็ดไข่ที่ติดเชื้อพบอัตราการผลิตไข่ลดลง 20-100% และการฟักไข่เป็นตัวอ่อนลดลง (Burgess and Yuill, 1981; Jansen, 1964) ดังนั้นการฉีดวัคซีนให้สัตว์จึงเป็นวิธีการสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Zander *et al.*, 1997)

ปัจจุบันการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเชื้อเป็นของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนตามมาตรฐาน ASEAN (1998) โดยฉีดวัคซีนในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลและหลังจากนั้น 14 วัน ทำการฉีดเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดปริมาณไวรัส 10^2 fifty percent lethal dose (LD_{50})/มล. ตัวละ 1 มล. โดยเป็ดทดลองที่ได้รับวัคซีนอย่างน้อย 90% ต้องไม่แสดงอาการป่วยหรือความผิดปกติที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดและเป็ดในกลุ่มควบคุมต้องตายภายใน 7 วัน จึงจะถือว่าวัคซีนผ่านการทดสอบ

การเตรียมเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทำโดยฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด สเตรนท้องถิ่นที่มีปริมาณไวรัส 10^3 LD_{50}/มล. ในเป็ดทดลองจำนวน 10 ตัวๆ ละ 1 มล.สังเกตอาการทุกวัน หลังการฉีดเชื้อ 4-5 วัน เก็บตับจากเป็ดที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน นำตับไปบดและทำเป็น 20% ในสารละลาย 0.85% NaCl แล้วทำการไตเตรทหาความรุนแรงของเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เตรียมได้ โดยทำ 10 fold dilution จาก 10^{-1}-10^{-9} นำเชื้อที่ความเจือจาง 10^{-5}-10^{-9} ฉีดในเป็ดทดลองความเจือจางละ 5 ตัวๆ ละ 1 มล.บันทึกการตายของเป็ดเป็นเวลา 7 วัน แล้วคำนวณค่า LD_{50} โดยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938) ซึ่งการหาความรุนแรงในเป็ดต้องทำอย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจึงต้องใช้เป็ดอย่างน้อย 60 ตัว ในการเตรียมไวรัสเชื้อพิษทับ 1 ครั้ง ตามวิธีของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และเชื้อที่เตรียมสามารถใช้ได้ประมาณ 1-2 ปี มีความรุนแรงมากกว่าหรือเท่ากับ 10^2 LD_{50}/มล. โดยไวรัสที่เตรียมได้ต้องปลอดจากการปนเปื้อนเชื้ออื่น จึงจะเก็บไว้ใช้งานได้ซึ่งการเตรียมเชื้อพิษทับไวรัสกาฬโรคเป็ดด้วยวิธีนี้ให้มีคุณภาพดีต้องคัดเลือกเป็ดที่มีสุขภาพดี ปลอดจากโรค เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในเชื้อพิษทับ และการเก็บตับจากเป็ดทดลองต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อีกทั้งต้องใช้เป็ดจำนวนมากในการหาความรุนแรงของเชื้อ

ไวรัสกาฬโรคเป็ดสามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์หลายชนิด เช่น เพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ (chicken embryo fibroblast; CEF) (จารุภา, 2559; ทวีศักดิ์, 2546; Kalaimathi, 1989; OIE, 2014; Sinthia*et al.*, 2017) เพาะเลี้ยงในเซลล์ตับของคัพภะเป็ด (Duck embryo liver cell; DEL) (Kalaimathi, 1989) หรือจากเซลล์คัพภะเป็ด (Duck embryo fibroblast; DEF) (ทวีศักดิ์, 2546) หรือในเซลล์ชนิดเลี้ยงต่อเนื่อง (Baby Hamster kidney cell line; BHK-21) (Sinthia*et al.*, 2017) ซึ่งใช้ในการตรวจหรือวินิจฉัยโรคกาฬโรคเป็ดแต่ยังไม่มีการใช้เพื่อเตรียมเป็นเชื้อพิษทับ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อและการใช้สัตว์จำนวนมากให้เป็นไปตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง จึงมีแนวคิดในการเตรียมเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด สำหรับเป็นเชื้อพิษทับโดยการเพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปฐมภูมิ (primary chicken embryo fibroblast; 1°CEF ซึ่งเป็นผลผลิตจากไข่ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และใช้ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดเพื่อใช้ทดแทนการเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงจากสัตว์ทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลคละเพศอายุ 3 สัปดาห์ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อนจำนวน 100 ตัว

2. อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (CEF) หรือ growth medium (GM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 9% Medium 199 Eagle solution, 3.6% calf serum, 2.6% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM Vitamin solution และ 0.1% amphotericin B solution และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (maintenance medium; MM) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 4.7% Medium 199 Eagle solution, 3.6% calf serum, 2.5% $NaHCO_3$ solution, 1% penicillin streptomycin solution, 0.1% MEM Vitamin solution และ 0.1% amphotericin B solution, 4% Ham F10 solution และ 4% tryptose phosphate broth solution ตามขั้นตอนและวิธีการเตรียมของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ (2530)

3. การเตรียมเซลล์ 1°CEF

ใช้ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free, SPF) อายุ 11 วัน จำนวน 50 ฟอง/ครั้ง (ทำการเพาะเลี้ยงไวรัส 3 passage จะใช้ไข่ไก่ฟัก จำนวน 150 ฟอง) เก็บตัวอ่อนใส่จานแก้วที่สะอาด ตัดส่วนหัวทิ้ง บดผ่านไซริงค์แก้วขนาด 20 มล. ล้างเนื้อเยื่อโดยเติม phosphate buffered saline (PBS) pH 6.8-7.2 และกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กนาน 5 นาที ตั้งให้เนื้อเยื่อตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเนื้อเยื่อให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยการเติมสารละลาย 0.25% trypsin นาน 30 นาที (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530) เก็บส่วนที่เป็นของเหลวหรือเซลล์แขวนลอยโดยกรองผ่านตะแกรงลวดสแตนเลส ขนาดรู 0.25 มม. ผสมสารละลาย lactalbuminhydrolysate 50% โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์[1] นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยซีรัมลูกโค 1.5 เท่า โดยปริมาตร ปั่นอีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนตะกอนมาเติม GM และเก็บเซลล์แขวนลอยบางส่วนนำมาย้อมด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์ แล้วปรับจำนวนเซลล์ด้วย GM ให้มีปริมาณเซลล์ 1.0×10^6 เซลล์/มล.

เพาะเซลล์ 1°CEF ในขวดพลาสติกเพาะเซลล์ ขนาด 75 ซม^2 โดยใส่เซลล์เริ่มต้นที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเติม GM จำนวน 20 มล. (เซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 1.0×10^6 เซลล์/ขวด หรือ 5.0×10^4 เซลล์/มล.) จำนวน 22 ขวด นำไปบ่ม ที่ตู้บ่ม 37°C , 5% CO_2 นาน 48-72 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ 1°CEF ที่เหลือเก็บใส่ตู้เย็น 4°C สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด

4. การเพิ่มปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด

4.1 การเพิ่มปริมาณไวรัสในเป็ดทดลอง

นำเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเจือจางด้วยPBS ให้ได้ไวรัสที่มีความรุนแรง 10^3 LD_{50}/มล. ฉีดในเป็ดทดลองจำนวน 10 ตัวๆ ละ 1 มล. หลังฉีดเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด 4-5 วัน เจาะเลือดเป็ด ตัวละ 3 มล. เพื่อเก็บซีรัมนำมารวมกัน และแบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสและเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ 1°CEF ต่อไป

---

[1]Beckman model J-6B centrifuge, USA

4.2 การเตรียมไวรัสกาฬโรคเป็ดในเซลล์ 1°CEF

นำเซลล์1°CEF จากข้อ 3. เทมีเดียมเก่าทิ้งล้างด้วย PBS 2 ครั้ง นำไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เก็บจากซีรัม ซึ่งทราบปริมาณไวรัสแล้ว มาเจือจางด้วย PBS ให้มีปริมาณไวรัส 10^4 $TCID_{50}$/มล. ใส่เชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดลงเซลล์ 1°CEF ที่เตรียมไว้ จำนวน 10 ขวดๆ ละ 5 มล. โดยค่า MOI เท่ากับ 0.05 (ธวัชชัยและฤทธิ์ลือชัย, 2555) จากนั้น เติม MM จำนวน 15 มล. บ่มที่ 37°C 5% CO_2 แล้วทำการเก็บขวดไวรัสทุกวันๆละ 1 ขวด นาน 10 วัน นำมาแช่แข็งที่ตู้ -20°C ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายน้ำไวรัส (thaw) นำไป ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์[1] เก็บส่วน น้ำใส แบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80°C และนำไปหาปริมาณไวรัสโดยใช้เซลล์ 1°CEF

