บทที่ 1

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease: FMD) เป็นโรคระบาดที่รุนแรงและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสัตว์กีบคู่ เช่น โค-กระบือ แพะ แกะ สุกร และสัตว์ป่าอีกมากกว่า 70 ชนิด เช่น กวาง ละมั่ง และช้าง เป็นต้น (Grubman and Baxt, 2004; Thomson et al., 2003) สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัสไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Virus: FMDV) ประกอบด้วย 7 Serotype ได้แก่ O, A, C, Asia1, South African Territories 1 2 และ 3 (SAT1 2 และ 3) โดยไวรัสแต่ละ serotype ไม่ให้ความคุ้มโรคร่วม (Cross immunity) กับ serotype อื่นได้ไม่ว่าจะเกิดจากการติดเชื้อหรือการทำวัคซีน และปัจจุบันยังสามารถแบ่งออกเป็น 6 5 subtype (Berinstein et al., 2000)โดยพบว่าสามารถเกิดภูมิคุ้มกันร่วมบางส่วน (partial cross immunity) ใน serotype เดียวกันแต่ต่าง subtype ได้ สำหรับในประเทศไทยพบมีการระบาดวนเวียนอยู่ 3 serotype คือ O, A, Asia1 (Linchongsubongkoch et al., 2008 Kongthon, 1990)

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 เช่นเดียวกับองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) จัดให้โรคปากและเท้าเปื่อยอยู่ใน กลุ่มโรคระบาดสัตว์ประเภท A ซึ่ง The World trade Organization (WTO) ถือเป็นข้อบังคับในการค้าสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ทำให้ประเทศที่มีการระบาดของ FMD ถูกกีดกันทางการค้า เพื่อป้องกันความเสี่ยงที่จะนำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (FMDV) เข้าสู่ประเทศที่ปราศจากจากโรคปากและเท้าเปื่อย ทำให้ประเทศที่ยังมีโรคปากและเท้าเปื่อยระบาดอยู่ได้รับความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างใหญ่หลวง ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่ได้รับผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์และการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ ดังนั้นนโยบายการควบคุมและกำจัดโรคปากและเท้าเปื่อยจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการเป็นอันดับต้นๆ โดยเฉพาะการรณรงค์ฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคใน

โค-กระบือ แพะ แกะ และสุกร ปีละ 2 ครั้ง ซึ่งวัคซีนถือเป็นเครื่องมือสำคัญที่มีประสิทธิภาพในการ ป้องกันและ ควบคุมโรค วัคซีนฯ ที่ใช้ต้องให้ความคุ้มโรคที่ตรงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ด้วย

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นวัคซีนที่มีพัฒนาการตั้งแต่แบบดังเดิม (coventional vaccine) จนถึงปัจจุบันหลายวิธี เช่น Frenkel's ผลิตจากเยื่อลิ้นวัว วิธี Stationary monalayer cell culture แบบ Raue flask วิธี Staticnary monstayer cell culture แบบ Roller bottle และวิธี suspension cell culture ตามลำดับ (อุดมและประคัลภ์, 2508, กมล, 2514) ซึ่งการผลิตวัคซีนในอดีตไม่มีการทำให้เชื้อไวรัสเข้มข้น (Concentration) และบริสุทธิ์ Purification ซึ่งบางครั้งอาจทำให้สัตว์แพ้ได้จากปริมาณโปรตีนที่มีสูงในวัคซีนรวมถึงทำให้สะดวกในการเก็บสะสมไวรัสเข้มข้นที่ทำให้หมดสภาพการก่อโรค (antigen) ก่อนที่จะนำไปผสมเป็นวัคซีต่อไป ซึ่งทำให้สามารถบริหารจัดการการผลิตวัคซีนให้เพียงพอและสอดคล้องต่อความต้องการของผู้ใช้ในการป้องกันโรคและควบคุมได้ โดยในปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาการผลิตวัคซีน (New generation) ทั้ง DNA Vaccine และการผลิตโดยใช้ virus vector โดยอยู่ในขั้นการวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการยังไม่ได้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะลดข้อจำกัดในด้านประสิทธิภาพ และการผลิตวัคซีนได้

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และวัคซีนต่างประเทศยังคงใช้วิธีการผลิตแบบ Suspension cell culture ซึ่งมีข้อจำกัดในการใช้อยู่หลายประการ เช่น การให้วัคซีนสู่ตัวสัตว์ และการเก็บรักษา รวมถึงโปรแกรมการฉีดวัคซีนที่เหมาะสม จึงจะทำให้การป้องกันและควบคุมโรคโดยการฉีดวัคซีนมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นเพื่อให้การป้องกันและควบคุมโรคสัตว์โดยการใช้วัคซีนเกิดประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องมีการเผยแพร่ให้ข้อมูลความรู้เกี่ยวกับโรคปากและเท้าเปื่อย ตั้งแต่ข้อมูลทั่วไปของโรค สาเหตุอาการ การติดต่อ รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อก่อโรค การวินิจฉัย รายละเอียดเกี่ยวกับวัคซีนทั้งการผลิต การใช้ การเก็บรักษา รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น สุขภาพสัตว์และสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการใช้วัคซีนในการป้องกันและควบคุมโรคให้เกิดประสิทธิภาพ ทั้งจากการสืบค้น และการประสบการณ์ของผู้เรียบเรียง เพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อบุคลากรที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย นักวิชาการ และผู้สนใจ สามารถใช้เป็นข้อมูลหรือคู่มือในการปฏิบัติงานต่อไป

บทที่ 2

โรคปากและเท้าเปื่อย

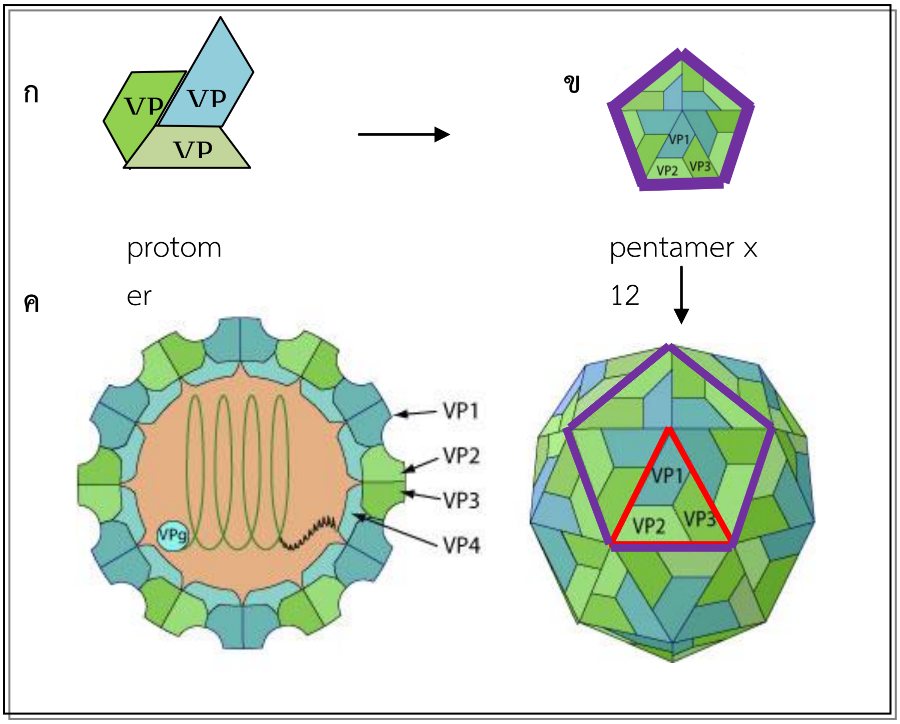
Foot and Mouth Disease:FMD

2.โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease: FMD)

2.1 สาเหตุ

โรคปากและเท้าเปื่อย มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease virus: FMDV) จัดอยู่ใน genus *Apthovirus* family *Piconaviridae* ซึ่งชื่อของ family *"picorna"* มาจากคำว่า "pico" ซึ่งแปลว่า ขนาดเล็ก และ "rna" หมายถึง ribonucleic acid (RNA) ดังนั้นไวรัสใน family นี้จึงมีขนาดเล็ก โดยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นไวรัสขนาดเล็ก มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 26 นาโนเมตร (Alexandersen et al., 2003) ไม่มีเยื่อหุ้มอนุภาค (non enveloped) มีรูปร่างแบบ icosahedral ผิวเรียบ โดยโครงสร้างอนุภาคไวรัสประกอบด้วยหลายๆ หน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด คือ 1A 1B 1C และ 1D (หรือที่เรียกว่า VP4 VP2 VP3 และ VP1ตามลำดับ) อย่างละ 60 ชิ้น มาประกอบเรียงตัวเป็นแบบ icosahedral asymmetric unit โดย VP1-VP3 เป็นผิวด้านนอก และ VP4 อยู่ด้านในรวมเป็น protomer และ 5 protomer มาเรียงตัวกันเป็น pentamer จากนั้น 12 pentamer มารวมตัวกันเป็นโปรตีนเปลือกหุ้ม (capsid) (Clavijo et al., 2004; Domingo et al., 2002; Fry et al., 1999) (ภาพที่ 1)

ภายในอนุภาคไวรัสบรรจุสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid: RNA) สายบวกสายเดี่ยว (positive sense single-stranded RNA) ขนาดประมาณ 8,500 คู่เบส (Kitching et al., 2005) โดยจะถูกแปลรหัสได้เป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) ซึ่งจะถูกแปลรหัสได้เป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) และถูกตัดย่อยเป็นส่วนๆ ซึ่งมีหน้าที่ต่างกัน โครงสร้างสารพันธุกรรม (genomic RNA) ของไวรัสสามารถแบ่งเป็นส่วนสำคัญ (Domingo et al., 2002) (รูปที่ 2) ได้แก่



รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสปากและเท้าเปื่อย (ก) การเรียงตัวของ VP1-VP3 ในโปรโตเมอร์ (ข) การเรียงตัวของ 5 protomer เพื่อประกอบขึ้นเป็น 1 pentamer (ค) โครงสร้างของเปลือกหุ้มทั้งภายในและภายนอก ซึ่งประกอบด้วยการรวมกันของ protomer เป็น pentamer และ pentamer รวมเป็นเปลือกหุ้ม (capsid) ซึ่งภายในบรรจุสารพันธุกรรม

ที่มา ดัดแปลงจาก Clavijo et al, 2004

บริเวณ 5′untranslated region (UTR) เป็นบริเวณที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเองของไวรัส (viral replication) และการเริ่มต้นแปลรหัสโปรตีน (protein translation) ซึ่งบริเวณนี้เริ่มจากส่วนปลาย 5’-VPg - S fragment - poly C, pseudonot (PKs)- cis acting replicative element (*cre*) - internal ribosome entry site (IRES) - AUG 2 ตำแหน่งตามลำดับ

การแปลรหัสโปรตีนจะเริ่มจากมีไรโบโซมเข้ามาเกาะ IRES และประกอบกันขึ้นเป็น translation initiation complex ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ใกล้กับ AUG start codon ซึ่งเป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีนสายยาว (Clavijo et al., 2004; Grubman and Baxt, 2004)

ส่วนของ L ^{pro} บริเวณที่อยู่ถัดมาจากบริเวณ 5′untranslated regian (UTR) ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีน L ทำหน้าที่เป็น proteinase ตัดตัวเองออกจากสายโพลีเพปไทด์ทางด้าน 5′ของโปรตีนห่อหุ้ม และยังทำหน้าที่เป็น trans proteinase ไปหยุดการทำงานของ host translation initiation factor eIF4G ของเซลล์เจ้าบ้านทำเซลล์เจ้าบ้านให้ไม่สามารถแปรรหัสได้ (de Los Santos et al., 2006; Mason et al., 2003)

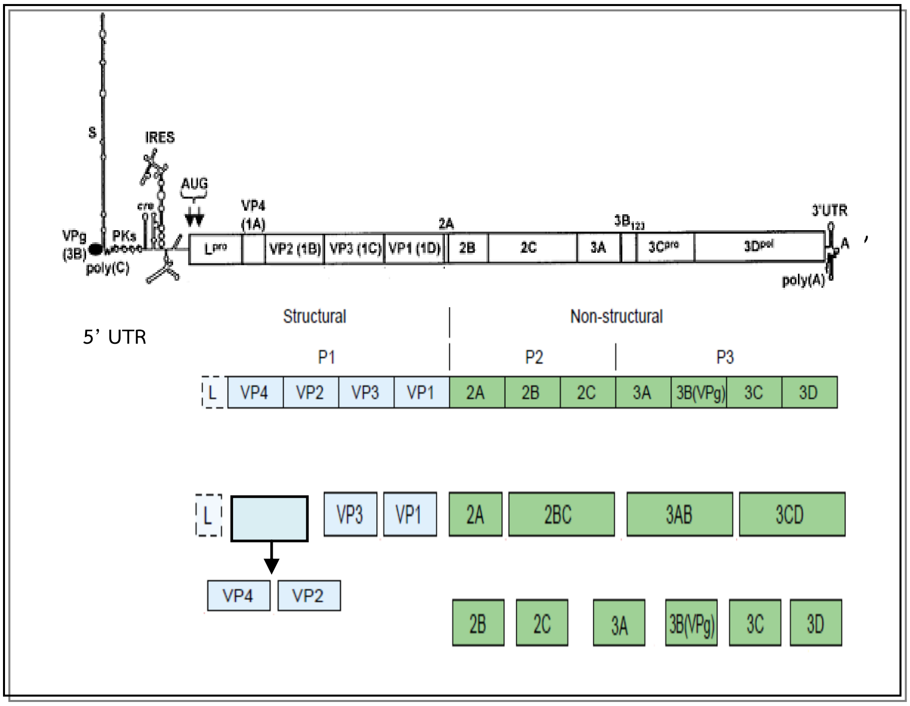
บริเวณที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างเป็นบริเวณที่ติดกับ 5′UTR บริเวณนี้เป็นส่วน P1 region ประกอยด้วยยีน 1D, 1B, 1C และ 1A ซึ่งจะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนโครงสร้าง VP1 VP2 VP3 และ VP4 ตามลำดับ โดยโปรตีน VP1 จะมีส่วนของ G-H loop หรือที่เรียกว่า FMDV loop (residues 140-160) ซึ่งเป็นบริเวณที่มี epitope ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีจึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้สูง (Fry et al., 2005; Grubman and Baxt, 2004) นอกจากนี้โปรตีน VP0 ซึ่งจะถูกโปรตีน 3C ตัดเพื่อแยกออกเป็น VP2 และ VP4 ในระยะที่ไวรัสกำลังบรรจุ genome เข้าสู่ภายในอนุภาค (Saiz et al., 2002)

บริเวณ nonstructural protein เป็นบริเวณที่อยู่ถัดจากส่วนโปรตีนโครงสร้าง เป็นส่วนของ P2 และ P3 region เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของ โดย P2 จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน 2A 2B และ 2C โปรตีน 2A ทำหน้าที่เป็น proteinase ในการตัดบริเวณ P1ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนโครงสร้างให้หลุดออกจากโปรตีนสายยาวในการตัดครั้งแรก

(primarycleavage) ส่วนโปรตีน 2B ทำหน้าที่ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่จะผ่านเข้าออกเมมเบรน (membrane) ทั้ง 2B และ 2C จำกัดอยู่บริเวณผิวด้านนอกของ endoplasmic reticulum ของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเป็นบริเวณที่มีการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมไวรัส บริเวณ P3 ประกอบไปด้วยโปรตีน 3A 3B 3C และ 3D ในส่วนโปรตีน 3B มีความเหมือนกับโปรตีน VPg ที่อยู่บริเวณด้านปลาย 5′ โปรตีน 3C เป็น proteinase ซึ่งทำหน้าที่ตัดโปรตีนสายยาว และสามารถตัดโปรตีนบางตัวของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งทำให้เซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถแปรรหัสได้ ส่วนโปรตีน 3D ทำหน้าที่เป็น RNA polymerase (Buenz and Howe, 2006; Mason et al., 2003) (รูปที่2)

2.2 ระบาดวิทยาของโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease : FMD)

