



วารสาร

ชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (มีนาคม 2566)

Vol.31 No.1 (March 2023)



การจำแนก
คุณลักษณะเชื้อวัคซีน
หลอดลมอักเสบติดต่อในไก่
ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์



การพัฒนาวัคซีน
อหิวาต์สุกร สเตรนไซนิส
ชนิดาเซลล์เพาะเลี้ยง
ในระดับต้นแบบ



ความคุ้มโรค
แรกเริ่มและระยะคุ้มโรค
ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่
ชนิดน้ำมัน



การเจริญเติบโต
ของเชื้อไวรัส
โรคลัมปี สกิน
สายพันธุ์ท้องถิ่น
ในเซลล์ไลน์ MDBK



หลักการตรวจสอบ
vaccine matching
ด้วยวิธี virus neutralisation
และ LP ELISA ในการคัดเลือก
ไวรัสสำหรับการผลิต
วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2566

สารบัญ

- จากกองบรรณาธิการ 5
- การจำแนกคุณลักษณะเชื้อวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์
นพคุณ มุณลิน คณิตา ภาสะฐิติ 6
- การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ
นลินี หงษ์ชุมพล ละมุล โม้ลี 29
- ความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน
วรพร ปู่สูงเนิน ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน 41
- การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคล้มปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK
ภาวนา ทศพิทักษ์กุล อติชาติ อภิรักษ์ 53
- หลักการตรวจสอบ vaccine matching ด้วยวิธี virus neutralisation และ LP
ELISA ในการคัดเลือกไวรัสสำหรับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย
วีไล ถินจงสุขงกช 63

The Journal of Veterinary Biologics

Volume 31 No. 1 March 2023

Contents

- The editorial 5
- Characterization of Department of Livestock Development infectious bronchitis vaccine 6
Noppakun Moolsin Kanita Bhasathiti
- Development of classical swine fever vaccine; Chinese strain in tissue culture, pilot scale 29
Nalinee Hongchumpon Lamul Molee
- Onset and duration of immunity of oil adjuvant fowl cholera vaccine 41
Woraporn Poosungnoen Ritluechai Poosungnoen
- Growth kinetic of Lumpy skin disease virus local strain in MDBK cell line 53
Pawana Tospitakkul Atichat Apirug
- Principle of vaccine matching investigation by virus neutralisation and LP ELISA in seed virus selection for foot and mouth disease vaccine production 63
Wilai Linchnongsubongkoch

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	จาทูรนต์ พลราช	Advisory board	Jaturon Polrach
บรรณาธิการ	ไชยา ส่งาประโคน	Editor	Chaiya Sangaprakhon
กองบรรณาธิการ	ฐิตวพัฒน์ จันทวร	Editorial board	Thitawat Janthawon
	ร่มพฤษ์ อุดล		Rompkrue Udon
	อนันต์ ท้าวเพชร		Anan Thaopech
	สายพิณ ขุมทรัพย์		Saipin Khumsab
	วรพร ปู่สูงเนิน		Woraporn Poosungnoen
ฝ่ายจัดการวารสาร	สมเกียรติ เลิศวิมลลักษณ์	Manager	Somkiat Lerdwimonluk

สำนักงาน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 โทรศัพท์ 0-4431-1476 ต่อ 1165 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

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน

1. เรื่องที่จะนำลง

- 1.1 ผลงานวิจัย (Research article) เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง มีการกำหนดปัญหาและวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน มีการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ สรุปและอภิปรายผลการวิจัย อันนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิชาการ
- 1.2 บทความทางวิชาการ (Technical article) เป็นงานเขียนขนาดสั้น ซึ่งมีการกำหนดประเด็นที่ชัดเจน โดยผู้เขียนเรียบเรียงจากผลงานทางวิชาการของตนเอง หรือของผู้อื่นในลักษณะที่เป็นการวิเคราะห์วิจารณ์ หรือเสนอแนวความคิดใหม่ ๆ จากพื้นฐานทางวิชาการนั้นๆ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ ของผู้เขียน
- 1.3 บทความปริทรรศน์ (Review article) คือบทความที่รวบรวมผลงาน หรือแนวคิดเรื่องใดเรื่องหนึ่ง โดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์มาแล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
- 1.4 เรื่องอื่นๆ ที่คณะบรรณาธิการวารสารพิจารณาเห็นสมควร

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 และใช้ตัวอักษรปกติขนาด 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 ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบ ทวินาม (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) เขียนให้เนื้อความครอบคลุมเรื่องทั้งหมด โดยเฉพาะที่มา วัตถุประสงค์ วิธีการ ผล และสรุป หรืออาจแยกเป็น 4 ย่อหน้า คือ ส่วนที่มา (Backgrounds) วิธีการ (Methods) ผล (Results) และสรุป (Conclusion) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยเขียนแยกหน้า
- 4.4 คำสำคัญ (Keywords) คำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ 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) ถ้าเป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ ควรอธิบายอย่างละเอียด 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) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านเข้าใจได้ง่าย
 - 4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ระบุแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง

- 1) วารสารหรือหนังสือ เมื่ออยู่ต้นประโยค เช่น นพพร (2539), Lin and Lee (1981) เมื่ออยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (วิลและคณะ, 2532; Kumakai *et al.*, 1961) กรณีอ้างอิงเอกสารหลายเรื่องที่เขียนโดยผู้แต่งคนเดียวกันและปีที่พิมพ์ซ้ำกัน ให้ใช้ a, b, c หรือ d ตามหลังปีที่พิมพ์สำหรับเอกสารภาษาต่างประเทศ และใช้ ก ข ค หรือ ง ตามหลังปีที่พิมพ์ สำหรับเอกสารภาษาไทย เช่น เจือ และคณะ (2516ก), Katz (1984a)
- 2) บุคคลหรือข้อมูลที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปรวมในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Layton, R. B. and Weathers, C. C., unpublished data),for other bacteria (Jones, A. X., personal communication)
- 3) เอกสารที่หน่วยงานเป็นผู้จัดทำ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างถึงครั้งแรก และระบุชื่อย่อที่เป็นทางการหลังเครื่องหมายจุลภาค (.) การอ้างถึงครั้งต่อไปให้ใช้ชื่อย่อนั้น กรณีที่ไม่มีชื่อย่อ ให้ระบุชื่อหน่วยงานเต็มทุกครั้ง เช่น (องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, ร.ส.พ., 2519)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง เริ่มจากเอกสารอ้างอิงภาษาไทยเขียนเรียงตามลำดับพยานุชนของผู้เขียน เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษเขียนเรียงลำดับ ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้เขียน

- 1) วารสาร ระบุชื่อผู้เขียน ตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง เช่น
 สายพิณ ชุมทรัพย์ สุรพล ชุมทรัพย์ และจาดุรนต์ 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) หนังสือ ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง บรรณาธิการ (ถ้ามีบรรณาธิการหลายคนให้อ้างทุกคน) ชื่อหนังสือ ครั้งที่พิมพ์ สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ ประเทศ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง สำหรับหนังสือภาษาอังกฤษ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. ถ้าอ้างอิงหลายหน้าใช้ pp. เช่น

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ 2543 ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย โรงพิมพ์ชุมนุม
สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 81

ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2520 โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา ใน เกษม สุขสถาน และอุดม
พูลเกษ บรรณาธิการ หลักการทำไร้อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
หน้า 141-145

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. Fowl cholera. *In* Manual
of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. OIE. Paris,
France. p. 899.

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* Lemman, A. D. (ed.), Diseases of
Swine, 6th ed. Iowa State University Press. Iowa. pp. 293-297.

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

จันทร์หา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิวัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพิงพิศ ดุลยพัชร์
2541อาหารจากข้าวโพด คู่มือส่งเสริมการเกษตรที่ 43 แหล่งที่มา
<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm> 27 มีนาคม 2541

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

จากกองบรรณาธิการ

จากปี พ.ศ. 2563 หรือ ค.ศ. 2020 ที่ทั่วโลกและประเทศไทย ประสบกับปัญหาด้านสุขภาพของประชากร (คน) ที่รุนแรงมาก คือ ปัญหาการระบาดของโรคไวรัสโคโรนา-2019 (COVID-19) ที่มีคนติดเชื้อมากกว่า 630 ล้านคนและเสียชีวิตจำนวนมากถึง 6.6 ล้านคน ถือเป็นภัยพิบัติที่สำคัญของโลกในยุคโลกไร้พรมแดน สำหรับโรคในสัตว์ของประเทศไทย ปี 2563 พบกับปัญหาการระบาดของโรคคอตีบแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) ปี 2564 พบกับปัญหาการระบาดของโรคลัมปี สกิน (Lumpy Skin Disease, LSD) และต้นปี 2565 ก็มีการประกาศพบโรคคอตีบแอฟริกาในสุกร (African swine fever, ASF) ซึ่งทั้ง 3 โรค เป็นโรคอุบัติใหม่ที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทย ทำให้เกิดการตื่นตัวของนักวิชาการในสาขาต่างๆ เช่น นักวัคซีนวิทยา นักไวรัสวิทยา เพื่อพัฒนาวัคซีนชนิดใหม่ๆ ที่ใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ ได้แก่ วัคซีนชนิด mRNA วัคซีนชนิด Vector เป็นต้น รวมทั้งใช้หลักการควบคุมโรคอย่างเข้มข้น (Biosecurity) ทำให้ปัจจุบันประเทศไทยได้ขอคืนสถานะประเทศปลอดโรค AHS ต่อบริษัทสุขภาพสัตว์โลก (WOAH) แล้ว สำหรับโรค LSD และ ASF ก็ถูกควบคุมอยู่ในวงจำกัด รวมทั้งโรค COVID-19 ก็ได้ถูกประกาศให้เป็นโรคประจำถิ่นแล้ว

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้ เป็นปีที่ 31 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2566 ประกอบไปด้วยเนื้อหาที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้วัคซีนที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ จำนวน 5 เรื่อง ได้แก่ 1) การจำแนกคุณลักษณะของเชื้อวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ 2) การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไซนิส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ 3) ความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เปิด-ไก่ ชนิดน้ำมัน 4) การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK และ 5) หลักการตรวจสอบ vaccine matching ด้วยวิธี virus neutralization และ LP ELISA ในการคัดเลือกไวรัสสำหรับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเรื่องที่ 5 นี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้ใช้งานและผู้ผลิตวัคซีน (สทช.) ในการผลิตวัคซีนให้ตรงหรือใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในพื้นที่ เพื่อควบคุม หยุดยั้งการระบาดของเชื้อให้เร็วที่สุด รวมทั้งช่วยลดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

ท้ายนี้กองบรรณาธิการ ขอขอบคุณผู้อ่านที่ยังให้ความสนใจและหวังว่าวารสารชีวผลิตภัณฑ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิชาการ วิจัย การต่อยอด การพัฒนานวัตกรรมของนักวิชาการ นักวิจัย และเป็นข้อมูลแก่ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจ

ขอขอบคุณ
น.สพ. ไชยา ส่งประโคน
บรรณาธิการ

การจำแนกคุณลักษณะเชื้อวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์

นพคุณ มูลสิน¹คณิตา ภาสะฐิติ¹

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบค้นประวัติต้นตอวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ ทำการจำแนกและตรวจสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ โดยศึกษาขนาดและรูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics data) สร้างแบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติโดยวิธี homology modeling และเสนอการเรียกชื่อสายพันธุ์ตามระบบสากล ผลการศึกษาพบว่าต้นตอและวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่กรมปศุสัตว์ผลิตเป็นสายพันธุ์ที่องค์การวิจัยและพัฒนายาวนานกว่า 60 ปี มีขนาดอนุภาคไวรัส 60-80 นาโนเมตร รูปร่างลักษณะกลม มีความบริสุทธิ์สูง พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์ LSD/051 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 87.76 % และมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 85.69% โดยที่กรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่จดจำและถูกตัดด้วยเอนไซม์โฮสต์ประกอบด้วยอาร์จินีน-อาร์จินีน-เซอรีน-อาร์จินีน-อาร์จินีน จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นด้วยวิธี neighbor joining และ maximum likelihood แสดงให้เห็นเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ของกรมปศุสัตว์จำแนกอยู่ในจีโนไทป์ 1 ลำดับเชื้อสายที่ 25 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษารายละเอียดทางพันธุกรรมจากยีนทั้งหมดเพื่อยืนยันอีกครั้ง จากโครงสร้างสามมิติของโปรตีน spike พบว่ากรดอะมิโนบริเวณ N-terminal domain ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจมีความเหมือนกันระหว่างวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ของกรมปศุสัตว์กับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่สายพันธุ์ H 120 และ Mass 41 โดยระบบสากลควรใช้ชื่อสายพันธุ์วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์เป็น IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54)

โดยสรุปจากการจำแนกคุณลักษณะต่างๆและวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศศาสตร์ของต้นตอและวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ พบว่ามีความบริสุทธิ์สูง มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคสายพันธุ์ที่ก่อโรคทางเดินหายใจได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: ประวัติต้นตอวัคซีน

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนในไก่

แบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติ

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น พบได้ในไก่ทุกอายุ เป็นโรคติดต่อที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ทั่วโลก มีสาเหตุจากเชื้อ Infectious bronchitis virus (IBV) ซึ่งรายงานครั้งแรกในรัฐนอร์ทดาโกตา สหรัฐอเมริกา ปี 1931 (Schalk and Hawn, 1931) ในไก่อายุ 2 วันถึง 3 สัปดาห์ พบการตาย 40-90% การติดต่อโรคนี้เกิดจากการสัมผัสไก่ป่วย (Direct contact) หรือพาหะที่มีเชื้อไวรัสปนมากับอาหาร น้ำ สิ่งรองนอน มูลไก่ หรือเกิดจากคนเป็นผู้นำโรคเข้าฟาร์ม (Indirect contact) ไวรัสสามารถแพร่กระจายติดต่อไปในอากาศ (Airborne transmission) (OIE, 2018) ไก่ทั่วไปที่ป่วยจะแสดงอาการน้ำมูกน้ำตาไหล อ้าปากหายใจ จาม ในไก่ไข่เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในท่อไข่ (oviduct) ส่งผลให้ผลผลิตไข่ลดลง เปลือกไข่มีสีซีดฟองไข่มีลักษณะผิดปกติ และไข่ขาวเหลว นอกจากนี้เชื้อบางสายพันธุ์ (Nephropathogenic strain) เพิ่มจำนวนในไตทำให้เกิดรอยโรคและไตอักเสบ (interstitial nephritis) มีการคั่งของยูเรตในท่อไต ในไก่ป่วยหากไก่ที่มีการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย อีโคไลและเชื้อมัยโค-พลาสมา จะทำให้อัตราการป่วยตายสูงเพิ่มมากขึ้น (Jackwood, 2012)

ในประเทศไทยได้มีการรายงานการระบาดของเชื้อ IBV ครั้งแรกในปีค.ศ. 1954 (Chindavanig, 1962) ณ ปัจจุบันยังพบการแพร่ระบาดของโรคทุกพื้นที่ของประเทศซึ่ง IBV นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากไวรัสเดิมจัดเป็น new variant (Pohuang *et al.*, 2011; Munyahongse *et al.*, 2020) IBV เป็น corona virus ชนิดแรกที่มีมนุษย์ค้นพบก่อนที่จะมีการประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จัดอยู่ใน Family Coronaviridae Genus Gamma coronavirus Species Avian coronavirus เดิมตลอด 50 ปีที่มีการค้นพบ IBV เชื่อว่า Gamma coronavirus มีสมาชิกเพียงชนิดเดียวคือ IBV ซึ่งพบไวรัสชนิดนี้เฉพาะในไก่เท่านั้น แต่ปัจจุบันได้พบ gamma coronavirus ในสัตว์ปีกอื่นที่แยกเชื้อได้จาก นกยูง นกกระทา ไก่วง และนกป่า ที่เรียกว่า IBV-like virus (OIE, 2018) สมาชิกใน genus corona virus จะมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่เหมือนกันเมื่อส่องขยายโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบอนุภาคไวรัสขนาดประมาณ 60 ถึง 150 นาโนเมตร มีปุ่มหนามยื่นออกมาเหมือนรัศมีของดวงอาทิตย์ซึ่งภาษาลาตินเรียกว่า corona (Lalchandama, 2020) เมื่อศึกษาสารพันธุกรรมภายในอนุภาคไวรัส (จีโนม) ซึ่งประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลีอิกสายเดี่ยวชนิด positive-sense RNA ขนาดความยาวประมาณ 27.6 Kb ขนาด 2/3 จีโนมบริเวณ 5' ทำหน้าที่สร้างโปรตีน 15 ชนิดสำหรับถอดรหัสและจำลองตัวอนุภาค (nonstructural replicate proteins: nsp2-16) ที่เหลือ 1/3 บริเวณ 3' ของจีโนมไวรัสทำหน้าที่ผลิตโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด คือ spike glycoprotein (S), envelope glycoprotein (E), membrane glycoprotein (M) และ nucleocapsid protein (N) สำหรับ S protein มีลักษณะเป็นปุ่มหนามอยู่บริเวณเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัสจัดเป็น membrane protein type I (Lontok *et al.*, 2004) ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย คือ S1 และ S2 โปรตีนส่วน S1 ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (receptor-binding domain) ในส่วน amino-terminal ของ S1 ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ให้สร้าง neutralizing antibodies ซึ่งเป็น protective immunity ที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ IBV และแอนติบอดีนี้ยังแสดงถึงซีโรไทป์จำเพาะของเชื้อไวรัสอีกด้วย (Cavanagh, 2007) ในอดีตการจำแนก IBV จะอาศัยวิธีการทางซีรัมวิทยาเช่น haemagglutination inhibition (HI) หรือ Virus neutralization (VN) แต่เนื่องจากการอุบัติขึ้นของเชื้อ IBV ชนิดใหม่อย่างต่อเนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านความเป็นแอนติเจนหรือพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปจากไวรัสชนิดเดิมเป็นอย่างมากจากกระบวนการ mutation, insertion หรือ deletion นอกจากนี้ยังเกิดจากกระบวนการ recombination (Valastro *et al.*, 2016) เป็นผลให้เกิดไวรัสที่เรียกว่า new variant type ทำให้การจำแนกสายพันธุ์ IBV โดยวิธี serotyping แทบไม่มีการทำอีกต่อไป (OIE, 2018) ในทางตรงกันข้ามการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลำดับรหัส

พันธุกรรมในส่วนยีนที่ทำหน้าที่สร้าง S1 protein มีการศึกษาแพร่หลายเนื่องจากทำได้รวดเร็ว ให้ความถูกต้อง สามารถเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆได้เป็นอย่างดี ให้ข้อมูลที่น่าไปใช้ประโยชน์ด้านการ เฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ติดตามวิวัฒนาการของเชื้อ ตลอดจนการจำแนกสายพันธุ์ในวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกัน โรค (Jackwood and De Wit, 2020)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ได้ผลิตวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีน ชนิดเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง (live attenuated vaccine) โดยผ่านกระบวนการ lyophilization มาเป็น ระยะเวลายาวนานโดยใช้เชื้อ IBV ที่แยกได้จากการระบาดในประเทศสายพันธุ์ท้องถิ่น (Local strain) สำหรับ ป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งใช้ในไก่เนื้อโดยการหยอดตาหรือจุ่มกัว 2 หยด ครั้งแรกเมื่ออายุ 5-7 วัน และครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 3-4 สัปดาห์ สำหรับไก่ไข่ให้วัคซีนสองครั้งแรกเช่นเดียวกับในไก่เนื้อ ครั้งที่สาม เมื่อ อายุ 6-8 สัปดาห์และซ้ำทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562) ในการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ IBV ที่นำมาใช้ผลิตวัคซีนนี้สามารถกระทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาเช่นวิธี virus isolation และ virus neutralization ใช้สำหรับยืนยันกรณีการเกิดโรค (Confirmation of clinical cases) ส่วนวิธี gene sequencing สำหรับการระบุชนิดและสายพันธุ์ของไวรัส (Virus identification) ส่วนวิธีเสริมอื่นเช่นการศึกษา ไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะใช้จำแนกชนิดไวรัสจากรูปร่างที่แตกต่างกันและสามารถศึกษารายละเอียด โครงสร้างต่างๆที่มีขนาดเล็กบนอนุภาคไวรัส (OIE, 2018)

ในการศึกษารุ่นนี้มีจุดประสงค์ต้องการสืบค้นประวัติต้นตอเชื้อ IBV ที่สทช.นำมาใช้ผลิตวัคซีนและ ต้องการทราบคุณลักษณะต่างๆของเชื้อได้แก่ขนาดและรูปร่างการนำความรู้ทางชีวสารสนเทศศาสตร์มาจำแนก สายพันธุ์ตลอดจนศึกษาโครงสร้างโปรตีนสามมิติบริเวณปุ่มหนาม (S1) ตลอดจนนำเสนอการตั้งชื่อสายพันธุ์วัคซีน ผลที่ได้จากการศึกษาหัตถ์พันธุกรรมบริเวณ S1 ซึ่งมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงทำให้ทราบรายละเอียด สายพันธุ์และสามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ IBV ที่ใช้ผลิตวัคซีนกับเชื้อที่มีการระบาด รวมถึงใช้เป็นเอกสารทางวิชาการ เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนชีววัตถุต่อทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและ ยาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สืบค้นประวัติแหล่งที่มาต้นตอและเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ โดย สืบค้นจากวารสารวิชาการที่เผยแพร่ข้อมูลไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ทั้งในประเทศและต่างประเทศ รวมถึงการเข้าถึงข้อมูล Nucleotide และ Protein databases โดยระบุเป็นเลข Accession number สำหรับ Nucleotide (EU589323) และ Protein sequence (ACB87909.1) พร้อมสัมภาษณ์ผู้พัฒนา seed IBV
2. เตรียมตัวอย่างไวรัสต้นตอ (seed virus) เพื่อศึกษารูปร่างและโครงสร้างส่วนหนามหรือ S1 ด้วยกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิสชัน (TEM)¹ ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ตัวอย่างไวรัสปริมาณ $10^{4.75}$ EID₅₀/ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มล. ต่อจากนั้นดูด 20 ไมโครลิตรสารละลายไวรัสหยดลงบน copper grid ซึ่งถักทอเป็นโครงตาข่ายสำหรับรองรับ ตัวอย่างปล่อยให้ดูดซับตัวอย่างประมาณห้านาที หลังจากนั้นย้อมตัวอย่างด้วย 2% uranyl acetate ทำการ ดูดความชื้นด้วยตู้ดูดความชื้นทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำตัวอย่างทำการยิงลำอิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างด้วย ความต่างศักย์ 120 kV จากนั้นโฟกัสและขยายด้วยเลนส์แม่เหล็กขนาดกำลังขยาย 100,000 – 200,000 เท่า

¹ ยี่ห้อ FEI รุ่น Tecnai G20, Czech Republic

3. การวิเคราะห์ข้อมูลเชื้อ IBV โดยใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics Data)

3.1 จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลชีวสารสนเทศต่างๆ ประกอบด้วยฐานข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (DNA) และ mRNA ที่เก็บรักษาและบริหารจัดการโดย National center for biotechnology กระทรวงสาธารณสุข สหรัฐอเมริกา ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรมบริเวณ Spike 1 gene ใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งเป็นชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ประกอบไปด้วยตรรกะขั้นตอนวิธีสำหรับเปรียบเทียบความคล้ายกันของ DNA หรือโปรตีน ประกอบด้วย

- Blastn เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน S1 เชื้อ IBV ของกรมปศุสัตว์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ IBV สายพันธุ์ต่างๆทั่วโลกที่อยู่ในฐานข้อมูล
- Blastp เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีน S1 เชื้อ IBV ของกรมปศุสัตว์กับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ IBV สายพันธุ์ต่างๆทั่วโลกที่อยู่ในฐานข้อมูล

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนบริเวณ S1 ซึ่งทำหน้าที่สร้างและประกอบเป็นปุ่มหนามของ IBV กรมปศุสัตว์ก่อนการศึกษาในครั้งนี้สหข. ได้ศึกษาจากตัวอย่าง seed IBV จำนวน 3 lots ที่เก็บรักษา เปรียบเทียบกับ vaccine IBV จำนวน 3 Batch ที่ผลิตต่อเนื่องกัน โดยเทคนิค RT-PCR, Restriction fragment length polymorphism และ Sanger nucleotide sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น complete S1 gene ความยาว 1,635 nucleotides มีความเหมือนกันระหว่าง seed และ vaccine 100% แสดงถึงลักษณะที่เรียกว่า genetic stability ซึ่งรายละเอียดไม่ได้นำมาเผยแพร่ในการศึกษานี้โดยที่ข้อมูลได้จากการศึกษาถูกเก็บไว้ที่ GenBank สามารถเข้าถึงได้โดยใช้รหัส Accession number: Nucleotide sequence (EU589323), Protein sequence (ACB87909.1)

3.2 เปรียบเรียงข้อมูลรหัสพันธุกรรมข้อมูลนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนโดยเทียบเรียงคู่ลำดับข้อมูลสองเส้น (Pairwise alignment) หรือหลายตัวอย่างข้อมูลในเวลาเดียวกัน (Multiple sequence alignment) โดยทำการเปรียบเทียบความเหมือน (Identity) หรือความคล้าย (Similarity) บริเวณโปรตีน S1 วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนอกกรมปศุสัตว์กับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อนอกสเตรนวัคซีนที่นิยมใช้กัน ได้แก่ Mass41, H120, 4/91, QX, Ma5 (ตารางที่ 1) และเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนอื่นที่เป็นเชื้ออ้างอิงหรือสายพันธุ์ที่มีความคล้ายของกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม CustalW (Thompson *et al.*, 1994)

3.3 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ข้อมูลยีน S1 วัคซีน IBV กรมปศุสัตว์กับเชื้อ Reference IBV strains ซึ่งจำแนกเป็น 6 genotype 32 lineages (ตารางที่2) และเชื้อ IBV 7 Thai isolated โดยที่ 4 Isolated (GenBank accession number:Chonburi:MG191016, Phetchabun: MG191018, Prachinburi:MG191020, Saraburi: MG191023) รายงานโดย (Munyahongse *et al.*, 2020) และอีก 3 Isolated (GenBank accession number:THA90151Group1:GQ503617, THA80151Group2:GQ503616, THA241251/Mass:GQ885131) รายงานโดย (Pohuang *et al.*, 2011) นำมาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013) เลือก Neighbor – joining และ Maximum-likelihood method และใช้ General time reversible model ร่วมกับการกระจายข้อมูลแบบ gamma distribution และ invariant site model กำหนดให้ทำการสร้างแผนภูมิโดยการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มด้วยค่า Bootstrap value 1000 (nodal support value)

3.4 สร้างและทำนายหน้าที่จากโครงสร้างสามมิติ S1 โดยวิธี homology modeling เริ่มจากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน S1 เชื้อ IBV กรมปศุสัตว์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วใช้ Swiss-Model web server (<http://swissmodel.expasy.org/>) ทำการ

- 3.4.1 ค้นหาและคัดเลือก Template S1 protein ที่มีโครงสร้างสามมิติที่มีรายละเอียดความถูกต้องที่ดีที่สุดซึ่งได้โครงสร้างโปรตีนนี้มาจากการทดลองโดยใช้เทคนิค X-ray crystallography หรือ Cryo-TEM
 - 3.4.2 สร้างแบบจำลองขึ้นมาโดยการทำให้ alignment ระหว่าง S1 protein IBV กรมปศุสัตว์ (Query Protein) กับโครงสร้าง Template protein ซึ่งการ alignment นี้จะเป็นการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ Backbone และ side chain และ loop เพื่อนำมาสร้างเป็นแบบจำลองโครงสร้างสามมิติ
 - 3.4.3 ประเมินความถูกต้องโครงสร้างโปรตีนสามมิติที่สร้างขึ้น โดยใช้ค่า Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN) Z-Scores และค่า QMEANDisCo (Studer *et al.*, 2020)
4. นำเสนอการตั้งชื่อสายพันธุ์ (strain) ชื่อ IBV กรมปศุสัตว์ที่ใช้ผลิตเป็นวัคซีนตามหลักเกณฑ์การเรียกชื่อสากล ดังนี้
- IBV/ชนิดสัตว์/ประเทศ/genetic type, serotype/ชื่อสายพันธุ์/ปีที่ทำการแยกเชื้อ

ผล

1. ประวัติต้นตอวัคซีน IBV (Seed History)

ในช่วงปี 1954 -1955 ได้เกิดการระบาดของโรคในไก่ที่กรุงเทพฯ ในช่วงระบาดดังกล่าวได้มีการทำการแยกเชื้อไวรัสหลายครั้งพร้อมได้มีการสืบหาสาเหตุของโรคพบว่าเกิดจากเชื้อ Infectious bronchitis virus ในการวินิจฉัยยืนยันโรคใช้วิธี Neutralization test ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ Immune serum จากห้องปฏิบัติการ Dr.Salsbury และกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา ขณะนั้นมีการค้นคว้าเอกสารทางวิชาการต่างประเทศ (Review literature) พบว่ามีเอกสารจำนวน 5 ฉบับ (Chindavanig, 1962) ระบุว่ามีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ โดยวิธีการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ทำกรดัดแปลงคุณสมบัติเชื้อไวรัสที่ก่อโรค จึงเป็นที่มาของการพัฒนาวัคซีนนี้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกโดยที่มิวิจัยพัฒนาวัคซีนประกอบด้วย นายสัตวแพทย์ ปิยะ ชัยสิทธิ์ยุทธพันธ์ นายสัตวแพทย์ พอ จินดาวณิก นายประเสริฐ วิมลสุข และนายเจริญ แก้วทับ โดยทำการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค เตรียมเป็น seed virus ทำโดยใช้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ (S-strain) ทำการผ่านไวรัสลงไปในไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วันบริเวณช่องว่าง allantoic sac ในไข่จำนวน 142 ครั้ง ได้ปริมาณไวรัสมีปริมาณคงที่และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนในไก่อายุ 10 วันจำนวน 42 ตัว พบว่าไก่สร้างภูมิคุ้มกันได้ดียาวนานถึง 3 เดือนโดยเชื้อไวรัสนี้ได้อ่อนกำลังลงไม่ก่อให้เกิดโรคในไก่ (Chindavanig, 1962)

จากการสัมภาษณ์ในปีพ.ศ. 2550 น.สพ.พอ จินดาวณิก อดีตผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ให้ข้อมูลว่า ได้ใช้ไวรัส Passage ที่ 143 เป็นต้นกำเนิดของการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ในช่วงเวลาที่ นายสัตวแพทย์จักร พิชัยณรงค์สงคราม ดำรงตำแหน่งอธิบดีกรมปศุสัตว์และเคยดำรงตำแหน่งเป็นผู้อำนวยการกองเซรัมหรือสทช.ในปัจจุบัน (พอ จินดาวณิก, สัมภาษณ์)

2. การจำแนกคุณลักษณะไวรัสโดยใช้รูปร่างลักษณะ (Morphological Characterization)