4.3 การเพาะเลี้ยงไวรัสต่อ (Passage)

นำไวรัสที่มีปริมาณสูงสุดใน passage ที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ 1°CEF เป็น passage ที่ 2 และนำไวรัสที่มีปริมาณสูงสุดใน passage ที่ 2 มาเพาะเลี้ยงต่อใน passage ที่ 3 โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.2

5. การหาปริมาณไวรัสในเซลล์ 1° CEF

การทดสอบหาปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ด ทำโดยเตรียมเซลล์ 1°CEF เพาะเซลล์ลงใน 96 well-plate จำนวนเซลล์ประมาณ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่ 37^0C 5% CO_2เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนำไวรัสกาฬโรคเป็ดที่ต้องการหาปริมาณเจือจางไวรัสแบบ 10-fold dilution เลือกความเจือจาง ที่ 10^{-1}–10^{-10} ด้วย PBS pH 6.8-7.2 ถ่ายมีเดียมเก่าทิ้ง แล้วเติมน้ำไวรัสลงใน well-plate ความเจือจางละ 10 หลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตรและเติมมีเดียมใหม่อีก 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยอ่านผลการเกิด cytopathic effect (CPE) เป็นเวลา 5 วัน และคำนวณหาปริมาณไวรัส ได้ค่าเป็น $TCID_{50}$/มล. (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 2530)

6. การหาความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลอง

นำไวรัสที่ได้ใน passage ที่ 1, 2 และ 3 มาหาปริมาณไวรัสโดยใช้สัตว์ทดลอง (LD_{50}/มล.) เพื่อยืนยันความรุนแรงของเชื้อ โดยเจือจางไวรัสแบบ 10-fold dilution ด้วย PBS แล้วเลือกความเจือจางที่ 10^{-2}-10^{-7} ฉีดในเป็ดทดลองความเจือจางละ 5 ตัวๆ ละ 1 มล. เข้ากล้ามเนื้อขา บันทึกอาการป่วยหรือตาย 7 วันและคำนวณหาปริมาณไวรัส ได้ค่าเป็น LD_{50}/มล. (Reed and Muench, 1938)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ 1°CEF กับความรุนแรงของไวรัสในเป็ดทดลอง ระหว่าง passage ที่ 1, 2 และ 3