ปี ค.ศ.1546 Hieronymus Fracastorius เป็นคนแรกได้เคยรายงานโรคระบาดที่เกิดในวัว ของเมืองเวโรนา ประเทศอิตาลี โดยวัวป่วยมีแผลตุ่มใส เปื่อยในช่องปาก กินอาหารไม่ได้ ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ได้ระบุถึงสาเหตุของโรค ต่อมาไม่นานก็พบการระบาดของโรคลักษณะคล้ายกันในสัตว์ประเทศเยอรมนี และสหราชอาณาจักรเช่นกัน ในช่วงปลายศตวรรษที่ 19 ปี ค.ศ. 1897 Friedrich Loeffler และ Paul Frosch ได้ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว พบว่าเป็นเชื้อจุลชีพที่มีขนาดเล็กว่าแบคทีเรียทีเรียและสามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อไวรัส ซึ่งนับว่าเป็นไวรัสชนิดแรกที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งปัจจุบันรู้จักในชื่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ต่อในปี ค.ศ. 1922 Vallee และ Carre ทำการทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไปในหนูตะเภา และพบว่าหนูตะเภามีความไวต่อเชื้อไวรัสดังกล่าว ซึ่งการทดลองนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาการเพาะเลี้ยงไวรัสในห้องทดลอง และทีมวิจัยของ Vallee ยังพิสูจน์ได้ว่าไวรัส FMD มีมากกว่าหนึ่ง serotype ที่เป็นสาเหตุก่อโรคในสัตว์ (Longjam et al., 2011; Mahy, 2005)



รูปที่ 2 แบบแผนที่ของ genomic RNA และโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสบน genome ของ FMDV โดย viral RNA จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) จากปลาย 5' คือ L protein ตามด้วยกลุ่มของโปรตีนโครงสร้าง (VP1-VP4) และกลุ่ม nonstructural protein จากนั้นจะถูกตัดเป็นส่วนๆ โดยการทำงานของโปรตีน 2A ซึ่งเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่ 2A ถูกสังเคราะห์ขึ้น และการตัดโปรตีนสายยาวขั้นต่อๆ ไปเกิดจากการทำงานของโปรตีน 3C ส่วนการตัดครั้งสุดท้ายใน VP0 แยกเป็น VP2 และ VP4 จะเกิดขึ้นหลังจาก genome RNA ถูกบรรจุเข้าไปในเปลือกหุ้ม

ที่มา ดัดแปลงจาก (Buenz and Howe, 2006)

โดยในปี 1922 Vallee และ Carre สามารถจำแนกได้ 2 serotype คือ O จากเมือง Oise ประเทศฝรั่งเศส และ A จากเมือง Allemagne ประเทศเยอรมัน ต่อมาในปี 1926 Waldmann และ Trautwein แยกเชื้อ

serotype C ได้จากประเทศเยอรมัน (Mahy, 2005) และในอีก 30 ปีถัดมา Pirbright laboratory ประเทศอังกฤษ ได้พบอีก 3 serotype คือ SAT1, 2 และ 3 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากการระบาดในแอฟฟิกาใต้ และ serotype สุดท้าย คือ Asia 1 แยกเชื้อได้จากกระบือปลักในประเทศ Pakistan (Doel, 2003; Kitching, 1998; Sutmoller et al., 2003)

โรคปากและเท้าเปื่อยได้แพร่ระบาดไปทั่วโลก โดยพบเป็นโรคประจำถิ่น (edemic) ในหลายพื้นที่ของโลกโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย แอฟริกาใต้ อเมริกาใต้ อย่างไรก็ตามยังมีบางประเทศที่ได้รับรองการปลอดจากโรคปากและเท้าเปื่อยโดย OIE (OIE, 2013) เช่น ประเทศนิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย กรีนแลนด์ ไอซ์แลนด์ และพื้นที่ของทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ เป็นต้น ในปัจจุบันการระบาดของไวรัส FMD แต่ละ serotype จะมีการระบาดเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวแพร่กระจายไปยัง 7 ภาคส่วนของโลก ได้แก่ Asia, South Africa, the Middle East, และ South America (รูปที่ 3) (EuFMD, 2013)

ไวรัส FMD ที่ระบาดอยู่ทั่วโลกมี 7 serotype และยังแบ่งเป็นไวรัสชนิดย่อย (suptype) รวมทั้งหมด 65 ชนิด ดังนี้ (Longjam et al, 2011)

1. Serotype O แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 11subtypes คือ O_1-O_{11}
2. Serotype A แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 32subtypes คือ A_1-A_3
3. Serotype C แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 5 subtypes คือ C_1-C_5
4. Serotype Asia1 แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 3suptypes คือ Asia1/1- Asia1/3
5. Serotype South African Territories 1 (SAT1) แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 7 subtypes คือ SAT1/1 - SAT1/7
6. Serotype SAT2 แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 3 subtypes คือ SAT2/1- SAT2/3
7. Serotype SAT3 แบ่งเป็นชนิดย่อย ได้ 4 subtypes คือ SAT3/1- SAT3/4

โดย Serotype O, A และ Asia1 พบได้ทั่วโลก แต่ SAT 1 - 3 พบในเฉพาะแถบประเทศแอฟริกา

สำหรับการระบาดในประเทศไทยพบมีการระบาดอยู่ 3 serotype ได้แก่ O, A และAsia1 ซึ่ง serotype A ถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 ต่อมา serotype Asia1 และ O ถูกตรวจพบในปี พ.ศ. 2497 และ พ.ศ. 2500 ตามลำดับ (สมใจ และ นภดล , 2535, Chaisrisongkram, 1993) จากนั้นโรคปากและเท้าเปื่อยจึงถูกประกาศเป็นโรคระบาดในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในมาตรการควบคุมโรค ดังนั้นศูนย์ปฏิบัติการโรคปากและเท้าเปื่อยจึงได้ถูกก่อตั้งขึ้นในปี พ.ศ. 2499 มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรวจยืนยันและแยกชนิดของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย และต่อมาในปี 2503 ศูนย์ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจึงได้ถูกก่อตั้งขึ้น และมีศักยภาพในการผลิตวัคซีนได้ ชนิดของไวรัสที่พบการระบาดในประเทศไทย

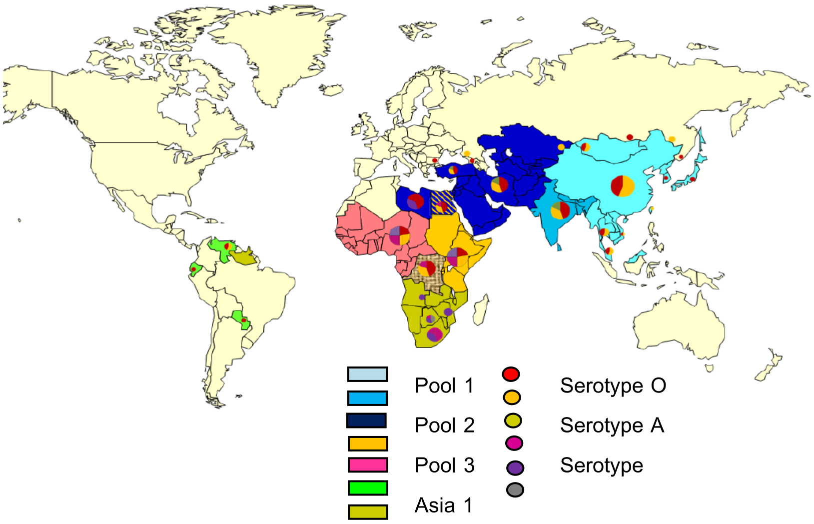
Serotype O ชนิดย่อย O_1

Serotype A ชนิดย่อย A_{15}-A_{22}

Serotype Asia1 ชนิดย่อย Asia1

2.3 พยาธิกำเนิดโรค

เมื่อเชื้อไวรัส FMD เข้าสู่ร่างกายสัตว์ ซึ่งส่วนใหญ่มักจะได้รับเชื้อโดยการสูดหายใจ หรือกินอาหาร น้ำซึ่งมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ หรือรับเชื้อเข้าสู่ทางผิวหนังผ่านบาดแผล เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจากนั้นเชื้อแพร่เข้าสู่กระแสเลือด และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ pre-viraemic, viraemic และ post-viraemic ความรุนแรงของพยาธิสภาพ อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไวรัสและชนิดสัตว์



รูปที่ 3 แผนที่การแพร่การกระจายของไวรัสปากและเท้าเปื่อยแต่ละserotype ในปี 2012 -2013
ที่มา EuFMD, 2013

โค หรือแพะและแกะ สามารถรับเชื้อเข้าสู่ร่างการผ่าน ระบบทางเดินหายใจบริเวณเยื่อบุผิวเพดานอ่อน (soft palate) ของคอหอย (pharynx epithelium) ซึ่งระยะแรกที่ติดเชื้อสามารถตรวจพบไวรัสที่บริเวณนี้ได้ใน 1 - 3 วัน จากนั้นไวรัสจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง ก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดในวันที่ 4-5 หลังการติดเชื้อ และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น แต่กรณีที่ไวรัสเข้าสู่ร่างกายผ่านบาดแผลที่ผิวหนัง หรือฉีดเชื้อเข้าที่ลิ้นไวรัสจะเจริญและเพิ่มจำนวนบริเวณที่ติดเชื้อก่อนที่จะกระจายไปทางต่อมน้ำเหลืองและแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น (Henderson et al., 1948) ที่แสดงให้เห็นอย่างเดินชัดคือ บริเวณเท้า รอยต่อของกีบและร่องกีบเท้า (Alexandersen et al., 2001; Alexandersen et al., 2003)

ในสุกร พบจากพฤติกรรมและสรีระของสุกรพบว่าสามารถรับเชื้อเข้าสู่ร่างการผ่านได้ 2 ระบบหลัก คือ ระบบทางเดินหายใจโดยไวรัสจะเพิ่มจำนวนได้ดีบริเวณปอดแล้วจึงแพร่เข้าสู่กระแสเลือด อีกระบบคือระบบทางเดินอาหาร โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนได้ดีบริเวณ palatine tonsil แล้วจึงแพร่เข้าสู่ระบบน้ำเหลือง หลังติดเชื้อภายใน 24 – 48 ชั่วโมง เนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อคอหอย ต่อมน้ำเหลืองใต้คาง (mandibular lymph node) ม้าม และไรกีบเท้า จะเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเซลล์เนื้อเยื้อใต้ชั้นผิวหนังแท้ (dermal papillae) เกิดเป็นตุ่มน้ำใส (vescicle) ซึ่งในระยะนี้ยังสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสได้ และไม่พบภายหลังติดเชื้อนาน 48-72 ชั่วโมง (Murphy et al., 2010) สุกรสามารถกำจัดเชื้อในร่างกายออกได้หมดภายใน 3-4 สัปดาห์ ดังนั้นสุกรจึงไม่มีภาวะติดเชื้อแฝง หรือเป็นพาหะโรค (Arzt et al., 2011)

2.4 อาการของโรค

ลักษณะอาการในโค โดยทั่วไปจะมีเม็ดตุ่มใสบริเวณริมฝีปากภายในช่องปาก เหงือก บริเวณรอบลิ้น เพดานปาก บริเวณรอยต่อของกีบและร่องกีบเท้า นอกจากนี้อาจพบตุ่มใสที่หัวนม โดยเฉพาะแม่โคอาจเสี่ยงต่อการเกิดเต้านมอักเสบตามมาได้ จากนั้นตุ่มใสที่บริเวณปากและเท้าจะแตกเปื่อยและลอกหลุดทำให้สัตว์กินอาหารไม่ได้ น้ำหนักตัวจะลดลง แต่ตุ่มใสที่ลิ้นจะหายไปเองภายใน 4 วัน ในโคที่มีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน พบว่ามักมีอาการไข้สูงสูง 39.5-41 องศาเซลเซียส น้ำลายไหล เลียริมฝีปากบ่อยๆ มีน้ำมูกเหนียวข้น จนกระทั่งเป็นหนอง ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากมีตุ่มใสและการหลุดลอกเป็นแผลหลุม สำหรับลูกโคที่ได้รับเชื้ออาจตายก่อนที่จะพบตุ่มใส เนื่องจากไวรัสจะเข้าไปทำลายเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) หรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial necrosis) (Kitching et al., 2005; Musser, 2004)

ลักษณะอาการในแพะและแกะ ส่วนใหญ่อาการขาเจ็บในแพะและแกะเป็นอาการเริ่มแรกที่บ่งบอกว่าสัตว์เป็นโรคปากและเท้าเปื่อย โดยทั่วไป

แพะและแกะโตเต็มไวมักไม่ค่อยแสดงอาการทางคลินิก แต่อาจสังเกตพบมีตุ่มใสที่บริเวณปาก และภายในช่องปาก บริเวณร่องกีบ ส้นเท้า และรอยต่อระหว่างกีบได้บ้างเล็กน้อย แต่จะแตกและหายไปอย่างรวดเร็วไม่เกิน 3 วัน (Arzt et al., 2011; Hughes et al., 2002)

<u>ลักษณะอาการในสุกร</u> มีตุ่มใสบริเวณจมูก บริเวณขากรรไกรล่าง และทั่วทั้งบริเวณลิ้น รอยต่อระหว่างกีบ ส้นเท้า และที่เต้านม รอยโรคที่พบสามารถเห็นได้หลังจากสุกรเริ่มแสดงอาการ 2 วัน และจะลอกหลุดไปภายใน 4 วัน สุกรที่ป่วยอาจมีไข้สูงร่วมด้วย ในลูกสุกรอาจพบมีการติดเชื้อที่ลำไส้ได้ ((Kitching and Alexandersen, 2002)

ระยะฟักตัว

วัวที่ได้รับเชื้อจะมีระยะฟักตัวประมาณ 3-5 วัน ส่วนแพะและแกะมีระยะฟักตัวประมาณ 2-8 วัน ขณะที่ในสุกรมีระยะฟักตัวประมาณ 2-14 วัน หรืออาจสั้นเพียง 1 วัน โดยช่วงของระยะฟักตัวขึ้นอยู่กับช่องทางการรับเชื้อ (route) ความรุนแรงแรงของไวรัส(virulence) ชนิดและอายุของสัตว์ อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานระยะฟักตัวนานถึง 2 สัปดาห์ในสัตว์บางชนิด (Alexandersen et al., 2003; Arzt et al., 2011; Kitching and Hughes, 2002)

2.5 การติดต่อ

ไวรัส FMD สามารถแพร่กระจายเชื้อและส่งผ่านเชื้อระหว่างสัตว์ป่วยไปยังสัตว์ปกติได้ 2

ทางหลัก ๆ คือ **การติดเชื้อทางตรง (direct contract)** เช่น การสัมผัสโดยตรงระหว่างสัตว์ การติดต่อผ่านทางอากาศ (Airborne Transmission) โดยไวรัสอาจติดไปกับฝุ่นละอองที่ฟุ้งอยู่ในอากาศ (droplet nuclei; อนุภาคมีขนาดประมาณ < 3 mm) การแพร่เชื้อผ่านทางละอองน้ำมูกน้ำลาย หรือสาร