จากการศึกษารูปร่างไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่โดยใช้ตัวอย่าง Seed virus ที่เป็น local strain สำหรับผลิตเป็นวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของกรมปศุสัตว์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด TEM ขนาดกำลังขยาย 150,000 เท่า พบไวรัสมีรูปร่างค่อนข้างทรงกลมโดยมีปุ่มหนามยื่นออกมาภายนอก โดยอนุภาคไวรัสมีขนาดประมาณ 60-80 นาโนเมตร แต่ละอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน และจากภาพถ่ายแสดงให้เห็นรูปร่างลักษณะ corona virus โดยที่ไม่พบภาพไวรัสชนิดอื่น (รูปที่ 1)

3. การวิเคราะห์คุณลักษณะ IBV โดยการใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศศาสตร์

3.1 เปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ S1 protein gene

ใช้โปรแกรม BLAST เปรียบเทียบ % Identity ระหว่าง IBV กรมปศุสัตว์และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่จำหน่ายในประเทศไทยรวมถึง IBV สายพันธุ์อื่น พร้อมแสดงผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีน (ตารางที่ 1) จากตารางพบว่าเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนเทียบกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีน IBV H120 และ Ma 5 มากที่สุด 81.26% และมีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ 81.47% และ 81.58% อย่างไรก็ตามถ้าเปรียบเทียบกับเชื้อ IBV สายพันธุ์อื่นจะพบว่ามีความเหมือนของกรดอะมิโนเหมือนกับ IBV LSD/051 มากที่สุด 85.69% และมีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ 87.76%

3.2 แสดง Multiple sequence alignment

จากการเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่าง S1 ของเชื้อ IBV ซึ่งจัดอยู่ใน avian corona virus สปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจำนวน 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนและสายพันธุ์อ้างอิงหรือสายพันธุ์อื่นเมื่อเทียบกับวัคซีนกรมปศุสัตว์ จะพบ% ความเหมือนของกรดอะมิโน (ตารางที่ 1) และลักษณะอื่นๆ ที่สำคัญ (รูปที่ 2) จากรูป พบว่าด้านปลาย amino terminal (N-terminal) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของกรดอะมิโนหรือนิวคลีโอไทด์สูงมากพบกรดอะมิโน Methionine (M) ทำหน้าที่เป็น Translation initiation codon เมื่อนับลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 24 และ 25 พบว่ามีการขาดหายไปของกรดอะมิโนในเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์และเชื้อ IBV (ลำดับ 4-6) สำหรับกรดอะมิโนด้าน Carboxy terminal (C-terminal) ของเชื้อ IBV แต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวกรดอะมิโนค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved region) โดยเฉพาะบริเวณเชื่อมต่อระหว่าง S1 และ S2 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ตัว (five basic amino acid) คือ arginine-arginine-basic amino acid-arginine-arginine บริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่เอนไซม์ serine proteases ของเซลล์โฮสต์จดจำและตัดพันธะเปปไทด์ (Spike glycoprotein cleavage recognition site) (Cavanagh *et al.*, 1986)

3.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการจำแนกสายพันธุ์ IBV กรมปศุสัตว์โดยการทำ phylogenetic strain classification โดยการนำ S1 gene ของเชื้อ IBV จำนวน 52 สายพันธุ์มาสร้าง tree โดยใช้วิธี character base approach ได้แก่ Maximum likelihood (Jones *et al.*, 1992) (รูปที่ 3) และ distance-base approach ได้แก่ Neighbor-joining approach (Saitou and Nei, 1987) (รูปที่ 4) พบว่า Phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นสามารถจำแนกเชื้อ IBV ออกเป็น 6 genotype 32 lineages โดยใช้เกณฑ์ rules of thumb ถ้านิวคลีโอไทด์ต่างกัน 13% จัดอยู่คนละ lineage ในกรณีต่างกันมากกว่า 30% จัดแยกเป็นอีก genotype นอกจากนี้ lineage ยังถูกกำหนดจากการทำ monophyletic groups จากเชื้อ IBV อย่างน้อยสามสายพันธุ์ ซึ่งเกิดการระบาดอย่างน้อยสองครั้ง (Valastro *et al.*, 2016) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก phylogenetic tree จำนวน 32 lineages นั้นพบลักษณะสำคัญดังนี้ Genotype I ประกอบไปด้วยสมาชิก IBV จำนวนมากที่สุดถึง 27 lineages ส่วน Genotype (II-VI) ที่เหลือมีสมาชิก อย่างละ lineage สำหรับ IBV vaccine strains จัดจำแนกอยู่ที่ Genotype I lineage ที่ 1 (H120, Ma5) และ lineage ที่ 13 (4/91)

สำหรับ IBV กรมปศุสัตว์ถูกจำแนกอยู่ใน Genotype I ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ LSD/051 มากที่สุด (87.76% nucleotide identity และ 85.69% amino acid identity) สำหรับ IBV LSD/051 เป็นไวรัสที่แยกได้ในมณฑลซานตง สาธารณรัฐประชาชนจีน ระหว่างปี 2005-2006 โดยก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจในไก่มากกว่า 37 ฟาร์มซึ่งต่อมาในระยะเวลาสองปีพบว่าไวรัสนี้เกิดกระบวนการ recombination กลายเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่คือ IBV LSD/07-4

นอกจากนี้ IBV กรมปศุสัตว์ยังมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic relationships) ใกล้ชิด รองลงมา กับ IBV CA/1737/04 Genotype I lineage ที่ 25 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากการระบาดในฟาร์ม ไก่เนื้อที่มลรัฐแคลิฟอร์เนียปี 2004 ใน lineage 25 นี้จะประกอบด้วยสมาชิกที่แยกเชื้อได้จากมลรัฐ Delmarva (DMV) ซึ่งสมาชิกที่สำคัญคือ DMV/5642/06

3.4 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน S1

3.4.1 SWISS-MODEL server ซึ่งเป็น web-base service จะทำการค้นหาโครงสร้างสามมิติเพื่อใช้เป็น template จาก The SWISS-MODEL Template Library ซึ่งมีที่มาของโครงสร้างโปรตีน จาก protein data bank (PDB) สำหรับทำ homology modeling พบว่า PDB template ID: 6CV0 (Shang *et al.*, 2018) ถูกเลือกให้เป็นแม่แบบในการสร้างโครงสร้างสามมิติของ S1 IBV กรมปศุสัตว์

3.4.2 ทำการสร้างแบบจำลองสามมิติ (รูปที่ 5)

จากรูป 5 แสดง S1 ประกอบขึ้นด้วย protein domain ต่างๆมีลักษณะและหน้าที่ดังนี้

- 1) บริเวณ N-terminal domain (NTD) มีลักษณะโครงสร้างที่เรียกว่า galectin fold โดยที่โครงสร้างหลักประกอบด้วย 12 β sandwich ซ้อนทับกันเกิด hydrophobic interactions เหนือถัดโครงสร้างหลักขึ้นไปคือโครงสร้าง loop ซึ่งมีลักษณะ partial ceiling ซึ่งใน corona virus แต่ละ genus จะมีลักษณะเฉพาะสามารถใช้บ่งบอกถึงวิวัฒนาการไวรัสกลุ่มนี้ ส่วนโครงสร้างรองได้แก่ alpha helix และ beta sheet จากการศึกษา โดย (Promkuntod *et al.* 2014) พบว่า S1-NTD บริเวณกรดอะมิโนที่ 19-69 ทำหน้าที่จับกับเนื้อเยื่อทางเดินระบบหายใจโดยอาศัย alpha 2,3 sialic acid เป็นตัวรับโดยมีกรดอะมิโน 4 ตำแหน่งที่สำคัญในการยึดเกาะ (ตารางที่ 3)
- 2) บริเวณ C-terminal domain ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 parallel และ 5 antiparalle beta sheet และ extended loop ทำหน้าที่เป็น receptor-binding motifs (RBM) กับ เซลล์โฮสต์
- 3) บริเวณ SD2 เป็นบริเวณที่ต่อกับ S2 และเป็นบริเวณที่ถูก host cell protease Cleave เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Conformation ของโครงสร้างก่อนเกิดการ fusion ของ S2 subunit จากการศึกษาโครงสร้าง S1 protein ของเชื้อ IBV โดยวิธี Cryo-TEM สายพันธุ์ Mass 41 ซึ่งถูกเลือกให้เป็นแม่แบบในการสร้างโครงสร้างโปรตีนสามมิตินี้ได้ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) พบว่าวัคซีนกรมปศุสัตว์มีความคล้ายของกรดอะมิโน (Similarity) ตำแหน่งที่ 43 กับ IBV Mass41 strain และมีความเหมือนของกรดอะมิโน (Identity) ตำแหน่งที่ 63 และ 69 กับวัคซีน H120

3.4.3 ประเมินคุณภาพแบบจำลองโครงสร้างโปรตีนสามมิติที่สร้างขึ้น (รูปที่ 6)

ทำการประเมินความถูกต้องของแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยค่า QMEAN Z scores ประกอบไปด้วย

- 1) QMENDisCo global หรือ QMEAN distance constraints Global เป็นการประเมินคุณภาพแบบจำลองโดยรวมโดยประเมินเป็นค่าตัวเลขระหว่าง 0 และ 1 ถ้าได้เกิน 0.5 ถือว่าดีโดยเฉพาะแบบจำลองที่มีการเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่าง template และ target ครอบคลุมได้เพียง 50 % ภาพรวม QMEANDisCo ซึ่งแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า 0.78 \pm 0.05 (รูป 6ก)

- 2) QMEANDisCo Local หรือ QMEAN distance constraints Local เป็นการประเมินคุณภาพแบบจำลองโดย plot กรดอะมิโนในแบบจำลองแต่ละตัวเทียบความคล้ายกับโครงสร้าง native structure ของ template ประเมินเป็นค่าคะแนนออกมา ค่าคะแนนที่ได้จากกรดอะมิโนแต่ละตัว ค่า >0.6 ถือว่าดี (รูป 6ข)
- 3) QMEAN Z-score (รูป 6ก และ 6ง) ประกอบด้วย QMEAN (รูป 6ก) เป็นค่าคะแนนรวม (composite score) ควรจะมีค่า >-4 ซึ่งประกอบด้วยค่า
 - $C\beta$ เป็นค่าที่ประเมินคู่ carbon atom ตำแหน่ง beta ในกรดอะมิโนที่เกิดแรงปฏิสัมพันธ์ ในขณะที่ folding พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า -2.34
 - All atom เป็นค่า pairwise interaction ของอะตอมอื่นเช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และคาร์บอนที่ไม่ใช่ $C\beta$ พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า -3.39
 - Solvation ค่าที่บ่งถึงความสามารถในการเข้าถึงตัวทำละลายในที่นี้หมายถึงกรดอะมิโนที่ expose หรือ buried ที่จัดเรียงตัวกันในโครงสร้างสามมิติ พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่า -4.19
 - Torsion หรือ dihedral angle เป็นค่าที่วัดมุม psi และ phi ที่เกิดจากการนำเอากรดอะมิโน 3 ตัวที่เรียงต่อกันในโครงสร้างสามมิติซึ่งต้องมีพิคัดที่เหมาะสมถูกต้อง พบว่าแบบจำลองมีค่า -2.86
 - Ramachandran plot (รูป 6ค) ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของพิคัดกรดอะมิโนของ IBV กรมปศุสัตว์แต่ละจุดคือกรดอะมิโนหนึ่งตัวซึ่งถูกจัดเรียงแต่ละ Quadrant ตามมุม Psi และ Phi บ่งบอกถึงโครงสร้าง alpha helix, Beta sheet พบว่าแบบจำลองมีตำแหน่งพิคัดและโครงสร้างของกรดอะมิโนถูกต้อง 88.54%
 - QMAEN4 score (รูป 6ง) เป็นค่าที่บอกถึงความเบี่ยงเบนจากค่ามาตรฐานของแบบจำลองว่ามากน้อยเพียงใดเมื่อเทียบกับโครงสร้างโปรตีนทั้งหมดซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล protein data bank จำนวน 9,766 ชนิดที่ทราบโครงสร้างแท้จริงโดยแกน X แสดงความยาวของกรดอะมิโนที่สร้างขึ้นในแบบจำลองโปรตีนสามมิติ แกน Y แทนค่าคะแนน QMEAN แต่ละจุดเป็นตัวแทนของหนึ่งโปรตีนที่ทราบโครงสร้างที่ถูกต้องได้จากการทดลองแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยจุดสีดำ เทา เทาจาง เรียงลำดับเบี่ยงเบนจากน้อยไปมาก เครื่องหมายดาวสีแดงคือค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย (Mean) ของแบบจำลองที่สร้างขึ้น พบว่าแบบจำลองมีค่า $1 < Z\text{-score} < 2$

4. ระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์เชื้อ IBV

ณ ปัจจุบันยังไม่มีข้อตกลงที่เป็นที่ยอมรับเป็นทางการในระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์ IBV (Jackwood and De Wit, 2020) อย่างไรก็ตามนักวิชาการส่วนใหญ่ยอมรับและตั้งชื่อสายพันธุ์ IBV ตามข้อเสนอของศาสตราจารย์ Dave Cavanagh สหราชอาณาจักร ในปี 2001 (Cavanagh, 2001) ซึ่งการตั้งชื่อตามข้อกำหนดดังนี้

IBV/ชนิดสัตว์ปีกที่พบ/ประเทศกำเนิด/การจำแนกตามข้อมูลทางพันธุกรรมหรือทางซีรัมวิทยา/กำหนดชื่อสายพันธุ์/ปีที่ทำการแยก ตัวอย่างเช่น IBV/CH/US/GI-9, Ark/ArkDPI/81 อย่างไรก็ตามไวรัสที่พบในไก่จะไม่นิยมระบุค่าเรียก ดังนั้นชื่อเรียกจึงเป็น US GI-9 หรือ US ArkDPI/81

ดังนั้นการตั้งชื่อ IBV กรมปศุสัตว์ตามข้อตกลงควรจะเป็น IBV/CH/TH/GI-25, DLD/S/54 หรือย่อเหลือ TH/GI-25, DLD/S/54

วิจารณ์

การทราบประวัติที่มาและการจำแนกคุณลักษณะตลอดจนการทราบเชื้อสายพันธุ์ไวรัสมีความจำเป็นและสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะไวรัสที่ใช้เป็นสายพันธุ์ในการผลิตวัคซีน เป็นที่น่าภูมิใจและควรยกย่องในความรู้ความสามารถของนักวิชาการไทยในรุ่นบุกเบิกที่วิจัยและทำ attenuation ลดความรุนแรงในการก่อโรคเชื้อ IBV จนสามารถใช้เป็นต้นต่อไวรัส สำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (seed vaccine) ช่วยลดการสูญเสีย และประหยัดเงินตราในการนำเข้าวัคซีนจากต่างประเทศไม่น้อยกว่าพันล้านบาทต่อปี นับจากวันที่ 21 พฤษภาคม 2500 ที่มีพระราชกฤษฎีกาจัดระเบียบบริหารกรมปศุสัตว์มีการจัดตั้งแผนกไวรัสวัคซีนโดยมีนายประกอบ จินตกานนท์ เป็นหัวหน้าแผนก นับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นการผลิตวัคซีน IBV ในระดับอุตสาหกรรมขึ้นใช้ในประเทศ ตลอดระยะเวลาอันยาวนานกว่า 60 ปีที่มีการใช้สายพันธุ์ไวรัสท้องถิ่นผลิตวัคซีนป้องกันโรคบ่งบอกถึงระยะเวลาที่เก่าและยาวนาน แต่อย่างไรก็ตามเป็นความเก่าที่ทรงคุณค่ามีคุณภาพของวัคซีนสำหรับใช้ป้องกันโรคระบาด (คณิตาและนพคุณ, 2563) บ่งบอกได้จากการศึกษาคุณลักษณะต่างๆของเชื้อ โดยการศึกษารูปลักษณะและขนาดไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายภาพขนาดสูงทำให้ทราบว่าเชื้อ seed IBV กรมปศุสัตว์มีขนาด 60-80 นาโนเมตรโดยมีรูปร่างทรงกลมอยู่ในกลุ่ม Envelope virus ซึ่งมีปุ่มหนาม S protein ยื่นออกมานอกอนุภาคทำให้ระบุได้ว่าเป็น corona virus และจากการที่ปรากฏลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและขนาดสม่ำเสมอทำให้ทราบได้ว่าการแยกเชื้อและการพัฒนา seed ในช่วงเริ่มต้นนั้นสามารถแยกและเตรียมเชื้อได้บริสุทธิ์ (seed purity) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลด้านการควบคุมคุณภาพวัคซีนในปัจจุบันที่กำหนดให้ต้องมีการทดสอบไวรัสชนิดอื่นปนเปื้อนโดยการฉีด seed vaccine ความเข้มข้น 100 เท่าในไก่ปลอดเชื้อ specific pathogen free แล้วตรวจไวรัสปนเปื้อนโดยวิธี ELISA (Biocheck, IDEXX testkit) ซึ่งไม่พบแอนติบอดีไวรัสอื่นจำนวน 18 ชนิดปนเปื้อนอยู่ใน seed vaccine (OIE, 2018)

จากข้อมูลและความรู้ชีวสารสนเทศศาสตร์ซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์ที่ใช้เทคโนโลยีสารสนเทศและวิทยาศาสตร์คอมพิวเตอร์มาบูรณาการเข้ากับชีววิทยาโมเลกุล ถูกนำมาใช้ค้นคว้าข้อมูลใน GenBank โดยการทำ BLAST search พบว่าเชื้อ IBV กรมปศุสัตว์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนเทียบกับเชื้อ IBV H120 และ Ma 5 มากที่สุด 81.26% ซึ่งค่าความเหมือนของกรดอะมิโนใน S1 โพรตีนนี้สามารถใช้ทำนาย Cross-protection เชื้อ IBV ในแต่ละ Genotype หรือ Serotype ได้ (Ladman *et al.*, 2006) โดยที่ระดับความเหมือนของกรดอะมิโน 80-89% จะมีความสัมพันธ์กับการ Neutralizing virus ได้มากกว่า 41.7 % (Shimazaki *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย คณิตาและนพคุณ (2563) ที่พบว่าวัคซีน IBV กรมปศุสัตว์มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่แตกต่างจากวัคซีน IBV สเตรน H120

ในการทำ Multiple sequence alignment พบว่า IBV กรมปศุสัตว์มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตำแหน่งเดียวกับ IBV สายพันธุ์ LSD/051 และสายพันธุ์ DMV/5642/06, CA1737 จากเชื้อที่ระบอบทางทวีปอเมริกาทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประเทศไทยได้มีการนำไก่ Rhode island red มาทดลองเลี้ยงในประเทศตั้งแต่นั้นปี พ.ศ. 2492 และได้มีการนำเข้าพันธุ์ไก่เนื้อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศอย่างจริงจังในปีพ.ศ. 2510 (วัชรพงษ์, 2561) เมื่อพิจารณาตำแหน่ง Spike protein cleavage recognition site ของ IBV กรมปศุสัตว์คือ RRSRR จะเหมือนเชื้อ IBV ทางทวีปอเมริกา ซึ่งรูปแบบชนิดของกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่ง Cleavage site นี้จะอนุรักษ์และบ่งบอกถึงความเก่าแก่ของสายพันธุ์และมี correlation กับ geographic regions (Jackwood *et al.*, 2001)

จากการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโน (nucleotide or amino acid substitutions) ในแต่ละยีนหรือในจีโนมมีค่าค่อนข้างที่จะคงที่นำไปสู่การนำเอาข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Phylogenetic relationships) ในระดับต่างๆได้แก่ ระดับสิ่งมีชีวิตต่างชนิด (คน ชะนี อูรังอุตัง ไพรเมท) หรือในระดับอนุกรมวิธาน (genus, species) ไปจนถึงระดับต่ำกว่า species (strain classification)

โดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าข้อมูลของสารมหโมเลกุล (Macro molecule) ให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเทียบเคียงได้กับข้อมูลที่มาจกสัณฐานวิทยา (ศราวุธ, 2544) เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและทำ Phylogenetic analysis ของ S1 gene พบว่าให้ข้อมูลที่สำคัญในด้านระบาดวิทยาโดยที่การระบาดของไวรัส IBV นั้นมีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับ IBV vaccine strain ซึ่งสาเหตุเกิดการ breakthrough vaccine ยังต้องสอบสวนหาสาเหตุแท้จริงต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ สิ่งที่ถูกบันทึกกันไปทั่วโลกคือการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนกำลังควบคุมการระบาด สิ่งที่น่าประหลาดตามาคือโรคสงบลงชั่วคราว ในเวลาต่อมาไม่นานก็จะพบการระบาดรอบใหม่ซึ่งพบว่าเชื้อที่ระบาดใหม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์วัคซีน สถานการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการแยกไวรัสที่ได้จากการระบาดในพื้นที่ประเทศไทยพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการใช้วัคซีน (IBV Prachinburi, THA241251/Mass, Petchabun) ในกรณี QX IBV ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วประเทศ ซึ่งปัจจุบันนี้ประเทศไทยพบการระบาดในฝูงไก่สายพันธุ์ QX เป็นส่วนใหญ่ (Dominant strain) (Saraburi Isolated, THA80151 Group II) (Munyahongse *et al.*, 2020) (รูปที่ 3, 4)

ในส่วนของงานวิจัยตั้งแต่ต้นกำเนิดและวิวัฒนาการเชื้อ IBV วัคซีนกรมปศุสัตว์ให้ถูกต้องแน่ชัดควรจะได้มีการหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมจากยีนอื่นเช่น N หรือ RNA polymerase gene หรืออาจวิเคราะห์ทุกยีน (Whole genome sequencing) จากการที่ IBV กรมปศุสัตว์มี genetic relationships กับเชื้อ IBV genotype I lineage 25 จำเป็นต้องทดสอบ serum neutralization หรือ challenge test เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพในการคุ้มโรคต่อเชื้อกลุ่มนี้ ในการสร้าง phylogenetic tree ครั้งนี้ใช้ maximum likelihood ซึ่งเป็น robust method ร่วมกับวิธี Neighbor-joining โดยมีค่า bootstrap เป็นตัวประเมินความเชื่อมั่น phylogenetic tree โดยถือว่ามีความน่าเชื่อถือที่ค่า 70 % (Hills and Bull, 1993) พบว่า IBV กรมปศุสัตว์มีค่า bootstrap value สูงถึง 98-100 % ซึ่งสนับสนุนรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างขึ้น

การทราบโครงสร้างสามมิติทำให้ทราบรายละเอียดหน้าที่การทำงานโปรตีนอย่างถูกต้องชัดเจน ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาโครงสร้างสามมิติ S1 IBV เพียงโครงสร้างเดียว (Shang *et al.*, 2018) งานวิจัยนี้จึงสร้างและทำนายโครงสร้างสามมิติโปรตีน S1 IBV กรมปศุสัตว์ ซึ่งการทำนายโครงสร้างสามมิติ (Prediction of 3D structure) สามารถกระทำได้สามวิธีได้แก่การทำนายโครงสร้างจากคุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์โดยตรงไม่ต้องอาศัยโครงสร้างโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกันในฐานะข้อมูลต่างๆ ที่เรียกว่า ab initio methods ซึ่งมีข้อจำกัดคือใช้เวลานาน และพบความผิดพลาดเกิดขึ้นบ่อย วิธีที่สองจะทำนายโครงสร้างจากการม้วนพับที่เรียกว่า threading methods วิธีนี้ใช้ทำนายโครงสร้างโปรตีนในกรณีที่มีหลายโครงสร้างแม่แบบที่คล้ายคลึงกับโครงสร้างที่ต้องการสร้างวิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องทราบ folding topology และในกรณีเกิดช่องว่าง (Gaps) ในระหว่างการ alignment จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการทำนาย วิธีสุดท้าย Homology modeling ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุดในปัจจุบันเนื่องจากผลการทำนายมีความถูกต้องสูง (Xu *et al.*, 2000; Studer *et al.*, 2021)

ในการประเมินคุณภาพโครงสร้างสามมิติของ Spike protein S1 ของ IBV กรมปศุสัตว์ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี homology modeling โดยภาพรวมถือว่ามีความถูกต้อง (accuracy) ดีมีค่าคะแนน QMEANDisCo Global 0.78 +/- 0.05 มีค่า $1 < Z \text{ score} < 2$ อย่างไรก็ตามพบว่ามีค่า QMEAN -4.78 ซึ่งน้อยกว่า -4.0 ทั้งนี้เนื่องจากธรรมชาติของ Spike protein เป็น membrane protein ซึ่งมีคุณลักษณะทางเคมี-ฟิสิกส์ที่แตกต่างจาก Soluble protein เช่น โลโซไซม์ทำให้การทำนายโครงสร้างได้คะแนนต่ำหรืออีกนัยหนึ่งคือมีความถูกต้องน้อยมีความเบี่ยงเบนมากกว่าค่ามาตรฐาน (Benkert *et al.*, 2011) จากโครงสร้างสามมิติในภาพ 5x พบว่าวัคซีนกรมปศุสัตว์มีความคล้ายของกรดอะมิโน (Similarity) ตำแหน่งที่ 43 กับ IBV Mass41 strain และมีความเหมือนของกรดอะมิโน (Identity) ตำแหน่งที่ 63 และ 69 กับวัคซีน H120 ซึ่งความเหมือนและคล้ายนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดความรุนแรงจาก wild type strain ลงเป็น attenuated strain นอกจากนี้ผลการศึกษารายละเอียดของยีน S1

หรือ โครงสร้างสามมิติ S1 protein ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการสร้างเวกเตอร์วัคซีนหรือวัคซีนรูปแบบอื่นเช่น mRNA vaccine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนในการป้องกันโรค

ในการตั้งชื่อ IBV ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม gamma corona virus ยังไม่มีหน่วยงานสากลรับเป็นผู้กำหนดหลักเกณฑ์ในการตั้งชื่อ หน่วยงาน International committee on Taxonomy of Virus ทำการตั้งชื่อไวรัสในระดับ species ขึ้นไป (ICTV code, 2018) ในกรณีการตั้งชื่อ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็น beta corona virus WHO เป็นผู้กำหนดในการเรียกชื่อแต่ในกรณีของ variant ระบบการตั้งชื่อสายพันธุ์ (genetic lineages) จะใช้ 3 ระบบ คือ GISAID, Nexstrian, Pango (Konings *et al.*, 2021) เช่น สายพันธุ์ Delta ซึ่งจัดเป็น variant of concern ระบบการตั้งชื่อของ GISAID คือ G/452R.V3 ระบบ Nexstrian คือ 21A/S:478K ระบบ Pango คือ B.1.617.2

ดังนั้นจากเดิมการเรียกชื่อสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กรมปศุสัตว์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นว่า DLD หรือ S strain (ศักดิ์ชัยและคณะ, 2528) เพื่อความเข้าใจและยอมรับในระบบการตั้งชื่อสากล ควรใช้ชื่อ IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54) ควบคู่กันไป

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสืบค้นประวัติต้นตอไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ใช้ผลิตวัคซีนกรมปศุสัตว์ และได้ทำการจำแนกตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและข้อมูลชีวสารสนเทศศาสตร์ พร้อมได้ตั้งชื่อสายพันธุ์ไวรัสชนิดนี้เป็น IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54) เพื่อใช้ประโยชน์ในการขึ้นทะเบียนและเพื่อความ เป็นสากลและบ่งบอกรายละเอียดของความเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Anun yuenyongolan Regional Manager IDEXX laboratories Co., Ltd ที่ได้ให้ข้อมูล วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ strain ต่างๆที่จำหน่ายในประเทศไทย ขอคุณรศ.สพ.ญ.ดร.กรรณาภรณ์ สุริยผล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทีมอบเอกสารอ้างอิงประกอบการเขียนรายงานฉบับเต็ม นายสัตวแพทย์ ดร. แอบ คงทน ที่ประสานงานในการสัมภาษณ์ นายสัตวแพทย์ พอ จินดาวงศ์ ผู้พัฒนา Seed IBV และ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์พร้อมด้วยเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

คณิตา ภาสะฐิติ และ นพคุณ มูลสิน 2563 เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 29(1-2): 57-67
วัชรพงษ์ วัฒนกุล 2561 การผลิตสัตว์ปีก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี
ศิริราชู กลิ่นบุหงา 2544 Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ในชีวสารสนเทศศาสตร์ ฝ่ายนิเทศสัมพันธ์ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ หน้า149-171
ศักดิ์ชัย หิมะทองคำ สุณีย์ หิมะทองคำ และสละ กองสมัคร 2528 การแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดไตบวมจากรายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ครั้งที่ 12 ของสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย (2-4 ธันวาคม 2528)
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2562 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ หจก. วนิดาการพิมพ์กรุงเทพฯ หน้า 14

- ASEAN Secretariat. 2018. ASEAN standard requirements for infectious bronchitis vaccine, Live. *In* Manual of ASEAN standard for animal vaccine, Livestock publication series No. 2A, 3rd ed. Hanoi, Vietnam. pp. 3-5.
- Benkert, P., Biasini, M. and Schwede T. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *bioinformatics*. 27: 343-350.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Bournsnel, M.E. and Brown, T.D. 1986. Corona IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res*. 4: 133-143.
- Cavanagh, D. 2001. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian Pathol*. 30: 109-115.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res*. 38: 281-297.
- Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. *J.Thai Vet. Med. Assoc*. 12: 1-7.
- Hills, D.M. and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol*. 42: 182-192.
- ICTV Code: the International Code of Virus Classification and Nomenclature. 2018. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV).
- Jackwood, M. W. 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis*. 56: 634-641.
- Jackwood, M.W. and De Wit, S. 2020. Infectious Bronchitis. *In* : David E. Swayne, chief editors. *Diseases of Poultry*. 14. UK: Wiley-Blackwell. pp. 167-188.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H. and Wade, E. 2001. Spike Glycoprotein Cleavage Recognition Site Analysis of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Diseases*. 45: 366-372.
- Jones, D.T., Taylor W.R. and Thornton. J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. 8: 275-282.
- Konings, F., Perkins, M.D. Kuhn, J.H., Pallen, M.J., Alm, E.J., Archer, B.N., Barakat, A., Bedford, T., Bhiman, J.N., Caly, L., Carter, L.L., Cullinane, A., Oliveira, T.D., Druce J., Masry I.E., Evans, R., Gao, G.F., Gorbalenya, A.E., Hamblion, E., Herring, B.L., Hodcroft, E., Holmes, E.C., Kakkar, M., Khare, S., Koopmans, M.P.G., Korber, B., Leite, J., MacCannell, D., Marklewitz, M., Maurer-Stroh, S., Rico, J.A.M., Munster, V.J., Ziebuhr, J. and Kerkhove, M.D.V. 2021. SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. *Nature Microbiology*. 6: 821-823.
- Ladman, B.S., Loupos, A.B. and Gelb, J.Jr. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol*. 35: 127-133.
- Lalchandama, k. 2020. The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. *Science vision*. 78-92.