ผล

จากการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ดในเซลล์ 1°CEF พบว่าปริมาณไวรัส passage ที่ 1 ในวันที่ 5-6 และ passage ที่ 2 ในวันที่ 6 จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุด คือ $10^{5.50}$ $TCID_{50}$/มล. แต่ passage ที่ 3 จะให้ปริมาณไวรัสสูงสุดในวันที่ 5 คือ $10^{4.71}$ $TCID_{50}$/มล. (ตารางที่ 1) และเมื่อหาความรุนแรงของไวรัส passage ที่ 1, 2 และ 3 ในเป็ดทดลอง (LD_{50}/มล.) มีค่า $10^{5.17}$, $10^{5.80}$ และ $10^{4.50}$ LD_{50}/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ ขั้นตอนการเตรียมไวรัสตั้งต้นได้ใช้ไวรัสที่มีอยู่ในซีรั่มเป็ดในช่วงที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดแทนการใช้ไวรัสที่ได้จากวิการ (lesion) นั้น เนื่องมาจากวิการโรคกาฬโรคเป็ดส่วนใหญ่ที่พบเกิดขึ้นที่หลอดอาหารและลำไส้ ซึ่งการเก็บวิการจากตำแหน่งดังกล่าวพบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (ทวีศักดิ์, 2546) จากการทดลองปริมาณไวรัสที่ได้จาก passage ที่ 1 และ 2 ที่มีปริมาณเท่ากันคือ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. แต่ให้ค่า LD_{50} ที่ต่างกันเมื่อฉีดในเป็ดทดลอง อาจเนื่องมาจากคุณภาพของสัตว์ทดลองที่ทดสอบในช่วงเวลานั้นๆ สำหรับปริมาณไวรัสที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (สำหรับการฉีดพิษทับ) ใช้เพียง 10^{2} $TCID_{50}$/มล. ซึ่งไวรัสที่เตรียมได้มีปริมาณ $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/มล. ซึ่งเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็นเชื้อพิษทับ โดยให้ผลเช่นเดียวกับไวรัสที่เตรียมได้จากเป็ดโดยเป็ดทดลองจะเสียชีวิตภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ (ตารางที่ 2) สำหรับไวรัสที่เตรียมจาก passage ที่ 3 จะมีปริมาณน้อยกว่า passage ที่ 1 และ 2 ในวันที่ 5-6 แต่ความรุนแรงของไวรัสกาฬโรคเป็ด เมื่อนำมาเตรียมเป็นเชื้อพิษทับปริมาณ 10^{2} $TCID_{50}$/มล. ยังคงมีความรุนแรงเทียบเท่ากับ passage ที่ 1 และ 2 ซึ่งแม้ว่าการเลี้ยงใน 1°CEF เป็นระบบหนึ่งในการลดความรุนแรง (attenuate) เพื่อเป็นวัคซีนเชื้อเป็นเช่นเดียวกับวัคซีนในปัจจุบัน แต่ต้องมีการ passage ต่อเนื่องหลายครั้ง เช่น 25-80 passage (Yang *et al*., 2015) อาจเป็นไปได้ว่าพันธุกรรมหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของไวรัสกาฬโรคเป็ดในการศึกษาครั้งนี้ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง และเพื่อให้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวน passage สูงสุดที่สามารถให้ความรุนแรงในการเป็นเชื้อพิษทับได้และศึกษาอายุการเก็บรักษาไวรัส (keeping quality) รวมไปถึงการศึกษาความแตกต่างของการใช้ไวรัสที่เตรียมจากสัตว์และจากเซลล์ในกระบวนการฉีดพิษทับ เพื่อยืนยันและปรับปรุงกระบวนการทดสอบวัคซีนกาฬโรคเป็ดต่อไป

สรุป

ไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงที่เตรียมจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ passage ที่ 1-3 มีปริมาณไวรัสในเซลล์ ($TCID_{50}$) และมีความรุนแรงในเป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบล (LD_{50}) ใกล้เคียงกัน สามารถใช้เป็นเชื้อพิษทับในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกาฬโรคเป็ด ซึ่งช่วยลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองในการเตรียมเชื้อพิษทับได้

เอกสารอ้างอิง

จารุภา เถาวัลย์ 2559 คู่มือการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก งานไวรัสวิทยาและการเพาะเลี้ยงเซลล์ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและ สัตว์อพยพคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 8, 42-52

ธวัชชัย ปัจฉานุกูลและฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 2555 ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 20-21(1-2): 31-39

ทวีศักดิ์ ส่งเสริม 2546.โรคเป็ดและห่านในประเทศไทย พยาธิวิทยาและการวินิจฉัย หน้า 15

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ 2530 การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-4

อุราศรี ตันตสวัสดิ์ 2542 แนวทางการป้องกันโรคสำคัญในเป็ดและห่าน กรมปศุสัตว์ หน้า 29

ASEAN 1998. ASEAN standard requirements forduck plague vaccine, live In :ASEAN standard for animal vaccines. 2nd edition. Livestock publication Series No. 2A. p 8-9.

Burgess, E. C. and Yuill T. M.. 1981. Increased cell culture incubation temperatures for duck plague virus isolation. Avian Dis. 25: 222–224.

Jansen, J. 1964. The interference phenomenon in the development of resistance against Duck plague. J.CompPathol. Ther. 74: 3-7.

Kalaimathi, R. 1989. Adaptation of a virulent strain of duck plague virus to chicken embryo fibroblast cell culture. INDIAN VET. J. 66(11): 1001-1004.

Office international des EpiZooties (OIE) 2014. Manual of diagnostic tests and vaccine for tersestrial Animals. CHAPTER 2.3.7: 507-513.

Reed, L. J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am* J Public Hygiene. 27: 493–497.

Sandhu, T. S. and Leibovitz, L. 1997. Duck virus enteritis (Duck plague). In B.W. Calnek (Ed.), Diseases of Poultry 10th edn Ames, IA: Iowa State University Press. pp. 675–683.