คัดหลั่ง (Droplet, > 6 mm) โดยเฉพาะในสุกรมีโอกาสติดเชื้อผ่านระบบทางเดินหายใจได้ง่าย ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง จากตัวอย่างการระบาดในประเทศสหราชอาณาจักร เมื่อปี 2001 มีรายงานว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ O สามารถแพร่เชื้อผ่านอากาศได้ไกลถึง 20 กิโลเมตร (Alexandersen and Donaldson, 2002; Alexandersen et al., 2003) โดยเฉพาะไวรัสไทป์ C สามารถแพร่ไปได้ไกลกว่า 300 กิโลเมตร (Donaldson and Alexandersen, 2002; Sorensen et al., 1992) การติดต่อจากการใช้แหล่งอาหารและน้ำร่วมกัน การรับเชื้อผ่านทางการกิน สัตว์ต้องได้รับเชื้อมากถึง 10^4–10^5 ในสุกร และ 10^5–10^6 $TCID_{50}$ ในโคจึงจะก่อโรคได้ (Sellers et al., 1971) ไวรัสสามารถถูกขับออกจากตัวสัตว์ทางสารคัดหลั่ง น้ำลาย ปัสสาวะ อุจาระ และน้ำนม โดยไวรัสคงสภาพอยู่ได้ที่ pH ระหว่าง 7.2-7.6 และจะหมดสภาพของการติดเชื้อที่ pH น้อยกว่า 6 และมากกว่า 9 (Racaniello, 2001) ดังนั้นเชื้อจึงถูกทำลายได้ด้วย 2% sodium hydroxide, 4% sodium carbonate หรือ 0.2% citric acid ไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้ 3 วัน ในช่วงฤดูร้อน และมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 28 วัน ในช่วงฤดูหนาว สำหรับในอุจจาระแห้งเชื้อสามารถมีชีวิตได้ 14 วัน ขณะที่ในอุจจาระที่มีสภาพกึ่งเหลวและอากาศหนาวไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลา 6 เดือน นอกจากนี้เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอาจมีชีวิตอยู่ในปัสสาวะได้นานถึง 39 วัน โดยไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 1 ปี แต่จะมีชีวิตสั้นลงเมื่ออุณหภูมิสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น ซึ่งพบว่าที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 10 วัน และที่ 56 องศาเซลเซียส สามารถมีชีวิตอยู่ได้น้อยกว่า 30 นาที การพาสเจอร์ไรซ์ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เชื้อไวรัสอาจยังคงมีชีวิตอยู่ ดังนั้นน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่ติดเชื้อจะต้องทำการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 20 นาที เชื้อไวรัสจึงจะหมดสภาพ (Musser, 2004)นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถคงอยู่ในตัวสัตว์หลังติดเชื้อได้นานมากกว่า 4 สัปดาห์โดยที่สัตว์ไม่แสดงอาการ หรือในสภาวะที่เรียกว่า “พาหะโรค” โดยไวรัสสามารถ

แฝงอยู่บริเวณเนื้อเยื่อคอหอยของวัวได้นานหลายปี และเชื้อสามารถแฝงอยู่ในตัวแกะหรือแพะได้นานตั้งแต่1-5 เดือนหรืออาจนานถึง12 เดือน ขณะที่สุกรไม่พบว่าเป็นพาหะ(Jorna et al., 2003; Sutmoller et al., 2003)

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยน้อยสุด ($TCID_{50}$) ที่ทำให้สัตว์ติดเชื้อในช่อง ทางการติดต่อต่างๆ กัน

ชนิดสัตว์	ช่องทางการติดต่อ (route)				
	การหายใจ (Inhalation)	ใต้ผิวหนัง (Intradermal)	ใต้กล้ามเนื้อ (Intramuscular)	การหยอดจมูก (Nasal instillstion)	การกิน (oral)
โค	10	100	10^4	10^4-10^5	10^5-10^6
แกะ	10	100	10^4	10^4-10^5	10^5-10^6
สุกร	>800	100	10^4	unknow	10^4-10^5

ที่มา (Alexandersen et al., 2003)

อย่างไรก็ตามการติดเชื้อทางอ้อม ได้แก่ อุปกรณ์เครื่องมือการเกษตร คน ยานพาหนะ และสภาพแวดล้อมการเลี้ยงที่หนาแน่น ตลอดจนสัตว์เลี้ยงอื่นที่อยู่ภายในฟาร์มล้วนเป็นสาเหตุที่จะทำให้เกิดการแพร่การกระจายขยายวงกว้างออกไปยังพื้นที่ข้างเคียงได้ (Kitching et al., 2005)โดยเฉพาะในคนที่ทำงานอยู่ในฟาร์มที่เกิดโรค หรือมีโอกาสสัมผัสกับสัตว์ป่วย มักจะนำเชื้อออกนอกบริเวณได้ง่าย ไวรัสจะมีโอกาสปนเปื้อนมากับเครื่องแต่งกาย ผม หรือผิวหนังของผู้ปฏิบัติงาน จากการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างไวรัสจากผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มที่เกิดโรค โดยเก็บตัวอย่างจากโพรงจมูก (nasal swab) พบปริมาณไวรัสประมาณ 100- 1000 IU ต่อมิลลิลิตร แต่หากผู้ปฏิบัติงานชำระร่างกายและเปลี่ยนเสื้อผ้าภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากรับเชื้อ จะลดปริมาณไวรัสลงได้ถึง 100 เท่า (Sellers et al., 1970)

2.7 การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการสังเกตจากอาการนั้นไม่เพียงพอ สัตว์บางชนิดที่เป็นโรคอาจไม่แสดงอาการ และลักษณะอาการของโรคอาจคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆ ได้ เช่น โรค vesicular stomatitis และ swine vesicular disease ในสุกร โรค bovine papular stomatitis, bovine herpes mammilitis, infectious bovine rhinotracheitis, bovine mucosal disease, malignant catarrhal fever และ rinderpest ในโคกระบือ และโรค bluetongue, parapox-virus, peste des petits ruminants และ footrot ในแพะและแกะ (Alexandersen et al., 2003; Remond et al., 2002) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการเกิดโรคในสัตว์

โดยทั่วไปหลักการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการมี 2 วิธีหลักๆ คือ

การตรวจหาแอนติเจนจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงจากรอยโรค โดยเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างเนื้อเยื่อลิ้น เนื้อเยื่อบริเวณไรกีบที่เท้า และน้ำเหลืองจากเม็ดตุ่มใสหรือเยื่อเมือกของสัตว์ป่วยมาเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่วิธีมีข้อจำกัดหลายประการเช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจ ซึ่งจำเป็นต้องรอเวลาให้เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนซึ่งอาจใช้เวลาหลายวันหากมีเชื้อในปริมาณน้อย และเนื่องจากต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เพิ่มขั้นตอนที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง (Longjam et al., 2011)

complement fixation test (CFT) เป็นวิธีทดสอบที่ใช้สำหรับตรวจและแยกชนิด (typing) ของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย จากตัวอย่างเยื่อเมือกของสัตว์ป่วย แต่การแปลผลต้องอาศัยความชำนาญและประสลการณ์ของ

ผู้อ่านผล จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธี antigen capture-ELISA ขึ้นมาแทน รวมทั้งมีการประเมินผลของวิธีทดสอบ และถูกนำมาใช้เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งขั้นตอนในการตรวจวินิจฉัยได้อธิบายไว้ในคู่มือของ OIE (Remond et al., 2002)

วิธี polymerase chain reaction PCR หรือ reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหา RNA ของไวรัสมีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง อีกทั้งให้ผลภายในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสโดยตรงจากตัวอย่าง แต่วิธีนี้ต้องใช้ชุดน้ำยาและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง (Mackay et al., 2002)

การตรวจวินิจฉัยทางซีรัม (Serological diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยโรคโดยอาศัยพื้นฐานทางซีรัมวิทยา มีประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวัง ติดตามการระบาดของโรคเพื่อยืนยันการติดเชื้อโดยเฉพาะในแพะและแกะ ซึ่งแสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อยหรือไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นชัดเจน วิธีการตรวจทางซีรัมโดยทั่วไปจะตรวจโดยวิธี virus neutralization test (VNT) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะกับการตรวจหาซีโรไทป์แต่จะต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค ELISA ขึ้นมาโดยวัดระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งมีหลายเทคนิคเช่น liquid phase blocking ELISA (LPELISA) solid phase blocking ELISA หรือ competitive ELISA ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการกันอย่างกว้างขวางทั่วโลกสำหรับการตรวจคัดกรองโรค (Lunt et al., 1994; Paiba et al., 2004)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non-structural proteins ในปัจจุบันวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาได้ให้ความสำคัญในการแยกสัตว์ที่ได้รับวัคซีนออกจากสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยการตรวจหาระดับการตอบสนองทาง

ภูมิคุ้มกันต่อ non-structural proteins (NSPs) ของไวรัส ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะแสดงออกมาให้เห็นในช่วง viral replicative cycle ในสัตว์ที่ติดเชื้อ แต่จะไม่พบในสัตว์ที่ได้รับวัคซีนที่ผ่านการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งมีรูปแบบการทดสอบที่แตกต่างกัน ได้แก่ agar gel immunodiffusion test, direct ELISA และ blocking ELISA ปัจจุบันมี มีการผลิตเป็นชุดทดสอบ (test kit) เชิงพาณิชย์ออกจำหน่ายอย่างกว้างขวาง

2.6 การรักษาและการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส จึงไม่มียารักษาโดยตรง การรักษาโรคมักจะรักษาตามอาการ เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะหรือยาฆ่าเชื้อทาแผลที่ปากและกีบเท้า และการป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน แต่อย่างไรต้องมีมาตรการการควบคุมโรคเพื่อป้องกันการแพร่ระบาด ซึ่งตามพระราชพระราชบัญญัติโรค ระบาดสัตว์ พ.ศ.2499 ได้กำหนดมาตรการการป้องกันโรคระบาดตามมาตรา 8 มีใจความโดยย่อ คือ ในท้องที่หรือเขต หรือหมู่บ้านใด มีสัตว์ตั้งแต่สองตัวขึ้นไปป่วยหรือตายมีอาการคล้ายคลึงกันในระยะเวลาห่างกันไม่เกิน 7 วัน ให้แจ้งต่อเจ้าหน้าที่หรือสัตวแพทย์ท้องที่ภายใน 24 ชั่วโมงนับตั้งแต่สัตว์ป่วยหรือตาย และเจ้าของต้องค วบคุมสัตว์ป่วยทั้งหมดไว้ภายในบริเวณที่สัตว์อยู่ ห้ามเคลื่อนย้ายออกจากบริเวณ กรณีสัตว์ตายให้ควบคุมซาก ห้ามเคลื่อนย้ายหรือชำแหละ หากไม่มีการชันสูตรซากภายใน 48 ชั่วโมง สามารถฝักซากใต้ระดับผิวดินไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร โดยเจ้าหน้าที่สามารถดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่สามารถออกคำสั่งเป็นหนังสือได้ ดังนี้ (รายละเอียดฉบับเต็มตามภาคผนวก)

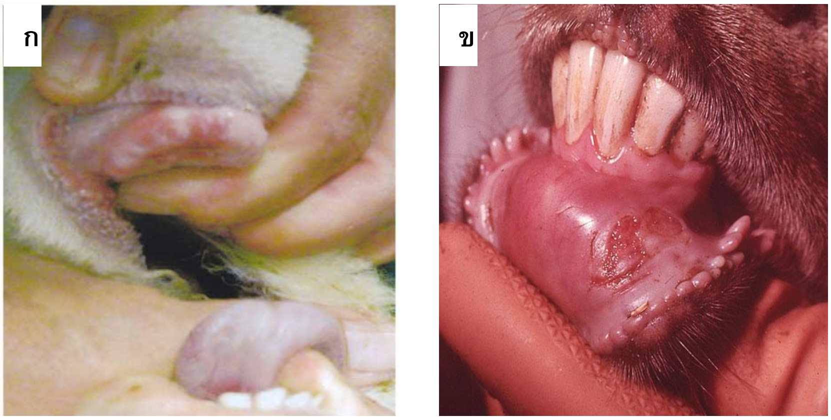
1. ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ป่วย หรือสงสัยว่าป่วยไว้ในภายในเขต ตามวิธีที่กำหนด และกำหนดเขตโรคระบาดชั่วคราว มีรัศมีไม่เกิน 5 กิโลเมตรจากที่ตรวจพบโรคระบาด
2. ให้ฝัง หรือเผาซากนั้น ณ ที่ที่กำหนดให้ ถ้าไม่อาจทำได้ ให้สั่งทำลายโดยวิธีอื่นตามแต่เห็นสมควร
3. ให้กักขัง แยก หรือย้ายสัตว์ที่อยู่ร่วมฝูง หรือเคยอยู่ร่วมฝูงกับสัตว์ป่วย หรือสงสัยว่าป่วยหรือตายไว้ภายในเขต และตามวิธีที่กำหนดให้
4. ให้ทำลายสัตว์ที่เป็นโรคระบาด หรือสัตว์พาหะของโรค
5. ให้กำจัดเชื้อโรคที่อาหารสัตว์ หรือซากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคระบาดตามวิธีที่กำหนดให้
6. ให้ทำความสะอาด และทำลายเชื้อโรคระบาดหรือพาหะของโรคระบาดในที่ดิน อาคาร ยานพาหนะ หรือ สิ่งของ ตามวิธีที่กำหนดให้ และกักยานพาหนะที่บรรทุกสัตว์หรือซากสัตว์เพื่อตรวจโรคระบาด หรือควบคุมสัตว์หรือซากเพื่อควบคุมไว้สังเกต
7. ประกาศเป็นเขตโรคระบาด หรือเขตสงสัยว่ามีโรคระบาด

นอกจากมาตรการที่กล่าวมาข้างต้น การใช้วัคซีนเป็นเครื่องมือทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมและป้องกันโรค โดยการใช้วัคซีนรอบพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค (ring vaccination, barrier vaccination หรือ high-risk enterprise vaccination) โดยปกติมีนโยบายกำหนดให้มีการฉีดวัคซีนปีละ 2 ครั้ง (ทุก 6เดือน) เพื่อป้องกันโรคในสัตว์ที่มีความไวต่อโรค รวมถึงมีการใช้วัคซีนแบบวงแหวนในกรณีที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในพื้นที่ในรัศมีอย่างน้อย 5 กิโลเมตรรอบจุดเกิดโรค ร่วมกับการเฝ้าระวังเพื่อกำหนดขอบเขตหรือพื้นที่ของการควบคุมโรค ค้นหาการระบาดของโรค และการสร้างพื้นที่ปลอดโรค โดยเฉพาะการเฝ้าระวังควรเน้นพื้นที่ที่มีกระแสลม หรือสัตว์ป่าที่อาจเป็นปัจจัยต่อการระบาดควรจะเพิ่มการเฝ้าระวังมากยิ่งขึ้น ซึ่งการเฝ้าระวังของประเทศไทยจะเน้นการเฝ้าระวังเชิงรุก

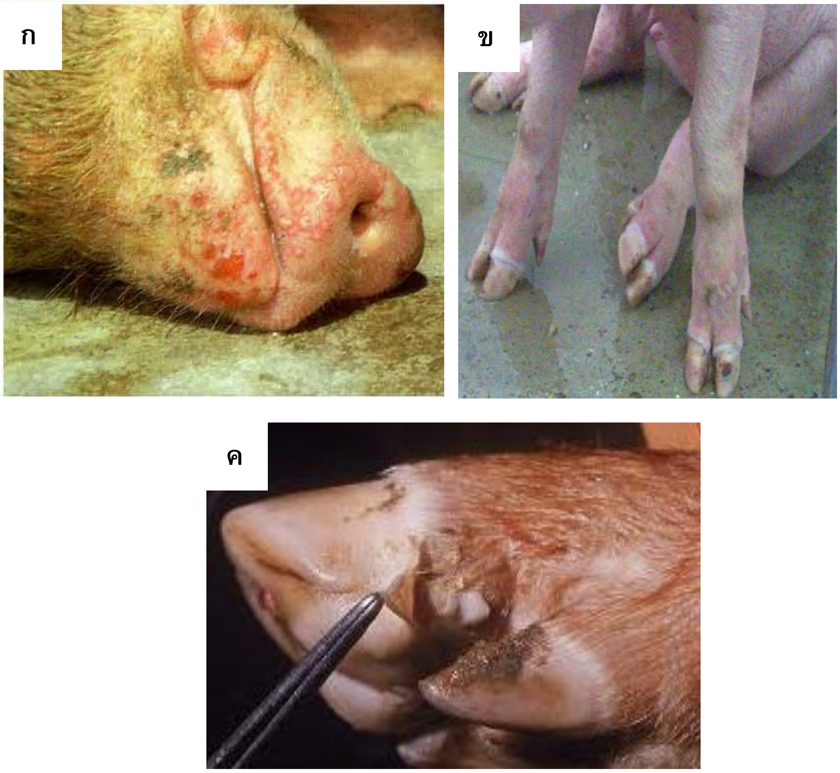
เพื่อการตรวจพบโรคให้เร็วที่สุดจากอาสาสมัครประจำพื้นที่ ร่วมกับองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่นรวมทั้งผู้รับซื้อสัตว์และการแจ้งโรคจากเจ้าของสัตว์ นอกจากนี้เพื่อให้การเฝ้าระวังมีประสิทธิภาพสัตว์ทุกตัวจะต้องถูกทำเครื่องหมายและขึ้นทะเบียน โดยเริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2549 เพื่อการตรวจสอบย้อนกลับสัตว์ได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศสมาชิกของ SEAFMD เพื่อประสานความร่วมมือในการปราบปรามและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย มีเป้าหมายที่จะทำให้ประเทศในภูมิภาคปลอดจากโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการใช้วัคซีนภายในปี ค.ศ. 2020 วัคซีนจึงเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรค สามารถลดอัตราการป่วยและอัตราการตายจากโรคติดเชื้อได้ และช่วยลดความสูญเสียที่อาจเกิดจากการระบาดของโรคได้ ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตวัคซีนใช้เองภายในประเทศ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ แพะ แกะ ชนิดรวม 3 ไทป์ เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำ (Aqueous vaccine) โดยประกอบด้วยเชื้อไวรัสไทป์ O, A และ Asia1 แต่ละไทป์ไม่น้อยกว่า 10^7 $TCID_{50}$ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสำหรับสุกร ชนิดรวม 3 ไทป์ เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน (Oil vaccine) แต่ละไทป์ไม่น้อยกว่า 10^7 $TCID_{50}$ โดยวัคซีนชนิดน้ำและวัคซีนชนิดน้ำมันสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน 6 เดือนหลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรก แต่ส่วนใหญ่วัคซีนชนิดน้ำให้ความสามารถในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสุกรได้น้อยกว่าในโค