- Lontok, E., Corse, E. and Machamer, C.E. 2004. Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. *Journal of virology*. 78(11): 5913-5922.
- Munyahongse, S., Pohuang, T., Nonthabenjawan, N., Sasipreeyajan, J. and Thontiravong, A. Genetic characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014-2016 : identification of a novel recombinant variant. 2020. *Poultry Science*. 99: 1888-1895.
- Office International des Epizooties, OIE. 2018. Avian infectious bronchitis. In manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.2 . pp. 1-14.
- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: identification of natural recombination in the field isolates. *Virus Genes*. 43: 254-260.
- Promkuntod, N., Eijndhoven, R.E.W.V., Vrieze, G.D., Grone, A. and Verheije, M.H. 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*. 448: 26-32.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 7: 95-99.
- Saitou, N. and Nei, N. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Schalk, A.F. and Hawn, M.C. 1931. An apparent new respiratory disease of baby chicks. *J. AM. Vet Med. Assoc*. 78: 413-422.
- Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu C., Geng, Q., Luo, C., Zhang, W. and Li, F. 2018. Cryo-EM structure of the infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins. *PLOS Pathogens*. 1-19.
- Shimazaki, Y., Harada, M., Horiuchi, T., Yoshida, K., Tanimura, C., Nakamura, S., Mase, M. and Suzuki, S. 2009. Serological Studies of Infectious Bronchitis Vaccines against Japanese Field Isolates of Homologous and Heterologous Genotypes. *J. Vet. Met. Sci*. 71 (7): 891-896.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, R., Haas, J. and Schwede, T. 2020. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*. 36(6): 1765-1771.
- Studer, G., Tauriello G., Bienert S., Biasini M., Johner N. and Schwede T. 2021. ProMod3-A versatile homology modelling toolbox *PLOS Computational Biology*: 1-18.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice, *Nucl. Acids Res*. 22: 4673-4680.

- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G. and Monne, I. 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39: 349-364.
- Xu, D., Xu Y. and Uberbacher EC. 2000. Computational tool for protein modeling. *Current Protein and Peptide Science.* 1: 1-21.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ % ความเหมือนของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ระหว่าง IBV กรมปศุสัตว์กับ IBV สายพันธุ์อื่น

สายพันธุ์ (vaccine strain)	% กรดอะมิโน (545 aa)	% นิวคลีโอไทด์ (1,635 nt)	NI
IBV DLD : Mass41	80.47	81.65	N/A
IBV DLD : H120	81.26	81.47	3.49:2.63
IBV DLD : Ma5	81.26	81.58	N/A
IBV DLD : 4/91	74.77	77.9	N/A
IBV DLD : QX	80.37	81.78	N/A
สายพันธุ์อื่น (other strain)			
IBV DLD : LSD/051	85.69	87.76	N/A
IBV DLD : LSD/07-4	84.94	86.67	N/A
IBV DLD : CA/1737/04	80.89	83.12	N/A
IBV DLD :DMV5642/06	80.34	83.28	N/A
IBV DLD:THA90151Group1	79.59	81.12	N/A
IBVDLD : IBV Chonburi	78.72	81.18	N/A
จีโนมอื่น			N/A
IBV DLD : SARS-CoV-2	28.81	3.12	N/A

หมายเหตุ ค่า Neutralization index (NI) มากกว่า 2.00 ถือว่าให้ความคุ้มโรค (ASEAN, 2018; OIE, 2018)

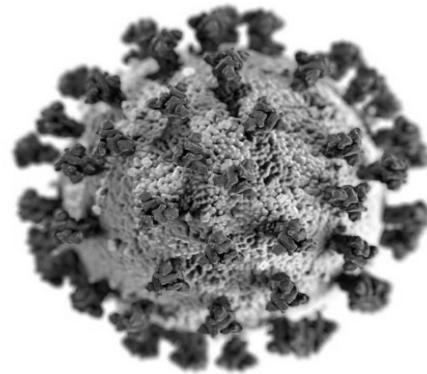
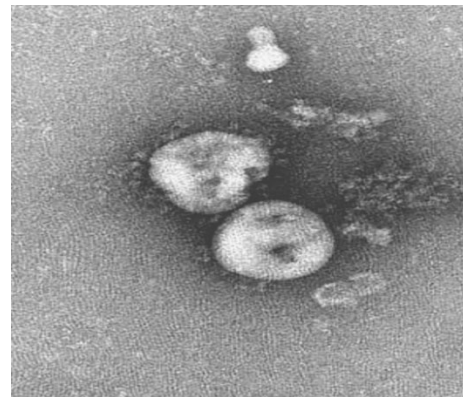
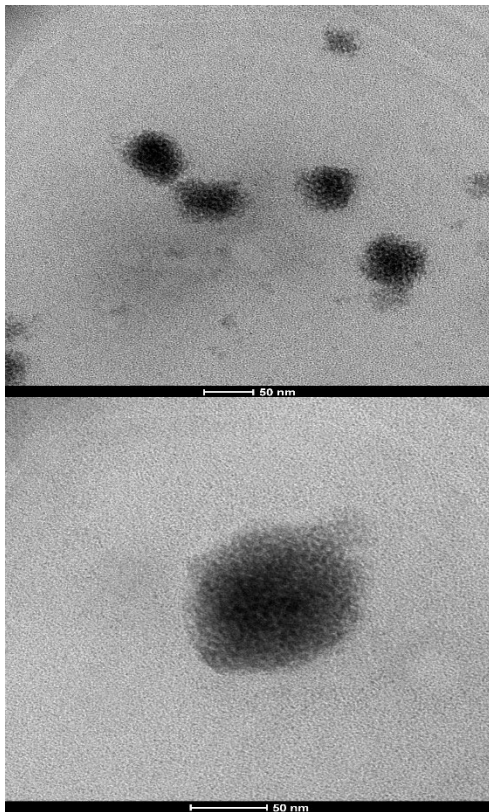
N/A หมายถึงไม่มีข้อมูลการศึกษา

ตารางที่ 2 เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สายพันธุ์อ้างอิงจำแนกเป็น 6 genotype และ 32 lineages (Valastro *et al.*, 2016)

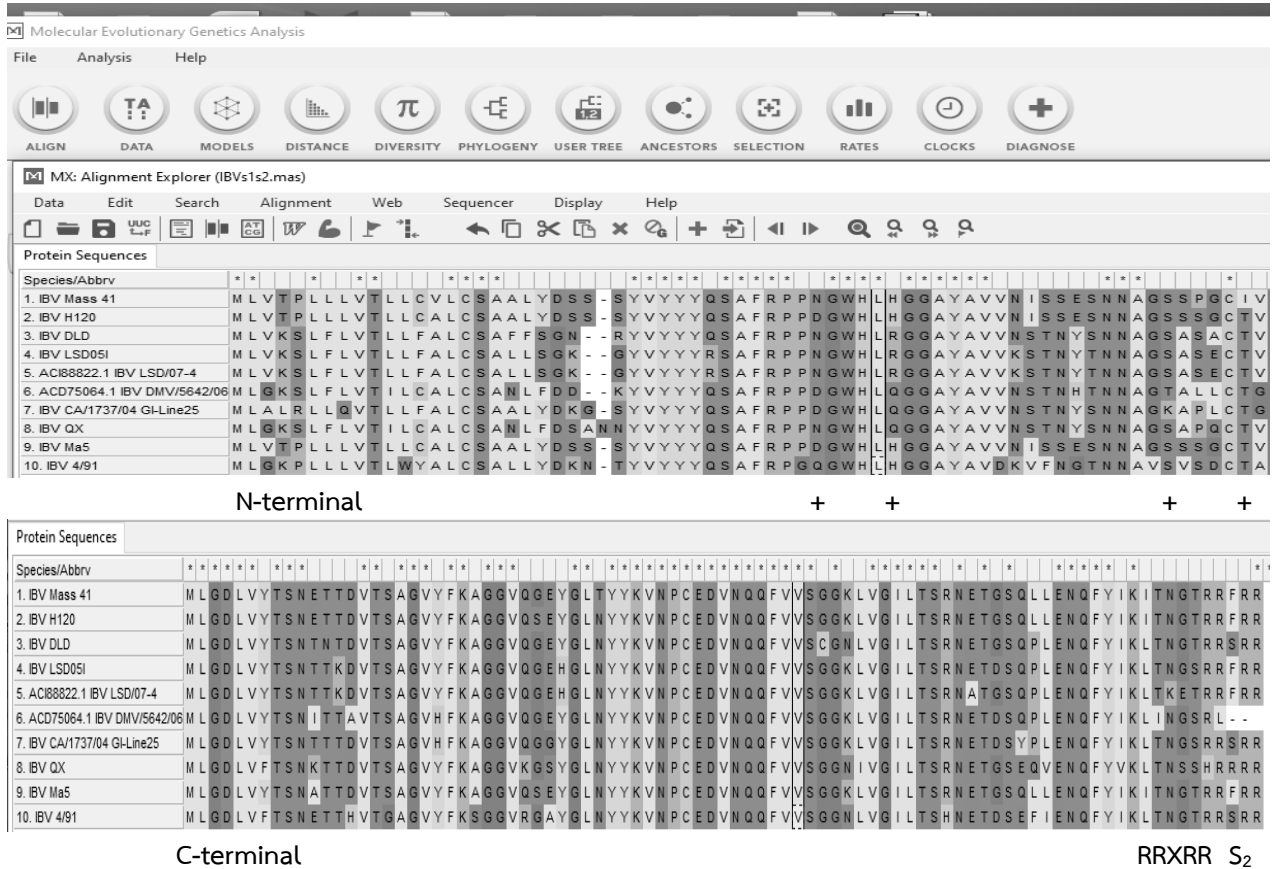
Lineage	Reference strains		
	Strain name	Country of origin	GenBank acc. Number
GI-1	Beaudette	USA	M95169
GI-2	Holte	USA	GU393336
GI-3	Gray	USA	L14069
GI-4	Holte	USA	L18988
GI-5	N1/62	Australia	U29522
GI-6	VicS	Australia	U29519
GI-7	TP/64	Taiwan	AY606320
GI-8	L165	USA	JQ964061
GI-9	ARK99	USA	M99482
GI-10	B	New Zealand	AF151954
GI-11	UFMG/G	Brazil	JX182775
GI-12	D3896	The Netherlands	X52084
GI-13	Moroccan-G/83	Morocco	EU914938
GI-14	B1648	Belgium	X87238
GI-15	B4	Korea	FJ807932
GI-16	IZO 28/86	Italy	KJ941019
GI-17	CA/Machado/88	USA	AF419315
GI-18	JP8127	Japan	AY296744
GI-19	58HeN-93II	China	KC577395
GI-20	Qu_mv	Canada	AF349621
GI-21	Spain/97/314	Spain	DQ064806
GI-22	40GDGZ-97I	China	KC577382
GI-23	Variant2	Israel	AF093796
GI-24	V13	India	KF757447
GI-25	CA/1737/04	USA	EU925393
GI-26	NGA/B401/2006	Nigeria	FN182243
GI-27	GA08	USA	GU301925
GII-1	D1466	The Netherlands	M21971
GIII-1	N1/88	Australia	U29450
GIV-1	DE/072/92	USA	U77298
GV-1	N4/02	Australia	DQ059618
GVI-1	TC07-2	China	GQ265948

ตารางที่ 3 ตำแหน่งและชนิดกรดอะมิโนที่จำเป็น (Critical amino acid) ในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจไก่
 N=Asparagine D=Aspartic acid H=Histidine R=Arginine P=Proline S=Serine
 T=Threonine I=Isoleucine

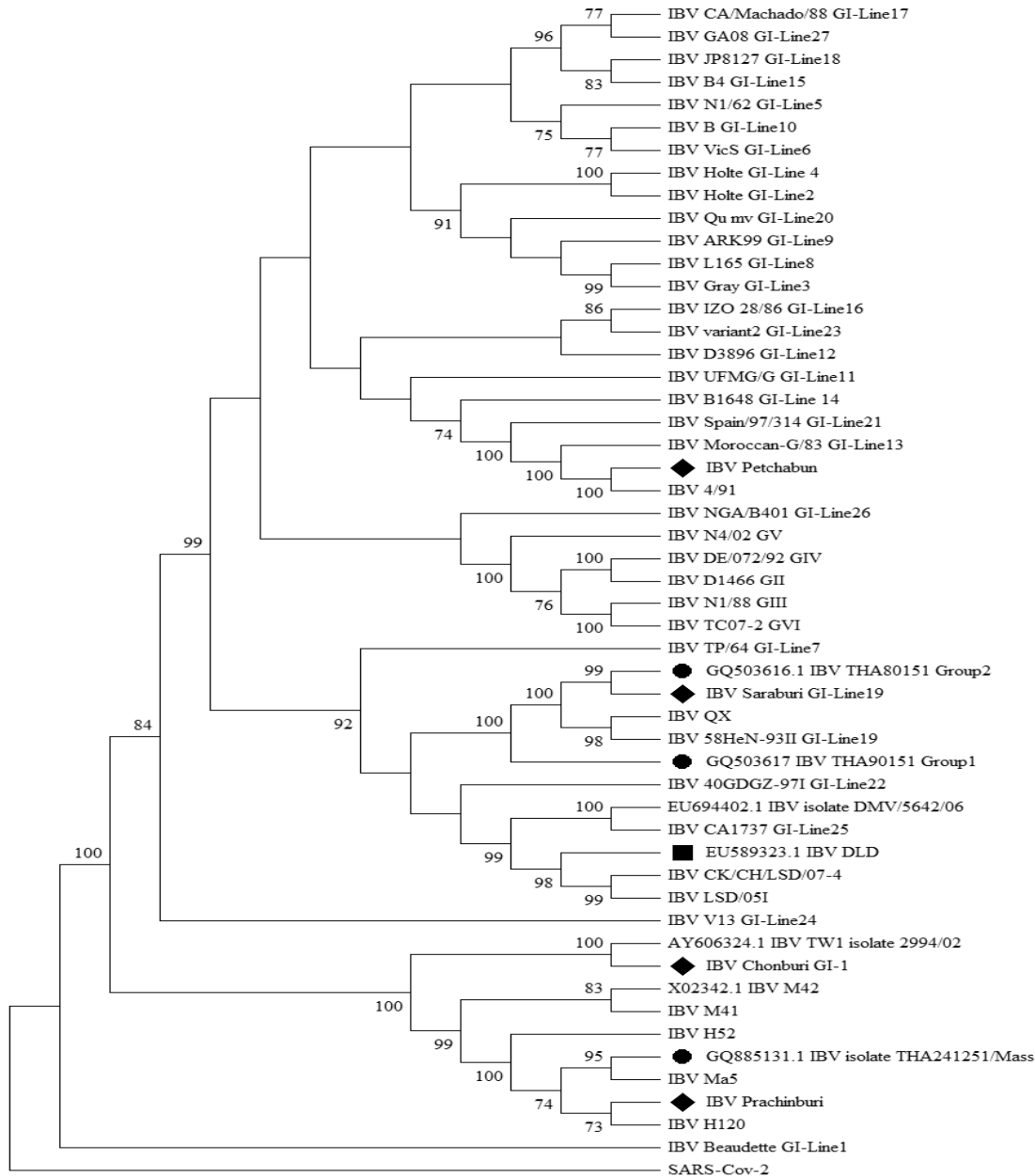
สายพันธุ์/ตำแหน่ง/ ชนิดกรดอะมิโน	aa38	aa43	aa63	aa69
Mass 41	N	H	P	T
H120	D	H	S	I
DLD	N	R	S	I



- รูปที่ 1** ภาพถ่ายด้วยกล้อง TEM แสดงอนุภาค Corona virus ขนาดกำลังขยาย 150,000 เท่า
- Seed IBV กรมปศุสัตว์รูปร่างทรงกลมไวรัสแต่ละอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน
 - Corona virus แสดงลักษณะรูปร่าง pleomorphic appearance
 - Seed IBV กรมปศุสัตว์ แสดงให้เห็นปุ่มหนามยื่นออกมาภายนอก lipid bilayer membrane
 - แบบจำลองอธิบายโครงสร้างภายนอก Corona virus แสดงปุ่มหนามที่ยื่น S protein พื้นที่ทรงกลมเทาคือ lipid bilayer membrane



รูปที่ 2 ลำดับกรดอะมิโน S protein ของวัคซีนหลอดลมอักเสบสายพันธุ์ต่างๆ (1-10) ทางด้าน N-terminal เป็นบริเวณที่มีความแปรผันของกรดอะมิโนสูงมาก (เครื่องหมาย+) C-terminal เป็นบริเวณที่กรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไม่เปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะบริเวณ Cleavage site (RRXRR: X= F, S) S₂ คือบริเวณตั้งต้นของ S protein subunit 2
 ตัวอักษรในแถบสีคือตัวย่อของกรดอะมิโนเช่น R = arginine, F =Phenylalanine, S=Serine
 - คือกรดอะมิโนที่ขาดหายไปเนื่องจากกระบวนการ gene deletion

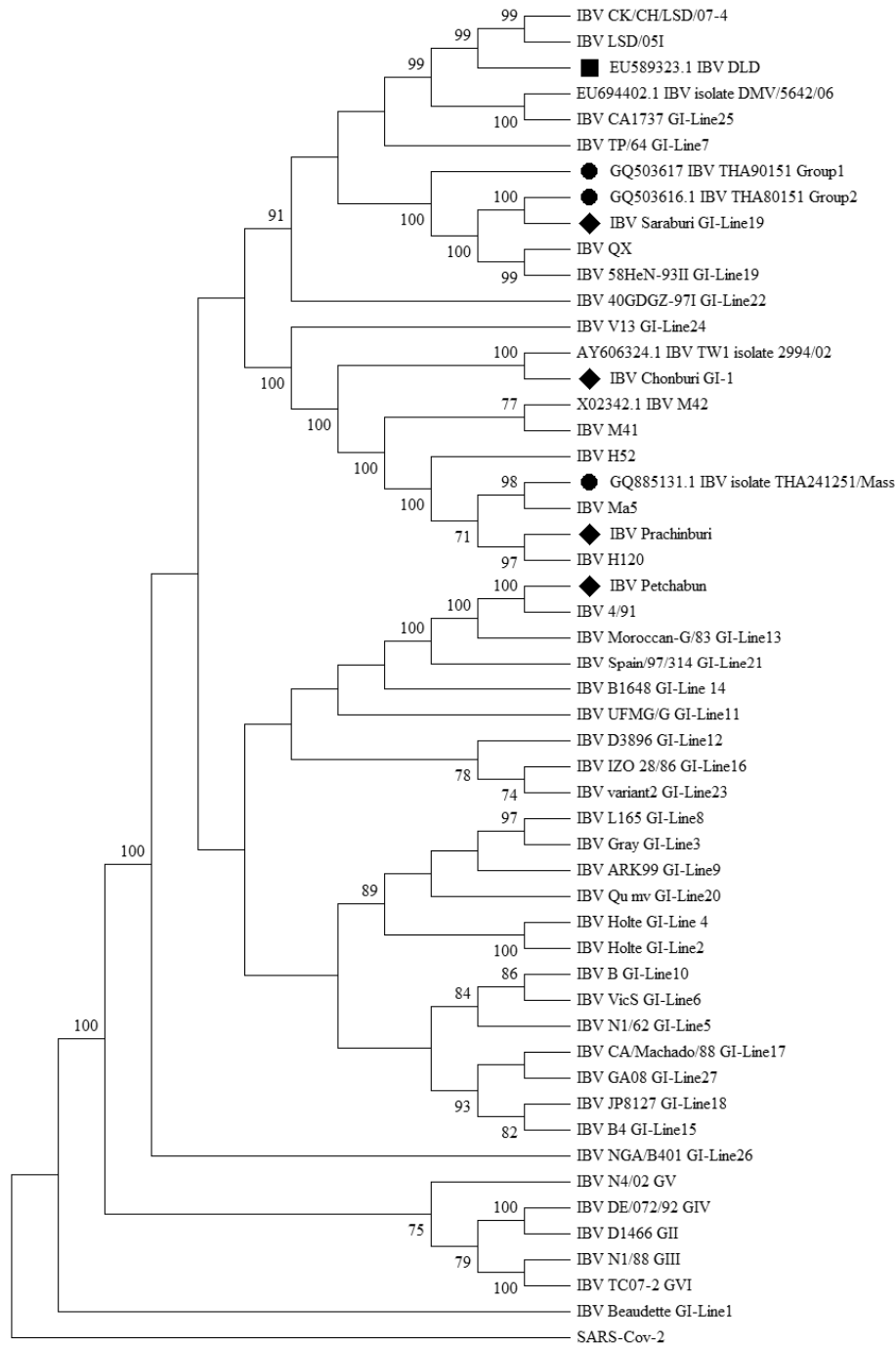


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ complete S1 gene ระหว่างไวรัสวัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของกรมปศุสัตว์และ IBV reference strains, 7 Thai IBVs isolated. สร้างโดยโปรแกรม MEGA v.6.0 โดยใช้ the maximum likelihood method; GTR+G+I model, 1,000 bootstrap replicates โดยแสดงผลค่าbootstrap ด้วยตัวเลขตั้งแต่ 70

■ วัคซีนกรมปศุสัตว์ (EU589323.1 DLD)

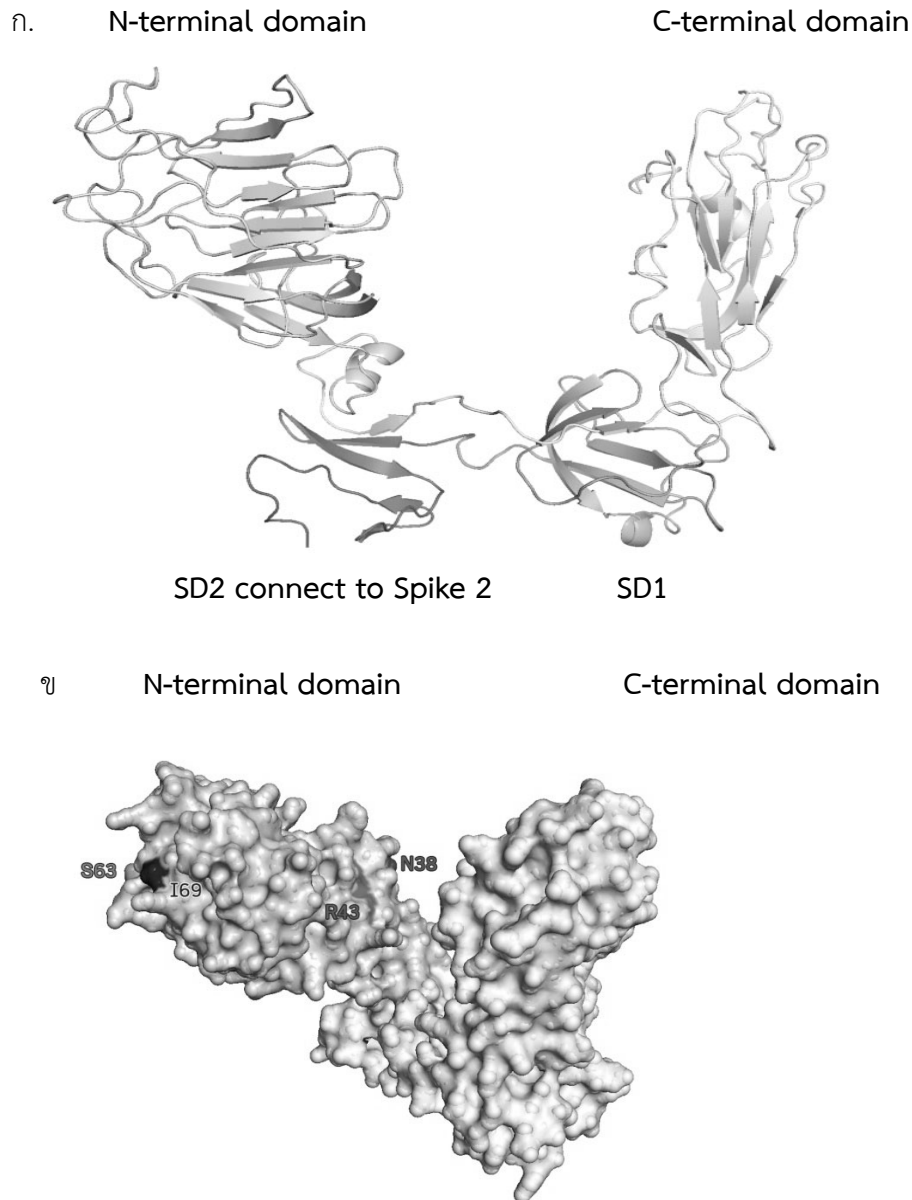
● IBV 3 Thai isolated : GQ503616.1 IBV THA80151 Group 2, GQ503617 IBV THA 90151 Group 1 และ GQ885131.1 IBV isolate THA 241251/Mass

◆ IBV 4 Thai isolated : IBV Petchabun, IBV Saraburi - GI Line 19, IBV Chonburi GI - 1 และ IBV Prachinburi



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ complete S1 gene ระหว่างไวรัสวัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ของกรมปศุสัตว์และ IBV reference strains, 7 Thai IBVs isolated. สร้างโดยโปรแกรม MEGA v.6.0 โดยใช้ Neighbor-joining method; p-distance model, 1,000 bootstrap replicates โดยแสดงผลค่าbootstrap ด้วยตัวเลขตั้งแต่ 70

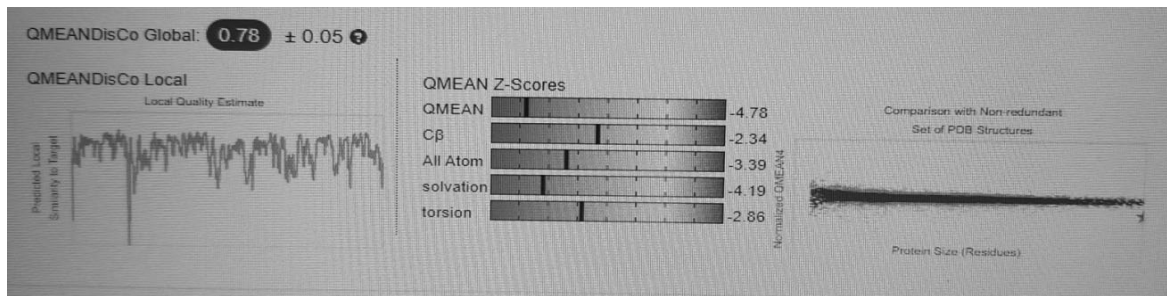
- วัคซีนกรมปศุสัตว์ (EU589323.1 DLD)
- IBV 3 Thai isolated: GQ503617 IBV THA 90151 Group 1, GQ503616.1 IBV THA80151 Group 2 และ GQ885131.1 IBV isolate THA 241251/Mass
- ◆ IBV 4 Thai isolated: IBV Saraburi - GI Line 19, IBV Chonburi GI – 1, IBV Prachinburi และ IBV Petchabun



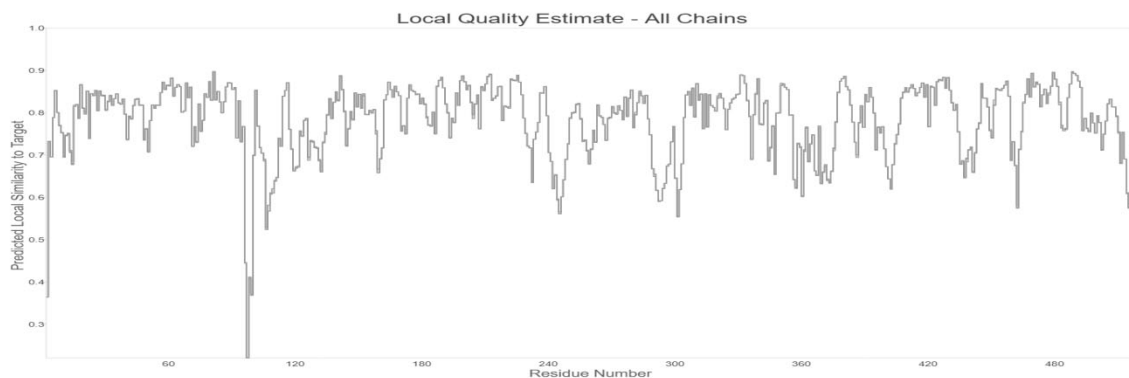
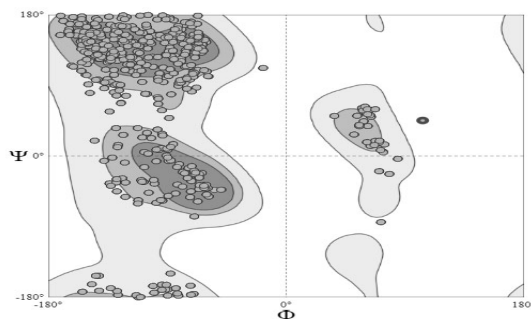
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง S1protein IBV วัคซีนกรมปศุสัตว์สร้างโดยวิธี homology modeling

- ก. แสดง 3-D structure monomeric S1protein ประกอบด้วย N-terminal และ C-terminal และ subdomain SD1,SD2 * partial ceiling
- ข. แสดง critical amino acid residues ตำแหน่งที่ 38, 43, 63 และ 69 (แดง ม่วง เขียว น้ำเงิน) ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับเนื้อเยื่อทางเดินหายใจไก่

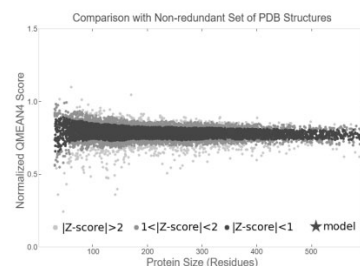
ก. คะแนนโดยรวมจากการประเมินแบบจำลอง



ข. ค่า QMEANSDisCo Local

ค. Ramachandran plot (Ramachandran *et al.*, 1963)

ง. QMEAN4 Score



รูปที่ 6 ประเมินโครงสร้างสามมิติของโปรตีน S1 เชื้อ IBV กรมปศุสัตว์

ก. ภาพรวม QMEANDisCo Global มีค่า 0.78 ± 0.05

ข. เส้นกราฟจำนวนกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโปรตีน S1 ค่าคะแนนที่ได้ของกรดอะมิโนแต่ละตัวควร >0.6

ค. Ramachandran plot จุดสีม่วงคือกรดอะมิโนของ IBV กรมปศุสัตว์แต่ละจุดคือกรดอะมิโนหนึ่งตัว ซึ่งถูกจัดเรียงลงตามแต่ละ Quadrant ตามมุม Psi และ Phi บ่งบอกถึงโครงสร้าง alpha helix, Beta sheet

ง. QMAEN4 Score ★ คือตำแหน่งของแบบจำลองที่สร้างขึ้นมามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $1 < Z\text{-score} < 2$ เทียบกับจุดต่างๆคือโปรตีนทั้งหมดในฐานข้อมูล

Characterization of Department of Livestock Development infectious bronchitis vaccine

Noppakun Moolsin¹

Kanita Bhasathiti¹

Abstract

This study aims to explore and characterize the seed virus history, which has been used for infectious bronchitis vaccine produced by the Department of Livestock Development so far. The shape and size of the virus were visualized by transmission electron microscopy, and bioinformatics data was analyzed. The three-dimensional structure of spike1 protein was predicted by homology modeling. Lastly, a uniform, informative system was proposed for naming the infectious bronchitis vaccine strain. The result showed that the Infectious bronchitis virus particle was spherical with 60-80 nanometers in size, and BLAST search revealed 87.76% nucleotide identity and 85.69 % amino acid identity to LSD/501 virus with RRSRR cleavage recognition site. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining and maximum likelihood methods disclosed genetically closed relation to infectious bronchitis virus which belonged to Genotype I lineage 25; however, whole-genome sequencings should be further studied. The 3-D spike1 protein homology modeling showed that the N-terminal domain contained four critical amino acid residues required to bind tracheal tissue, similar to infectious bronchitis H 120 vaccine and Mass 41 strain. A nomenclature proposal for IBV DLD strain (TH/GI-25, DLD/S/54) should be adopted based on phylogenetic strain classification.