Sinthia, T., Khondoker, M., Hafizur, R., Anwer, H., Amal, K., Shaima, A. and Giasuddi, J. 2017. Adaptation of Duck plagueVirus(DPV) In Baby Hamter Kidney cell line (BHK-21) Toward Vaccine Development. International Journal of Current Research. 9(5): 49733-49737.

Yang, C., Li, J., Li, Q., Li, L., Sun, M., Li, H., Xia, Y., Yang, H. and Yu, K. 2015. Biological properties of a duck enteritis virus attenuated via serial passaging in chick embryo fibroblasts. Arch. Virol. 160(1): 267–274.

Zander, D.V., Bermudez, A.J. and Mallison, E.T.1997. Principle of disease prevention: diagnosis And Control. In : Disease of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press. pp. 21-25.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เพาะเลี้ยงในเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อ (1°CEF) passage ที่ 1, 2 และ 3

วันที่ (เก็บ)	ปริมาณไวรัส ($TCID_{50}$ /มล.)		
	Passage 1	Passage 2	Passage 3
1	$10^{4.00}$	$10^{5.50}$	$10^{5.50}$
2	$10^{3.89}$	$10^{5.00}$	$10^{5.00}$
3	$10^{3.89}$	$10^{4.71}$	$10^{4.58}$
4	$10^{4.09}$	$10^{4.71}$	$10^{4.58}$
5	$10^{5.50}$	$10^{5.43}$	$10^{4.71}$
6	$10^{5.50}$	$10^{5.50}$	$10^{4.58}$
7	$10^{4.71}$	$10^{3.60}$	$10^{4.09}$
8	$10^{4.58}$	$10^{3.60}$	$10^{2.09}$
9	$10^{3.60}$	$10^{3.60}$	$10^{2.09}$
10	$10^{2.09}$	$10^{1.80}$	อ่านค่าไม่ได้

*อ่านค่าไม่ได้เนื่องจากปริมาณไวรัสน้อยกว่า 10^{1} $TCID_{50}$ /มล.

ตารางที่ 2 ปริมาณไวรัสหรือความรุนแรงของเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดที่เพาะจากเซลล์คัพภะไก่ปลอดเชื้อทดสอบในเป็ดทดลอง

Dilution	จำนวนเป็ด (ตาย/รอด)		
	Passage 1	Passage 2	Passage 3
10^{-2}	5/0	5/0	5/0
10^{-3}	4/1	5/0	4/1
10^{-4}	4/1	4/1	3/2
10^{-5}	3/2	4/1	2/3
10^{-6}	2/3	3/2	1/4
10^{-7}	0/5	0/5	0/5
ความรุนแรง (LD_{50}/มล)	$10^{5.17}$	$10^{5.80}$	$10^{4.50}$

หมายเหตุ เป็ดทดลองตายภายใน 7 วัน

The preparation of virulent duck plaque virus from SPF chicken embryo fibroblast

Ditee Prasertsuwan[1] Kungwan Jungtheerapanich[1]

Abstract

Study on the preparation of virulent duck plague virus using for vaccine potency test by propagating in specific pathogen free chicken embryo fibroblast cell (SPF-CEF) was conducted. The virus was injected intramuscularly into Khaki Campbell duck. After 4-5 day, sera were collected and cultured in SPF-CEF. The virulent virus was harvested every day for 10 days in order to determine virus titer in SPF-CEF whereas the level of virulent virus was done in duck. The process of growing virus, serial passages, was performed in SPF-CEF. Then the virus cultivation in the passage 2 and 3 were then compared in terms of virus titer. The study found that at day 5 and 6, the harvested virus obtained maximum titer about $10^{5.5}$ $TCID_{50}$/ml in passage 1and 2 while passage 3 was $10^{4.7}$ $TCID_{50}$/ml. The virulent level of virus in challenged duck from the first to the third passage were $10^{5.17}$ LD_{50}/ml, $10^{5.8}$ LD_{50} and $10^{4.5}LD_{50}$/ml, respectively. In summary, the virulent duck plague virus, prepared in SPF-CEF from passage 1, 2 and 3, still had nearly the same virus content and virulent in ducks which can be used for potency test of duck plague vaccine. As a result, the number of experimental ducks can be reduced for the preparation of virulent virus.

Keywords: virulent duck plaque virus, specific pathogen free chicken embryo fibroblast, virus titer

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