รูปที่ ลักษณะอาการทั่วในโคหลังจากติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โคป่วยจะแสดงอาการที่ (ก) เพดานฟัน เหงือก (ข) เต้านม (ค) กีบเท้า



รูปที่ ลักษณะอาการทั่วในแพะหลังจากติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จะแสดงอาการที่ (ก) ลิ้น (ข) เหงือก



รูปที่ ลักษณะอาการทั่วในสุกรหลังจากติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จะแสดงอาการที่ (ก) รอบปาก (ข,ค) ไรกีบเท้า

บทที่ 3

การผลิตวัคซีน
โรคปากและเท้าเปื่อย
(Foot and Mouth Disease Vaccine)

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Vaccine)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์หรือกองผลิตชีวภัณฑ์ (เดิม) เป็นหน่วยงานที่อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของกรมปศุสัตว์ มีหน้าที่ผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์ซึ่งรวมถึงวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ และสุกรด้วย โดยผลิตวัคซีน โรคปากและเท้าเปื่อย จากไวรัส 3 serotype หรือ type (ไทป์) ได้แก่ type O, A และ Asia1 วัคซีนที่ผลิตมีทั้งแบบชนิดเดี่ยว (Monovalent) ซึ่งผลิตจากไวรัสเพียง type เดียว, วัคซีนชนิด 2 type (Bivalent) และวัคซีนชนิดรวม 3 type (Trivalent) โดยมีวิวัฒนาการผลิตตั้งแต่วิธีดั้งเดิมตามแบบของ ดร. เฟรงเกล (Dr. Frenkel) ที่ใช้เยื่อลิ้นวัว มาจนถึงวิธีผลิตในปัจจุบันซึ่งใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดแขวนลอย (Cell suspension culture)

วิวัฒนาการของการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

วิธีการผลิตวัคซีน FMD มีการพัฒนาปรับปรุงการผลิตให้ดีขึ้นโดยอยู่ในพื้นฐานเพื่อการลดปัญหา และข้อจำกัดต่างๆ ของการผลิตเพื่อให้ได้ตามมาตรฐานสากล ตลอดจนการใช้วัคซีนให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด เช่น การทำให้ไวรัสเข้มข้น (concentration) และการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ (Pufication) ปราศจากสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ต่อสัตว์ ซึ่งอาจทำให้สัตว์มีอาการแพ้วัคซีน รวมถึงประโยชน์ที่จะสามารถแยกสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อทางธรรมชาติหรือสัตว์ที่ได้รับวัคซีนได้ การปรับปรุงการผลิตเพื่อเก็บสะสมแอนติเจนสำหรับผลิตวัคซีนให้สอดคล้องต่อความต้องการใช้ของเกษตรกร และเพื่อ ควบคุม โรคกรณีระบาดฉุกเฉิน ซึ่งวิธีการผลิตที่ใช้ในปัจจุบันสามารถผลิตไวรัสที่มีความบริสุทธิ์ สำหรับใช้เป็นแอนติเจน (antigen) ได้ครั้งละปริมาณมาก และสามารถเก็บสะสมเป็นสต็อคไว้ใช้ได้

ทำให้สามารถบริหารการผลิตได้อย่างเพียงพอ และทันเวลาตามความต้องการใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคภายในประเทศ

แต่การผลิตวัคซีนในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีปัญหาในเรื่องของคุณภาพให้ความคุ้มโรคเพียง 6 เดือน และอายุของวัคซีนเพียง 1 ปี อีกทั้งการผลิตต้องใช้การลงทุนกับระบบการผลิตสูง เนื่องจากต้องผลิตจากไวรัสทั้งตัว (Whole virus) ซึ่งต้องมีระบบกีดกันเชื้อไวรัสไม่ให้แพร่กระจายสู่ธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งจะเป็นวิธีการผลิตวัคซีนในอนาคต

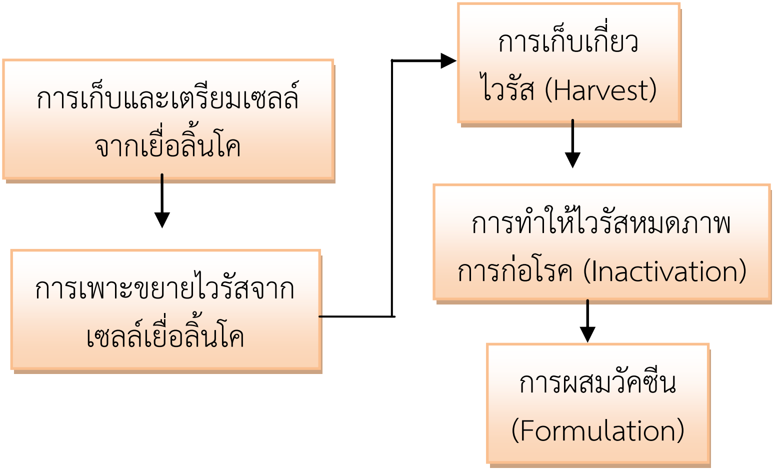
วิธีการผลิตวัคซีนมีวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่

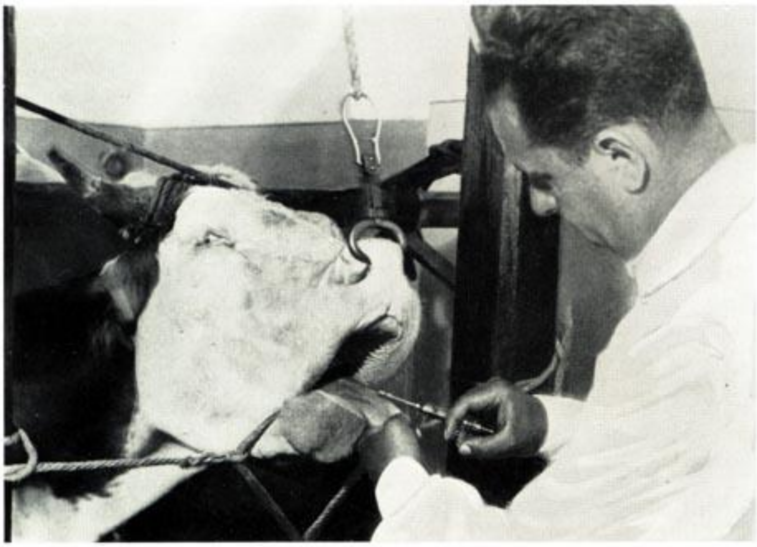
3.1 การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในอดีต

3.1.1 การผลิตวัคซีนแบบเฟรงเกล (Frenkel's)

เป็นการผลิตวัคซีนโดยทำการเพาะขยายไวรัสที่เก็บจากสัตว์ป่วยในพื้นที่ที่มีการระบาดมาจำแนก type ทางซีรัมวิทยา และนำไปฉีดเข้าที่ลิ้นวัว (bovine tongue epithelium) ต่อเนื่องกันหลายๆ ครั้ง (รูปที่) จนเชื้อมีความรุนแรง กล่าวคือ โคจะแสดงวิการหลังจากฉีด 24 ชั่วโมง จากนั้นก็เก็บเยื่อลิ้นวัวไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เยื่อลิ้นวัวชั้นนอกจะถูกลอกให้เหลือเฉพาะส่วนชั้นในซึ่งมีเชื้อไวรัสที่ยังมีชีวิตอยู่ และนำไปเพาะในน้ำยาเลี้ยงเชื้อ Earle's solution ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกสกัดไวรัสโดยการบดเยื่อลิ้นวัวให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แตกและมานำไปแยกกากเซลล์ นำน้ำใสที่มีไวรัสไปกรองผ่านกระดาษกรองจนใส น้ำใสไวรัสจะต้องผ่านการทดสอบ โดยไวรัสต้องมีความรุนแรงสูงกว่า 1/40 ในสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7.2 -7.4 ปราศจากการปนเปื้อนเชื้ออื่น (sterility) และมี LD_{50} ในหนูขาวหรือในโคระหว่าง $10^{-6.5}$ ถึง 10^{-8} ต่อหนึ่งกรัม น้ำใสไวรัสที่ได้จะเก็บเป็นเชื้อพันธุ์ (seed)

ขั้นตอนการผลิตด้วยวิธี Frenkel's (ภาพรวม)



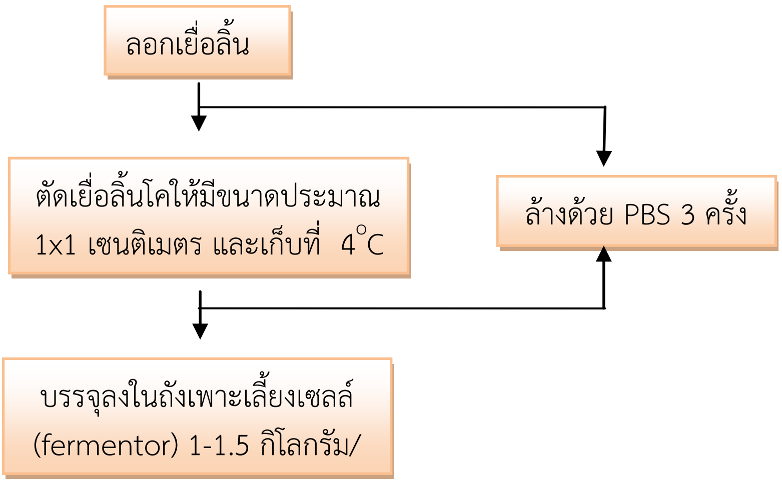


รูปที่ การฉีดเชื้อไวรัสFMD บริเวณใต้เยื่อผิวลิ้นวัว (bovine tongue epithelium)

ที่มา http://history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/vetservicewwii

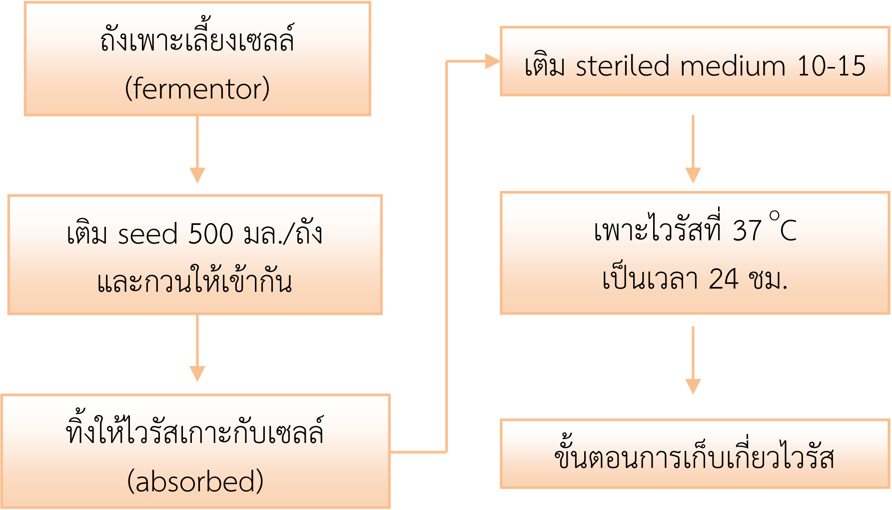
ขั้นตอนการเก็บและเตรียมเซลล์จากเยื่อลิ้นโค

ทำการลอกเยื่อลิ้นโคและล้างด้วยสารละลาย PBS ตัดเยื่อลิ้นโคให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร เก็บแช่ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง และนำไปบรรจุลงในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ (fermentor) 1-1.5 กิโลกรัม/ถัง



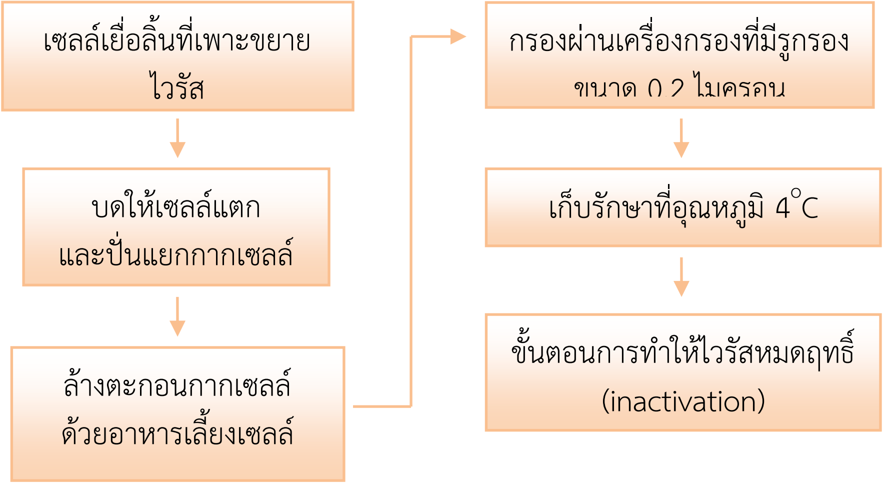
ขั้นตอนการเพาะขยายไวรัสจากเซลล์เยื่อลิ้นโค

เติม Seed virus 500 มิลลิลิตร ลงในถังเพาะเลี้ยงเซลล์ ปั่นให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะกับเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปลอดเชื้อ 10-15 ลิตร เพาะไวรัสที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปั่นความเร็วรอบต่ำๆ ให้เข้ากันทุกๆ 3 ชั่วโมง



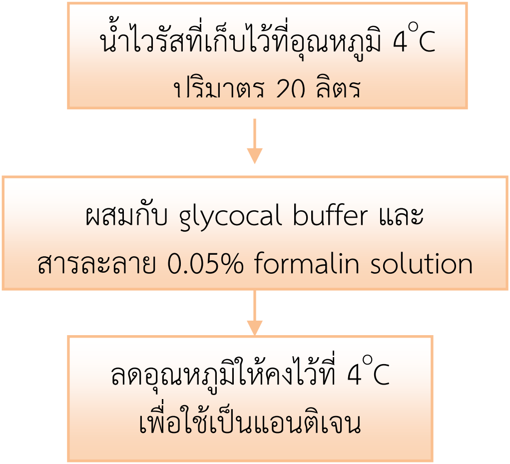
ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวไวรัส (Harvest)

นำเซลล์เยื่อลิ้นที่เพาะขยายไวรัสมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเยื่อลิ้น นำไปปั่นเพื่อแยกกากเซลล์เยื่อลิ้น และล้างตะกอนกากเซลล์ให้หลุดออกจากเครื่องปั่นแยกด้วย steriled medium กรองส่วนใสด้วยเครื่องกรองที่มีรูกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บน้ำใสไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ 4°C.