In summary, seed characterization and bioinformatics data analysis revealed that the infectious bronchitis vaccine produced by the Department of Livestock Development derived from highly pure seed and provided good safety and efficacy to protect the respiratory type of infectious bronchitis disease.

Keywords: Seed history, Infectious bronchitis vaccine,
Phylogenetic tree, 3-D homology modeling

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, 30130

การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ

นลินี หงษ์ชุมพล¹ละมุล โม้สี²

บทคัดย่อ

ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง สเตรนไชนีส ในระดับต้นแบบโดยเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์ FS-L3 ในขวดเพาะเซลล์พลาสติกขนาด 225 ตารางเซนติเมตร ใช้อาหารเลี้ยงไวรัสที่มีซีรัมโค 10% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน นำมาผสมกับสารคงสภาพประกอบด้วยโพลิไวนิลไพโรลิโดนและแลคโตส ผลิตเป็นวัคซีนชนิดดูดแห้ง 3 ชุด จำนวน 26,600, 33,870 และ 34,110 โด๊ส ตามลำดับ ปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนทำแห้งและหลังทำแห้งเท่ากับ $6.83 \pm 0.58 \log \text{TCID}_{50}/\text{มล.}$ และ $5.22 \pm 0.63 \log \text{TCID}_{50}/\text{โด๊ส}$ ตามลำดับ ทดสอบความปลอดภัยพบว่าวัคซีนทุกชุดมีความปลอดภัยไม่พบอาการแพ้หรือผิดปกติบริเวณที่ฉีด องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศกำหนดความคุ้มครองของวัคซีนในสุกรต้องไม่น้อยกว่า 100 PD₅₀/โด๊ส ซึ่งการทดสอบความคุ้มครองวัคซีนระดับต้นแบบทั้ง 3 ชุด มีความคุ้มครองไม่น้อยกว่า 319.890 PD₅₀/โด๊ส ทุกชุด

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพในห้องปฏิบัติการ วัคซีนมีความปลอดภัยและมีความคุ้มครองในสุกรตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคตได้

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 ระดับต้นแบบ

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

²สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

โรคอหิวาต์สุกรเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกร เกิดจากเชื้อไวรัส Classical swine fever อยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Pestivirus (สุพล, 2543) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก ติดต่อโดยการสัมผัสกับสัตว์ป่วย สิ่งขับถ่าย น้ำเชื้อ หรือสารคัดหลั่งจากสัตว์ที่ป่วยหรือตาย การเข้าออกฟาร์มที่เกิดโรค การใช้เครื่องมืออุปกรณ์ร่วมกันระหว่างฟาร์ม ประเทศไทยมีรายงานการพบโรคอหิวาต์สุกร ตั้งแต่ พ.ศ. 2493 สถานการณ์ของโรคล่าสุดในปี 2560 พบการระบาด 1 ครั้ง ในเขตจังหวัดอุดรธานี (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุดรธานี, 2560) แม้ว่าอุบัติการณ์ของโรคจะลดลงแต่ยังมีความจำเป็นต้องควบคุม ป้องกันและเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการป้องกันโรคที่สำคัญคือการฉีดวัคซีนและการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ของฟาร์ม

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรณโซนิส เป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดผ่านกระต่าย ซึ่งเป็นวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคได้ดี แต่การผลิตวัคซีนแต่ละชุดต้องใช้กระต่ายในการเพิ่มปริมาณไวรัสอย่างน้อยชุดละ 100 ตัว จึงจำเป็นต้องมีแหล่งเพาะเลี้ยงที่ผลิตกระต่ายได้อย่างต่อเนื่องและกระต่ายต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ ซึ่งแหล่งเพาะเลี้ยงกระต่ายเพาะพันธุ์กระต่ายไม่ทันกับความต้องการของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ที่มีความต้องการปีละ 5,000-6,000 ตัว หรือบางแหล่งเลี้ยงกระต่ายที่สายพันธุ์ไม่ตรงตามความต้องการ เป็นกระต่ายที่เลี้ยงเพื่อความสวยงามทำให้ใช้ในงานผลิตวัคซีนค่อนข้างยาก เป็นผลให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนได้อย่างสม่ำเสมอและเพียงพอ ต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ปริมาณการใช้วัคซีนอหิวาต์สุกรของกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ ปี 2554-2558 เฉลี่ยปีละ 6.26 ล้านโดส เมื่อพบปัญหากระต่ายไม่เพียงพอหรือไม่ตรงกับการใช้งาน จึงทำให้ปริมาณการผลิตลดลงไม่ทันกับความต้องการของเกษตรกร เสียดุลการค้ากับต่างประเทศในการนำเข้าวัคซีน

วัคซีนอหิวาต์สุกรมีหลายชนิดมีทั้งชนิดผ่านกระต่าย (Lapinized vaccine) ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) และชนิด Subunit ซึ่งวัคซีนชนิดผ่านกระต่ายเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัย กระตุ้นแอนติบอดีและให้ความคุ้มโรคได้ดีสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรคในวันที่ 5 หลังสุกรได้รับวัคซีน และให้ความคุ้มโรคมานานกว่า 1 ปี (ฉาย, 2529) วัคซีนชนิดนี้จึงยังเป็นที่นิยมใช้และมีบริษัทผู้ผลิตวัคซีนยังคงดำเนินการผลิตอยู่หลายชนิด เช่น Chinese strain (C strain) และ Lapinized Philippines Coronel (LPC) เป็นต้น (Pan *et al.*, 2008) การพัฒนาไวรัสอหิวาต์สุกรในเซลล์เพาะเลี้ยงมีการศึกษาโดยใช้เซลล์หลายชนิด เช่น ไตหนูตะเภา (ฉายและคณะ, 2529) SK-6 (Terpstra *et al.*, 1990) และ PK-15 (Wu *et al.*, 2013) เป็นต้น ปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ซึ่งข้อดีของวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงคือ ควบคุมการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ ให้ความคุ้มโรคได้เช่นเดียวกับชนิดผ่านกระต่ายแต่ผลิตได้ปริมาณที่เพียงพอมากกว่า (Nath *et al.*, 2016) ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Coglapest และ Green cross เป็นต้น ส่วนการพัฒนาวัคซีนชนิด Subunit ซึ่งสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกรได้เช่นกันแต่อาจใช้เวลานานกว่าและมีราคาสูง ยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Porcilis Pesti (Coronado *et al.*, 2021) ในประเทศไทยการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง วาสนาและคณะ (2544) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรณโซนิสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด พบว่าเชื้อไวรัสสามารถเจริญได้ในเซลล์ SK6 และเซลล์ FS-L3 ซึ่งเป็นเซลล์ไตสุกร รวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อโค (Bovine Fetal Muscle; BFM) จากนั้นจึงทดลองเพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรณโซนิส ชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ FS-L3 ที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ แล้วนำเชื้อไวรัสที่ได้มาทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสุกร พบว่าเชื้อไวรัสมีความปลอดภัยต่อสุกร ไม่พบเชื้อไวรัสในเลือด ไม่พบการแพร่เชื้อไวรัสไปยังสุกรที่นำมาเลี้ยงรวมกันและเป็นไวรัสวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคสูง สามารถนำไปพัฒนาผลิตเป็นวัคซีนชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (วาสนาและคณะ, 2548) ข้อดีของเซลล์ FS-L3 คือเพาะเลี้ยงได้

โดยไม่ต้องใช้ซีรัมเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Sakoda and Fukusho, 1998) ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆจากซีรัม

สหข.จึงมีแนวคิดพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง เพราะสามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมาเพิ่มปริมาณไวรัสแทนกระต่ายได้ เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มปริมาณได้ตามความต้องการใช้งาน ควบคุมคุณภาพของเซลล์ในระหว่างการผลิตได้ง่ายกว่าการใช้กระต่าย หากมีการเก็บรักษาที่เหมาะสมจะเก็บสต็อกเซลล์เพื่อใช้งานได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะสามารถนำมาผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรได้ต่อเนื่องและควบคุมคุณภาพการผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ อีกทั้งเป็นการลดปริมาณกระต่ายในกระบวนการผลิตวัคซีนด้วย ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3 มาใช้เพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกรและผลิตเป็นวัคซีน เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ (pilot scale) และทดสอบคุณภาพของวัคซีนทางห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองตามมาตรฐานสากล

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง FS-L3

ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส

ไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดผ่านกระต่าย ที่สหข. ได้รับมาจากประเทศฮังการี (วาสนา, 2548ก) และ adapt ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (Growth medium, GM): Eagle's Minimum essential medium (MEM) Nissui No.1¹ ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptose phosphate broth² 0.295%, Bacto Peptone³ 0.5%, 10 mM N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid⁴ (BES), L-glutamine⁵ 0.292 มก./มล., sodium bicarbonate⁶ 2.25 มก./มล. และ antibiotic⁷ 1%

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส (Maintenance medium, MM): Eagle's Minimum essential medium (MEM) Nissui No.1¹ ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptose phosphate broth² 0.295%, Bacto Peptone³ 0.5%, 10 mM N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid⁴ (BES), L-glutamine⁵ 0.292 มก./มล., sodium bicarbonate⁶ 2.25 มก./มล., antibiotic⁷ 1% และ fetal bovine serum⁸

สารคงสภาพ (Stabilizer)

ประกอบด้วย polyvinyl pyrrolidone⁹ 10% และ lactose¹⁰ 0.3% ในน้ำกลั่น สำหรับผสม virus stock ในการทำแห้งวัคซีน

สัตว์ทดลอง

สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large white, Landrace, Duroc) คละเพศ อายุ 6-10 สัปดาห์ จำนวน 45 ตัว เป็นสุกรจากฟาร์มเอกชนที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร ดำเนินการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกรและกาฬโรคเป็ด สหข. อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา มีระบบการเลี้ยงแบบ Conventional หลังสิ้นสุดการทดลองทำการุณยฆาตด้วยวิธี frontal shock (Gunshot) (American Association of Swine Veterinarians and National Pork Board, 2008) ผลิตสัตว์ทดลองด้วยวิธีการเผาซาก

¹Nissui, Japan

²BD, USA

³BD, USA

⁴Sigma, USA

⁵Merck, Germany

⁶Sigma, USA

⁷Jiangxi dongfang, China

⁸Capricorn, South America

⁹Kollidon[®] 90F, Germany

¹⁰SuperTab[®] 21AN, Germany

การเพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L3

เพาะเลี้ยงเซลล์ FS-L3 ในขวดเพาะเซลล์พลาสติกขนาด 225 ตารางเซนติเมตร¹¹ บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จึงนำมาใช้งาน

การเพาะเลี้ยงไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส

เปรียบเทียบความเข้มข้นของซีรัมโค (Fetal bovine serum, FBS)

เพาะเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ โดยคำนวณให้ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ (Multiplicity of Infection; MOI) เท่ากับ 0.1 (กัญญา, 2550) เติม MM ที่มีความเข้มข้นของ FBS เป็น 2%, 5% และ 10% บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 7-14 หลังเพาะ ส่งตรวจหาปริมาณไวรัส เปรียบเทียบความเข้มข้นของ FBS และวันที่ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดหลังเพาะ

เปรียบเทียบปริมาณไวรัสเมื่อเพาะต่อเนื่อง

นำไวรัสจากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ FBS ที่ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดมาเพาะต่อเนื่องในสภาวะเดียวกัน เปรียบเทียบปริมาณไวรัสแต่ละครั้ง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเลือก Working seed virus (WSV) ของการศึกษาในครั้งนี้

เพาะเลี้ยงเก็บเป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน

เพาะเชื้อไวรัส WSV ในเซลล์ FS-L3 ที่เตรียมไว้ จำนวน 3 ชุดๆละ 20 ขวด เก็บตัวอย่างน้ำไวรัสแต่ละชุด ส่งตรวจปริมาณไวรัส และเก็บเป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน

การผลิตวัคซีนระดับต้นแบบ (pilot scale)

นำ virus stock มาผสมกับสารคงสภาพในอัตราส่วน 1:1 บรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 6 มล. ขวดละ 1 มล. นำไปทำแห้งนานประมาณ 27 ชั่วโมง ได้เป็นวัคซีนสำเร็จรูปเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การทดสอบคุณภาพ

ทดสอบคุณลักษณะทั่วไปทางกายภาพ (property test) เป็นวัคซีนชนิดแห้ง สีขาวนวล ละลายง่าย ไม่มีสิ่งแปลกปลอม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ก)

ทดสอบหาปริมาณความชื้น (moisture test) ด้วยเครื่องหาปริมาณความชื้นแบบ Karl Fisher method ต้องไม่เกิน 4% (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ข)

ทดสอบสภาพสุญญากาศในขวดบรรจุวัคซีน ด้วยเครื่องวัดสภาพสุญญากาศ (vacuum tester coil) ขวดวัคซีนที่มีสภาพสุญญากาศจะเปล่งแสงสีม่วง/เขียว ภายในขวดบรรจุ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก)

การตรวจหาเชื้อ Mycoplasma ด้วยวิธี MycoAlert™ Plus ต้องปราศจากเชื้อ mycoplasma (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข)

ทดสอบความปลอดภัยของเชื้อราและแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (sterility test) ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2563)

ตรวจปริมาณไวรัสในวัคซีนก่อนและหลังทำแห้งด้วยวิธีย้อมสี Immunoperoxidase (วาสนา, 2548ข)

ทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง (safety test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561ค) เตรียมสุกรทดลอง 3 ตัว ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโดสปกติ ให้กับสุกรทุกตัว สังเกตอาการ 21 วัน สุกรทุกตัวต้องไม่แสดงอาการป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร และไม่พบความผิดปกติบริเวณที่ฉีดหรืออาการแพ้อื่นๆ

ทดสอบความคุ้มโรคในสุกรทดลอง (potency test) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2560) เตรียมสุกรทดลอง 12 ตัว ฉีดวัคซีนที่เจือจางขนาด 40 เท่า และ 160 เท่าของโดสปกติ ให้กับสุกรความเจือจางละ 5 ตัว สุกรกลุ่มควบคุม 2 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ฉีดด้วยเชื้อพิษอหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID₅₀/มล. (50% pig infective dose) ให้สุกรกลุ่มฉีดวัคซีนทั้ง 10 ตัว และกลุ่มควบคุม 2 ตัว สังเกตอาการ 14 วัน นำข้อมูลสุกรที่

¹¹Corning, USA

แสดงอาการป่วยหรือตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรมาคำนวณด้วยวิธีการมาตรฐาน (Reed and Muench, 1938) ค่าความคุ้มโรค ที่ได้ต้องไม่น้อยกว่า 100 PD₅₀ (50% protective dose) ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมต้องตายด้วยโรคอหิวาต์สุกรภายใน 14 วัน หลังจากฉีดเชื้อพิษ

ผล

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสในอาหารที่มีความเข้มข้นของ FBS ที่แตกต่างกัน พบว่าไวรัสที่เพาะในอาหารที่มี FBS 10% ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดวันที่ 12 หลังเพาะ เท่ากับ 6.33 log TCID₅₀/มล. (50% tissue culture infective dose) (รูปที่ 1)

ผลการเพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่องจำนวน 7 passage ด้วยสภาวะความเข้มข้น FBS 10% บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส และเก็บไวรัส (harvest) วันที่ 12 หลังเพาะ มีปริมาณไวรัส P.1-P.7 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่ง P.5, P.6 และ P.7 มีปริมาณไวรัสสูงที่สุดเท่ากับ 6.50 log TCID₅₀/มล. เท่ากัน จึงใช้ไวรัส P.7 เป็น WSV เพื่อใช้เพาะไวรัสผลิตเป็นวัคซีนต้นแบบสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ผลการเพาะไวรัส 3 ชุด เพื่อใช้เป็น virus stock สำหรับผลิตวัคซีน เก็บไวรัสวันที่ 12 หลังเพาะ ได้ปริมาตรแต่ละชุดเป็น 1,400 มล., 1,800 มล. และ 1,790 มล. นำมาผลิตวัคซีนต้นแบบได้จำนวนวัคซีนทั้งสิ้น 94,580 โดส (ตารางที่ 2) เนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกระบวนการเพาะเซลล์จึงทำให้ปริมาตรแต่ละชุดไม่เท่ากัน

ผลการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ วัคซีนทุกชุดผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ภายในขวดวัคซีนมีสภาพสุญญากาศ ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและ Mycoplasma ปริมาณความชื้นเฉลี่ย หลังทำแห้งเท่ากับ 2.58±0.24% ปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนและหลังทำแห้งเท่ากับ 6.83±0.58 และ 5.22±0.63 log TCID₅₀/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง ไม่พบความผิดปกติ การบวม หรืออักเสบบริเวณที่ฉีด ไม่พบอาการแพ้วัคซีน สุกรไม่แสดงอาการของโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 2)

ผลการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรทดลอง สุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนขนาดความเจือจาง 40 เท่าของโดสปกติ สุกรมีความคุ้มโรคต่อไวรัสอหิวาต์สุกร เมื่อฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID₅₀/มล. สุกรทุกตัว ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร คิดเป็นร้อยละ 100 สุกรกลุ่มที่ได้รับวัคซีนขนาดความเจือจาง 160 เท่าของโดสปกติ ซึ่งมีความเจือจางมากกว่ากลุ่มแรก สุกรมีความคุ้มโรคต่อไวรัสอหิวาต์สุกร เมื่อฉีดพิษทับด้วยเชื้ออหิวาต์สุกรที่มีความรุนแรง 5 log PID₅₀/มล. สุกรทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร คิดเป็นร้อยละ 100 เช่นกัน เมื่อนำจำนวนสุกรรอด/ตาย ของแต่ละชุดมาคำนวณด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อหาระดับความคุ้มโรค พบว่าวัคซีนต้นแบบทั้ง 3 ชุด มีระดับความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319.890 PD₅₀/โดส ทุกชุด ส่วนสุกรกลุ่มควบคุมตายด้วยโรคอหิวาต์สุกร (ตารางที่ 5)

วิจารณ์

จากผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณซีรัมตัวอ่อนลูกโค หรือ FBS ในอาหารเลี้ยงไวรัส พบว่าไวรัสที่เพาะในอาหารที่มี FBS 10% ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุด (รูปที่ 1) การศึกษาในครั้งนี้ได้นำไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไซนิสจากการเพาะด้วยซีรัมตัวอ่อนลูกโค 10% มาผลิตเป็นวัคซีนชนิดจุดแห้งและทดสอบความปลอดภัยในสุกร ปรากฏว่าวัคซีนมีความปลอดภัยไม่พบอาการแพ้วัคซีนหรือความผิดปกติบริเวณที่ฉีด ซึ่งวาสนาและคณะ (2545) ทดสอบวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรน GPE⁻ ที่ผลิตจากไวรัสที่เพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของซีรัมโค 5% สุกรที่ฉีดวัคซีน ไม่พบอาการแพ้วัคซีน ไม่มีไข้ และไม่พบปฏิกิริยาบริเวณที่ฉีดเช่นกัน วัคซีนมีส่วนประกอบของสารหลาย

ชนิด เช่น ไวรัส (active immunizing antigens) สารคงสภาพ ยาปฏิชีวนะ ซีรัม และอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดเหล่านี้มีแนวโน้มเป็นสาเหตุของอาการแพ้วัคซีนได้ โดยไม่อาจระบุได้ชัดเจนว่าการแพ้แต่ละครั้งมาจากสาเหตุใด (Chung, 2014) จึงควรสังเกตอาการของสัตว์หลังจากฉีดวัคซีนและจัดเตรียมอุปกรณ์หรือยาที่จำเป็นสำหรับแก้ไขหากพบสัตว์แพ้วัคซีน ทั้งนี้ซีรัมโคที่ใช้ในการผลิตวัคซีนถือเป็นต้นทุนที่มีราคาสูง หากจะพัฒนาผลิตในระดับอุตสาหกรรม ต้องศึกษาการใช้ในระดับที่ต่ำกว่าแต่ได้ปริมาณไวรัสที่เพียงพอที่จะผลิตวัคซีนเพื่อเป็นการลดต้นทุน

จากผลการเพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่อง 7 passage พบว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพิ่มขึ้นในแต่ละ passage และมีปริมาณไวรัสสูงที่สุดเท่ากับ 6.50 log TCID₅₀/มล. จำนวน 3 passage เท่ากัน ได้แก่ P.5, P.6 และ P.7 จึงกำหนดให้ P.5 เป็น master seed virus (MSV), P.6 เป็น working seed virus 1 (WSV1) และ P.7 เป็น working seed virus 2 (WSV2) เนื่องจากมีปริมาณไวรัสสูงและเป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับการผสมกับสารคงสภาพ นำเข้ากระบวนการทำแห้งเป็นวัคซีนสำเร็จรูปแล้ว ยังคงมีปริมาณไวรัสหลังทำแห้งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ ASEAN (1998) ซึ่งไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายที่เพาะในเซลล์ FS-L3 เป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อสุกรและให้ความคุ้มโรคได้ดี สามารถนำไปใช้เป็นไวรัสวัคซีนตั้งต้น (seed vaccine virus) สำหรับผลิตวัคซีนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (วาสนาและคณะ, 2548) การกำหนด MSV และ WSV เป็นการวางแผนใช้ไวรัสวัคซีนตั้งต้นในการผลิตวัคซีน (seed lot system) เพื่อสร้างความมั่นใจว่าวัคซีนที่ผลิตทุกครั้งมาจากไวรัสวัคซีนตั้งต้นแหล่งเดียวกัน สามารถผลิตเป็นวัคซีนที่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่สม่ำเสมอและผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งไวรัสที่จะนำมาใช้เป็นไวรัสวัคซีนตั้งต้นต้องมีปริมาณไวรัสที่สูงและสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไวรัสเป็นที่น่าพอใจ (Harrak *et al.*, 2021) เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดด้านระยะเวลาจึงทำให้เพาะเลี้ยงไวรัสต่อเนื่องได้เพียงครั้งเดียวโดยไม่ได้ทำซ้ำ ข้อมูลปริมาณไวรัสที่ได้จึงอาจมีความคลาดเคลื่อน แต่สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อวางแผนการศึกษา ที่ละเอียดครอบคลุมเพื่อเลือก MSV และ WSV ที่เหมาะสมได้

วัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ จำนวน 3 ชุด มีปริมาณไวรัสเฉลี่ยก่อนทำแห้ง 6.83±0.58 log TCID₅₀/มล. เมื่อนำไวรัสที่ได้มาผสมกับสารคงสภาพ บรรจุลงขวดแก้ว ผ่านการทำแห้งแล้ว วัคซีนมีปริมาณไวรัสเฉลี่ยหลังทำแห้ง 5.22±0.63 log TCID₅₀/มล. คิดเป็นอัตราการสูญเสียไวรัสร้อยละ 23.57 แม้จะมีการสูญเสียไวรัสระหว่างการผลิตแต่ปริมาณไวรัสหลังทำแห้งยังคงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ ASEAN (1998) คือ วัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงต้องมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 2.3 log TCID₅₀/มล. การผลิตวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้งพบการสูญเสียไวรัสระหว่างการผลิตได้จากหลายขั้นตอน เช่น การแช่แข็งไวรัส การละลายไวรัส การทำแห้งวัคซีนและชนิดของสารคงสภาพ เป็นต้น ฤทธิ์ลือชัยและธวัชชัย (2554) เปรียบเทียบปริมาณไวรัสในวัคซีนกาฬโรคเปิดก่อนและหลังทำแห้ง ซึ่งสารคงสภาพที่ใช้ในการผลิตวัคซีนกาฬโรคเปิดเป็นโพลีไวนิลไพโรลิโดนและแลคโตสเช่นเดียวกับวัคซีนอหิวาต์สุกร แต่วัคซีนกาฬโรคเปิดมีทริบิตอนเป็นส่วนประกอบเพิ่ม พบว่าการสูญเสียไวรัสหลังทำแห้งร้อยละ 7.08 แต่วัคซีนกาฬโรคเปิดสำเร็จรูปยังมีปริมาณไวรัสอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน จึงแนะนำให้เตรียมไวรัสกาฬโรคเปิดก่อนผลิตวัคซีนให้มีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 6.5 log TCID₅₀/มล.

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกรระดับต้นแบบ วัคซีนมีระดับความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319.890 PD₅₀/โดส สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดไม่น้อยกว่า 100 PD₅₀/โดส (OIE, 2019) สุกรที่ได้รับวัคซีนไม่แสดงอาการป่วยด้วยโรคอหิวาต์สุกร ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรในต่อมน้ำเหลือง ม้ามและต่อมทอนซิลหลังฉีดเชื้อพิษหับ สามารถป้องกันโรคอหิวาต์สุกรได้เช่นเดียวกับวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดผ่านกระต่าย สเตรนไชนีส ที่กรมปศุสัตว์ผลิตในปัจจุบันซึ่งความคุ้มโรคไม่น้อยกว่า 319 PD₅₀/โดส วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันโรคได้อย่างสมบูรณ์ ภายหลังฉีดวัคซีนไม่พบอาการของโรค ไม่พบไวรัสในกระแสเลือดและไม่พบการแพร่เชื้อไปยังสุกรตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยังป้องกันการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้หลายสายพันธุ์ (Coronado *et al.*, 2021)

อย่างไรก็ตาม แม้วัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ ที่ผลิตได้จะมีปริมาณไวรัสของวัคซีนหลังทำแห้งตามมาตรฐาน ASEAN และมีความคุ้มครองตามมาตรฐาน OIE ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาให้ความคุ้มครองหลังจากสุกรได้รับวัคซีน (Duration of immunity) และความคงตัวของวัคซีน เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างกัน (Stability) ซึ่งจะได้วางแผนการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุป

การผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับต้นแบบ จำนวน 3 ชุด ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพในห้องปฏิบัติการ วัคซีนมีความปลอดภัยและมีระดับความคุ้มครองในสุกรตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิงรีนฤดี บุญยะโหดระ สัตวแพทย์หญิงสุจิตรา ปาจริยานนท์ และสัตวแพทย์หญิงวาสนา ภิญโญชนม์ ผู้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการดำเนินงาน คณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่ายที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับโครงการวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อเสนอแนะระหว่างการดำเนินงานวิจัย นายสัตวแพทย์ดิถี ประเสริฐสุวรรณ คุณธีระพงษ์ เจริญ และบุคลากรกลุ่มไวรัสวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่ทำให้การวิจัยบรรลุตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา สุวินทรากกร 2550 เกร็ดความรู้จากการพัฒนาการผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 17 ฉบับที่ 1 หน้า 23-30
- ฉาย จอมเกาะ 2529 วัคซีนอหิวาต์สุกรกับการสร้างภูมิคุ้มกันในสุกร รายงานทางวิชาการ 2526 – 2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 384-390
- ฉาย จอมเกาะ สละ กองสมัคร มีโนรุ ชาวาดา 2529 การทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรเชื้อเป็นชนิดทีชชูคัลเจอร์ รายงานทางวิชาการ 2526 – 2529 กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ เล่มที่ 2 หน้า 357-365
- วาสนา ภิญโญชนม์ 2548ก โรคอหิวาต์สุกร : การวิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN 974-682-214-4 หน้า 43
- วาสนา ภิญโญชนม์ 2548ข คู่มือการวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรทางห้องปฏิบัติการ โรคอหิวาต์สุกร : การวิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN 974-682-214-4 หน้า 14 – 17
- วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากกร สุจิตรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกคิน และสุรพงษ์ อุดมพันธ์ 2548 การทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มครองของเชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสที่พัฒนาในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตวแพทยสาร 56(1): 45-56
- วาสนา ภิญโญชนม์ กัญญา สุวินทรากกร สุจิตรา ปาจริยานนท์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกคินและฤทธิธิดาชัย ปุ่สูงเนิน 2544 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสเตรนไชนีสชนิดผ่านกระต่ายในเซลล์ไลน์ สัตวแพทยสาร 52(3): 21-30
- วาสนา ภิญโญชนม์ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกคิน สุจิตรา ปาจริยานนท์ กัญญา สุวินทรากกร ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ และดุจยทัต คันธวร 2545 การพัฒนาวิธีผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง รายงานฉบับ

- สมบูรณ์ : การวิจัยและพัฒนาวิธีวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันโรคอหิวาต์สุกรในประเทศไทย สำนักวิจัยและ
บริการวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ISBN 974-326-121-4 หน้า 177-178
สุพล เลื่องยศลือขากุล 2543 บทที่ 1 โรคอหิวาต์สุกร ใน โรคติดเชื่อของสุกร โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กรุงเทพ หน้า 1-17
- สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุดรธานี 2560 เรื่อง ขอส่งสำเนาประกาศเขตโรคระบาดสัตว์ชั่วคราว ชนิดโรคอหิวาต์
สุกร (Classical Swine Fever) แหล่งที่มา
http://www.dld.go.th/th/images/stories/warning/2560/256011/25601102_1.pdf
7 พฤศจิกายน 2563
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2560 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์สุกร
SOP-QCSD-013 หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจสอบคุณลักษณะทั่วไปและการ
ละลายของวัคซีนอหิวาต์สุกร SOP-QCSD-002 หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบหาปริมาณความชื้น SOP-QCSD-
004 หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561ค มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์สุกร
SOP-QCSD-011 หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบสภาพสุญญากาศในขวดบรรจุ
วัคซีน SOP-QCP-033 หน้า 1-4
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจหาเชื้อ Mycoplasma โดยวิธี
MycoAlert™ Plus SOP-QCR-019 หน้า 1-8
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2563 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การทดสอบความปลอดภัยของเชื้อราและ
แบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป SOP-QCP-031 หน้า 1-7
- ฤทธิ์ลือชัย ปู่สูงเนิน และธวัชชัย ปัจฉานุกูล 2554 การสูญเสียปริมาณไวรัสในขั้นตอนแช่แข็งและทำแห้งของการ
ผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ปีที่ 20 ฉบับที่ 1-2 และปีที่ 21 ฉบับที่ 1-2 หน้า 40-47
- American Association of Swine Veterinarians and National Pork Board. 2008. On-farm euthanasia
of swine recommendations for the producer. p.7
<https://www.aasv.org/aasv/documents/SwineEuthanasia.pdf>
[Accessed 7 November 2020].
- Asean standard for animal vaccines. 1998. Asean standard requirements for swine fever vaccine
(cell culture origin), live. ASEAN Cooperation in Food, Agriculture and Forestry. pp.60-61.
- Chung, E.H. 2014. Vaccine allergies. Clinical and experimental vaccine research. 3:50-57.
- Coronado, L., Perera C.L., Rios L., Frias M.T., and Perez L.J. 2021. A critical review about different
vaccines against classical swine fever virus and their repercussions in endemic regions.
Vaccine.9(2):1-22 <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/154> [Accessed 1 August 2021].
- Harrak, M.E., Belkourati, I., Boumart, Z., Fakri, F., and Hamdi, J. 2021. Chapter 12 The
manufacture of veterinary vaccines: quality control of the manufacturing process.
Veterinary vaccines: Principles and applications. 1st ed. John Wiley & Sons Ltd. pp.147-
159. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119506287.ch12> [Accessed 29
October 2021].