ขั้นตอนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ (Inactivation)

นำน้ำไวรัสที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ผสมกับสารละลาย glycorol buffer และ
สารละลาย 0.05% formalin solution ปั่นให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาลดอุณหภูมิให้คงไว้ที่ 4°C ซึ่งน้ำไวรัสที่ผ่านขบวนการนี้จะใช้เป็นแอนติเจน (antigen) เพื่อรอนำไปการผสมวัคซีน



ขั้นตอนการผสมวัคซีน (Formulation)

สารละลายแอนติเจนถูกผสมเข้ากับสารแขวนลอย aluminum gel และสารผสมอื่นๆ ตามสูตร ซึ่งใช้เป็นสื่อนำส่ง (adjuvant) โดยรักษาอุณหภูมิการผสมไว้ที่ 4°C ตลอดเวลา ปั่นจนเข้ากันดี ซึ่งขั้นตอนการผสมวัคซีนลักษณะนี้เป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ เก็บตัวอย่างนำไปทดสอบคุณภาพวัคซีน และรอบรรจุลงขวดขนาด 300 มิลลิลิตร จำนวน 250 มิลลิลิตร/ขวด และเก็บรักษาวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

น้ำไวรัสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

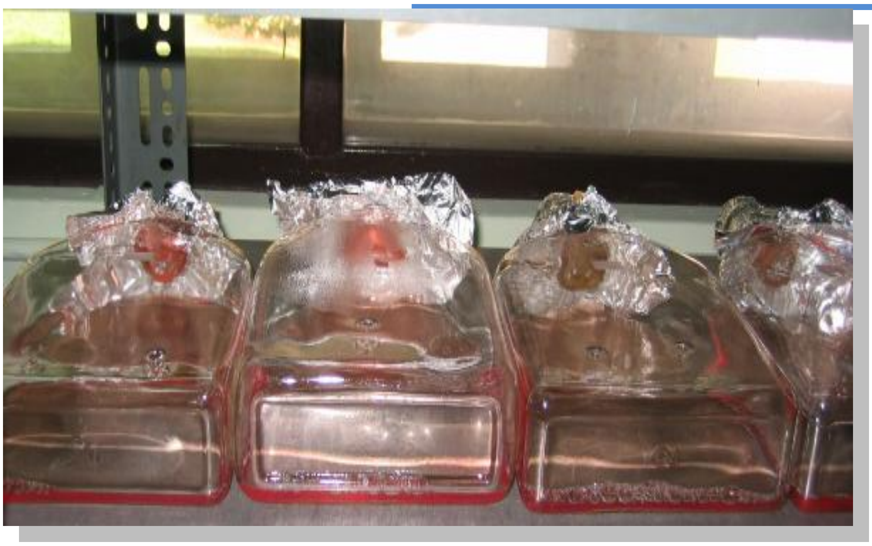
ผสมกับ aluminum gel
และสารผสมอื่นๆ

↓

ลดอุณหภูมิให้คงไว้ที่ 4°C
เพื่อใช้เป็นแอนติเจน → ส่งทดสอบคุณภาพ

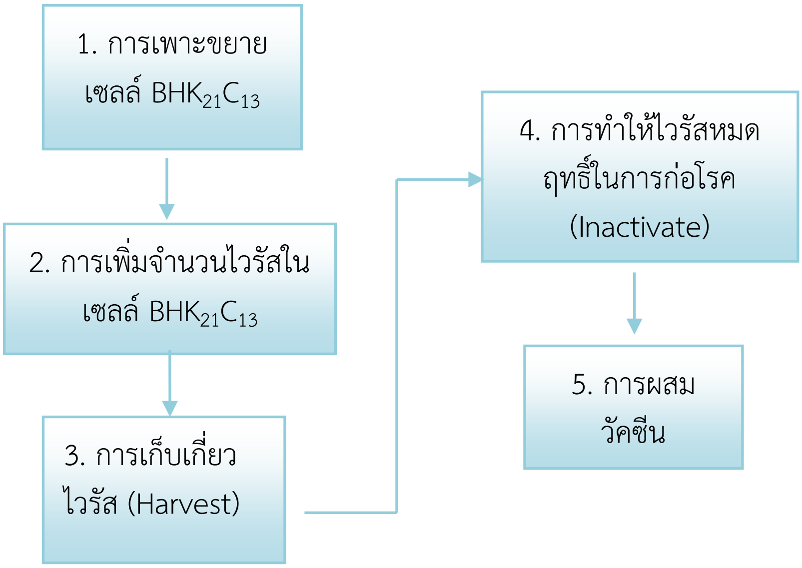
3.1.2 การผลิตวัคซีนโรปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Stationary monolayer ในขวดเพาะเซลล์ แบบ Roux flask

เป็นวิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง $BHK_{21}C_{13}$ (Baby hamster Kidney) แบบ Stationary monolayer ที่เพาะเซลล์ในขวดแบบ Roux flask (รูปที่) เมื่อได้เซลล์จำนวนมากพอ จึงเพาะขยายไวรัสในเซลล์ดังกล่าว เมื่อได้ไวรัสจำนวนมากทำการทำให้ไวรัสหมดสภาพการก่อโรค (Inactivate) เพื่อนำไปผสมเป็นวัคซีนต่อไป



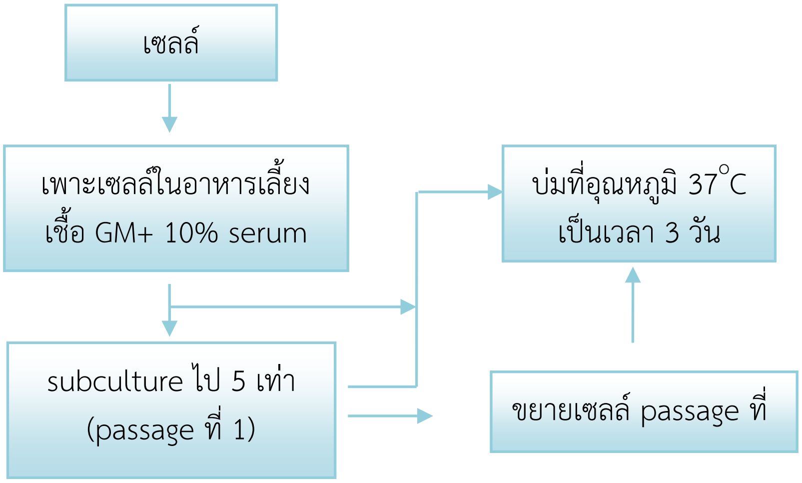
รูปที่ การเพาะขยายเซลล์ stationary monolayer ในขวดเพาะเซลล์แบบ Roux flask

ขั้นตอนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยวิธีstationary monolayer ในขวดเพาะเซลล์แบบ Roux flask โดยภาพรวม



ขั้นตอนการเพาะขยายเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในขวด Roux flask

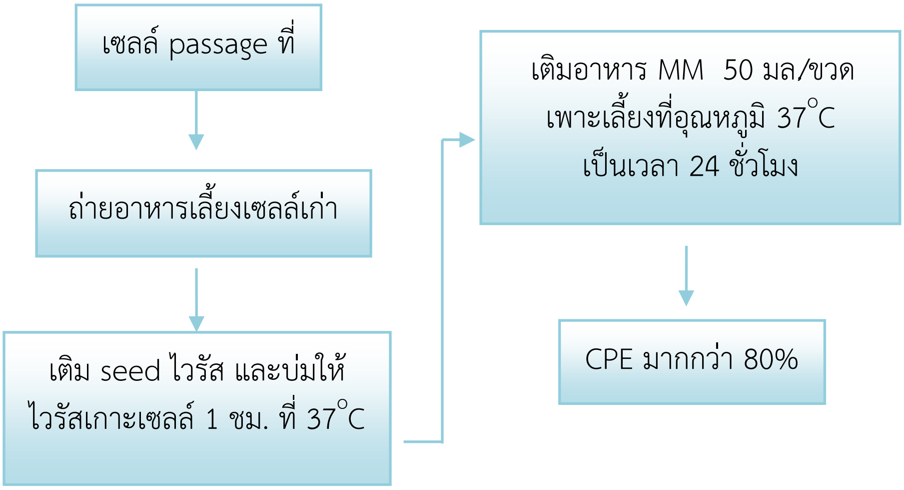
นำ Seed เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเพาะเลี้ยงในขวด Roux flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Growth medium (GM) ผสม 10% bovine calf serum เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกระทั่งเซลล์เจริญเต็มขวด จากนั้นทำการขยายเซลล์ (subculture cell) จาก 1 ไป 5 เท่า (passage1)และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะเดิม ต่อมาเพาะขยายเซลล์อีกครั้ง (passage 2) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะเดิม



ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$

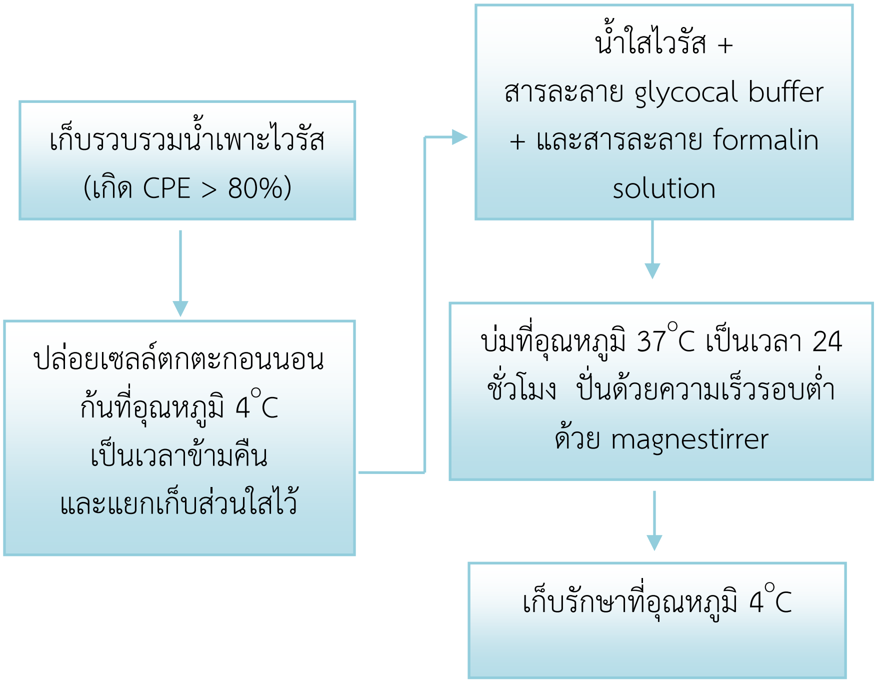
หลังจากเพาะเซลล์ passage ที่ 2 จนเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นเติม seed virus ปริมาณ 3-5% โดยปริมาตร บ่มให้ไวรัสเกาะเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Maintenance Media (MM) ซึ่งปราศจากซีรัมปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ

สังเกตการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect: CPE) ทุกวัน จนกระทั่งเกิด CPE มากกว่า 80% จึงเก็บเกี่ยวไวรัส (harvest)



การเก็บเกี่ยวไวรัส (Harvest) และทำไวรัสหมดฤทธิ์ (Inactivate)

เก็บรวบรวมน้ำเพาะไวรัส (เกิด CPE > 80%) แต่ละขวดมารวมกัน ปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนนอนก้นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน ดูดเก็บส่วนใสน้ำไวรัสใส่ขวด 5 ลิตรต่อขวด จากนั้นผสมน้ำใสไวรัสเข้ากับสารละลาย glycocal buffer และสารละลาย formalin solution บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นความเร็วรอบต่ำด้วย magnetic stirrer เก็บเป็นแอนติเจนที่อุณหภูมิ 4°C. เพื่อรอผสมเป็นวัคซีน

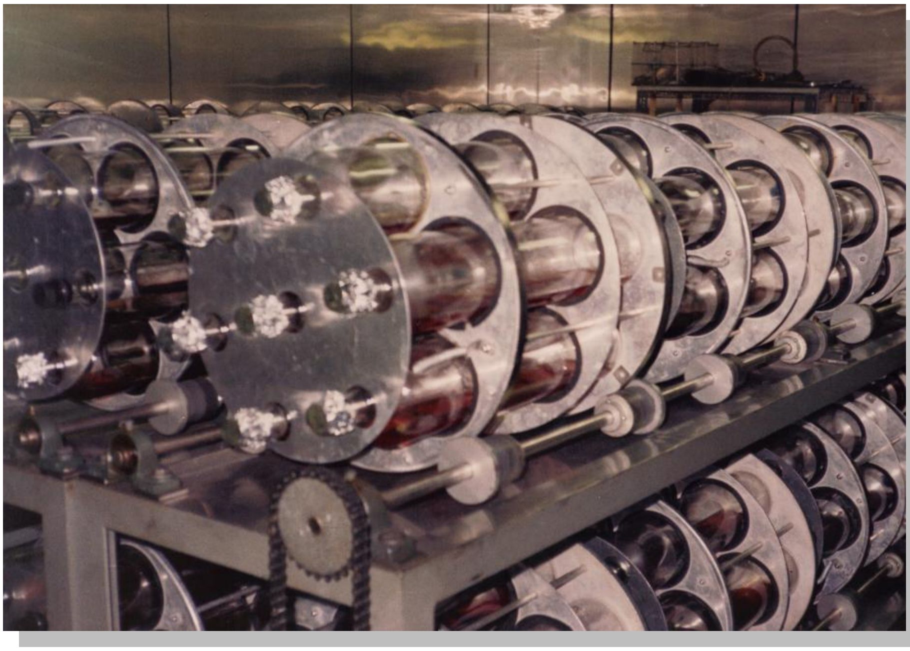


การผมวัคซีน

สารละลายแอนติเจนถูกผสมเข้ากับสารแขวนลอย aluminum gel และสารผสมอื่นๆ ตามสูตร ซึ่งใช้เป็นสื่อนำส่ง (adjuvant) โดยรักษาอุณหภูมิการผสมไว้ที่ 4°C ตลอดเวลา ซึ่งคล้ายกับขั้นตอนการผสมวัคซีนด้วยวิธีแฟรงเกลข้างต้น เก็บตัวอย่างนำไปทดสอบคุณภาพวัคซีน และรอบรรจุลงขวดขนาด 250 มิลลิลิตรต่อขวด และเก็บรักษาวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ส่งทดสอบคุณภาพวัคซีน

3.1.3. การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Stationary monolayer cell Culture ในขวดเพาะเซลล์แบบ Roller bottle

เป็นวิธีการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ cell) แบบ Stationary monolayer ที่เพาะเซลล์ในขวดแบบ Roller bottle (รูปที่) ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ในการผลิตแต่ละครั้งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด Roux flash ซึ่งสามารถผลิตไวรัสได้มากขึ้นและทำให้ได้ปริมาณวัคซีนมากขึ้นด้วย

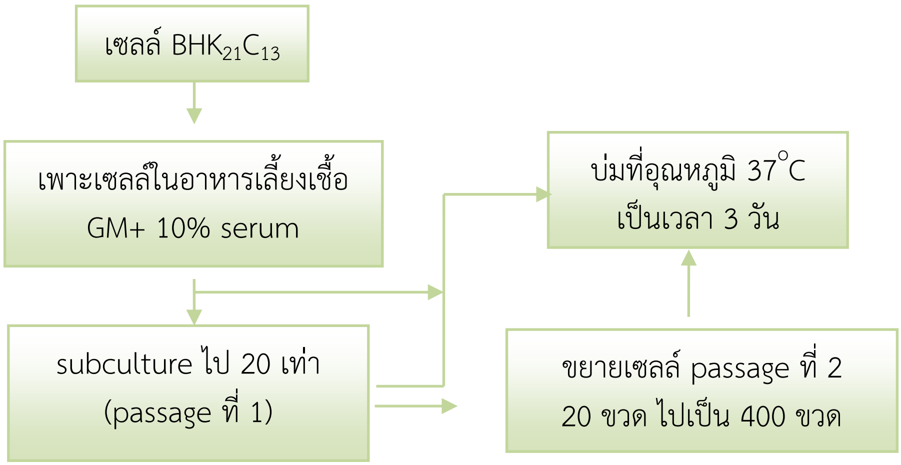


รูปที่ การเพาะขยายเซลล์ stationary monolayer ในขวดเพาะเซลล์แบบ Roller bottle

ขั้นตอนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยวิธี stationary monolayer Cell Culture ในขวดแบบ Roller bottle

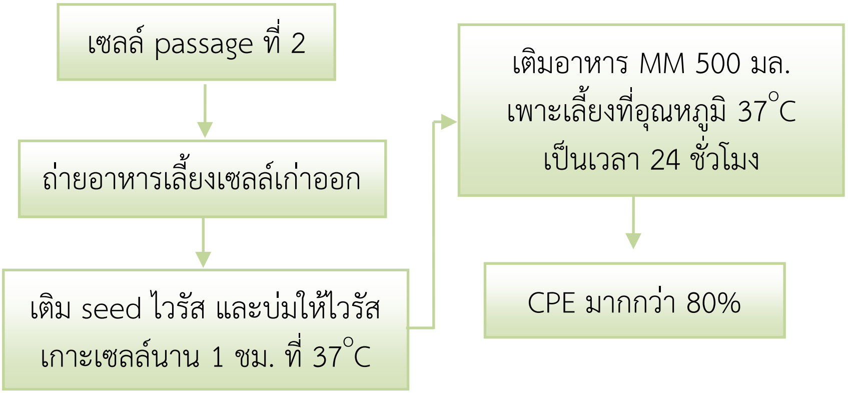
ขั้นตอนการเพาะขยายเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ในขวด Roller bottle

นำ Seed เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเพาะเลี้ยงในขวด Roller bottle ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Growth medium (GM) ผสม 10% bovine calf serum เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน หรือจนกระทั่งเซลล์เจริญเต็มขวด รูปที่ จากนั้นทำการขยายเซลล์ (subculture cell) จาก 1 ไป 20 เท่า (passage1) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะเดิม ต่อมาเพาะขยายเซลล์อีกครั้ง (passage 2) จาก 20 ขวด ไปเป็น 400 ขวด และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะเดิม



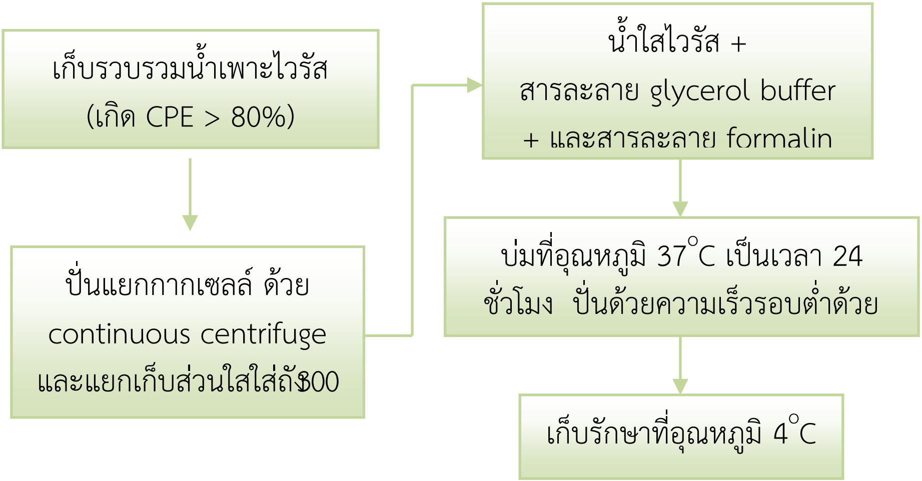
ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$

หลังจากเพาะเซลล์ passage ที่ 2 จนเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นเติม seed virus ปริมาณ 3-5% โดยปริมาตร บ่มให้ไวรัสเกาะเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ Maintenance Media (MM) ซึ่งปราศจากซีรัมปริมาตร 500 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิด CPE ทุกวัน จนกระทั่งเกิด CPE มากกว่า 80% จึงเก็บเกี่ยวไวรัส (harvest)



การเก็บเกี่ยวไวรัส (Harvest) และทำไวรัสหมดฤทธิ์ (Inactivate)

เก็บรวบรวมน้ำเพาะไวรัส (เกิด CPE > 80%) แต่ละขวดมารวมกันในขวด 50 ลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง continuous centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดูดเก็บส่วนใสน้ำไวรัสใส่ถัง 300 ลิตร ต่อขวด จากนั้นผสมน้ำใสไวรัสเข้ากับสารละลาย glycocal buffer และสารละลาย formalin solution บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นความเร็วรอบต่ำด้วย magnetic stirrer เก็บเป็นแอนติเจนที่อุณหภูมิ 4°C. เพื่อรอผสมเป็นวัคซีน



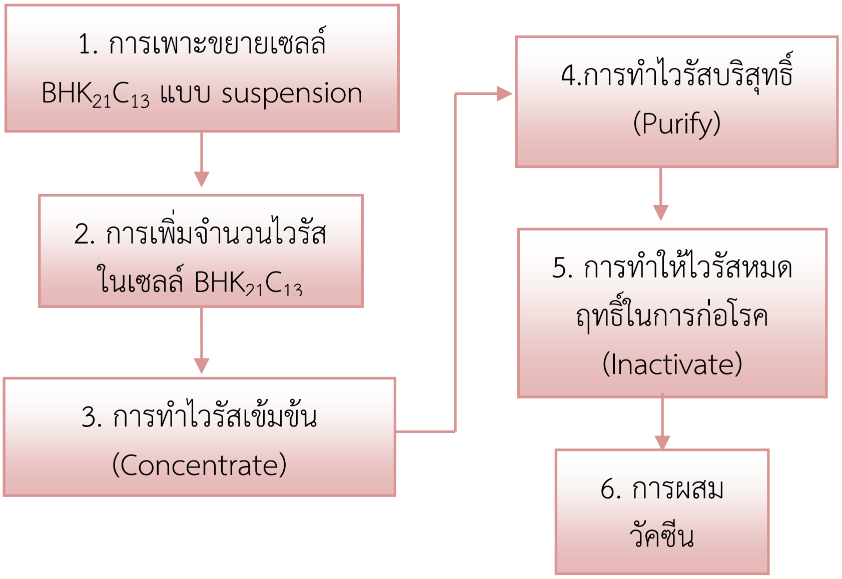
สารละลายแอนติเจนถูกผสมเข้ากับสารแขวนลอย aluminum gel และสารผสมอื่นๆ ตามสูตร ซึ่งใช้เป็นสื่อนำส่ง (adjuvant) โดยรักษาอุณหภูมิการผสมไว้ที่ 4°C ตลอดเวลา ซึ่งคล้ายกับขั้นตอนการผสมวัคซีนวิธีข้างต้น เก็บตัวอย่างนำไปทดสอบคุณภาพวัคซีน และรอบรรจุลงขวดขนาด 250 มิลลิลิตรต่อขวด และเก็บรักษาวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ส่งทดสอบคุณภาพวัคซีน

3.2 การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบัน

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี suspension cell culture ในถังหมัก fermenter

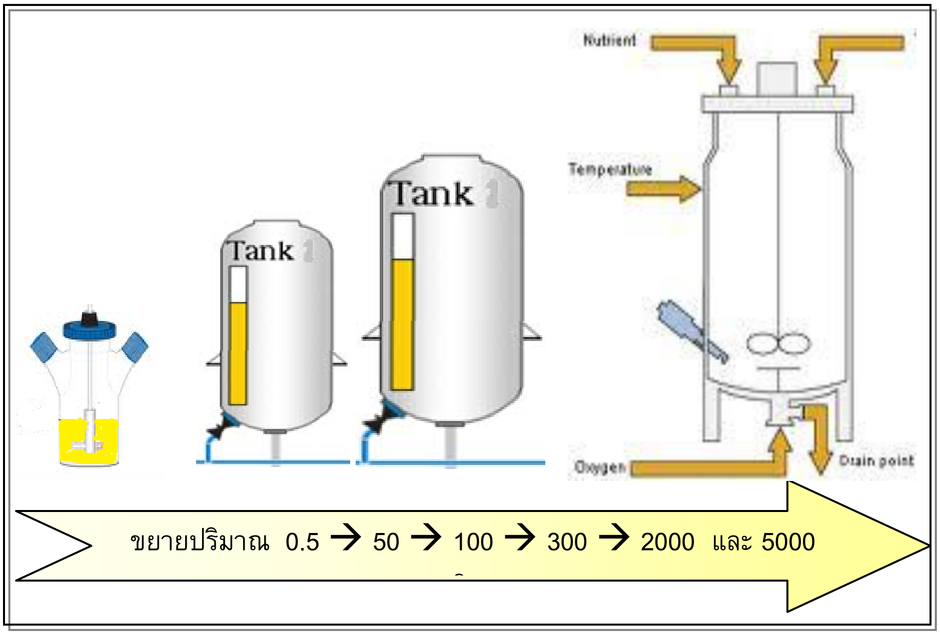
ในปัจจุบันกรมปศุสัตว์ และบริษัทเอกชนในต่างประเทศ ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยใช้ไวรัสทั้งอนุภาค (Whole virus) เพาะขยายในเซลล์เพาะเลี้ยง $BHK_{21}C_{13}$ แบบ Suspension cell culture เนื่องจากสามารถผลิตไวรัสได้ปริมาณมากๆ และมีแอนติเจนสะสมอย่างเพียงพอ รวมทั้งมีการผลิตที่ทำให้ไวรัสเข้มข้น และบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งทำให้วัคซีนมีความปลอดภัย (Safety) ปริมาณการฉีดต่อตัว (Dose) ลดลงสะดวกต่อการใช้งาน และเพียงพอทันเวลาตามความต้องการ

ขั้นตอนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย suspension cell culture



ขั้นตอนการเพาะขยายเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบ suspension cell culture

นำ Seed เซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196°C มาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 500 มล. ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Growth medium (GM) ผสม 5% bovine calf serum เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37°C pH 7.2 ป้อนอากาศบริสุทธิ์ขนาด 5 ลิตรต่อนาทีเข้าใต้ใบพัดของถัง นาน 5 วินาที ทุกๆ 45 วินาที และปั่นเซลล์อย่างต่อเนื่องที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการ subculture ต่อไปจนถึง passage ที่ 7 โดยการขยายเซลล์สู่ถังขนาด 50 → 100 → 300 → 2000 และ 5000 ลิตรตามลำดับ



ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ $BHK_{21}C_{13}$ แบบ suspension cell culture

เซลล์ suspension ในถังหมักขนาด 5000 ลิตรที่เจริญเต็มที่ โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 2.0-2.5X 10^6 เซลล์ต่อมล. ถูกทำให้ตกตะกอนด้วยการหยุดปั่นแต่คงรักษาอุณหภูมิที่ 4 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และเติม Maintenance Media (MM) ซึ่งปราศจากซีรัม และปรับปริมาตรให้ได้เซลล์ 2.0-2.5X 10^6 เซลล์ต่อมล. จากนั้นเติม seed virus ปริมาณ 3-5% โดยปริมาตร และบ่มให้ไวรัสเกาะเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิด CPE ทุกวัน จนกระทั่งเกิด CPE มากกว่า 80% จึงเก็บเกี่ยวไวรัส (harvest)

เซลล์ suspension ในถังหมักขนาด 5000 ลิตร
2.0-2.5X 10^{6} เซลล์ต่อมล.

↓

ตกตะกอนด้วยการหยุดปั่น
เป็นเวลา 2 วัน

↓

ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่
ปรับปริมาตรเซลล์ให้มีปริมาณ 2.0-2.5X 10^{6} เซลล์ต่อมล.

↓

เติม seed virus ปริมาณ 3-5% โดยปริมาตร และบ่มให้ไวรัส
เกาะเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

↓

CPE มากกว่า 80%

ขั้นตอนการทำไวรัสเข้มข้น (Concentration) และทำไวรัสให้บริสุทธิ์ (Purification)

นำน้ำไวรัสมาปั่นแยกกากเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่อง (Continuous Centrifuge) กรองตะกอนกากเซลล์กรองด้วยเครื่องกรอง ขนาด 2-4 ไมครอน จากนั้นนำไปผ่านเครื่องกรองที่ทำให้ไวรัสเข้มข้นด้วยเครื่อง Utrafitration ที่มีขนาดรูกรองประมาณ 150 กิโลดาลตัน ให้เหลือน้ำไวรัสเข้มข้นประมาณ 60-100 ลิตร (รูปที่) โดยในขั้นตอนนี้จะเป็นการแยกส่วนของ nonspecific protein และโปรตีนแปลกปลอม (foreigner protein) อื่นๆ นำไวรัสเข้มข้น (60-100 ลิตร) ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนไวรัสด้วยเครื่อง centrifuge bowl refrigerated centrifuge ละลายตะกอนด้วย elution

medium ปรับความเข้มข้นให้ได้ 275 เท่าจากความเข้มข้นเริ่มต้น ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำไวรัสอีกรอบด้วยเครื่อง centrifuge bowl refrigerated centrifuge เก็บนำไวรัสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4°C

น้ำไวรัสในถังหมักขนาด5000 L

↓

ปั่นแยกกากเซลล์ด้วย continuous centrifuge และกรองตะกอนกากเซลล์ด้วยเครื่องกรอง ขนาด 2-4 μ

↓

ทำให้ไวรัสเข้มข้นด้วยเครื่อง Utrafitration ที่มีขนาดรูกรองประมาณ150 กิโลดาลตัน

↓

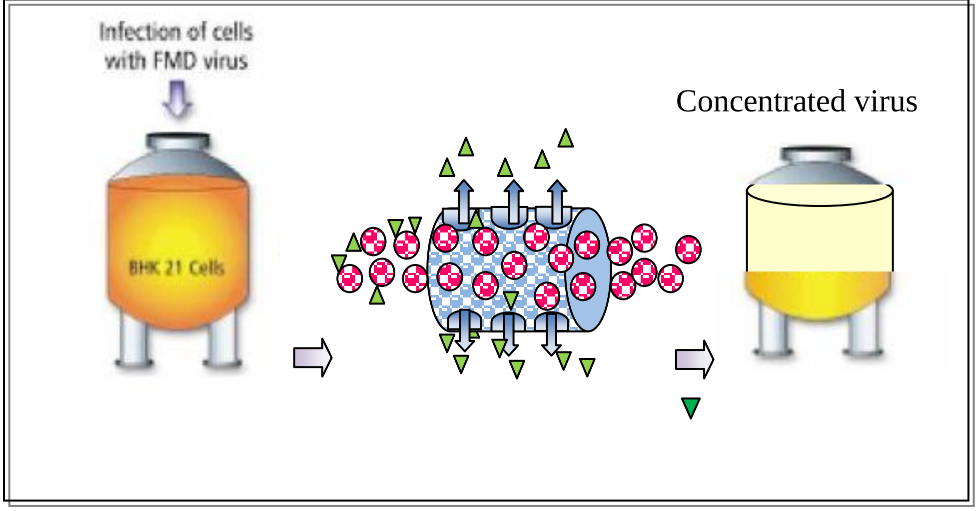
ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนไวรัสด้วยเครื่อง centrifuge bowl

↓

ละลายตะกอนด้วย elution medium ปรับความเข้มข้นให้ได้ 275 เท่าจากความเข้มข้นเริ่มต้น

↓

ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนไวรัสด้วยเครื่อง refrigerate centrifuge bowl เก็บนำไวรัสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ ลักษณะการทำไวรัสเข้มข้น (Concentration) และทำไวรัสให้บริสุทธิ์ (Purify)

3.4.5. ขั้นตอนการทำให้ไวรัสหมดสภาพการก่อโรค (Inactivate)

นำไวรัสเข้มข้นที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผสมกับสารละลาย 10% Binary ethyleneimuine (BEI) ปั่นให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้แอนติเจนสำหรับใช้ผสมเป็นวัคซีน และแบ่งเก็บแอนติเจนในขวดทนความเย็นสูงปริมาตรขวดละ 800 มิลลิลิตร เก็บแช่รักษาในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 °C

3.4.6. ขั้นตอนการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ มี 2 ชนิด คือ วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือ เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำ (aqueous vaccine) ชนิด 3 ไทป์ และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับ

สุกร เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน (oil vaccine) ชนิด 3 ไทป์ โดยแต่ละวัคซีนมีขั้นตอนการผสมแตกต่างกัน ดังนี้

สูตรการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือ

แอนติเจนไวรัสไทป์ O, A และ Asia 1 ที่มีปริมาณความเข้มข้นต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Van Bekkum medium	1400 L
สารละลาย 10% Saponin		50 L
สารละลาย 4% formaldehyde solution		6 L
สาร Antifoam		2 L
สารละลาย Glycocal buffer		2 L
สารแขวนลอย Aluminium hydroxide gel		430 L