- Nath, M.K., Sarma, D.K., Das, B.C., Deka, P., Kalita, D., Dutta, J.B., Mahato, G., Sarma, S., and Roychoudhury, P. 2016. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated with cell culture adapted classical swine fever vaccine. *Veterinary world*, EISSN: 2231-0916. pp.308-312.
- Office International des Epizooties (OIE). 2019. Classical swine fever (infection with classical swine fever virus) *In Terrestrial Manual* chapter 3.8.3. pp.1-26.
- Pan, C.H., Jong, M.H., Huang, Y.L., Huang, T.S., Chao, P.H., and Lai S.S. 2008. Rapid detection and differentiation of wild-type and three attenuated lapinized vaccine strains of classical swine fever virus by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20:448-456.
- Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 27(3):493-497.
- Sakoda, Y., and Fukusho, A. 1998. Establishment and characterization of a porcine kidney cell line, FS-L3, which forms unique multicellular domes in serum-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34:53-57.
- Terpstra, C., Woortmeyer, R., and Bartelling, S.J. 1990. Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. *Deutsch Tierärztliche Wochenschrift*. 97(2):77-79.
- Wu, S.C., Liao, M.Y., Lin, Y.C., Sun, C.J., and Wang, C.T. 2013. The feasibility of a novel bioreactor for vaccine production of classical swine fever virus. *Vaccine*. 31:867-872.

ตารางที่ 1 ปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส (log TCID₅₀/มล.) ที่เพาะในเซลล์ FS-L3 ต่อเนื่อง

Passage (P.)	1	2	3	4	5	6	7
ปริมาณไวรัส (log TCID ₅₀ /มล.)	5.00	4.33	5.33	6.00	6.50	6.50	6.50

ตารางที่ 2 ปริมาตร Virus stock ก่อนและหลังผสมกับสารคงสภาพ และจำนวนวัคซีนทำแห้งสำเร็จรูป

ชุดที่	Virus stock (มล.)	สารคงสภาพ (มล.)	Vaccine bulk (มล.)	วัคซีนสำเร็จรูป (ขวด)	คิดเป็นวัคซีน (โดส)
1	1,400*	1,400	2,800	2,660**	26,600
2	1,800*	1,800	3,600	3,387**	33,870
3	1,790*	1,790	3,580	3,411**	34,110
รวม	4,990	4,990	9,980	9,458	94,580

* สูญเสียจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกระบวนการเพาะเซลล์

** สูญเสียจากการบรรจุ bulk vaccine ลงขวด

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพทางปฏิบัติการห้องวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ

การทดสอบ	การตัดสิน	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	Mean ±SD
1. คุณลักษณะทั่วไปทางกายภาพ	ตามมาตรฐาน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
2. ความเป็นสุญญากาศ	เป็นสุญญากาศ	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
3. ความชื้น	ไม่เกิน 4%	2.57%	2.82%	2.35%	2.58±0.24
4. ไม่ปนเปื้อนเชื้ออื่น	ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและ Mycoplasma	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	-
5. ปริมาณไวรัส (log TCID ₅₀ /มล.)					
5.1 ก่อนทำแห้ง		6.5	6.5	7.5	6.83±0.58
5.2 หลังทำแห้ง	ไม่น้อยกว่า 2.3	4.5	5.5	5.67	5.22±0.63

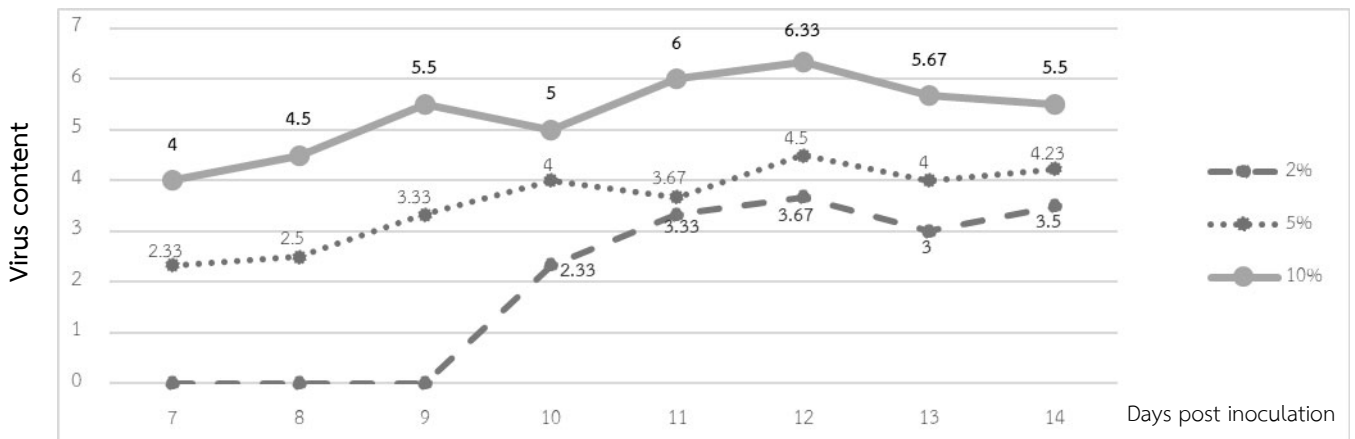
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบ ในสุกรทดลอง

การทดสอบ	การตัดสิน	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3
1. ความปลอดภัย	ไม่พบความผิดปกติ บวม หรืออักเสบบริเวณที่ฉีด สุกรไม่มีอาการแพ้	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
2. ความคุ้มโรค	ไม่น้อยกว่า 100 PD ₅₀ /โดส	319.890	319.890	319.890

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคุ้มโรควัคซีนอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงระดับต้นแบบในสุกรทดลอง

ชุดวัคซีน	สุกรกลุ่มทดลอง (รอด/ตาย)		สุกรกลุ่มควบคุม (รอด/ตาย)	ความคุ้มโรค (PD ₅₀ /โด้ส)
	เจือจาง 40 เท่า (%รอด)	เจือจาง 160 เท่า (%รอด)		
1	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890
2	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890
3	5/0 (100%)	5/0 (100%)	0/2 (0%)	319.890

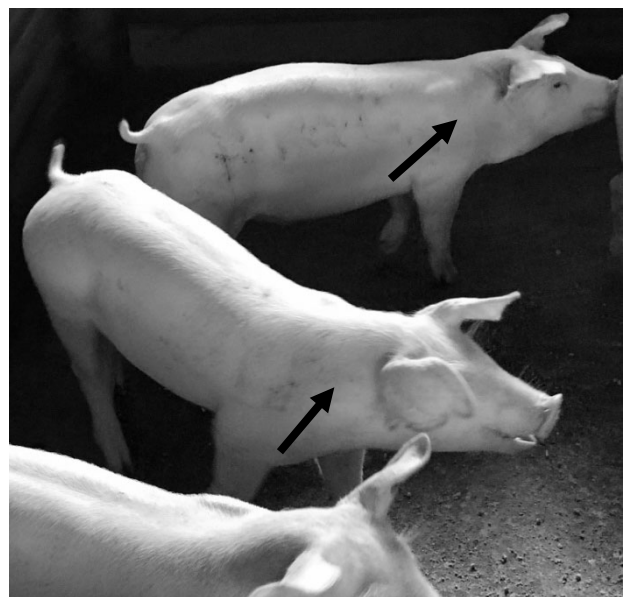
Log TCID₅₀/มล.



รูปที่ 1 ปริมาณไวรัสอหิวาต์สุกร สเตรนไชนีส (log TCID₅₀/มล.) ที่เพาะในเซลล์ FS-L3 ในอาหารเลี้ยงที่มี FBS 2%, 5%, และ 10%



(ก)



(ข)

รูปที่ 2 การทดสอบความปลอดภัยในสุกรทดลอง (ก) ฉีดวัคซีนขนาด 10 เท่าของโด้สปกติให้กับสุกรทดลอง (ข) สุกรที่ได้รับวัคซีนไม่มีอาการของโรค ไม่พบความผิดปกติบริเวณที่ฉีด

Development of classical swine fever vaccine; Chinese strain in tissue culture, pilot scale

Nalinee Hongchumpon¹

Lamul Molee²

Abstract

The tissue-based classical swine fever vaccine, Chinese strain, was developed from a lab scale to pilot production. The FS-L3 cell line cultured in 225 cm² plastic tissue culture flask was inoculated with Chinese strain virus in growth media adding 10% fetal bovine serum and incubated at 37°C. After 12 days, three batches of the harvested virus were formulated with polyvinyl pyrrolidone and lactose to produce lyophilized vaccine equal to 26,600, 33,870, and 34,110 doses respectively. The mean of virus content before and after the lyophilized process were 6.83 ± 0.58 and 5.22 ± 0.63 log TCID₅₀/ml. respectively. None of the allergic and local reactions were found in vaccinated animals. The OIE Terrestrial Manual required the minimum protective dose in vaccinated animals not less than 100 PD₅₀/dose and all vaccine batches reached the requirement given not less than 319.890 PD₅₀/dose.

In summary, the pilot vaccine passed physical property test in laboratory, safety test, and potency test in swine comply with international standards. The improvement of industrial-scale vaccine production can be developing in further study.

Keywords: classical swine fever vaccine, Chinese strain, tissue culture FS-L3, pilot scale

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, 30130

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

ความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

วรพร ปู่สูงเนิน¹ฤทธิลือชัย ปู่สูงเนิน¹

บทคัดย่อ

ที่มา: โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ เป็นโรคติดต่อร้ายแรง เกิดได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด ห่าน ไก่วง รวมทั้งนกหลายชนิด สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A การป้องกันที่ได้ผลมากที่สุดคือการทำวัคซีน ซึ่งวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตในปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ มีขนาดฉีด 1 ml และต้องฉีดทุก 3 เดือน จึงมีการวิจัยตำรับวัคซีนชนิดใหม่ที่มีการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในด้านต่างๆ ได้แก่ ลดขนาดฉีด ลดปริมาณแอนติเจน ลดจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีน เพิ่มระยะคุ้มโรคให้นานขึ้น สร้างความคุ้มโรคได้สูง มีความปลอดภัย ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการแพ้ กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงและยาวนาน ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่ใช้แอดจูแวนท์สำเร็จรูปชนิดน้ำมัน

วิธีการ: ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 สเตรนท้องถิ่น โดยใช้แอดจูแวนท์สำเร็จรูปพร้อมผสม (MONTANIDE™ ISA 71 VG) มีจำนวนเชื้อ 1.0×10^9 CFU/ml (ขนาดฉีดได้สละ 0.5 ml) นำวัคซีนไปทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ และทดสอบในเป็ดพันธุ์กากี้แคมป์เบลล์ ได้แก่ ทดสอบความปลอดภัย ทดสอบหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม โดยการฉีดวัคซีนให้เป็ดทดลองแล้วนำไปฉีดพิษตับ หลังการฉีดวัคซีน 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน และทดสอบหาระยะคุ้มโรค โดยการฉีดวัคซีนให้เป็ดทดลองแบบฉีด 1 ครั้งและ 2 ครั้ง แล้วแบ่งสัตว์ไปฉีดพิษตับทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน และเจาะเลือดเป็ดทดลองไปทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ผล: วัคซีนที่ผลิตมีคุณสมบัติตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด วัคซีนมีความปลอดภัย เป็ดทดลองไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน ไม่มีอาการหรืออาการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ วัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคแรกเริ่ม ได้ที่ 3 วันหลังฉีดวัคซีน โดยให้ความคุ้มโรคถึง 80% และให้ผล 100% ที่ 7 วันหลังฉีดวัคซีนเป็นต้นไป สำหรับผลการทดสอบหาระยะคุ้มโรค วัคซีนให้ความคุ้มโรคตลอดระยะเวลาการทดลอง (12 เดือน) รวมทั้งมีระดับแอนติบอดีที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งจากการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง

สรุป: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ขนาดฉีดได้สละ 0.5 ml มีความปลอดภัย เป็ดมีความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังจากฉีดวัคซีน 3 วัน และวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้นานอย่างน้อย 12 เดือน

คำสำคัญ: วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน ความคุ้มโรคแรกเริ่ม ระยะคุ้มโรค

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็ด-ไก่ (Fowl cholera) เป็นโรคติดต่อร้ายแรง เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype A เป็นโรคที่เกิดได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด ห่าน ไก่วง รวมทั้งนกหลายชนิด ทุกระดับอายุ แต่สัตว์อายุมากมีอัตราการป่วยและตายสูงกว่าสัตว์อายุน้อย ติดต่อกันได้จากการสัมผัสสัตว์ป่วยโดยตรง หรือติดต่อกันทางน้ำและอาหาร ระยะฟักตัว ประมาณ 2-9 วัน ในกรณีที่เป็นอย่างเฉียบพลัน มักตายอย่างกะทันหัน ทำให้โรคนี้อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง และเกิดความสูญเสียทั้งการเลี้ยงสัตว์ปีกในฟาร์มและสัตว์ปีกที่เลี้ยงตามหลังบ้าน การรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ แต่ปัจจุบันพบว่าเชื้อเกิดการดื้อยา จึงต้องป้องกันไม่ให้เกิดโรคโดยการมีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดี คัดแยกสัตว์ป่วยออกจากฝูงโดยเร็ว และการใช้วัคซีนป้องกันโรคตามโปรแกรมที่กำหนด (ประภากร, 2560)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์ริน จากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ โดยแนะนำให้ฉีดในเป็ดและไก่พื้นเมืองตัวละ 1 ml ทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) แต่วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ส่วนใหญ่จากผู้ผลิตรายอื่น เช่น K Vac FC3, Poulvac® Pabac IV, GlobiVac® เป็นต้น รวมทั้งวัคซีนสัตว์ปีก เช่น วัคซีนกัมโบโร วัคซีนกาฬโรคเป็ด วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตาย เป็นต้น แนะนำให้ฉีดตัวละ 0.5 ml และการฉีดวัคซีนตัวละ 1 ml ทำให้พบการบวมบริเวณที่ฉีดวัคซีนในสัตว์บางตัว นอกจากนี้วัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินมีข้อเสีย คือ มีระยะคุ้มโรคสั้นเพียง 3 เดือน ทำให้เกษตรกรต้องฉีดวัคซีนหลายครั้ง จึงอาจไม่ได้ฉีดวัคซีนตามเวลาที่กำหนด และทำให้เกิดโรคตามมาได้ ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวทำได้โดยการผสมแอดจูแวนท์ชนิดต่างๆ ในวัคซีน เช่น ผสมกับบอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล เป็นวัคซีนชนิดผสมอะลัม ให้ความคุ้มโรคนานขึ้น แต่ไม่เกิน 6 เดือน และมีโอกาสทำให้สัตว์เกิดการแพ้ได้ ในขณะที่การผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันอยู่ในรูปของอิมัลชัน เป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในด้านต่างๆ ได้แก่ ลดขนาดฉีด ลดปริมาณแอนติเจน ลดจำนวนครั้งที่ฉีดวัคซีน เพิ่มระยะคุ้มโรคให้นานขึ้น สร้างความคุ้มโรคได้สูง มีความปลอดภัย ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการแพ้ กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงและยาวนาน ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่พึ่งเซลล์และแบบพึ่งเซลล์ (Arous *et al.*, 2013; Aucouturier *et al.*, 2001; Belloc *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2015) และในปัจจุบันมีการพัฒนาแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันสำเร็จรูปพร้อมผสม ซึ่งมีวิธีการเตรียมง่าย ทำให้วัคซีนมีความหนืดลดลง ฉีดง่ายขึ้น มีความคงตัวสูง และมีการใช้ในการผลิตวัคซีนอย่างแพร่หลาย จึงมีความเป็นไปได้ว่าการผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันจะช่วยลดได้สและเพิ่มระยะคุ้มโรคในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ได้

ผู้วิจัยได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันจากเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 สเตรนท้องถิ่น พบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันผ่านการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัย ให้ความคุ้มโรคในเป็ดพันธุ์กาก้าแคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดได้สฉีดเหลือตัวละ 0.5 ml ในจำนวนเชื้อที่ลดลง ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน (วรพรและวีระชาย, 2562) แต่จากผลงานวิจัยดังกล่าวยังขาดข้อมูลเรื่องความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนและเพิ่มข้อมูลในการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรม ผู้วิจัยจึงสนใจตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม โดยทดสอบหาความคุ้มโรคในวันที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากฉีดวัคซีน และตรวจหาระยะคุ้มโรค โดยทดสอบหาความคุ้มโรคทุกเดือนหลังจากฉีดวัคซีน โดยฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง รวมทั้งตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. multocida* serotype A:1 สายพันธุ์ท้องถิ่น เก็บในสภาพทำแห้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนแบคทีเรีย เชื้อนี้ใช้ในการผลิตวัคซีน ตรวจสอบความคุ้มครองแรกเริ่มและระยะคุ้มครอง

วัคซีนอิวาต์เปิด-ไก่ชนิดน้ำมัน

นำตัวอย่างบรอกแบคทีเรียที่ถูกฆ่าเชื้อแล้ว (inactivation) มาผสมกับ 0.85% normal saline โดยนำไปตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์¹ (นิตยาและคณะ, 2547) แล้วนำไปผสมกับแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมัน² ในอัตราส่วนบรอกแบคทีเรีย:แอดจูแวนท์ เท่ากับ 30:70 (w/w) ให้มีปริมาณเชื้อ 1.0×10^9 CFU/ml ทำการผสมที่อุณหภูมิ 20°C ดังนี้ ปั่นผสมแอดจูแวนท์ด้วยเครื่องปั่นผสมวัคซีน³ (high shear mixer) ความเร็วรอบ 7,600 รอบ/นาที เติบบรอกแบคทีเรียลงในแอดจูแวนท์ เพิ่มความเร็วของเครื่องเป็น 11,600 รอบ/นาที ปั่นนาน 3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 คืน บรรจุขวดวัคซีนขนาด 10 ml (ผลิตทั้งหมด 200 ml หรือ 400 โด๊ส) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรอการทดสอบคุณภาพต่อไป

สัตว์ทดลอง

เปิดพันธุ์กาก็แคมป์เบลล์ ไม่จำกัดเพศ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 189 ตัว ไม่เคยฉีดวัคซีนอิวาต์เปิด-ไก่และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออิวาต์เปิด-ไก่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเลี้ยงเพื่อปรับสภาพและสังเกตอาการ อย่างน้อย 1 สัปดาห์

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในกระบวนการผลิต (In-process)

1) การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial concentration)

นำตัวอย่างเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และคำนวณหาปริมาณเชื้อด้วยสมการ $Y=37.563X-47.777$ (นิตยาและคณะ, 2547)

2) การทดสอบความบริสุทธิ์ (Purity test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาแยกแกรม ต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก *P. multocida* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย แกรมลบ ติดสีแดง รูปร่างแท่งสั้น หรือแท่งสั้นค่อนข้างกลม (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก; ASEAN Secretariat, 1998)

3) การทดสอบการฆ่าเชื้อโดยสมบูรณ์ (Inactivation test)

นำตัวอย่างวัคซีนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร dextrose starch agar⁴ (DSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ต้องไม่มี *P. multocida* หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร (ASEAN Secretariat, 1998)

การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป (Finished product)

1) การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Sterility test)

ดูตัวอย่างวัคซีน ลงใน Fluid Thioglycollate Medium⁵, Tryptic Soy Broth⁶ และ Sabouraud Dextrose Broth⁷ โดยดูตัวอย่าง 1 ml/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 หลอด แยก Fluid Thioglycollate Medium และ Tryptic Soy Broth ชนิดละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 °C และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดๆ ละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 20-25 °C เพื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ รา aerobic bacteria และ anaerobic bacteria

¹Biochrom Libra S32, UK

²MONTANIDE™ ISA 71 VG, France

³IKA Ultra Turrax® T25, Germany

⁴Difco™, France

⁵HIMEDIA, India

⁶BD™, Germany

⁷Difco™, France

เมื่อครบ 14 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จึงจะถือว่าทดสอบผ่าน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ข; WOH, 2018b)

2) การทดสอบชนิดอิมัลชัน (Drop test)

เมื่อหยดตัวอย่างวัคซีนลงในน้ำ หากเป็นอิมัลชันชนิด W/O ต้องคงอยู่นาน และไม่กระจายตัวในน้ำ (Aucouturier *et al.*, 2001)

3) การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic aspect)

เมื่อหยดตัวอย่างวัคซีนลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์⁸ วัคซีนต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 μm (Aucouturier *et al.*, 2001)

4) การทดสอบความหนืด (Viscosity test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดสารละลาย ใช้ Spindle No.1 ค่าที่ได้ต้องน้อยกว่า 100 centipoises จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ค)

5) การทดสอบความคงตัว (Stability test)

นำตัวอย่างวัคซีนไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์¹⁰ ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ต้องแยกชั้นไม่เกิน 5% จึงถือว่าผ่านการทดสอบ (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ง)

การทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

1) การทดสอบความปลอดภัย

นำเปิดทดลองจำนวน 10 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา จำนวน 2 เท่าของโดสปกติ (ตัวละ 1 ml) จากนั้นสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน เปิดทดลองทุกตัวต้องไม่พบอาการแพ้วัคซีนและไม่พบอาการและอาการของโรคคอหอยอักเสบ-เปิด-ไก่ จึงถือว่าวัคซีนมีความปลอดภัย (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562จ; WOH, 2018a)

2) การตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม

นำเปิดทดลองจำนวน 25 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา ตัวละ 0.5 ml หลังจากฉีดวัคซีนนาน 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน นำเปิดมาฉีดพิษหัดด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 Median lethal dose (LD₅₀) /ml ตัวละ 1 ml เข้ากล้ามเนื้อขา ครั้งละ 5 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุมครั้งละ 2 ตัว หลังจากฉีดพิษหัดแล้ว สังเกตอาการและนับจำนวนเปิดตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องรอดอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ฉ; WOH, 2018a) และเจาะเลือดเปิดทดลองก่อนฉีดพิษหัดทุกครั้ง เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี

3) การตรวจหาระยะคุ้มโรค

แบ่งเปิดทดลองเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 60 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อขา ตัวละ 0.5 ml โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนจำนวน 1 ครั้ง และกลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนจำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทุกเดือน นำเปิดมาฉีดพิษหัดด้วยเชื้อ *P. multocida* serotype A:1 ปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 LD₅₀/ml ตัวละ 1 ml เข้ากล้ามเนื้อขา ครั้งละ 5 ตัว/กลุ่ม โดยมีกลุ่มควบคุมครั้งละ 2 ตัว จนครบ 12 เดือน หลังจากฉีดพิษหัดแล้ว สังเกตอาการและนับจำนวนเปิดตายเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต้องรอดอย่างน้อย 70% และกลุ่มควบคุมตาย 80% จึงถือว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรค (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ช; WOH, 2018a) และเจาะเลือดเปิดทดลองก่อนฉีดพิษหัดทุกครั้ง เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี

⁸OLYMPUS BX 51, USA

⁹Brookfield DV-I, USA

¹⁰SIGMA 3K 18, UK

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป¹¹ ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม 1:50 ด้วย sample dilution buffer แล้วเติมซีรัมที่เจือจางลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง และเติม anti-duck horseradish peroxidase conjugate หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย wash solution 3 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (TMB) หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 100 µl และอ่านผลค่า OD ที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader¹² แล้วนำค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ที่ได้มาคำนวณหาค่า S/P ratio ตามสูตร

$$\text{ค่า S/P ratio} = \frac{\text{ค่า OD}_{450} \text{ ตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - \text{ค่า OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}{\text{ค่า OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมบวก} - \text{ค่า OD}_{450} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}$$

โดยตัดสินผลที่ ค่า S/P ratio > 0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และค่า S/P ratio ≤ 0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า S/P ratio เฉลี่ยในเปิดทดลองแต่ละกลุ่ม ด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในด้านต่างๆ ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทุกประการ (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง

1) การทดสอบความปลอดภัย

ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เมื่อฉีดวัคซีน จำนวน 2 เท่าของโดสปกติ (ตัวละ 1 ml) พบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยในเปิดทดลอง ไม่พบอาการแพ้วัคซีน และไม่พบการบวมหรืออักเสบบริเวณจุดฉีด รวมทั้งไม่พบอาการและอาการของโรคอหิวาต์เป็ด-ไก่

2) การตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม

ผลการตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม พบว่าหลังจากฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เปิดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซีน นาน 3 และ 5 วัน มีความคุ้มโรค 80% ทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่เปิดกลุ่มที่ฉีดวัคซีน นาน 7, 10 และ 14 วัน มีความคุ้มโรค 100% ทุกกลุ่ม สำหรับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนมีอัตราการตาย 100% (ตารางที่ 2)

3) การตรวจหาระยะคุ้มโรค

ผลการตรวจหาระยะคุ้มโรค พบว่าหลังจากฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน เปิดทดลองกลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้ง มีความคุ้มโรค 100% ตั้งแต่เดือนแรกถึงเดือนที่ 11 และเดือนสุดท้ายมีความคุ้มโรค 80% ในขณะที่เปิดกลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 2 ครั้ง มีความคุ้มโรค 100% ตั้งแต่เดือนแรกถึงเดือนสุดท้าย สำหรับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนมีอัตราการตาย 100% ทุกเดือน (ตารางที่ 3)

¹¹ID Screen®, France

¹²Infinite M200 PRO, Switzerland

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่ม พบว่าเปิดทดลองทุกกลุ่มมีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio > 0.5) โดยกลุ่มที่ฉีดวัคซีนนาน 3 และ 5 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีน นาน 7, 10 และ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับกลุ่มที่ฉีดวัคซีนนาน 7 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ฉีดวัคซีน นาน 10 และ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนนาน 10 และ 14 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการตรวจหาระยะคุ้มโรค พบว่าเปิดทดลองทั้งหมด ทั้งกลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (ค่า S/P ratio > 0.5) และกลุ่มที่ฉีดวัคซีน จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้ง มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ทุกเดือน (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

ในปี 2562 ผู้วิจัยได้ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน พบว่าให้ความคุ้มโรคในเปิดพันธุ์กาก็แคมป์เบลล์ได้ 100% แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว รวมทั้งสามารถลดได้สปีดเหลือตัวละ 0.5 ml ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกเพียง 7 วัน ในขณะที่เปิดกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์ริน มีระดับแอนติบอดีลดลงอย่างชัดเจน หลังฉีดวัคซีนเข็มแรก 21 วัน เมื่อฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 7 วัน ระดับแอนติบอดีจึงสูงขึ้นมาใหม่ และระดับแอนติบอดีลดลงอีกครั้งหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 14 วัน ในขณะที่กลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงคงที่ตลอดการทดลองและให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดหลังฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 นาน 14 วัน (วรพรและวีรชาย, 2562)

เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ที่ทดสอบหาความคุ้มโรคแรกเริ่มและระยะคุ้มโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน จากการทดลองจะเห็นว่าวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันที่ผสม MONTANIDE™ ISA 71 VG โดยใช้เชื้อ 1.0×10^9 CFU/ml (ขนาดฉีดได้สละ 0.5 ml) สามารถให้ความคุ้มโรคแรกเริ่มที่ 3 วันหลังฉีดวัคซีนและให้ผลได้ 100% หลังฉีดวัคซีน 7 วัน และวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้นานถึง 12 เดือน รวมทั้งมีระดับแอนติบอดีที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งการฉีดวัคซีน 1 ครั้งและ 2 ครั้งทุกเดือน (WOAH, 2018a) ต่างจากวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อตายไม่ผสมแอดจูแวนท์ (ชนิดบรอกแบคเทอร์ริน) ที่สทช. ผลิตในปัจจุบัน คือ ต้องฉีดวัคซีนตัวละ 1 ml จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 3 สัปดาห์ วัคซีนจึงเริ่มให้ความคุ้มโรคภายหลังฉีดวัคซีน 2 สัปดาห์และให้ความคุ้มโรคได้ 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) เช่นเดียวกับงานวิจัยวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ที่ไม่ได้ผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีน ดังเช่น Olson and Schlink (1986) ทดลองผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดเชื้อเป็น สเตรน Clemson University (CU) แล้วละลายน้ำดื่มให้ไก่จวง พบว่าวัคซีนเริ่มให้ความคุ้มโรคแรกเริ่มภายใน 4 วันหลังทำวัคซีน เมื่อทำวัคซีนครั้งเดียว ให้ความคุ้มโรคได้นาน 8 สัปดาห์ แต่หากทำวัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 3 สัปดาห์ ให้ความคุ้มโรคได้นาน 13 สัปดาห์ ในขณะที่การผสมแอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้ดีขึ้น เช่น Belloc *et al.* (2008) ที่ทดลองฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดบรอกแบคเทอร์รินและชนิดน้ำมัน พบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงกว่าวัคซีนชนิดบรอกแบคเทอร์รินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้มีงานวิจัยเปรียบเทียบการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดอะลัมและชนิดน้ำมัน พบว่าวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงและให้ความคุ้มโรคสูงกว่าวัคซีนชนิดอะลัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (levy *et al.*, 2013) รวมทั้งมีรายงานการใช้แอดจูแวนท์ชนิดน้ำมันในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ในรูปแบบต่างๆ อย่าง

ประสบผลสำเร็จ โดยช่วยให้ภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้เร็ว เพิ่มระดับภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นและยาวนาน เพิ่มระยะคุ้มโรคและให้ความคุ้มโรคสูงต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ (Abdel Aziz *et al.* 2015; Burns *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับวัคซีนเฮโม-รายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันที่สทช.ผลิตในปัจจุบัน จากเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* B:2,5 เริ่มให้ความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีนนาน 3 สัปดาห์ และให้ความคุ้มโรคได้นาน 15 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2557) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah *et al.* (1997) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดน้ำมันในกระป๋อง พบว่าวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้นาน 250 วันและมีระดับแอนติบอดีสูงนาน 300 วัน และ Muneer *et al.* (2005) ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมียชนิดอะลัมและชนิดน้ำมันในพื้นที่ พบว่าโคและกระป๋องที่ฉีดวัคซีนชนิดน้ำมันมีระดับแอนติบอดีสูงนาน 360 วัน ต่างจากกลุ่มที่ฉีดวัคซีนชนิดอะลัม ซึ่งมีระดับแอนติบอดีลดลงหลังฉีดวัคซีนเพียง 3 เดือน และระดับแอนติบอดีลดลงต่ำสุดภายใน 6 เดือนหลังฉีดวัคซีน

สรุป

วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน ขนาดฉีดได้สละ 0.5 ml ที่ผลิตผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนดทางห้องปฏิบัติการ มีความปลอดภัย เปิดพันธุ์จากแคมป์เบลล์มีความคุ้มโรคแรกเริ่มหลังจากฉีดวัคซีน 3 วัน และวัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้นานอย่างน้อย 12 เดือน แม้ฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียน เพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำการใช้สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้าราชการและพนักงาน ฝ่ายผลิตวัคซีน แบคทีเรีย ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนแบคทีเรีย ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก กลุ่มสัตว์ทดลอง และกลุ่มวิจัย และพัฒนา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา รักศรี ธนรัตน์ จานุกิจ และจันทร์ทิพย์ แสงทอง 2547 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* ในวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(2): 19-25
- ประกายกร ธาธานาย 2560 โรคสัตว์ปีกและการป้องกัน ใน การผลิตสัตว์ปีก หน้า 10
- พยนต์ สินสูงศักดิ์ 2547 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 14(1): 55-56
- วรพร ปู่สูงเนิน และวีรชาย ปู่สูงเนิน 2562 ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 28(1): 27-42
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2557 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ ศูนย์สื่อสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ หน้า 13
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ก เรื่องการทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ (SOP-QCB-024) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข เรื่องการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อรา และแบคทีเรียของชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (SOP-QCP-031) หน้า 1-6
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ค เรื่องการทดสอบความหนืด (Viscosity test) ของบรอตแบคทีเรียเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-027) หน้า 1-3

- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ง เรื่องการทดสอบความคงตัว (Stability test) ของบรอกแบคทีเรีย
เฮโมรายิกเซพติซีเมีย (SOP-QCB-028) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562จ เรื่องการทดสอบความปลอดภัย (safety test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่
(SOP-QCB-026) หน้า 1-3
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ฉ เรื่องการทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่
(SOP-QCB-025) หน้า 1-3
- Abdel Aziz H. M. G., El-Enbaawy M. I. H., Afifi M., Ibrahim S. I., Omar L. and Koudier M. H. 2015. Efficacy of Montanide ISA-70-VG as Adjuvant to Fowl Cholera Vaccine. J. Vet. Adv. 5(3): 848-852.
- Arous, J. B., Deville, S., Pal, J. K., Baksi, S., Bertrand, F. and Dupuis, L. 2013. Reduction of Newcastle Disease Vaccine Dose Using a Novel Adjuvant for Cellular Immune Response in Poultry. Proc. Vac. 7: 28-33.
- ASEAN Secretariat. 1998. ASEAN standard requirements for fowl cholera bacterin. In ASEAN standards for animal vaccines, Livestock publication series 2A, 2nd ed. Penehar Swadaya, Indonesia. pp. 14-15.
- Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine. 19: 2666-2672.
- Belloc, C., Dupuis, L., Deville, S., Aucouturier, J. and Laval, A. 2008. Evaluation of safety and immune response induced by several adjuvants included in *Pasteurella multocida* vaccines in chickens. Revue. Med. Vet. 159(7): 371-375.
- Burns, K. E., Ruiz, J. and Glisson, J. R. 2003. Evaluation of the effect of heating an oil-emulsion *Pasteurella multocida* bacterin on tissue reaction and immunity. Avian Dis. 47(1): 54-58.
- Ievy, S., Khan, M. F. R., Islam, M. A. and Rahman, M. B. 2013. Isolation and Identification of *Pasteurella multocida* from Chicken for the Preparation of Oil Adjuvanted Vaccine. Microbes and Health. 2(1): 1-4.
- Jansen, T., Hofmans, M. P., Theelen, M. J., Manders, F., and Schijns, V. E. 2006. Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. Vaccine. 24(26) :5400-5405.
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M. and Krut, O. 2015. Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. Scand. J. Immunol. 81(5): 291-297.
- Muneer, R., HUSSAIN, M. and Zahoor, A. B. 2005. Efficacy of Oil Based Haemorrhagic Septicaemia Vaccine: A Field Trial. Int. J. Agri. Biol. 7(4): 571-573.
- Olson, L. D. and Schlink, G. T. 1986. Onset and duration of immunity and minimum dosage with CU cholera vaccine in turkeys via drinking water. Avian Dis. 30(1): 87-92.
- Shah, N. H., Shah, N. H. and Graaf, F. K. 1997. Protection against haemorrhagic septicaemia induced by vaccination of buffalo calves with an improved oil adjuvant vaccine. FEMS Microbiol. Lett. 155(2): 203-207.