ปั่นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันนานประมาณ 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

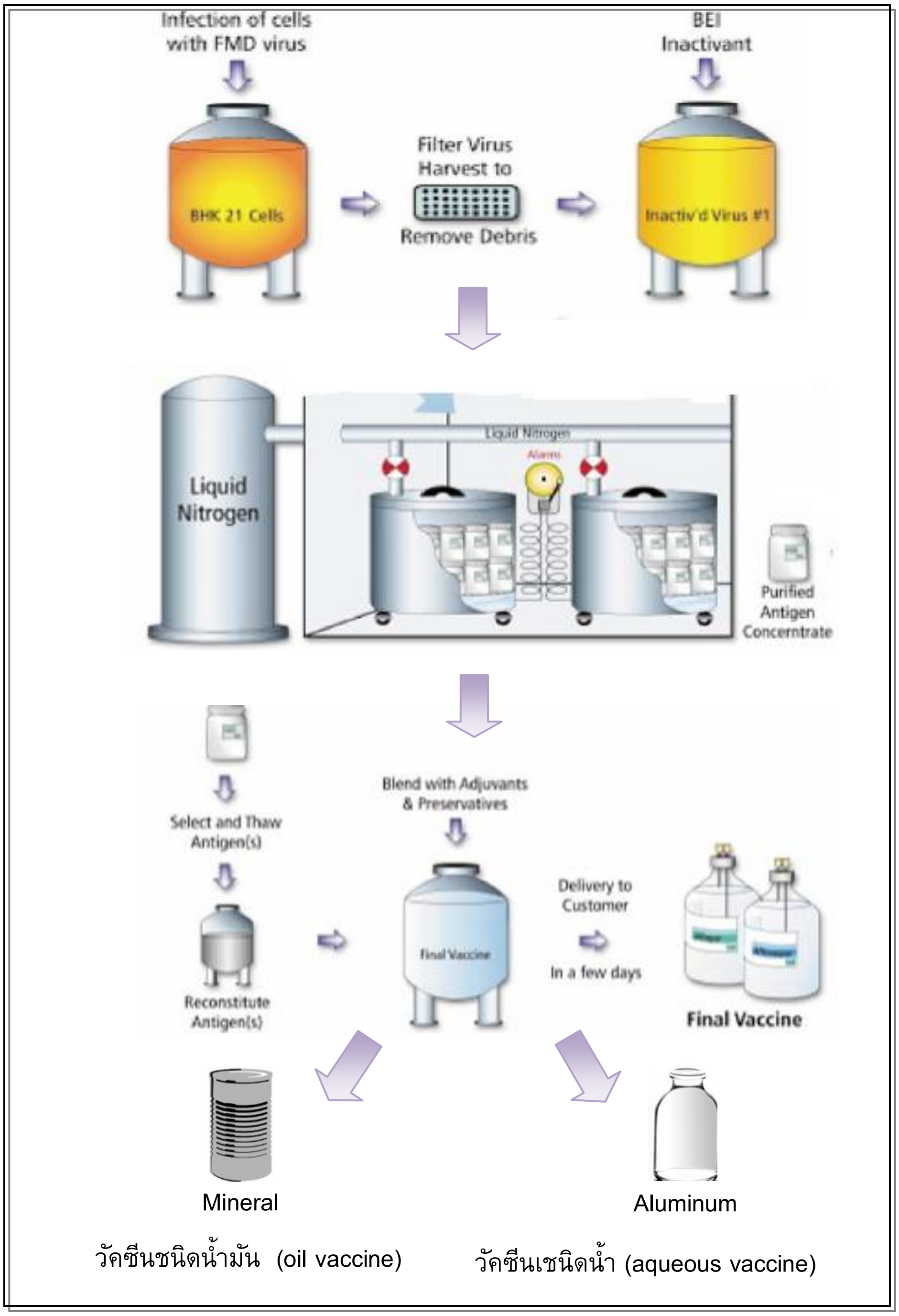
สูตรการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือสำหรับสุกร

ส่วนการผสมที่ 1 นำแอนติเจนไวรัสไทป์ O (ความเข้มข้นตามสูตร) ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ Van Bekkum medium ให้มีปริมาตรรวมเป็น 275 ลิตร (Liquid phase) ผสมกับส่วนผสมน้ำมัน (Oil phase) ปริมาตร 275 ลิตร ปั่นผสมส่วน Liquid phase และ Oil phase ให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 นาที (ปั่นครั้งที่ 1)

ส่วนการผสมที่ 2 แอนติเจนไวรัสไทป์ A (ความเข้มข้นตามสูตร) ผสมตามปริมาตรในสภาวะเดียวกับไทป์ O ข้างต้น (ปั่นครั้งที่ 2)

ส่วนการผสมที่ 3 แอนติเจนไวรัสไทป์ Asai1 (ความเข้มข้นตามสูตร) ผสมตามปริมาตรในสภาวะเดียวกับไทป์ O ข้างต้น (ปั่นครั้งที่ 3)

นำส่วนผสมทั้ง 3 ส่วนมาปั่นผสมให้เข้ากันที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้วัคซีนกลับวัตภาคที่ 4°C นานข้ามคืน



รูปที่ แผนผังการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในอนาคต
(Next generation FMD vaccine)

วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นวัคซีนที่มีการผลิตมายาวนาน ตั้งแต่ การใช้เซลล์เนื้อเยื่อลิ้น เซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ แบบเกาะพื้น และปัจจุบัน ใช้เซลล์ไลน์ชนิดแขวนลอย ซึ่งเป็นที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถเพาะใน ปริมาณสูง เช่น 5,000 ลิตร ทำให้ได้ไวรัสในปริมาณมาก ผู้ผลิตหลายแห่งทั้ง ในยุโรป เอเชีย และอเมริกาใต้ ได้ใช้วิธีดังกล่าว เพื่อนำมาผลิตเป็นวัคซีนชนิด เชื้อตาย ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายจะขึ้นกับเสตรนที่ใช้เป็นวัคซีน จะให้ ความคุ้มโรคครอบคลุมเสตรนอื่นๆ ที่ระบาดอยู่หรือไม่ และสารกระตุ้นภูมิใน รูปแบบต่าง เช่น Alum หรือน้ำมัน ทำให้สัตว์มีภูมิ คุ้มกันในเวลาสั้นที่สุด แม้ว่าวัคซีนเชื้อตายจะเป็นวัคซีนหนึ่งที่นำมาใช้ร่วมกับมาตรการควบคุมโรค และสามารถกำจัดไวรัสให้หมดไปจากหลายๆ ประเทศที่ปลอดโรค เช่น ประเทศในทวีปยุโรป และเอเชีย อาทิ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ แต่หลายประเทศ เช่น ไทย ลาว พม่า เวียดนาม กัมพูชา จีน อินเดีย อเมริกาใต้ และอื่นๆ ยังคง ประสบกับปัญหาการระบาดของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยมีเสตรนที่ แตกต่างกันไป ทำให้โรคปากและเท้าเปื่อยยังเป็นความเสี่ยงของการระบาดใน ประเทศปลอดโรค เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั้งการส่งออก การชดเชย งบประมาณในการกำจัดโรค เช่น ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น ประเทศ อังกฤษ ต้องใช้งบประมาณสูงในการทำลายสัตว์ติดเชื้อเพื่อป้องกันการสูญเสีย การพัฒนาวัคซีนให้มีประสิทธิภาพจึงเป็นเรื่องที่สำคัญในปัจจุบัน

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในทศวรรษใหม่นั้นมีการนำเทคโนโลยี ชีวภาพมาใช้ในการพัฒนาเพื่อลดข้อด้อยของวัคซีนเชื้อตาย เช่น การใช้ดี เอน เอ เวคเตอร์ โปรตีน และไวรัสเวคเตอร์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1 อย่างไร ก็ตาม การพัฒนาวัคซีนในรูปแบบโปรตีน และไวรัสเวคเตอร์ จะเป็นรูปแบบที่ ได้รับความสนใจมาก

ดี เอน เอ เวคเตอร์ (DNA vector)

DNA vector เป็นการนำส่วนของ DNA ที่แปลรหัสเป็นโปรตีนของไวรัส FMD เช่น Capsid VP1, VP2 และ VP3 และ NSP อื่นๆ เช่น 3 C protease ใส่ใน plasmid ที่มีรหัสสำหรับการแปลรหัสจาก DNA เป็น RNA และ โปรตีนได้ เมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันตรวจจับโปรตีนจากยีนที่แทรกใน plasmid และกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนนั้นๆ (รูปที่ 1) รูปแบบนี้ได้มีการศึกษาพบว่าสามารถให้ภูมิคุ้มกันได้ จากการศึกษาใช้ plasmid ซึ่งมียีน P12A และ 3C ของไวรัสซีโรไทป์ O/NY00 ร่วมกับยีน swine interleukin 18 ฉีดในสุกรพบว่าให้ผลความคุ้มโรคของสุกร challenge จาก 3 ใน 4 ตัว นอกจากนั้นยังพบว่า T – lymphocyte proliferation response ในสุกรกลุ่มดังกล่าว สูงกว่ากลุ่มฉีด vector ที่ไม่มียีน P12A, 3C, IL 18 และกลุ่มฉีด PBS (Mingxiao et al., 2007)

<u>รูปที่ 1</u> แสดงหลักการของ DNA vaccine (รูปนี้จะถูกดัดแปลงอีกทีภายหลังครับ)

โปรตีนและเปปไตด์ (Protein and peptide)

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โปรตีนของไวรัสอาจถูกสร้างขึ้นในรูปแบบ โปรตีนสายสั้นๆ (Short peptide) หรือโปรตีนสมบูรณ์เสมือนไวรัส Virus like particle) เมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ต่อโปรตีนส่วนนั้นๆ ระบบที่ใช้สร้างโปรตีนอาจสร้างมาจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์แมลง เซลล์ยีสต์ แบคทีเรีย และพืช โดยระบบที่ได้รับความนิยมที่ขอกล่าวถึงคือเซลล์แมลง

Baculovirus expression system เป็นรูปแบบหนึ่งที่มีความนิยมนำมาใช้สร้างโปรตีน และพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับสัตว์เพื่อป้องกันโรคไวรัสหลายชนิด เช่น Swine fever (Bouma et al., 1999) Bluetongue (Pearson and Roy, 1993) เป็นต้น Baculovirus เป็นไวรัสที่สามารถติดเชื้อในเซลล์แมลง โดยเซลล์แมลงที่ใช้ในระบบดังกล่าว เช่น sf9 และ high five เป็นต้น ยีนที่เราสนใจจะถูกแทรกในยีน polyhedrin ของ baculovirus เมื่อไวรัสลูกผสมติดเชื้อในเซลล์แมลง โปรตีนจะถูกสร้างในปริมาณมาก และโปรตีนจะมีโครงสร้างที่คล้ายกับโปรตีนต้นฉบับเพราะเซลล์แมลงมีระบบ glycosylation เช่นเดียวกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การศึกษาโดยใช้ baculovirus กับ fmd vaccine นั้น มีการศึกษาสร้าง capsid protein ของ FMD virus ทำให้โปรตีน capsid สามารถสร้างและประกอบเป็นโปรตีนโครงสร้างเสมือนไวรัส (virus like particle) ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกับไวรัสในธรรมชาติ

การศึกษาโดยใช้ capsid ของไทป์ O manias สร้างจากเซลล์แมลงและใช้ montanide 206 เป็น adjuvant ฉีดเป็นวัคซีนในโค พบว่าให้ความคุ้มโรค 3 ใน 5 ตัวของโคเมื่อ challenge ด้วย ไวรัสที่ 21 หลังฉีดวัคซีน นอกจากนั้นพบว่าภาวะไวรัสในกระแสเลือดที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยที่ 18

วันหลัง challenge โดยเปรียบเทียบโคกลุ่มที่ได้รับวัคซีน dose ปกติ กับ 1/5 และ 1/25 ของโด๊สปกติ (Mohana Subramanian et al., 2012) จึงเห็นได้ว่า วัคซีนในรูปแบบโปรตีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้ นอกจากนั้นโครงสร้างโปรตีนของไวรัสสามารถดัดแปลงให้ทนต่อความร้อนได้ดีขึ้น เช่นการศึกษาของนักวิจัยจากอังกฤษ ได้เปลี่ยนกรดอมิโนลำดับที่ 93 ของโปรตีน VP2 ซึ่งอยู่บริเวณ interface ของ VP2 โดยเปลี่ยน Histidine ให้เป็น cysteine และสร้างโปรตีนจากเซลล์แมลง จะเกิดการสร้างพันธะ disulfide bond ระหว่าง VP2 (รูปที่ 2) ส่งผลให้ไวรัสสามารถทนต่อการถูกทำลายในสภาวะอุณหภูมิสูงที่ 56 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทนสภาวะกรดที่ pH 5.6 เป็นเวลา 15 นาทีได้ (Porta et al., 2013)

ไวรัส เวคเตอร์ (Viral vector)

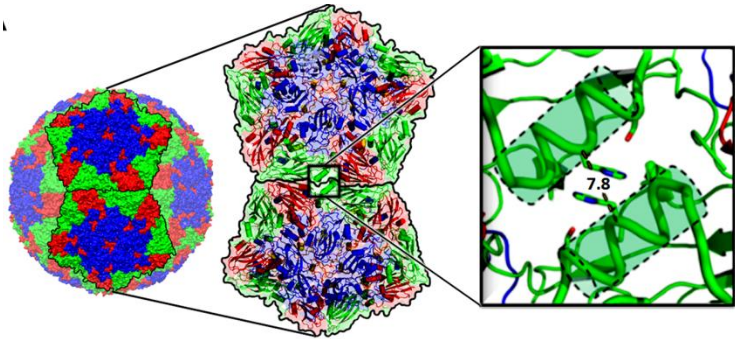
การใช้ไวรัสเวคเตอร์เป็นไวรัส host เพื่อให้สร้างโปรตีนของไวรัส FMD นั้น มีการทดลองที่ประสบความสำเร็จ และเป็น platform ที่ได้รับพัฒนามาก เช่น กลุ่ม Adenovirus ส่วน vector อื่นๆ เช่น Avipox ได้มีการศึกษาโดยใช้ Fowlpox virus จึงขอให้รายละเอียดของ Adenoviurs และ Fowlpox virus เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้อ่านได้ศึกษาต่อไป

Adenovirus เป็นไวรัสเวคเตอร์ที่พัฒนาให้เป็น host สำหรับฝากโปรตีนเพื่อเป็นวัคซีนในมนุษย์ และสัตว์อื่นๆ เช่น สุนัข แมว ม้า เป็นต้น ปัจจุบันบริษัท genvac ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาเป็นวัคซีน โดยได้รับอนุญาตให้ผลิตจาก APHIS และ Homeland security department (Grubman et al., 2010) Adenovirus ได้ถูกทดลองใช้เป็น vector ของ A24 โดยให้ผลคุ้มโรคดีในสุกรและโค แต่สำหรับ serotype O ซึ่งได้ทดลองพบว่า

ตารางที่ 1 แสดงรูปแบบการวิจัย Next generation FMD vaccine ชนิดต่างๆ ได้แก่ DNA, Protein, Virus like particle, Plant made peptide, Bacteria vector และ virus vector

รูปแบบ Next generation FMD vaccine	**เอกสารอ้างอิง**
DNA vaccine	
DNA plasmid vector	(Yang et al., 2005) (Ward et al., 1997) (Niborski et al., 2006) (Chinsangaram et al., 1998) (Li et al., 2008a)
Protein and peptide vaccine	
Peptide	(Parry et al., 1989)
Conjugate peptide	(Francis et al., 1987) (DiMarchi et al., 1986) (Wang et al., 2002) (Beignon et al., 2005) (Challa et al., 2007) (Cubillos et al., 2008)
Virus like particle	(Clarke et al., 1987) (Zhang et al., 2007)
Plant made peptide	(Pena et al., 2008) (Cao et al., 2009) (Li et al., 2008b) (Balamurugan et al., 2003) (Carrillo et al., 1998) (Carrillo et al., 2001) (Dus Santos et al., 2005) (Huang et al., 2005)