- Shah, R. R., Brito, L. A., O'Hagan, D. T. and Amiji, M. M. 2015. Emulsions as Vaccine Adjuvants. *In* Foged, C., Rades, T., Perrie, Y. and Hook, S. (eds.), *Advances in Delivery Science and Technology*, Springer Science+Business Media. New York. pp. 59-61.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2018a. Fowl cholera. *In* *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018*. OIE. Paris, France. pp. 895-905.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2018b. Test for sterility and freedom from contamination of biological materials intended for veterinary use. *In* *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018*. OIE. Paris, France. pp. 109-122.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบ	เกณฑ์	ผล	การตัดสิน
การทดสอบในกระบวนการผลิต			
1. การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย	1.0×10^9 CFU/ml	1.0×10^9 CFU/ml	ผ่าน
2. การทดสอบความบริสุทธิ์	ไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก <i>P. multocida</i>	ไม่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นนอกจาก <i>P. multocida</i>	ผ่าน
3. การทดสอบการฆ่าเชื้อโดยสมบูรณ์	ไม่มี <i>P. multocida</i> หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร	ไม่มี <i>P. multocida</i> หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดใดขึ้นบนอาหาร	ผ่าน
การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป			
1. การทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อใสและไม่มีเจริณของเชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อใสและไม่มีเจริณของเชื้อจุลินทรีย์	ผ่าน
2. การทดสอบชนิดอิมัลชัน	คงอยู่เหนือน้ำและไม่กระจายตัวในน้ำ	คงอยู่เหนือน้ำและไม่กระจายตัวในน้ำ	ผ่าน
3. การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์	เป็นเนื้อเดียวกัน และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน	เป็นเนื้อเดียวกัน และมีขนาดอิมัลชันประมาณ 1 ไมครอน	ผ่าน
4. การทดสอบความหนืด	น้อยกว่า 100 centipoises	19.33	ผ่าน
5. การทดสอบความคงตัว	แยกชั้นไม่เกิน 5%	2%	ผ่าน

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาความคุ้มโรคแรกเริ่มและค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD) หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน นาน 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน

วันที่	กลุ่มฉีดวัคซีน			ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD)	กลุ่มควบคุม		
	จำนวนสัตว์คุ้มโรค (ตัว)	จำนวนสัตว์ทั้งหมด (ตัว)	% ความสำเร็จ		จำนวนสัตว์ตาย (ตัว)	จำนวนสัตว์ทั้งหมด (ตัว)	% การตาย
3	4	5	80	0.97±0.23 ^A	2	2	100
5	4	5	80	2.26±1.19 ^A	2	2	100
7	5	5	100	6.40±0.96 ^B	2	2	100
10	5	5	100	8.46±1.02 ^C	2	2	100
14	5	5	100	8.69±1.32 ^C	2	2	100

- ตัวอักษร A, B และ C ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
- ค่า S/P ratio > 0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่
ค่า S/P ratio ≤ 0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาระยะคัมโรคของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมันและค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD) ทุกเดือน หลังการฉีดวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ชนิดน้ำมัน

เดือน ที่	ผลการตรวจหาระยะคัมโรค									ค่า S/P ratio เฉลี่ย (Mean±SD)	
	กลุ่มฉีดวัคซีน 1 ครั้ง			กลุ่มฉีดวัคซีน 2 ครั้ง			กลุ่มควบคุม			กลุ่มฉีดวัคซีน 1 ครั้ง	กลุ่มฉีดวัคซีน 2 ครั้ง
	จำนวนสัตว์ คัมโรค (ตัว)	จำนวนสัตว์ ทั้งหมด (ตัว)	% ความ คัมโรค	จำนวนสัตว์ คัมโรค (ตัว)	จำนวนสัตว์ ทั้งหมด (ตัว)	% ความ คัมโรค	จำนวนสัตว์ ตาย (ตัว)	จำนวนสัตว์ ทั้งหมด (ตัว)	% การ ตาย		
1	5	5	100	5	5	100	2	2	100	9.95±0.80 ^{Aa}	10.25±0.56 ^{Aa}
2	5	5	100	5	5	100	2	2	100	8.95±1.07 ^{Aa}	9.91±0.29 ^{Aa}
3	5	5	100	5	5	100	2	2	100	8.40±1.88 ^{ABa}	9.09±1.13 ^{ABa}
4	5	5	100	5	5	100	2	2	100	8.02±1.75 ^{ABa}	8.48±1.21 ^{ABa}
5	5	5	100	5	5	100	2	2	100	7.72±1.90 ^{ABa}	8.21±2.06 ^{ABa}
6	5	5	100	5	5	100	2	2	100	6.70±1.55 ^{BCa}	8.08±1.01 ^{Ba}
7	5	5	100	5	5	100	2	2	100	6.38±1.64 ^{BCa}	7.62±1.70 ^{BCa}
8	5	5	100	5	5	100	2	2	100	5.99±1.61 ^{BCa}	5.54±0.83 ^{CDEa}
9	5	5	100	5	5	100	2	2	100	4.46±1.55 ^{CDa}	5.43±1.36 ^{CDEa}
10	5	5	100	5	5	100	2	2	100	4.32±1.35 ^{CDa}	4.93±1.90 ^{DEFa}
11	5	5	100	5	5	100	2	2	100	3.97±0.83 ^{Da}	3.64±2.23 ^{DEFa}
12	4	5	80	5	5	100	2	2	100	3.96±0.73 ^{Da}	2.90±1.75 ^{Fa}

- ตัวอักษร A, B, C, D, E และ F ที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวอักษร a ที่เหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
- ค่า S/P ratio > 0.5 ผลเป็นบวก แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่ และ ค่า S/P ratio ≤ 0.5 ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้ออหิวาต์เป็ด-ไก่

Onset and duration of immunity of oil adjuvant fowl cholera vaccine

Woraporn Poosungnoen¹

Ritluechai Poosungnoen¹

Abstract

Backgrounds: Fowl cholera is a contagious bacterial disease that affects chickens, ducks, geese, turkeys, and birds, caused by *Pasteurella multocida* infection (*P. multocida*) serotype A. Immunization methods were considered the most effective prevention measures. Until now, the Bureau of Veterinary Biologics produced inactivated fowl cholera vaccine (broth bacterin) vaccination by injecting 1 ml/dose every three months. Oil adjuvant improves the effectiveness of vaccines by reducing volume, reducing the dose of antigen, reducing the frequency of vaccination, enhancing the breadth of the immune response, enhancing and sustaining immune responses, safe and increasing immunological memory associated with the adaptive immune system. The objective of this research was to study the onset and duration of immunity of the fowl cholera vaccine by using an oil adjuvant.

Methods: The oil adjuvant fowl cholera vaccine was produced from a bacterium *P. multocida* serotype A:1 (local strain) and ready-to-use adjuvant (MONTANIDE™ ISA 71 VG) containing 1.0×10^9 CFU/ml (0.5 ml/dose). The vaccine was tested in a laboratory and tested in Khaki Campbell ducks: safety, the onset of immunity (ducks were challenged 3, 5, 7, 10, and 14 days after vaccination), and duration of immunity (ducks were challenged every month after vaccination with single and twice vaccinations) including serum antibody was detected by ELISA.

Results: It was found that the vaccine has met the quality standard requirement in laboratory tests, is safe, and no symptoms or deviation of fowl cholera showed in ducks. For the onset of immunity, the ducks were protected against fowl cholera three days after vaccination (80% protection) and 100% at seven days after vaccination. For the duration of immunity, the ducks were protected against fowl cholera 12 months after vaccination, both single and twice. Moreover, the results of the antibody determination showed that the antibody titer of ducks immunized with single vaccination was not statistically different from the antibody titer detected from ducks vaccinated with twice vaccination ($P > 0.05$).

Conclusion: The oil adjuvant fowl cholera vaccine (0.5 ml/dose) is safe and provides quick onset protective immunity after three days of vaccination and long-term protection against fowl cholera for at least 12 months.

Keywords: Fowl cholera vaccine, Oil adjuvant, Onset of immunity, Duration of immunity

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, 30130

การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK

ภาวนา ทศพิทักษ์กุล¹ อติชาติ อภิรักษ์¹

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน โดยทั่วไปจะถูกเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสัตว์ที่ติดเชื้อ ด้วยเซลล์ปฐมภูมิที่มีความไวรับและเอื้อในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เช่น เซลล์อذنทะแกะ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ปฐมภูมิเป็นเซลล์ที่จัดเตรียมและเพาะเลี้ยงได้ยาก นอกจากนี้ยังต้องใช้สัตว์ทดลอง เซลล์อذنทะแกะ จึงไม่เหมาะแก่การนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในปริมาณมาก โดยเซลล์ไลน์ Mardin-Darby Bovine Kidney (MDBK) ได้ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์ทางเลือก จากคุณสมบัติของเซลล์ที่สามารถเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน ได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK โดยการเติมเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ที่ MOI 0.01 ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์และเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 192 ชั่วโมงหลังเติมเชื้อไวรัส แบบในสารละลาย medium และแบบ whole culture ปริมาณของเชื้อไวรัสจะถูกวัดด้วยวิธี TCID₅₀ จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ MDBK ที่ติดเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน เริ่มแสดงลักษณะผิดปกติ (CPE) ภายใน 2 วัน หลังเติม inoculum และจากความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับระยะเวลา เชื้อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังเติม inoculum และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังเติม inoculum โดยมีค่าปริมาณเชื้อไวรัสที่ 6.37 ± 0.31 และ 7.63 ± 0.42 log₁₀ TCID₅₀/ml ในตัวอย่างจากสารละลาย medium และ whole culture ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างสารละลาย medium 72 ชั่วโมงหลังเติม inoculum ยังคงพบปริมาณเชื้อไวรัสที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 48 hpi ($p < 0.05$) จากนั้นปริมาณเชื้อไวรัสจะค่อยๆ ลดลง ดังนั้นเพื่อให้การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสมีปริมาณเชื้อไวรัสสูงที่สุด การเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสแบบ whole culture ที่ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมงหลังเติม inoculum จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK

คำสำคัญ: ไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น เซลล์ไลน์ MDBK การเจริญเติบโต

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคคัมปี สกิน เกิดจากเชื้อไวรัส Lumpy skin disease virus (LSDV) สกุล *Capripoxvirus* วงศ์ *Poxviridae* โดยมีรหัสสายพันธุกรรมแบบ single linear dsDNA ความยาวประมาณ 150,000 bp ตัวไวรัสมีขนาดใหญ่และมีรูปร่างแบบ brick-shaped ยาว 293-299 nm กว้าง 262-273 nm (WOAH, 2021) เชื้อ LSDV สามารถแพร่กระจายได้หลายวิธี เช่น จากพาหะที่เป็นตัวนำเชื้อโรคนี้ไปติดต่อกันจากสัตว์สู่สัตว์ ได้แก่ เห็บแข็ง (Tuppurainen *et al.*, 2011) ยุงรำคาญ รื่น (Sanz-Bernardo *et al.*, 2020) และแมลงวันคอก (Paslaru *et al.*, 2021) จากการสัมผัสทางตรงและทางอ้อมจากน้ำลาย สารคัดหลั่ง สะเก็ดแผล และการใช้อุปกรณ์ต่างๆ ร่วมกัน หากแต่ช่องทางการติดต่อของโรคเหล่านี้แพร่กระจายเชื้อไวรัสได้ต่ำกว่าการแพร่กระจายจากพาหะนำโรค (WOAH, 2021) ดังนั้นวิธีการหลักในการป้องกันโรคคัมปี สกิน คือ การกำจัดและป้องกันแมลงพาหะในพื้นที่ ทำความสะอาดคอกและอุปกรณ์ในการเลี้ยง กักสัตว์ใหม่ก่อนนำเข้าพื้นที่ และการฉีดวัคซีน

การเพาะเลี้ยงเชื้อ LSDV ในห้องปฏิบัติการ สามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ปฐมภูมิและเซลล์ไลน์ เมื่อเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงจะมีลักษณะ cytopathic effects (CPE) เซลล์จะหดตัวจนกลมและหลุดจากพื้นผิวยึดเกาะ โดยเซลล์ปฐมภูมิมักจะเกาะจัดเป็นเซลล์ที่มีความไวรับสูง หากแต่การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ปฐมภูมินั้น มีความเสี่ยงที่จะมีการปนเปื้อนเชื้ออื่น เช่น เชื้อไวรัส bovine viral diarrhea จากกะที่นำมาใช้ผลิตเซลล์ปฐมภูมิ (WOAH, 2018) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความยุ่งยากซับซ้อนในการจัดหา เตรียม และการเพาะเลี้ยง จึงไม่เหมาะสมในการใช้เซลล์เหล่านั้น มาเพาะขยายไวรัสสำหรับงานการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการนำเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ มาใช้ในการเพาะขยายเชื้อไวรัส เช่น เซลล์ Vero (Mashaly *et al.*, 2020), เซลล์ Baby Hamster Kidney (BHK) (Wolff *et al.*, 2021) และเซลล์ Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (Fay *et al.*, 2020; Mashaly *et al.*, 2020; Moller *et al.*, 2019; Wallace and Viljoen, 2002; WOAH, 2021) เป็นต้น เซลล์ MDBK จัดเป็นเซลล์ homologous continuous cell line ที่มีต้นกำเนิดมาจากโค ที่เป็นสัตว์ที่มีความไวรับต่อเชื้อ LSDV จึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตของไวรัสมากกว่า heterologous continuous cell line ที่มีต้นกำเนิดจากสัตว์อื่น เช่น ลิงและแฮมเตอร์ เป็นต้น จากแนวทางข้อมูลของ WOAH การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส LSDV ในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสในวันที่ 4 ถึงวันที่ 8 หลังเซลล์ติดเชื้อ เมื่อเห็น CPE ประมาณ 50-70% เพื่อให้ได้ปริมาณของไวรัสที่สูงที่สุด หรือสามารถเก็บเกี่ยวเร็วกว่านั้นได้ หากพบ CPE ที่รุนแรงและเซลล์พร้อมที่จะหลุดลอก (WOAH, 2021) อย่างไรก็ตามทาง WOAH ไม่ได้ลงรายละเอียดในเรื่องของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสและ Multiplicity of infection (MOI) ที่ใช้ในการเพาะขยายเชื้อไวรัส จากข้อมูลงานวิจัยในต่างประเทศพบการใช้ MOI ที่ 0.01 จนถึง 5 และพบการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนที่ $5 \log_{10}$ pfu/ml และ $2 \log_{10}$ pfu/ml ในระยะเวลา 2-3 วัน หลังเติมเชื้อไวรัส ตามลำดับ (Fay *et al.*, 2020) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้ MOI ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.01 ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ LSDV เพื่อลดปริมาณเชื้อไวรัสตั้งต้นที่ต้องใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัสหนึ่งรอบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส LSDV สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK เพื่อเป็นประโยชน์ในการออกแบบและพัฒนากระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนโรคคัมปี สกิน เพื่อควบคุมและป้องกันโรคในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัส

เชื้อ LSDV ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือสายพันธุ์ 991.2 ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อโคเนื้อที่ป่วยในจังหวัดร้อยเอ็ด ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์เชื้อไวรัสจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ passage ที่ 9 และนำมาเพาะขยายที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

เซลล์ไลน์ MDBK

เซลล์ไลน์ MDBK ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์ทดสอบและวิจัยชีววัตถุสำหรับสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ passage ที่ 21

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ MDBK

เซลล์ไลน์ MDBK ชนิดเกาะพื้นผิวของภาชนะ ถูกเพาะเลี้ยงด้วย Growth medium ปริมาตร 5 ml ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (EMEM)¹, 10% fetal bovine serum (FBS)², และ 1% penicillin/streptomycin³ ที่อุณหภูมิ 37°C ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T25cm² tissue culture flask)⁴ จำนวน 9 ขวด ต่อหนึ่งรอบการทดลอง โดยมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ MDBK ให้เจริญเติบโตมากกว่า 80% ของพื้นที่ผิว ประมาณ 1 วัน

การเพาะเลี้ยงไวรัสและการเก็บตัวอย่าง

เมื่อเซลล์ไลน์ MDBK เจริญเติบโตมากกว่า 80% ของพื้นที่ผิว นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มาถ่ายมีเดียเก่าออกล้างด้วย EMEM 1 ครั้ง จากนั้นเติมเชื้อ LSDV ที่ถูกเพาะขยายที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (inoculum) ลงไป โดยเซลล์จะถูกทำให้ติดเชื้อด้วย MOI 0.01 เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง (adsorption period) จากนั้นทำการเติม fresh maintenance medium ที่ประกอบด้วย EMEM¹, 2.5% FBS², และ 1% penicillin/streptomycin³ ให้ครบปริมาตร 5 ml จำนวน 9 ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้เชื้อไวรัส เจริญเติบโตตามระยะเวลาที่กำหนด การเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสจะดำเนินการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงหลังการเติม inoculum (hour post inoculation, hpi) (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, และ 192 hpi) เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด หยิบขวดเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสออก 1 ขวด เพื่อนำมาสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ⁵ และทำการเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัส 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสในสารละลาย (medium) ปริมาตร 1 ml จากนั้นเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัส ส่วนที่ 2 แบบ whole culture ปริมาตร 4 ml ด้วยวิธี freeze-thaw โดยนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C และละลายในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C จำนวน 3 รอบ จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 วิธีไปปั่นแยกกากที่ความเร็วรอบ 600 x g เป็นระยะเวลา 20 นาที (WOAH, 2021) ด้วยหัวหมุนแบบมุมแกว่ง ST-2504MS rotor⁶ ที่อุณหภูมิ 4°C และแยกเก็บตัวอย่างที่เป็นส่วนใส (supernatant) ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะถูกนำมาทดสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสที่มีชีวิต โดยการทดลองนี้จะดำเนินการทั้งหมด 3 ซ้ำ

การทดสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสที่มีชีวิต (virus titration)

ทดสอบหาปริมาณของเชื้อไวรัสที่มีชีวิต ด้วยวิธี TCID₅₀ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ MDBK ใน 96-well plates ให้เจริญเติบโตมากกว่า 80% ของพื้นที่ผิวภาชนะ ตัวอย่างเชื้อไวรัสจะถูกทำให้เจือจางแบบ Ten fold serial dilutions และเซลล์ MDBK ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย 100 µl ของแต่ละ serial dilution บ่มเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติม fresh maintenance media 100 µl และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C สังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับทุกวัน อ่านผลการทดสอบในวันที่ 4 และคำนวณไตเตอร์ด้วยวิธี Spearman-Kärber (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561; Lei *et al.*, 2021) โดยมีหน่วยวัดเป็น TCID₅₀/ml

¹Nissui Pharmaceutical, Japan

²Sigma, USA

³Gibco, USA

⁴Corning, USA

⁵Olympus CKX53, Japan

⁶Kubota, Japan

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบผลปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่างจากสารละลาย medium และ whole culture (\log_{10} TCID₅₀/ml) ด้วยวิธี t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 365

ผล

ลักษณะ CPE ของเชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน ในเซลล์ไลน์ MDBK

ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ LSDV ในเซลล์ไลน์ MDBK ประเมินจากการเติมเชื้อ LSDV (inoculum) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง และสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ทุกวัน จากการทดลองพบว่าที่ 24 hpi ไม่พบลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 1B) ลักษณะเซลล์ไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส ซึ่งจะเริ่มสังเกตเห็นลักษณะ CPE ในวันที่ 2 หลังเติม inoculum มีลักษณะ CPE แบบเซลล์กลมทอและเกาะกลุ่ม (cluster) ในลักษณะ rosette shape กระจายทั่วแผ่นเซลล์เกาะพื่นผิว (multifocal areas of hyperplastic cells) (รูปที่ 1C) และค่อยๆเพิ่มขึ้น จนหลุดจากพื้นผิวอย่างสมบูรณ์ เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในวันที่ 3 หลังเติม inoculum (รูปที่ 1D) ลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแตกต่างจากในเซลล์ควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ โดยเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อไม่พบลักษณะที่ผิดปกติ ดังนั้นลักษณะผิดปกติของเซลล์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส LSDV และเชื้อไวรัสมีความสามารถในการเข้าเซลล์และเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้

การเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน ในเซลล์ไลน์ MDBK

เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน ในเซลล์ไลน์ MDBK เชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน (inoculum) ถูกเติมลงในเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ MOI 0.01 และบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน ตัวอย่างในสารละลาย medium และ whole culture ถูกเก็บเกี่ยว ณ เวลาต่างๆ ที่ถูกกำหนด จากนั้นหาค่าปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี TCID₅₀ ในเซลล์ไลน์ MDBK จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อไวรัสเริ่มมีการเพิ่มจำนวนตั้งแต่ 24 hpi โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ $0.13 \log_{10}$ TCID₅₀/ml และ $1.07 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ตามลำดับ ตามด้วยการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยที่ 48 hpi ที่ $0.8 \log_{10}$ TCID₅₀/ml และ $1.73 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ตามลำดับ และที่ 72 hpi มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ $0.93 \log_{10}$ TCID₅₀/ml และ $0.2 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ตามลำดับ โดยมีปริมาณเชื้อไวรัสที่ $6.37 \pm 0.31 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ในตัวอย่างสารละลาย medium ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 48 hpi อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ $7.63 \pm 0.42 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ในตัวอย่าง whole culture (ตารางที่ 1) จากนั้นปริมาณเชื้อไวรัสค่อนข้างคงที่และลดลง เมื่อผ่านระยะเวลา 72 hpi เป็นต้นไป (รูปที่ 2) ซึ่งในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 24 – 144 hpi นั้น ปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่างสารละลาย medium มีปริมาณน้อยกว่าในตัวอย่าง whole culture อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) โดยปริมาณเชื้อไวรัสจากวิธีการเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสแบบในสารละลาย medium มีปริมาณเชื้อไวรัสน้อยกว่าการเก็บแบบ whole culture ถึง $2 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ในวันที่ 2 หลังเติม inoculum และน้อยกว่าถึง $1.26 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ในวันที่ 3 หลังเติม inoculum (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

เชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน เป็นเชื้อไวรัสที่เจริญเติบโตได้ในเซลล์ปฐมภูมิ อย่างเซลล์อ้นทะแกะที่ยากต่อการเพาะเลี้ยง เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ช้า เพาะขยายได้อย่างจำกัด และมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้ออื่น เพื่อลดข้อจำกัดเหล่านั้น จึงมีการนำเซลล์ไลน์อย่าง MDBK เข้ามาใช้ในการเพาะขยายเชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน จากงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อไวรัสโรคล้มปี่ สกีน สายพันธุ์ท้องถิ่นสามารถเจริญเติบโตได้ดีและเหนียวนำไปให้เซลล์ MDBK เกิดลักษณะ CPE ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ (Fay et

al., 2020; Kumar *et al.*, 2021; Mashaly *et al.*, 2020; Moller *et al.*, 2019) โดยลักษณะ CPE สามารถพบได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป (Plowright and Witcomb, 1959; Mashaly *et al.*, 2020)

การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น วัดจากการหาค่าปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธี TCID₅₀ โดยปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่าง whole culture มากกว่าตัวอย่างสารละลาย medium (Fay *et al.*, 2020) ในทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งในตัวอย่างสารละลาย medium ที่มีปริมาณเชื้อไวรัสที่น้อยกว่านั้น คาดการณ์ว่าในสารละลายน่าจะประกอบด้วยไวรัสแบบ extracellular enveloped virions (EEVs) ที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ที่แตกออก เป็นหลัก หากแต่เชื้อไวรัสในตัวอย่าง whole culture นอกจากจะมีไวรัสแบบ EEVs แล้วนั้น ยังมีไวรัสแบบ intracellular mature virions (IMVs) ที่ยังสะสมอยู่ในเซลล์ และถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ เมื่อทำการเก็บเกี่ยวแบบ freeze-thaw ที่ทำให้เซลล์แตกจะส่งผลให้มีปริมาณเชื้อไวรัสที่มากขึ้น ดังนั้นวิธีการ freeze-thaw เพื่อให้เซลล์แตก จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสชนิดนี้ และไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของเชื้อไวรัส (Plowright and Witcomb, 1959) ไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ไลน์ MDBK ภายใน 24 hpi และเพิ่มอย่างรวดเร็วที่ 48 hpi จนถึงจนสูงสุดที่ 72 hpi ทั้งในการเก็บเกี่ยวตัวอย่างทั้งสองวิธี จากนั้นปริมาณเชื้อไวรัสค่อนข้างคงที่และลดลง โดยลักษณะการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดในระยะเวลา 48-72 hpi เช่น เชื้อไวรัสสายพันธุ์ Neethling สายพันธุ์ Egypt และสายพันธุ์ Africa (Mashaly *et al.*, 2020; Fay *et al.*, 2020) ทั้งนี้ความแตกต่างของปริมาณเชื้อไวรัสที่เจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยงและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในแต่ละการทดลอง มีผลมาจากปัจจัยหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของเชื้อไวรัส เซลล์เพาะเลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยง ปริมาณเชื้อไวรัสตั้งต้น (MOI) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ และสัดส่วนของซีรัม ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในปัจจัยต่างๆ เพิ่มเติมในอนาคตเพื่อพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสต่อไป

จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดี นอกจากนี้เชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ในสกุล *Capripoxviruses* สามารถให้ความคุ้มโรคในสกุลเดียวกันได้ (WOAH, 2021) จึงสามารถนำเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น มาเป็นสัดไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนโรคลัมปี สกิน ในการควบคุมและป้องกันโรคลัมปี สกิน ในประเทศไทยได้

สรุป

จากผลการวิจัยการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK พบว่าเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยความสัมพันธ์ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงกับปริมาณเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมงหลังเติม inoculum และเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัสแบบ whole culture เป็นช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเชื้อไวรัส เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุด ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนากระบวนการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสสำหรับการผลิตวัคซีนโรคลัมปี สกิน ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น และศูนย์ทดสอบและวิจัยชีววัตถุสำหรับสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์ MDBK และเจ้าหน้าที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์และศูนย์ทดสอบและวิจัยชีววัตถุสำหรับสัตว์ที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561 มาตรฐานวิธีการปฏิบัติงานเรื่อง การทดสอบ Infectious Titer Test (TCID₅₀) (SOP-QCF-035) ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย หน้า 1-4
- Fay, P. C., Cook, C. G., Wijesiriwardana, N., Tore, G., Comtet, L., Carpentier, A., Shih, B., Freimanis, G., Haga, I. R. and Beard, P. M. 2020. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. *J. Virol. Methods.* 285: 2-7.
- Kumar, N., Chander, Y., Kumar, R., Khandelwal, N., Riyesh, T., Chaudhary, K. 2021. Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. *PLoS ONE* 16(1): e0241022.
- Lei, C., Yang, J. and Sun, X. 2021. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virol. Sin.* 36(1): 141-144
- Mashaly, M. M., El-Deeb, A. H., Shahein, M. A. and Hussein, H. A. 2020. Comparative growth kinetic of Egyptian LSDV isolate in Vero and MDBK cell line. *J. of Viral. Sci.* 7: 66-76.
- Moller, J., Moritz, T., Schlottau, K., Krstevski, K., Hoffmann, D., Beer, M. and Hoffmann, B. 2019. Experimental lumpy skin disease virus infection of cattle: comparison of a field strain and a vaccine strain. *Arch Virol.* 164: 2931–2941.
- Paslaru, A. I., Verhulst, N. O., Maurer, L. M., Brendle, A., Pauli, N., Vöggtlin, A., Renzullo, S., Ruedin, Y., Hoffmann, B., Torgerson, P. R. and Mathis, A. 2021. Potential mechanical transmission of Lumpy skin disease virus (LSDV) by the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) through regurgitation and defecation. *Current Research in Insect Science.* Jan 1;1:100007.
- Plowright, W., and Witcomb, M. A. 1959. The growth in tissue cultures of a virus derived from lumpy-skin disease of cattle. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 78(2): 397–407.
- Sanz-Bernardo, B., Haga, I. R., Wijesiriwardana, N., Basu, S., Lerner, W., Diaz, A. V., Langlands, Z., Denison, E., Stoner, J., White, M. and Sanders, C. 2020. Quantifying the acquisition and retention of lumpy skin disease virus by haematophagus insects and the implications for transmission and control. *bioRxiv.* Jan 1.
- Tuppurainen, E.S., Stoltz, W.H., Troskie, M., Wallace, D.B., Oura, C.A.L., Mellor, P.S., Coetzer, J.A. and Venter, E. H. 2011. A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of lumpy skin disease virus in cattle. *Transboundary and emerging diseases*, 58(2), pp.93-104.
- Tuppurainen, E., Alexandrov, T. and Beltrán-Alcrudo, D. 2017. Lumpy skin disease field manual – A manual for veterinarians. *FAO Animal Production and Health Manual No. 20.* Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 60 pages.
- Wallace, D. B. and Viljoen, G. J. 2002. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). *Arch Virol.* 147: 659-663.

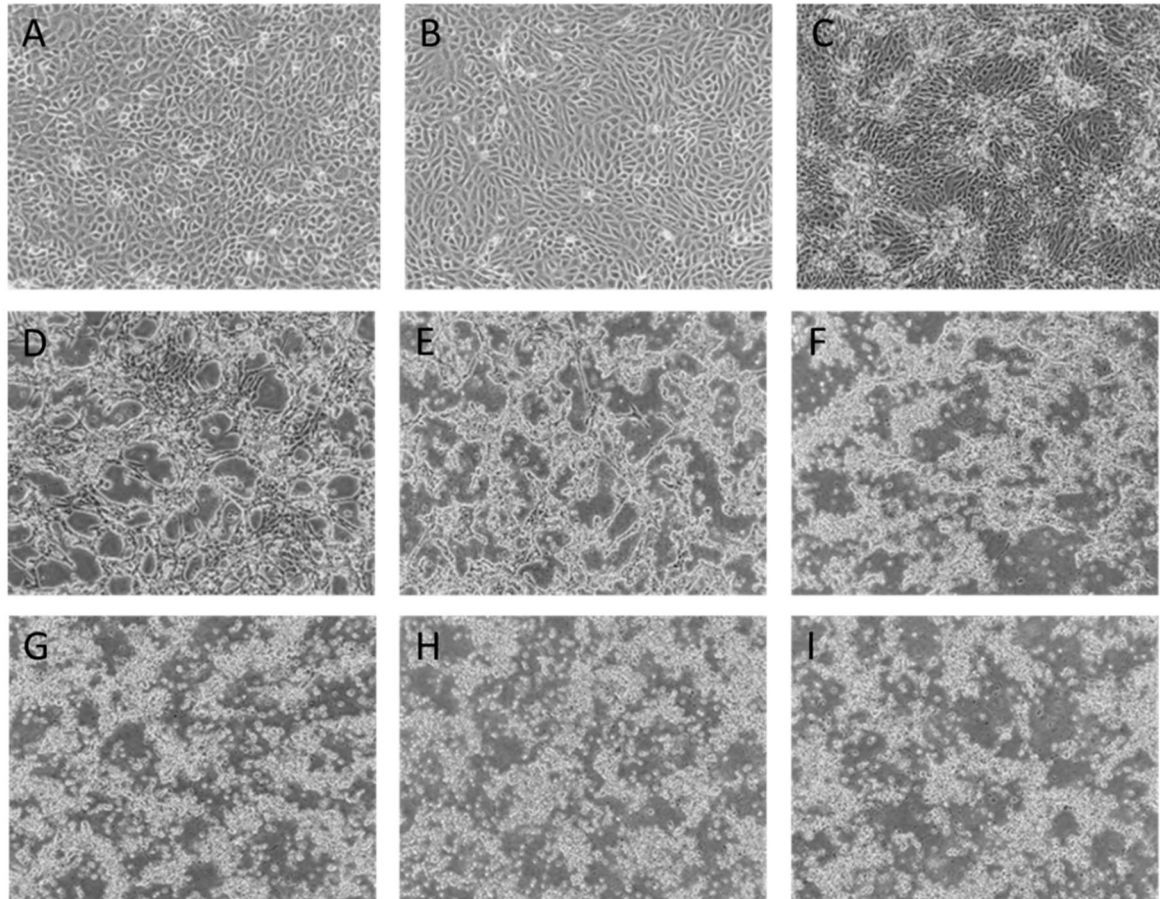
- Wolff, J., Moritz, T., Schlottau, K., Hoffmann, D., Beer, M. and Hoffmann, B. 2021. Development of a safe and highly efficient inactivated vaccine candidate against lumpy skin disease virus. *Vaccines*. 9: 1-30.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2018. Bovine viral diarrhoea. *Manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animal*. Chapter 3.4.7. pp 1075-1096.
- World Organization for Animal Health (WOAH). 2021. Lumpy skin disease. *Manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animal*. Chapter 2.4.13. pp 1-13.

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK กับระยะเวลาที่กำหนด

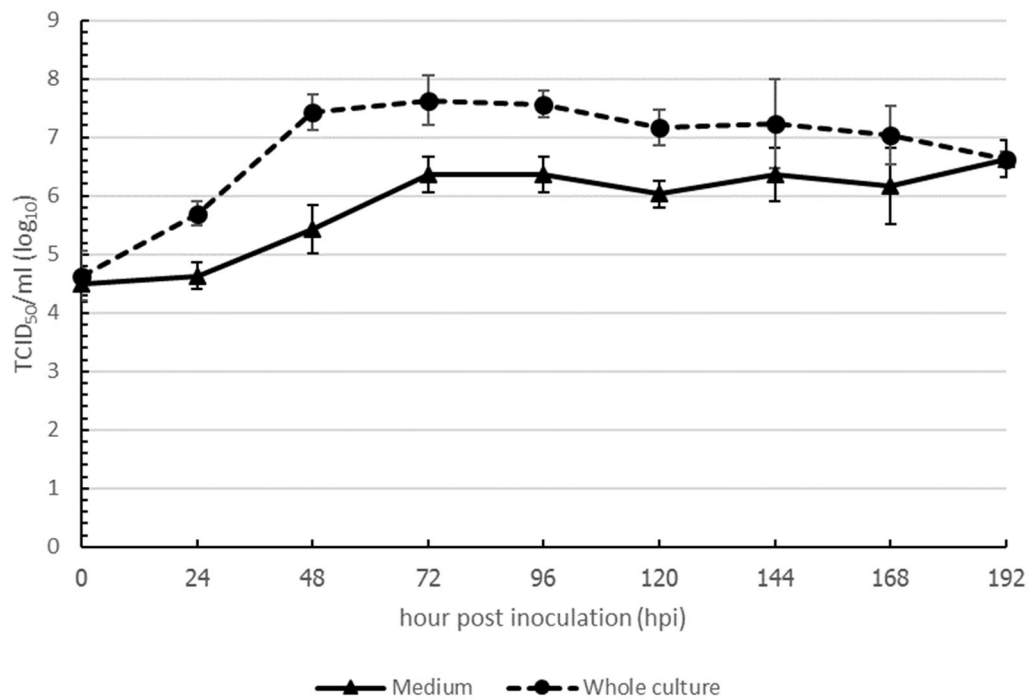
เวลา (ชั่วโมง)	ตัวอย่าง medium		ตัวอย่าง whole culture	
	ปริมาณเชื้อไวรัส (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml±SD)	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ เพิ่มขึ้นใน 24 ชั่วโมง (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	ปริมาณเชื้อไวรัส (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml±SD)	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ เพิ่มขึ้นใน 24 ชั่วโมง (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
0	4.50 ± 0.20 ^{A a}	-	4.63 ± 0.42 ^{A a}	-
24	4.63 ± 0.23 ^{A a}	+ 0.13	5.70 ± 0.20 ^{B b}	+ 1.07
48	5.43 ± 0.42 ^{A b}	+ 0.80	7.43 ± 0.31 ^{B c}	+ 1.73
72	6.37 ± 0.31 ^{A c}	+ 0.93	7.63 ± 0.42 ^{B c}	+ 0.20
96	6.37 ± 0.31 ^{A c}	0.00	7.57 ± 0.23 ^{B c}	- 0.07
120	6.03 ± 0.23 ^{A bc}	- 0.33	7.17 ± 0.31 ^{B c}	- 0.40
144	6.37 ± 0.46 ^{A bc}	+ 0.33	7.23 ± 0.76 ^{B cd}	+ 0.07
168	6.17 ± 0.64 ^{A bc}	- 0.20	7.03 ± 0.50 ^{A cd}	- 0.20
192	6.63 ± 0.31 ^{A c}	+ 0.47	6.63 ± 0.12 ^{A d}	- 0.40

หมายเหตุ 1. ทำ 3 ซ้ำ mean ± SD

- ตัวอักษรยกกำลังตัวใหญ่ แสดงถึงความไม่แตกต่าง (A,A) หรือแตกต่างกัน (A,B) ระหว่างคอลัมน์ภายในแถวเดียวกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
- ตัวอักษรยกกำลังตัวเล็ก แสดงถึงความไม่แตกต่าง (a,a) หรือแตกต่างกัน (a,b) ภายในคอลัมน์เดียวกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 1 Cytopathic effect ของเชื้อไวรัสโรคคัมปี สกิน ต่อเซลล์ไลน์ MDBK ในระยะเวลาต่างๆ
 A) 0 hpi B) 24 hpi C) 48 hpi D) 72 hpi E) 96 hpi F) 120 hpi G) 144 hpi H) 168 hpi I) 192 hpi
 ที่กำลังขยาย x100



รูปที่ 2 ปริมาณไวรัสเฉลี่ยของเชื้อไวรัสโรคคัมปี สกิน สายพันธุ์ท้องถิ่น ในเซลล์ไลน์ MDBK ณ ระยะเวลาต่างๆ
 หลังเติม inoculum ค่าที่แสดงคือ mean \pm SD จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Growth kinetic of Lumpy skin disease virus local strain in MDBK cell line

Pawana Tospitakkul¹Atichat Apirug¹

Abstract

Lumpy skin disease virus (LSDV) is usually isolated with primary cells which are sensitive to virus permission and replication such as lamb testis (LT) cell. However, Primary cells are difficult to prepare and culture, including the use of the experimental animals. Therefore, LT cell is not suitable for virus propagation on a large scale. Mardin-Darby Bovine kidney (MDBK) cell line is an alternative cell line that can support LSDV replication. The objective of this study is to determine the growth kinetics of LSDV local strain in MDBK cell line by inoculating LSDV local strain at a multiplicity of infection of 0.01 in a cell culture flask and harvesting the virus in the medium or harvesting the whole culture every 24 hours post-inoculation (hpi) till 192 hpi. Virus titres were examined in each sample using the TCID₅₀ method. The result suggested that MDBK LSDV-infected cells showed cytopathic effect within 2 days after inoculation and the growth kinetics revealed that LSDV were replicated within 24 hpi and reached its highest peak at 72 hpi for 6.37 ± 0.31 and 7.63 ± 0.42 log₁₀TCID₅₀/ml in the medium sample and whole culture sample, respectively. Especially, 72 hpi virus titer in the medium sample was still significantly increased when compared to 48 hpi ($p < 0.05$). The titre then declined after 72 hpi. Therefore, the effective method for culture and harvesting of LSDV local strain in the MDBK cell line is to use the whole culture harvesting at 48 - 72 hpi.

Keywords: Lumpy skin disease virus, Local strain, MDBK cell line, Growth kinetic

¹Bureau of Veterinary Biologics, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, 30130

หลักการตรวจสอบ vaccine matching ด้วยวิธี virus neutralisation และ LP ELISA ในการคัดเลือกไวรัสสำหรับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

Principle of vaccine matching investigation by virus neutralisation and LP ELISA in seed virus selection for foot and mouth disease vaccine production

วิไล ลินจงสุขงกช

ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ด้านโรคปากและเท้าเปื่อย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

เหตุผลและความเป็นมา

โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease, FMD) เป็นโรคระบาดสัตว์ที่รุนแรง ติดต่อย่างและแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว เกิดขึ้นในสัตว์เกือบทุกชนิดและสัตว์ป่าบางชนิด เกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) จัดอยู่ในกลุ่ม Picornavirus มีทั้งหมด 7 ไทป์ (serotype) คือ O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 (Brooksby and Rogers, 1975) ซึ่งในแต่ละไทป์ไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังแบ่งเป็นไวรัสชนิดย่อย (subtype) มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 64 subtype (Pereira, 1978) ดังนั้นสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับการฉีดวัคซีนไทป์ใดไทป์หนึ่งแล้ว จะไม่ให้ความคุ้มข้ามกับไวรัสไทป์อื่นหรือ subtype อื่น ปัจจุบันประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทยพบการระบาดอยู่เพียง 2 ไทป์ คือ O และ A ดังนั้นการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคจึงจำเป็นต้องเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมและตรงกับชนิดไวรัสที่กำลังระบาดอยู่ในพื้นที่ โดยมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการคือ (1) เพื่อเป็นการบ่งชี้ชนิดไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนมีคุณลักษณะทาง antigen matching ได้ดีกับไวรัสหรือสายพันธุ์ที่กำลังระบาดอยู่ในพื้นที่ (2) เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิชาการเพื่อสนับสนุนการคัดเลือก seed virus vaccine ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนระดับอุตสาหกรรมต่อไป การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว แม่นยำและได้มาตรฐานเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการเลือกใช้วัคซีนให้ตรงกับชนิดไวรัสที่ระบาดในปัจจุบันและใช้เป็นมาตรการในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี ELISA typing (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) ร่วมกับการเพิ่มปริมาณไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี real time RT-PCR (Callahan *et al.*, 2002) และการตรวจจำแนกชนิดไวรัสระดับโมเลกุลด้วยวิธี one step Multiplex RT-PCR (Le *et al.*, 2011) การทดสอบเหล่านี้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัส (antigen detection) จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ (epithelium tissue) หรือ vesicular fluid ที่เก็บจากสัตว์ป่วย ส่วนการตรวจตัวอย่างที่มาจากซีรัมสัตว์จะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Linchongsubongkoch and Janukit, 1994) ควบคู่กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein (Mackay *et al.*, 1998) วิธีการเหล่านี้ให้ผลถูกต้อง มีความจำเพาะและความไวสูง การเก็บตัวอย่างรอยโรคจากสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่สงสัยว่าป่วยควรเก็บตรงบริเวณที่มีไวรัสอยู่ได้แก่ vesicle fluid เยื่อบุลิ้น เนื้อเยื่อบริเวณอุ้งกับ หรือตั้งจุมูกและ coronary band ในสุกร และควรเก็บให้ได้ในปริมาณมากกว่า 1 กรัม บรรจุลงในภาชนะหรือขวดที่สะอาดที่มี 50% glycerine buffer เพื่อเก็บรักษาสภาพไวรัสตลอดการขนส่งหีบห่อตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการได้อย่างปลอดภัย จากรายงานของ Linchongsubongkoch *et al.*, (2018) พบว่าการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีคุณภาพดี (good) คือปริมาณเนื้อเยื่อมากกว่า 1 กรัม จะเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคได้ผลสูงกว่าตัวอย่างที่มีคุณภาพระดับปานกลาง (fair) คือปริมาณเนื้อเยื่อ 0.4-1.0 กรัม จะให้ผล positive 61.76% และ 47% ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามคุณภาพ

ตัวอย่างปริมาณน้อย (poor) คือขนาดเนื้อเยื่อน้อยกว่า 0.4 กรัม จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการตรวจวินิจฉัย โดยเฉพาะวิธี initial ELISA typing ทำให้ได้ผลค่อนข้างต่ำคือ 24% positive เท่านั้น จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์ด้วยวิธี virus isolation ซึ่งต้องใช้เวลาานาน ส่งผลกระทบต่อควบคุมโรคและการตรวจสอบการคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมในการผลิตวัคซีนให้ตรงกับชนิดไวรัสที่ระบาดในพื้นที่นั้นๆ

ส่วนของการตรวจสอบคุณลักษณะของไวรัส (strain characterisation) โดยการตรวจหาความสัมพันธ์ทางแอนติเจน (antigenic matching) ระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่วิเคราะห์ผลเป็นค่า r-value เพื่อใช้ในการคัดเลือกตัวแทนสายพันธุ์ไวรัสในพื้นที่ ที่ให้คุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็น seed virus ในการผลิตวัคซีน ปัจจุบันมีวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมีดังนี้ คือ virus neutralisation test (VNT) (Rweyemamu *et al.*, 1978 ; Doughy *et al.*, 1995) และ liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Kitching *et al.*, 1988) ; Linchongsubongkoch *et al.*, 2008) ดังนั้นจุดประสงค์ครั้งนี้คือการให้องค์ความรู้ด้านพื้นฐานและหลักการวิธี VNT และ LP ELISA มาใช้ในการตรวจสอบ vaccine matching การวิเคราะห์และการแปลผล r-value เปรียบเทียบผลมีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันอย่างไร รวมทั้งศึกษาข้อดี ข้อเสียของการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี เพื่อนำไปใช้เป็นมาตรฐานการตรวจสอบสำหรับการคัดเลือก seed virus ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ทั้งนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานเพื่อนำไปพิจารณาถึงขีดความสามารถและศักยภาพของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการพัฒนาองค์ความรู้และความเข้าใจของผู้ปฏิบัติงานในการเลือกใช้วิธีตรวจสอบที่เหมาะสมกับสถานะสถานการณ์ปัจจุบันและความพร้อมของห้องปฏิบัติการ

หลักการและวิธีการ

หลักการและเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบและการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีน ควรต้องทำความเข้าใจถึงองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1. หลักการคัดเลือกไวรัสสำหรับผลิตวัคซีน (Principle of virus vaccine selection)

สิ่งสำคัญในการใช้คัดเลือก virus vaccine เพื่อให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพ ต้องคำนึงคุณสมบัติดังนี้ คือ (1) สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันสูงหรือให้ความคุ้มโรคสูงและยาวนาน (2) มีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ มีความใกล้เคียงมากน้อยเพียงใด ในด้านให้ความคุ้มโรคหรือคุณสมบัติทาง antigen matching สำหรับการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน (potency test) ในสัตว์ทดลองสามารถดำเนินการตามมาตรฐาน OIE หรือ World Organisation for Animal Health และการฉีดพิษหัตถ์โดยใช้ homologous virus การคำนวณหาค่าความคุ้มโรคเป็นหน่วย PD50 หรืออาจสามารถใช้ในการประเมินค่าระดับภูมิคุ้มกันด้วยการตรวจสอบทาง serology แทนการฉีดพิษหัตถ์ในสัตว์ทดลองและใช้การตรวจหาปริมาณ แอนติเจนของ whole viral capsid (146S antigen) โดยวิธีการ sucrose density gradient ultracentrifugation ก่อนนำไปผสมเป็นวัคซีนต่อไป ซึ่งการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างความเข้มข้นของแอนติเจนกับค่าความคุ้มโรคนั้นบางครั้งพบว่าไม่ให้ความสัมพันธ์กัน อาจเกิดจาก strain ที่ไม่เหมือนกัน (Doel and Mowat., 1985) ในขณะที่การตรวจสอบความคุ้มโรคโดยส่วนใหญ่ใช้วิธีการฉีดพิษหัตถ์ด้วย homologous challenge ไม่ได้ใช้วิธี cross-protection โดยการฉีดพิษหัตถ์ด้วยไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ ซึ่งการเตรียมความเข้มข้นของ standard virus challenge ที่จะใช้ฉีดพิษหัตถ์นั้นต้องใช้เวลาเตรียมนานอาจจะไม่ทันเหตุการณ์การระบาด ดังนั้นจึงมีการประยุกต์นำวิธีการ antigenic matching โดยการตรวจวิเคราะห์ค่าระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสวัคซีนซึ่งเป็น homologous virus กับค่าระดับแอนติบอดีที่ได้จากไวรัสพื้นที่หรือ heterologous virus และนำมาคำนวณค่า r-value

2. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (Vaccine matching test หรือ r-value)

การตรวจ antigenic matching เป็นการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ มีหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ complement fixation (CF) test (Forman, 1974), virus neutralisation (VN) test (Rweyemamu *et al.*, 1978) และ liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Kitching *et al.*, 1988) ปัจจุบันนิยมใช้อยู่ 2 วิธีคือ LP ELISA และ VNT สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบอธิบายโดยสังเขปมีดังนี้

ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จากตัวอย่างพื้นที่ที่ส่งเข้ามายังห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจและจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA typing ตามวิธีการของ Roeder and Le Blanc Smith, (1987) จากนั้นทำการผ่านไวรัสลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสให้มีความรุนแรงสูงพอที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยผ่านลงบน primary lamb kidney cell หรือ ZZ-R 127 cell (fetal goat tongue cell line) (Linchongsubongkoch *et al.*, 2020) ประมาณ 3 passage จากนั้นผ่านลงบน BHK21 cell อีก 3-4 passage เพื่อให้ได้ไวรัสที่มีความรุนแรงสูง ตรวจหา virus titer โดยการ titration กรณีใช้วิธี ELISA technique แนะนำให้ตรวจสอบ antigen titration ELISA ส่วนกรณีใช้วิธี VNT จะต้องตรวจหาความรุนแรงไวรัสด้วยวิธี virus titration แบบ TCID50 (Karber, 1931) ก่อนเพื่อหา virus titer ที่เหมาะสมก่อนนำไปทำ antigen matching ต่อไป

2.1 การตรวจ vaccine matching โดยวิธี LP ELISA

การตรวจสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ antigen titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม (working dilution) ของแอนติเจนเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอน vaccine matching โดย LP ELISA ต่อไป

2.1.1 Antigen titration

เป็นการหาปริมาณความเข้มข้นที่พอเหมาะของแอนติเจน (working dilution) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบ LP ELISA แบบ double antibody sandwich ELISA โดยทำการ coat plate ด้วย rabbit trapping antibody ต่อ FMDV ด้วย 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer เก็บในตู้เย็น 4°C ค้างคืน วันต่อมาให้เตรียมแอนติเจนโดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ด้วย PBST buffer (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) ให้เตรียมแยกใน microtube จากนั้นเติมลงใน ELISA plate ที่ได้ coat ไว้แล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม แถวสุดท้ายของเพลทให้เติมเฉพาะ diluent แทนแอนติเจน เพื่อเป็น background เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้ง นำมาเติม guinea pig detecting antibody (block ด้วย normal bovine serum) เขย่า 1 ชั่วโมงในตู้ 37°C incubator ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้งและเติม conjugate (anti guinea pig IgG horseradish peroxidase conjugate) เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator ล้างเพลทและเติม substrate 0.01% Tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้ H₂O₂ เป็นตัว catalyst วางเพลทในอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H₂SO₄ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ 450 nm โดยใช้เครื่องอ่าน ELISA Reader อ่านค่าปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนที่ dilution สูงสุดที่ให้ค่า OD ประมาณ 1.5 ตัวอย่างเช่น sample 1, 2 และ 3 ได้ค่าแอนติเจนที่ dilution ที่ 1:320, 1:320 และ 1:640 ตามลำดับ เมื่อเวลานำไปใช้ในขั้นตอนการทำ vaccine matching ด้วยวิธี LP ELISA จะต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจน เท่ากับ 1:160, 1:160 และ 1:320 เนื่องจากต้องนำไปผสมกับซีรัมในปริมาณเท่ากันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นกลับมาเป็น 1:320 1:320 และ 1:640 เท่าเดิม ดังแสดงใน table 1

Table 1 ผลการตรวจ antigen titration ด้วยวิธี ELISA เพื่อหาความปริมาณความเข้มข้นแอนติเจน

An example of antigen titration and selecting the optimal dilution .												
Test plate O.D. readings												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.32	3.02	2.18	2.16	1.98	1.99	2.23	2.32	2.19	3.19	3.04	2.69
B	2.32	2.49	2.74	2.77	2.17	1.97	2.06	2.44	2.94	3.03	2.90	2.77
C	2.25	2.29	2.36	2.35	2.22	2.13	1.84	2.39	2.84	2.74	2.56	2.61
D	1.68	1.98	2.02	2.11	1.85	1.66	2.01	2.12	2.25	2.39	2.06	2.20
E	1.83	1.34	1.84	1.91	1.69	1.70	1.79	1.76	2.08	2.09	2.05	1.94
F	1.29	1.09	0.88	1.02	0.67	0.95	1.13	1.36	1.43	1.76	1.51	1.19
G	0.63	0.78	0.62	0.91	0.78	0.74	0.96	0.94	1.31	0.98	1.02	1.04
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02
Ag.diln	mean, 1-4			mean, 5-8			mean, 9-12					
1:20	2.67			2.13			2.78					
1:40	2.58			2.16			2.91					
1:80	2.31			2.14			2.69					
1:160	1.95			1.91			2.22					
1:320	1.63*			1.73*			2.04					
1:640	1.31			1.43			1.58*					
1:128	1.09			1.07			1.09					
0												
BG	0.00			0.00			0.01					
	Sample 1			Sample 2			Sample 3					
The concentration of 50% antigen dilution where the O.D. reading at 1.5 are :												
	Sample 1			dilution at 1: 160								
	Sample 2			dilution at 1: 160								
	Sample 3			dilution at 1: 320								

2.1.2 Vaccine matching test

หลักการตรวจสอบ vaccine matching หรือการหาค่า r-value เป็นการตรวจสอบทางซีโรโลยี เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างซีรัมโตเตอร์ที่ได้จากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน (vaccine strain) และซีรัมโตเตอร์ที่ได้จากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (field strain) โดยสามารถทำการตรวจสอบซีรัมโตเตอร์จากไวรัสพื้นที่ได้ครั้งละหลายๆตัวอย่างพร้อมกัน หลังจากนั้นนำมาหาค่า r-value ตามวิธีการ Kitching *et al.* (1988) วัสดุ อุปกรณ์และสารตรวจสอบที่สำคัญและจำเป็นสำหรับการตรวจสอบต้องประกอบด้วย 3 สิ่ง ดังนี้

- ซีรัมโค 3 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนด้วย homologous vaccine (bovine serum, 3 weeks post vaccination) แนะนำให้ใช้ monovalent vaccine และก่อนนำไปตรวจสอบให้ทำการ inactivate ซีรัมโดยจุ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที
- ไวรัสชนิดเดียวกับใช้ผลิตวัคซีน (homologous virus vaccine strain)
- ไวรัสจากพื้นที่ (heterologous virus field strain) ซึ่งสามารถเตรียมครั้งละหลายๆตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบพร้อมกันได้ แนะนำให้เตรียมไวรัสพื้นที่โดยเก็บจากหลายๆพื้นที่เพื่อใช้เป็นตัวแทนของแต่ละภูมิภาคภายในประเทศ

การตรวจหาค่า r-value ทำการตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA แบบ double antibody sandwich ELISA ดำเนินการดังนี้ ทำการ coat rabbit trapping antibody ลงบน ELISA plate ใช้ coating buffer 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator หรือเก็บค้างคืนในตู้เย็น 4°C วันต่อมาทำการเตรียม virus-serum mixture โดยแยกเตรียมในไมโครเพลทอื่น ทำการเจือจางซีรัมแบบ 2-fold serial dilution เช่น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128..... จากนั้นเตรียม working dilution ของ homologous vaccine strain และ heterologous field strain ที่ได้จากการทำ titration แล้วในข้อ 2.1.1 ทำการเติมสารละลาย virus ลงบนหลุมในแต่ละ dilution ของซีรัมในปริมาตรเท่าๆกัน ในส่วน

ของ virus control ทั้ง homologous และ heterologous virus ให้เติมลงในเพลทเดียวกัน โดยให้ใส่ buffer แทนซีรัม เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator เพื่อให้เกิด ปฏิกิริยา neutralise หรือ inhibition นำ virus-serum mixture ของแต่ละตัวอย่าง นำไปถ่ายลงใน ELISA plate ที่ได้ coat ไว้แล้วในตอนต้น ในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าใน 37°C incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS จำนวน 5 ครั้ง นำมาเติม guinea pig detecting antibody (block ด้วย normal bovine serum) เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator ล้างเพลทด้วย PBS 5 ครั้งและเติม conjugate (anti guinea pig IgG Horseradish peroxidase conjugate) เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C incubator ล้างเพลทและเติม substrate 0.01% tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้ H₂O₂ เป็นตัว catalyst วางเพลทใน อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H₂SO₄ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate อ่านค่า OD ที่ 450 nm โดยใช้เครื่องอ่าน ELISA Reader นำค่า OD ในแต่ละ dilution ของซีรัมและค่า OD เฉลี่ย ของ virus control ทั้งของ homologous และ heterologous virus มาใช้ในการคำนวณหา ค่า serum titer โดยคำนวณจากค่า serum dilution สูงสุด ที่อยู่ระหว่าง 50% OD ของ virus control ที่มีค่า OD ~ 1.5 ดังแสดงใน figure 1

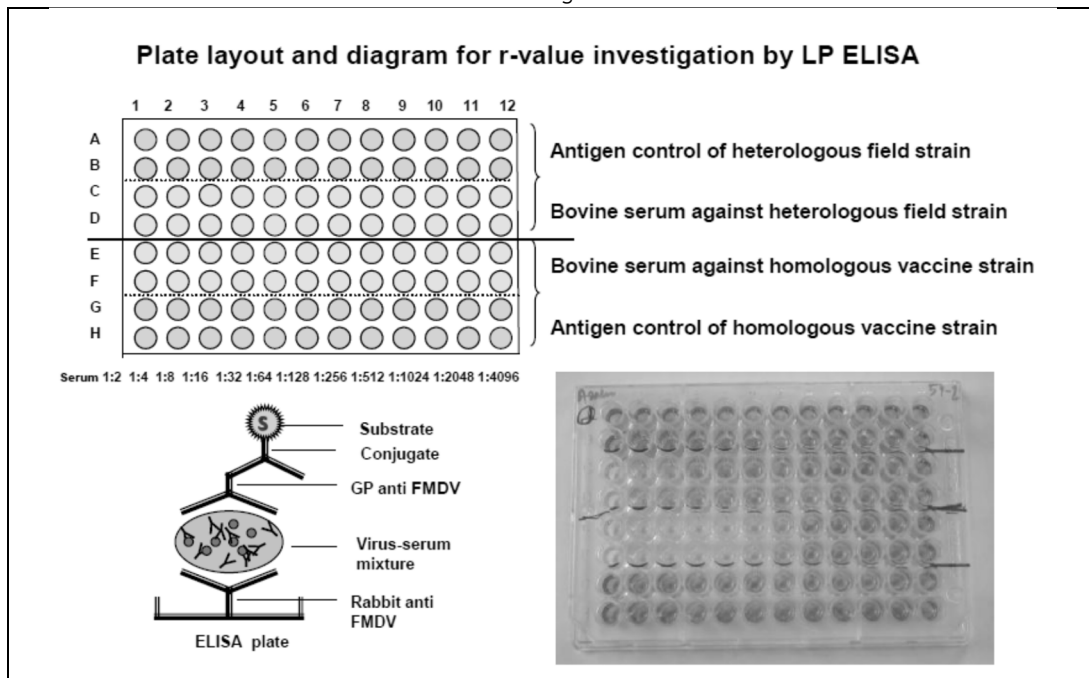


Figure 1 รูปแบบและ diagram การเตรียม virus-serum mixture ของ homologous และ heterologous virus

การคำนวณค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี (r-value) ด้วยวิธี LP ELISA

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี ระหว่างไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนกับไวรัสพื้นที่ โดยคำนวณจากค่าระดับ แอนติบอดีไตเตอร์ของซีรัมที่ได้จากไวรัสวัคซีนและแอนติบอดี ไตเตอร์ที่ได้จากไวรัสพื้นที่ ค่า r-value คำนวณได้จากอัตราส่วนดังนี้ และแสดงผลการอ่านตัวอย่างใน table 2

$$r\text{-value} = \frac{\text{Serum titer against heterologous field strain}}{\text{Serum titer against homologous vaccine strain}}$$

Table 2 ค่า OD reading ในการตรวจ vaccine matching ด้วยวิธี LP ELISA และการคำนวณหาค่า antibody titer ต่อ homologous และ heterolous ที่มีค่า 50% OD ของ virus control ที่ให้ค่า OD ~ 1.5

An example for determining the serum titer and r-value calculation .												
Test plate OD reading												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.65	1.67	1.65	1.64	1.74	1.68	1.65	1.62	1.61	1.61	1.62	1.65
B	1.65	1.48	1.53	1.40	1.42	1.46	1.43	1.45	1.55	1.50	1.53	1.58
C	0.30	0.29	0.27	0.27	0.37	0.57	0.97	1.34	1.47	1.53	1.67	1.69
D	0.34	0.28	0.29	0.29	0.40	0.55	0.98	1.26	1.44	1.64	1.66	1.67
E	0.46	0.49	0.46	0.44	0.54	0.75	0.93	1.09	1.30	1.41	1.58	1.53
F	0.38	0.49	0.42	0.52	0.56	0.67	0.86	0.95	1.23	1.32	1.40	1.31
G	1.74	1.69	1.66	1.70	1.72	1.58	1.57	1.63	1.58	1.58	1.73	1.65
H	1.82	1.85	1.86	1.72	1.84	1.69	1.79	1.65	1.63	1.68	1.70	1.68
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-B	1.65	1.58	1.59	1.52	1.58	1.57	1.54	1.54	1.58	1.56	1.58	1.62
C-D	0.32	0.29	0.28	0.28	0.38	0.56*	0.98*	1.30	1.46	1.59	1.67	1.68
E-F	0.42	0.49	0.44	0.48	0.55	0.71*	0.89*	1.02	1.27	1.37	1.49	1.42
G-H	1.78	1.77	1.76	1.71	1.78	1.64	1.68	1.64	1.61	1.63	1.72	1.67
Serum dil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
OD mean of field virus (12 wells) $\frac{18.9}{12} = 1.575$, therefore 50% OD = $\frac{1.575}{2} = 0.79$, serum titer = 90												
OD mean of vaccinevirus (12 wells) $\frac{20.39}{12} = 1.699$, therefore 50% OD = $\frac{1.699}{2} = 0.85$, serum titer = 90												
Result: r-value = $\frac{90}{90} = 1.0$												

กำหนดหลักเกณฑ์และการแปลผลค่า r-value โดยวิธี Liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) (Samuel *et al.*, 1990) ดังนี้

r = 0-0.19 Suggest that the field isolate is so different from the vaccine strain that vaccine is unlikely to protect.

r = 0.2-0.39 Suggest that the field isolate is antigenically related to the vaccine strain. The vaccine strain might be suitable for use if no closer match can be found provided that a potent vaccine is used and animals are preferably immunized more than one.

r = 0.4-1.0 Suggest that there is a close relationship between field isolate and vaccine strain. A potent vaccine containing the vaccine strain is likely to confer protection.

2.2 การตรวจ vaccine matching โดยวิธี Virus neutralisation test (VNT)

เป็นการตรวจระดับแอนติบอดีเชิงปริมาณ ด้วยวิธี 2-dimensional virus neutralisation test (2-D VNT) โดยทำการเจือจางซีรัมแบบ 2-fold serial dilution (1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) ลงบน 96-well tissue culture plate และเจือจางไวรัสพื้นที่และไวรัสตัวขึ้นแบบ half log dilution ($\text{Log } 10^{-1}, 10^{-1.5}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-3.5}, 10^{-4}, 10^{-4.5}, \dots, 10^{-7}$) โดยใช้ maintenance medium (MEM) เป็น diluent โดยแยกเตรียมใน microtube เติมน้ำเจือจางของไวรัสลงบนเพลทที่มีซีรัม dilution ต่างๆ ในปริมาตรเท่าๆกันคืออย่างละ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ส่วน virus control ให้เติม MEM แทนซีรัม

นำไปป่ม ใน 37°C incubator ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา neutralise ระหว่างไวรัสกับซีรัมได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติม cell suspension ของ BHK21 ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 3X10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปป่มใน 37°C CO₂ incubator เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง อ่านผลการเปลี่ยนแปลงเซลล์ cytopathic effect (CPE) หาค่าความรุนแรงของ virus control แบบ TCID₅₀ ตามวิธีการของ Karber (1931) หลังจากนั้นคำนวณหาค่า antibody titer จากไวรัสพื้นที่และจากไวรัสวัคซีน โดยดูค่า dilution สูงสุดของซีรัมที่สามารถ neutralise ไวรัสได้ 50% โดยอ่านค่าความรุนแรงของไวรัสที่ 100 TCID₅₀ วิธีดังกล่าวนี้มีรูปแบบการจัดวางตัวอย่างในเพลทได้เพียง 1 ตัวอย่างต่อเพลทเท่านั้น หากต้องตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากจำเป็นต้องใช้วัสดุ อุปกรณ์ สารละลาย มีเตรียมต่างๆค่อนข้างมาก ดังแสดงใน table 3

Table 3 รูปแบบการเตรียม virus-serum mixture ลงบน tissue culture plate การอ่านผล CPE ของแต่ละ dilution และคำนวณค่า serum titer โดยอ่านผลที่ความรุนแรงของไวรัสที่ 100 TCID₅₀ จาก field virus และ vaccine virus

Plate layout of field virus											Plate layout of vaccine virus												
serum → 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256											serum → 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256												
Virus dil.	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	10 ^{-4.5}	
↓ 10 ^{-2.5}	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	10 ⁻⁵
10 ⁻³	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	10 ⁻⁶
10 ^{-3.5}	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻⁷
10 ⁻⁴	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ⁻⁶
	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁷

-การอ่านผลเซลล์ cytopathic effect (CPE) : - = no CPE cell occurred, + = CPE cell occurred

-การคำนวณค่า serum titer

Field virus, virus control = 6.0 logTCID₅₀ :	Vaccine virus, virus control = 7.0 logTCID₅₀ :
อ่านค่าความรุนแรงที่ 100 TCID ₅₀ , = log 6.0 - log 2 = log 4.0	อ่านค่าความรุนแรงที่ 100 TCID ₅₀ , = log 7.0 - log 2 = log 5
อ่านค่า serum titer ที่ virus dilution 10 ⁻⁴ มีค่า = 1:90	อ่านค่า serum titer ที่ virus dilution 10 ⁻⁵ มีค่า = 1:180

ผลค่า r-value = $\frac{90}{180} = 0.5$

กำหนดหลักเกณฑ์ความหมาย r-value โดยวิธี 2-dimensional neutralization test (2-D VNT)

(WRL, The Pirbright Institute, ข้อมูลไม่ตีพิมพ์) ดังนี้

r < 0.3 Suggest that the field isolate is so different from the vaccine strain that the vaccine is unlikely to protect.

r = ≥ 0.3 Suggest that there is a close relationship between field isolate and vaccine strain.

ผลการตรวจค่า r-value

ผลการตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสที่ผลิตวัคซีนและไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ซึ่ง การวิเคราะห์ผลจะแสดงผลเป็นค่า r-value ด้วยวิธี LP ELISA และ 2-D VNT พบว่าการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน (Linchongsubongkoch *et al.*, 1991: Linchongsubongkoch *et al.*, 1992) ดังแสดงใน table 4

Table 4 ผลค่า r-value ด้วยวิธี LP ELISA และ 2-D VNT ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O และ Asia1

Sample no	r-value of FMDV type O		Sample no	r-value of FMDV type Asia1	
	LP ELISA	2-D VNT		LP ELISA	2-D VNT
1	1.00	1.00	1	1.00	1.00
2	1.50	0.65	2	1.18	0.75
3	0.51	0.44	3	1.19	1.06
4	0.69	0.70	4	0.90	1.22
5	0.64	0.52	5	1.00	0.77
6	0.63	1.03	6	1.09	1.65
7	0.41	0.99	7	1.01	0.88
8	1.51	0.62	8	1.12	0.50
9	0.49	0.52	9	0.82	0.70
10	0.62	0.64	10	0.98	1.59
11	0.50	0.58	11	1.01	0.50
12	1.08	1.68	12	1.20	1.02
13	0.66	0.45	13	0.70	1.19
14	0.78	1.12	14	1.17	0.62
15	0.45	0.68	15	1.00	0.80
16	0.50	0.70	16	1.02	0.64
17	0.73	0.75	17	1.56	0.86
18	0.63	1.30	18	0.63	0.83
19	0.88	1.00	19	0.80	1.12
20	1.72	1.00	20	0.95	0.59
21	0.54	0.67	21	0.89	0.78
22	0.88	0.58	22	0.91	1.11
23	0.73	1.64	23	0.99	0.84
24	0.72	1.50	24	1.10	0.96
25	0.83	1.04	25	0.89	1.17
26	1.40	1.19	26	0.78	0.70
27	0.77	0.54	27	1.14	0.75
28	0.78	0.46	28	0.61	1.06
29	0.76	1.00			
30	0.92	0.86			
31	0.52	1.39			
32	0.85	1.35			
33	0.69	1.70			
34	0.74	1.30			

Source: Linchongsubongkoch et. al, 1992 Source: Linchongsubongkoch et. al, 1991

ส่วนผลการเปรียบเทียบค่า r-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O และ Asia1 ด้วยวิธี LP ELISA และ 2-D VNT พบว่าให้ผลสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี การแปรผลพบว่าทั้งไวรัสไทป์ O จากพื้นที่ จำนวนทั้งหมด 34 ตัวอย่าง ให้ผลค่า r-value มากกว่า 0.40 ด้วยวิธี LP ELISA และให้ผล r-value มากกว่า 0.30 ด้วยวิธี 2-D VNT แสดงว่าไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ยังคงมี antigenic matching ใกล้เคียงและอยู่ในกลุ่มกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เช่นเดียวกับไวรัสไทป์ Asai1 จากพื้นที่จำนวนทั้ง 28 ตัวอย่าง ให้ผลค่า r-value มากกว่า 0.40 ด้วยวิธี LP ELISA และให้ผล r-value มากกว่า 0.30 ด้วยวิธี 2-D VNT แสดงว่าไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ยังคงมี antigenic matching ใกล้เคียงและอยู่ในกลุ่มกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน ดังแสดงใน figure 2 และ 3

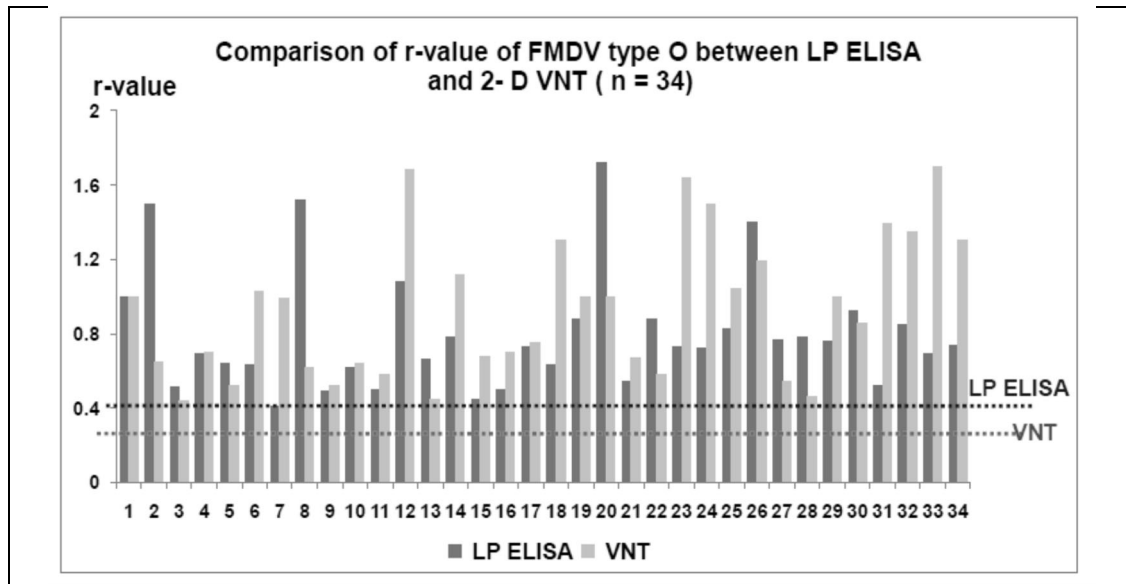


Figure 2 แผนภูมิแสดงผลค่า r-value ด้วยวิธี LP ELISA และ 2-D VNT ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โทป์ O

VNT : $r \geq 0.30$

Suggest that there is a close relationship between field virus and vaccine strain. A potent vaccine containing the vaccine strain is likely to confer protection.

LP ELISA: $r \geq 0.40$

Not significantly difference from vaccine strain.

Suggest that there is a close relationship between field virus and vaccine strain. A potent vaccine containing the vaccine strain is likely to confer protection

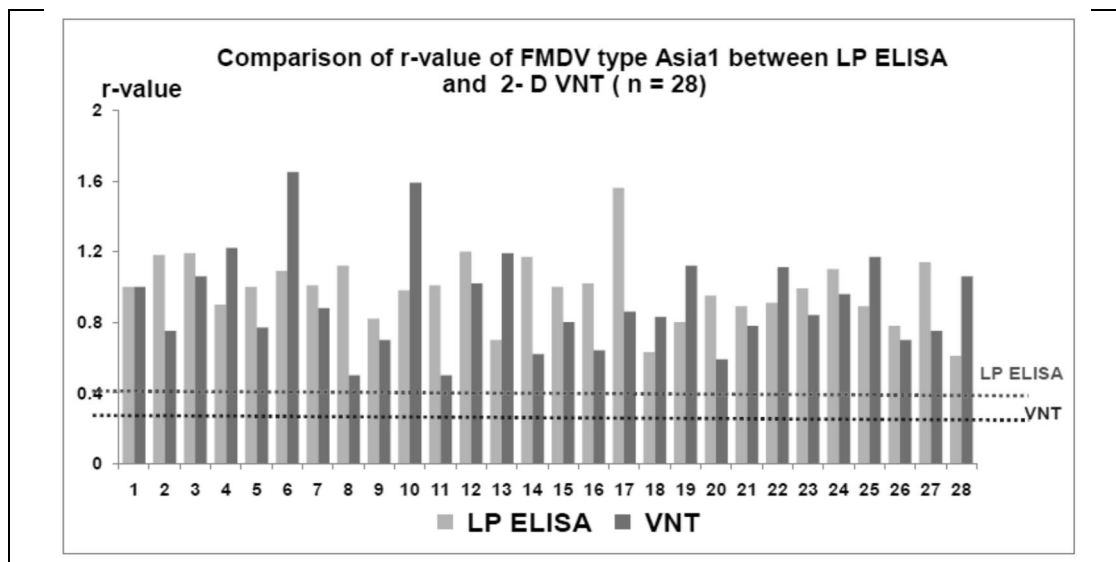


Figure 3 แผนภูมิแสดงผลค่า r-value ด้วยวิธี LP ELISA และ 2-D VNT ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โทป์ Asia1

VNT : $r \geq 0.30$ Suggest that there is a close relationship between field virus and vaccine strain.

A potent vaccine containing the vaccine strain is likely to confer protection.

LP ELISA: $r \geq 0.40$ Not significantly difference from vaccine strain. Suggest that there is a close relationship between field virus and vaccine strain. A potent vaccine containing the vaccine strain is likely to confer protection

Table 5 การเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของการตรวจ vaccine matching ระหว่างวิธี LP ELISA และ 2-dimensional neutralisation test (2-D VNT) ซึ่งการเลือกใช้แต่ละวิธีขึ้นอยู่กับศักยภาพของห้องปฏิบัติการ

LP ELISA	2-D VNT
วิธีทดสอบไม่ต้องใช้ tissue culture cell	จำเป็นต้องใช้ tissue culture cell ต้องเลือกใช้เซลล์ที่เหมาะสม อ่านผลภายใน 48-72 ชม. เช่น BHK21, IBRS2 ไม่แนะนำให้ใช้ primary cell เนื่องจากเซลล์ใช้เวลานานในการเจริญเติบโต ซึ่งเกิน 7 วัน ทำให้อ่านผลไม่ได้
ไม่จำเป็นต้องใช้ sterile technique	ต้องใช้ sterile technique, วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี มีเดีย และสารเคมีต่างๆ ต้องนึ่งหรืออบฆ่าเชื้อก่อนใช้งาน
ให้ความจำเพาะและความไวสูง	ให้ความจำเพาะและความไวสูง
การผลิตสารตรวจสอบ ELISA reagent ต้องใช้ไวรัสวัคซีนที่เหมาะสมที่สุด เตรียมเป็น immune serum โดยฉีด purified 146S antigen เข้ากระต่ายและหนูตะเภา ซึ่งใช้เวลานานและต้องทำ titration เพื่อหา working dilution ก่อนนำไปทดสอบ ใช้เวลาในการเตรียมประมาณ 2 เดือน	ไม่จำเป็นต้องผลิตสารตรวจสอบ เพราะสามารถนำตัวอย่างไวรัสวัคซีนและไวรัสพื้นที่ไปทำการทดสอบได้ทันที โดยทำ virus titration แบบ TCID50 เพื่อให้ได้ virus titer ที่สูงพอก่อนนำไปทดสอบ
ประหยัดสารตรวจสอบและแรงงาน	สิ้นเปลืองแรงงาน วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี
อ่านผลภายใน 1 วัน	อ่านผลภายใน 48-72 ชม.
อ่านผลโดยใช้เครื่องอ่าน ELISA Reader	อ่านผลโดยใช้กล้อง inverted microscope

ปัญหาที่พบบ่อยในการทดสอบ vaccine matching

หลักการตรวจ vaccine matching จะต้องมีองค์ประกอบหลัก 3 ชนิดซึ่งขาดชนิดใดชนิดหนึ่งไม่ได้ คือ homologous virus vaccine strain, bovine serum post vaccination (3-4 weeks post vaccinated with homologous vaccine) และ heterologous virus field strain สำหรับไวรัสที่จะนำมา ตรวจสอบนั้นไม่ว่าจะเป็นไวรัสวัคซีนหรือไวรัสพื้นที่ จะต้องผ่านการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น BHK21 หรือ IBRS2 หลายๆ passage จนให้ความรุนแรง (virus titer) สูงพอสมควร ซึ่งสามารถทดสอบได้ด้วยวิธี antigen titration แบบ ELISA technique และ วิธี virus titration แบบ TCID50 โดยใช้ tissue culture technique การทำ virus titration แนะนำให้ทำการทดสอบหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ได้ค่าปริมาณ ความเข้มข้นของ virus ที่คงที่ ทั้งนี้เวลานำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไปจะไม่ทำให้ค่า virus control ต่ำจากเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นการ standardize technique จึงเป็นสิ่งสำคัญ ส่วน bovine serum นั้นหากเป็นไปได้แนะนำให้ใช้ pool serum ที่เจาะเลือดจากสัตว์หลายๆตัว แล้วนำมาหาค่า antibody titer ของแต่ละตัวก่อนนำมารวมเป็น pool serum ไม่แนะนำให้ใช้

bovine serum จากสัตว์ที่ได้รับการฉีดพิษหับ (challenge) เพราะเนื่องจากการทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดประสิทธิภาพของวัคซีน ดังนั้น antibody titer จะต้องมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มาจากวัคซีน ไม่ใช่ภูมิคุ้มกันที่มาจากเชื้อไวรัส

ปัญหาหรือปัจจัยที่ทำให้การทดสอบไม่ได้ผล พอสรุปได้ดังนี้

(1) Virus control มี titer ไม่คงที่ พบว่าได้ค่า titer ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ไม่ว่าจะเกิดจากการ titration ด้วยวิธี ELISA หรือ TCID50 ก็ตาม ทำให้ไม่สามารถนำผลของ antibody titer ที่ได้จาก homologous virus หรือ heterologous virus มาวิเคราะห์ได้ ต้องทำการทดสอบใหม่ สาเหตุอาจมาจากการใช้ปริมาณความเข้มข้นของไวรัสไม่เหมาะสม (working dilution) หรือไวรัสมีความไม่ stable ใน condition ต่างๆ ในขณะทำการทดสอบ ทำให้ virus control ต่ำกว่าหรือบางครั้งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด วิธีแก้ปัญหา คือในขั้นตอนแรกต้องทำ virus titration หลายๆ ครั้ง (แนะนำไม่ต่ำกว่า 6 ครั้ง) จนได้ค่าคงที่ แล้วนำค่าเฉลี่ยมาใช้

(2) การหาค่า r-value จำเป็นอย่างยิ่งต้องทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงค่า virus control จะต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ทั้งของ heterologous virus และ homologous virus แล้วนำค่า r-value ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย กรณีทดสอบ 3 ครั้งแล้วได้ค่าไม่สอดคล้องกัน แนะนำให้ทำการทดสอบครั้งที่ 4

(3) การเตรียมหรือผ่านไวรัสวัคซีน (Homologous virus) ลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง BHK21 ไม่ควรผ่านหลายๆ ครั้ง จนได้ passage สูงเกินไป เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัส (antigenic variation) ผลของ r-value อาจผิดพลาดไปจากความเป็นจริง ซึ่งโดยปกติการเตรียมและผ่าน seed virus vaccine จะไม่ใช่ไวรัสที่ passage สูงเกิน 10 passage หากนำไปขยายเพิ่มปริมาณและนำไปเป็นผลิตวัคซีน อาจทำให้วัคซีนให้ประสิทธิภาพความคุ้มโรคลดลงหรือไม่ให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ขณะนั้น ดังนั้นจึงแนะนำให้มีการบริหารจัดการบันทึกรายละเอียดการใช้ seed virus vaccine ที่เหมาะสม เพื่อเป็นการควบคุมการผ่าน seed และการนำไปใช้ให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

(4) การเตรียม bovine serum (3 weeks post vaccination serum) สำหรับการประเมินประสิทธิภาพวัคซีน นั้น จำเป็นต้องเตรียมซีรัมจาก seed virus vaccine เท่านั้น โดยการฉีด monovalent vaccine เข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งแนะนำให้ฉีดโค โดยให้ฉีดโคมากกว่า 1 ตัว หรืออาจจะใช้สัตว์ทดลองที่ทดสอบ potency test ซึ่งใช้กลุ่มละ 5 ตัว หลังฉีดวัคซีนเป็นเวลา 21 วัน ให้ทำการเจาะเลือด เพื่อแยกซีรัม นำไปตรวจหา antibody titer ด้วยวิธี LP ELISA หรือ VNT ตัวอย่างซีรัมทั้ง 5 ตัว เพื่อคัดเลือกตัวอย่างซีรัมที่มี antibody titer ค่อนข้างสูง เพื่อนำไปใช้ทดสอบ vaccine matching test ต่อไป แนะนำให้ทำการ pool serum ก่อนนำไปใช้

ข้อแนะนำก่อนนำซีรัมไปใช้ในขั้นตอน vaccine matching ต้องทำการ inactivate serum โดยนำไปจุ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อวัตถุประสงค์เป็นการทำลาย complement และ protein อื่นๆ ที่อาจปนอยู่ในซีรัม ซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยา inhibition หรือ neutralise ระหว่าง antigen และ antibody

หลักเกณฑ์และคุณสมบัติของ seed vaccine strain (criteria and characteristic of seed vaccine strain)

การคัดเลือกได้ seed vaccine strain ที่ดีและเหมาะสม ต้องผ่านการทดสอบ vaccine matching และพิจารณาจากค่า r-value ที่ผ่านเกณฑ์กำหนดเพื่อคัดเลือกตัวแทนของไวรัสที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปผลิตเป็นวัคซีนนั้นต้องพิจารณาองค์ประกอบและคุณลักษณะ ตามรายละเอียดดังนี้ (Rweyemamu *et al.*, 1977)

- (1) ต้องเป็นไวรัสชนิดเดียวกับที่พบระบาดในพื้นที่ขณะนั้น
- (2) ไวรัสดังกล่าวสามารถทำการเพาะเลี้ยงใน tissue culture cell ได้อย่างรวดเร็ว และเพาะเลี้ยงได้หลายๆ passage อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ โดยยังคงคุณสมบัติเดิม
- (3) สามารถผลิตไวรัสที่ให้ความรุนแรงสูง (high virus yield)

- (4) สามารถให้คุณสมบัติของการเป็น immunogen ที่ดี เมื่อฉีดเข้าสัตว์จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี
- (5) เมื่อผลิตเป็นวัคซีนแล้วต้องมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี มีความคงทนและอยู่ได้ยาวนานโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการสลายตัวของแอนติเจน และสามารถรักษาคุณสมบัติ เหล่านี้ โดยเก็บในตู้เย็นได้ยาวนานมากกว่า 1 ปี

นอกจากนี้ความรู้และเทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงไวรัสให้มีความรุนแรง (virus titer) และให้ virus yield สูง ต้องคำนึงถึงคุณลักษณะและคุณสมบัติของ virus component หรือ particle ต่างๆ ที่มีอยู่ใน cell culture fluid เมื่อถูก infect ด้วยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ดังนั้นคุณสมบัติและข้อดี ข้อเสียของแต่ละ particle นั้นนำไปใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน table 6 ดังนี้

Table 6 คุณสมบัติทาง antigenic component in culture fluid infected with FMD virus

Antigenic property of FMDV components				
Component	Sedimentation coefficient	Molecular weight $\times 10^6$	Major peptide	Immunogenicity
Intact Virion	146S	8.08	VP1, VP2, VP3, VP4	+
Empty Virion	75S	4.19	VP0, VP1, VP3	+
12S Subunit	12S	0.29	VP1, VP2, VP3	-
VIA antigen*	5S	0.056		-

* VIA : Virus Infection Associated Antigen, VP0 = precursor of VP2, VP4

- 146S particle (complete particle) และ 75S particle (empty particle) มีคุณสมบัติเป็น immunogen ได้ดี คือเมื่อนำไปฉีดเข้าสัตว์จะสามารถกระตุ้นการสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้ ประโยชน์ในส่วนนี้คือการนำไปใช้ผลิตวัคซีน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงไวรัสเพื่อผลิตวัคซีนจึงควรให้มีส่วนของ 146S และ 75S particle ในปริมาณสูง

- 12S particle ไม่มีคุณสมบัติในด้าน immunogenicity แต่จะพบใน virus culture ซึ่งสามารถทำให้เกิด CPE cell ไม่มีประโยชน์ทั้งด้านการผลิตวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยโรค นอกจากนี้ยังพบว่า 12S particle เป็นส่วนประกอบของ 146S particle ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่สภาวะของ 146S particle ไม่เหมาะสม เช่นสภาวะเป็นกรดหรืออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง หรือการ thaw virus ด้วยความร้อนบ่อยๆ จะสามารถทำให้ 146S particle แตกสลาย เป็น 12S particle ได้

- VIA หรือ 5S particle เป็นส่วนของ 3D gene ของ FMDV genome ซึ่งเป็นส่วน enzyme RNA polymerase จะเกิดขึ้นในขั้นตอนหรือขบวนการ virus replication ในกรณีเกิดการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายหรือเข้าสู่ cell ไม่มีคุณสมบัติทางด้าน immunogenicity แต่จะมีประโยชน์ในด้านการตรวจวินิจฉัยเพื่อแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อกับสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน แต่ยังมีข้อเสียคือกรณีสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนเชื้อตายจำนวนหลายๆครั้ง มีโอกาสเกิด false positive ได้ ไม่แนะนำให้ใช้ตรวจสัตว์ในประเทศที่มีการฉีดวัคซีนเป็นประจำ

เอกสารอ้างอิง

- Brooksby, J. B. & Rogers, J. 1957. Methods used in typing the virus of foot and mouth disease at Pirbright, 1950-1955. In: Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses, Paris O.E.E.C. Project 208 pp. 31-34.
- 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 reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot and mouth disease virus. J.Am. Vet. Med. Assoc. 220: 1636-1642.
- Doel, T.R. and Mowat, G.N. 1985. An International collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 2. Quantification of 146S particles. J. biol. Standard. 13 (4): 335-344.
- Doughthy, 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. 14(3): 547-555.
- Forman, A.J. 1974. A study of foot and mouth disease virus strains by complement fixation. A model for the fixation of complement by antigen/antibody mixtures. Journal of Hygiene. 72: 227-232.
- Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive for Experimentelle Pathologie Pharmakologie. 162, 480-483.
- Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. Vaccine. 6 (5): 403-408.
- Le, V.P., Lee, K.N., Nguyen, T., Kim, S.M., Cho, I.S., Quyen, D.V., Khang, D.D. and Park, J.H. 2011. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, and Asia 1 circulating in Vietnam. J Virol Methods. 175: 101-108.
- Linchongsubongkoch, W., Kamolsiripichaiporn, S., Romlumduan, S. and Sinsuwonkwat, P. 1991. Subtyping of type Asia1 foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. Proceedings on the 10th Annual Livestock 10th Annual Livestock Conference. 404-415.
- Linchongsubongkoch, W., Kamolsiripichaiporn, S. and Janukit, S. 1992. Subtyping of type O foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. J. Thai Vet. Med. Association. 43 (3): 29-39.
- Linchongsubongkoch, L. and Janukit, T. 1994. Detection of antibody to FMDV by liquid phase blocking ELISA. Proceedings of the 1st Veterinary Biologics Annual Conference. 62-72.
- 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 (1): 80-89.
- Linchongsubongkoch, W., Boonsuya Seeyo, K., Choornasard, A., Ungvanijban, S., Panthumart, A., Samanit, J. and Deepang, C. 2018. Evaluation of sample quality effecting to the foot and mouth disease laboratory diagnostic results, J. of Veterinary Biologics. 27(1-2): 44-54.

- Linchongsubongkoch, W., Chuanpat, K., Samanit, J. and deepnag, C. 2020. Comparative Sensitivity of fetal goat tongue ZZ-R 127 cell line and primary lamb kidney cell for isolation of foot and mouth disease virus. *J. Vet. Biol.* 29 (1-2): 36-46.
- 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. *The Veterinary Quarterly.* 20: 9-11.
- Pereira,H.G. 1978. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot and mouth disease . *Br.vet. J.* 134: 58-62
- Rweyemamu, M.M., Pay,T.W.F. and Parker, M.J. 1977. Serological differentiation of foot and mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine viruses. *International Symposium on FMD, Lyon. Develop. Biol. Standard.* 35: 205-214.
- Rweyemamu ,M.M. Brooth ,J.C. Head, M., and Pay,T.W.F. 1978. Microneutralisation tests for serological typing and subtyping of foot and mouth disease virus strains. *J. Hyg. Camb.* 81:117-123.
- Roeder, P.L. & 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.