รูปแบบ Next generation FMD vaccine	เอกสารอ้างอิง
Bacteria - vectored	
lactobacillus	(Li et al., 2007)
Viral - vectored	
Adenovirus Pox virus	(Chinsangaram et al., 2003) (Moraes et al., 2002) (Pacheco et al., 2005) (Ma et al., 2008)



รูปที่ 2 แสดงกรดอมิโนhistidine ระหว่าง interface ของ VP2 capsid protein (Porta et al., 2013)

ให้ผลคุ้มโรคไม่สมบูรณ์ ซึ่งได้มีการใช้ยีนอื่นเพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่น 2B ทำให้เกิดการกระตุ้น T- cell ทั้ง CD4+ และ CD8+ ได้สูงเมื่อโคได้มีการ challenge ด้วย homologous virus ทำให้ลดความรุนแรงของโรคและการแพร่กระจายของไวรัสในกระแสเลือดได้ (Moraes et al., 2011) เป้าหมายที่นักวิจัยต้องการสูงสุดประการหนึ่ง คือ วัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคหลาย serotype จึงมีการศึกษาทดลองใช้ Adenovirus เป็นเวคเตอร์ของ ยีน P1 จาก serotype O และ A ในเวคเตอร์เดียวกัน จากการทดลองในสุกรพบว่าสามารถสร้าง nuetralising antibody ต่อไวรัสทั้ง 2 ไทป์ได้ แต่มีระดับที่ต่ำ

กว่าสุกรที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อตาย (Wu et al., 2003) จึงเห็นได้ว่าปัจจัยที่จะสร้างให้เวคเตอร์นั้นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้หลายไทป์ยังต้องมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงต่อไป

Pox virus เป็นไวรัสที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้เป็น vector เช่น canary pox vector และ fowlpox vector โดยมีการศึกษาพัฒนาใช้ canary pox เป็น vector สำหรับวัคซีนโรค bluetongue (Boone et al., 2007) rabies virus (Taylor et al., 1991) canine distemper virus (Stephensen et al., 1997) west-nile virus (Siger et al., 2006) ส่วน Fowl pox vector ใช้เป็น vector ในโรค Avian influenza (Boyle and Heine, 1993) Newcastle disease virus (Taylor et al., 1996) Infectious laryngotracheitis virus (Vagnozzi et al., 2012) Avian encephalomyelitis (Davison et al., 2006) and mycoplasma gallinarum (Zhang et al., 2010) Fowlpox มีข้อดีทาง genetic engineering ได้แก่ 1) ยีนที่โคลนใส่ใน DNA ของ FPV จะไม่ถูกตัดเมื่อ RNA ถูก transcribed 2) DNA ของ FPV สามารถแทรกด้วยยีนอื่นๆ ได้หลายยีน 3) ไม่สามารถจำลองตัวเองได้อย่างสมบูรณ์ใน Host ที่ไม่ใช้สัตว์ปีก และ 4) แอนติบอดีต่อ orthopox ไม่รบกวนต่อการใช้ vector และ 5) สามารถฉีดในสัตว์ได้หลายครั้ง เนื่องจากกระตุ้น neutralising antibody ในระดับต่ำ (Weli and Tryland, 2011)

การพัฒนาวัคซีน FMD ในรูปแบบ recombinant fowlpox virus ได้มีการตัดต่อ FMD ในไวรัส โดยใช้หนูไมซ์และหนูตะเภาเป็นสัตว์ทดลอง พบว่าให้ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสได้เมื่อตรวจด้วยวิธี serum neutralization test (Zheng et al., 2006) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ neutralizing antibody โดยใช้ recombinant fowlpox virus ที่มียีน P12A เชื่อมกับ IL 18 เพื่อเป็น adjuvant พบว่าสามารถกระตุ้น VN titer ได้และ มีระดับ IFN gamma ในซีรัมที่มากกว่าการฉีด fowlpox virus wildtype และ inactivate vaccine (Ma et al., 2008) IFN gamma เป็นสารที่สำคัญในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางเซลล์ ซึ่งมีผลให้สัตว์ต้านทานและกำจัดไวรัสได้เร็วขึ้น

จากที่กล่าวมาข้างต้น วัคซีนในรูปแบบใหม่ให้ความคุ้มโรคที่เร็ว และกระตุ้น CMI ได้ดี ซึ่งจะให้ผลต่อ heterologous challenge ที่มากขึ้น อย่างไรก็ดี กระบวนการผลิตวัคซีนโดยเชื้อตายนั้น เป็นวิธีที่มีความคุ้มค่า สามารถผลิตได้ปริมาณมาก การทำเป็น DIVA vaccine นั้น สามารถทำได้ และเตรียมเป็นหลายซีโรไทป์ได้ ข้อเด่นและข้อด้วยของการผลิตแบบดั้งเดิม และแบบใหม่นั้น ดังแสดงในตารางที่ 2

การพัฒนาวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ยังคงเป็นเป้าหมายหลักของหน่วยงานวิจัยในหลายๆ ประเทศ เพื่อป้องกันสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค สุกร แกะ แพะ เป็นต้น ของแต่ละประเทศ วัคซีนที่ต้องการให้เป็นวัคซีนที่ดี หรือวัคซีนในอุดมคติ ซึ่งมีคุณสมบัติดังตารางที่ 3 จึงมีความพยายามให้เกิดให้ได้ อย่างไรก็ดี โรคปากและเท้าเปื่อย เป็นโรคที่ได้กำจัดในหลายๆ ประเทศมาแล้ว แม้จะใช้วัคซีนเชื้อตาย หน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงควรให้ความสนใจและศึกษากระบวนการของประเทศนั้นๆ เพื่อนำมาปรับใช้กับประเทศไทย เพื่อให้การสร้างเขตปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 แสดงข้อเด่นและข้อด้วยของวัคซีนแบบดั่งเดิมและวัคซีนรูปแบบใหม่

วิธีการผลิตวัคซีน	ข้อเด่น	ข้อด้อย
Classical inactivate vaccine	- วิธีการผลิตได้ปริมาตรแอนติเจนสูง - หลายบริษัทมีความสามารถและองค์ความรู้ยาวนาน - เตรียมเป็นวัคซีนได้หลายซีโรไทป์ เช่น bi, tri, tetra, hexavalent	- ใช้อาคารที่มี Biosafety level 3 ต้องมีค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษา ป้องกันไวรัสปนเปื้อนทางอากาศ และของเสีย - กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำได้ดี แต่แบบเซลล์ต้องใช้ adjuvant ช่วยกระตุ้น
Next generation	-วิธีการผลิตแบบ genetic engineering และ biotechnology สามารถลดเวลาการวิจัยและคัดเลือกยีนที่ต้องการใช้เป็นวัคซีนได้รวดเร็ว -ไม่ต้องใช้ Biosafety level 3 เพราะไม่มีไวรัสปากและเท้าเปื่อยมีชีวิต (live virus) -สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มทางเซลล์ได้ดี ในกรณีใช้ไวรัสเวคเตอร์	-ผู้ผลิตต้องปรับเปลี่ยนวิธีการผลิต แสวงหาองค์ความรู้ใหม่ ยังไม่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่แพร่หลาย ยกเว้นในกลุ่มประเทศอเมริกาและยุโรป -ยังไม่มีการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายซีโรไทป์ที่ให้ผลดี

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบเชื้อตาย และวัคซีนในอุดมคติ ดัดแปลงจาก (Rodriguez and Gay, 2011)

คุณสมบัติ	วัคซีนเชื้อตาย	วัคซีนอุดมคติ
1. ป้องกันการติดเชื้อ	ไม่ป้องกัน	ป้องกัน
2. กระตุ้นภูมิคุ้มกันเริ่ม ณ วันที่	7	1
3. ป้องกันข้ามสายพันธุ์และซีโรไทป์	ป้องกันภายในซีโรไทป์	ป้องกันข้ามหลายซีโรไทป์
4. ระยะเวลาภูมิคุ้มกัน	4-12 เดือน	ตลอดชีวิต
5. อายุของวัคซีน	1 ปี	มากกว่า 4 ปี
6. ข้อกำหนดความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสูงของบริเวณผลิตวัคซีน	ต้องมีข้อกำหนด	ไม่มีข้อกำหนด
7. การแยกสัตว์ฉีดวัคซีนและติดเชื้อ	ต้องใช้การคัดแยกอย่างมาก (purification)	ใส่ Negative marker
8. การใช้ไวรัสที่ระบาดใหม่	ต้องใช้เวลาในการ adapt ไวรัส	ใช้เวลาสั้น
9. ช่วงเวลาถอนก่อนนำสัตว์เข้าฆ่า (withdrawal period)	21-60 วัน	น้อยกว่า 21 วัน
10. วัคซีนทนความร้อน	ต้องใช้ตู้เย็น $4^{\circ}C$	ไม่ต้องใช้ตู้เย็น
11. ราคา	ปานกลาง	ถูก

บทที่ 4

การทดสอบคุณภาพ
วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

การทดสอบวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ เป็นไปตามมาตรฐานของ Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals chapter 2.1.5 foot and mouth disease (OIE, 2013) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. การทดสอบวัคซีนในระหว่างขบวนการผลิต
2. การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป

4.1 การทดสอบวัคซีนในระหว่างขบวนการผลิต

4.1.1 การตรวจสอบเชื้อปนเปื้อน (Sterility test) เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ โดยใช้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypcase soya broth และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Thioglycolate broth บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

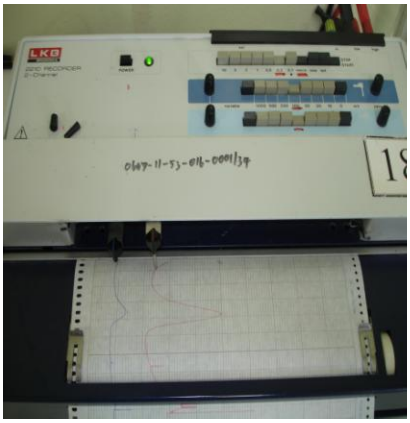
4.1.2 การหาปริมาณของไวรัส

4.1.2.1. **Antigen titration** ด้วยวิธี complement fixation test โดยอาศัยคุณสมบัติที่เป็นแอนติเจนของไวรัสทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี แล้วตรวจการเกิดปฏิกิริยาด้วยการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงกระต่าย ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) ไม่ควรน้อยกว่า 50% hemolysis

4.1.2.2 **Virus Neutralisation test** โดยวิธีการเจือจางไวรัสแบบ ten-fold dilution และเพาะไวรัสแต่ละความเจือจางลงในเซลล์ไตแกะ (lamb kidney cell) นำไปบ่มที่ 37^{0}C และอ่านผลการเกิด CPE คำนวณค่าเป็น $TCID_{50}$/ml ด้วย Karber method

4.1.2.3 **146S test** โดยการแยกอนุภาคไวรัสด้วยวิธีsucrose density gradient centrifugation และวัดปริมาณไวรัสด้วย UV spectrophotometer ที่ 254 nm ซึ่งถูกแปลค่าออกมาเป็นกราฟและคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับ

ค่ากราฟมาตรฐาน การแปลผลจะสัมพันธ์กับปริมาณของ 146 S โดยอ่านค่าเป็น µg/ml



รูปที่ แสดงเครื่อง UV spectrophotometer สำหรับวัดค่า 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งแปลผลออกมาเป็นกราฟ

4.1.3 การหาปริมาณสาร ethyleneimine คงเหลือ (residue ethyleneimine content) เพื่อทดสอบปริมาณสาร BEI คงเหลือจากขั้นตอนการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์

4.1.4 การหาปริมาณโปรตีนแปลกปลอมในแอนติเจน (Protein content test) ด้วยวิธี Lowry method เพื่อความคุมปริมาณโปรตีนแปลกปลอมไม่ให้มีปริมาณมากเกินไป

4.1.5 การทดสอบความไวของเซลล์ต่อไวรัส (sensitivity test) เพื่อทดสอบความไวของเซลล์ไตแกะก่อนนำมาใช้ในงานการทดสอบการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์อย่างสมบรูณ์ (Inactivation test) โดยเซลล์ไตแกะจะถูก inoculate ด้วยไวรัสปริมาณ 0.32 $TCID_{50}$/ml หลังจากบ่มที่ $37^{0}C$ เซลล์ควรเกิด CPE ใน 18-24 ชั่วโมง

4.1.6 การทดสอบการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์อย่างสมบูรณ์(Inactivation test) เป็นการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าไวรัสถูกทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BEI สมบูรณ์หรือไม่ โดยนำตัวอย่างเพาะเพิ่มจำนวนลงเซลล์ไตแกะ จำนวน 3 passage ผลคือจะต้องไม่เกิด CPE ในเซลล์ไตแกะ

4.1.7 Aluminium hydroxide gel adsorbancy test (A.D.90%) เป็นกาหาความสามารถในการดูดซับไวรัสของ aluminium hydroxide gel ซึ่งใช้เป็น adjuvant ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยโค-กระบือ โดยการเจือจาง gel ที่ระดับการเจือจางต่างๆ และปั่นผสมให้เข้ากับไวรัสที่ทราบปริมาณแน่นอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นส่วนใส มาตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี 146S โดยอ่านผลจากค่าปริมาณไวรัสที่คงเหลือจากการดูดซับต้องน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบวัคซีนสำเร็จรูป

4.2.1 การตรวจสอบเชื้อปนเปื้อน (Sterility test) เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ ในวัคซีน โดยใช้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypcase soya broth และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Thioglycolate broth บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

4.2.2 ความปลอดภัย (Safety test) เป็นการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน โดยใช้โค 2 ตัว อายุประมาณ 6 เดือน ฉีดวัคซีน 2 โด๊ส เข้าใต้ผิวหนังแผงคอหน้า ขาหน้าซ้าย ในสุกร 2 ตัว อายุประมาณ 2 เดือน ฉีดวัคซีน 2 โด๊ส เข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณคอหลังหูซ้าย สังเกตการณ์แพ้วัคซีนหลังฉีดทุกครึ่งชั่วโมงเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ทำการวัดอุณหภูมิและสังเกต

อาการทุกวันเป็นเวลา 14 วัน โดยโคต้องไม่แสดงอาการแพ้วัคซีน หรือ เกิดวิการใดๆ

4.2.3 การทดสอบความคุ้มโรค (Potency test) เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ใช้โคอายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 17 ตัวต่อการทดสอบวัคซีนแต่ละไทป์ โดยแบ่งวัวเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มฉีดวัคซีน 3 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว และกลุ่มควบคุม 2 ตัว ซึ่งแต่ละกลุ่ม (ยกเว้นกลุ่มควบคุม) จะถูกฉีดด้วยวัคซีนที่ไม่เจือจาง วัคซีนเจือจางที่ 1:1 1:4 และ 1:16 ตามลำดับ เข้าใต้ผิวหนังโค ต่อมาอีก 3 สัปดาห์ ฉีดพิษทับด้วยไวรัส 10 ,000 CID_{50}/ตัว ในทุกกลุ่ม อ่านผลทุกวันเป็นเวลา 8 วัน แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณด้วย Karber method วัคซีนต้องให้ความคุ้มโรคมากกว่าหรือเท่ากับ 3 $PD/_{50}$dose

สุกรอายุประมาณ 4 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัวต่อการทดสอบวัคซีนแต่ละไทป์ และกลุ่มควบคุม 2 ตัว โดยฉีดด้วยวัคซีน*ที่ไม่เจือจาง* แต่ละกลุ่ม (ยกเว้นกลุ่มควบคุม) เข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณคอหลังหูซ้าย ต่อมาอีก 3 สัปดาห์ ฉีดพิษทับด้วยไวรัส 10,000 CID_{50}/ตัว ในทุกกลุ่มควบคุม อ่านผลทุกวันเป็น เวลา 10 วัน วัคซีนต้องให้ความคุ้มโรคมากกว่าหรือเท่ากับ 70%

4.2.4 การทดสอบคุณลักษณะทั่วไป (Property test) เป็นการทดสอบลักษณะภายนอกที่มองเห็น เช่น ลักษณะขวด ไม่แตก ไม่รั่ว ไม่บุบเบี้ยว แค๊ปและฉลากติดแน่น สีตัวหนังสือชัดเจนไม่ลอกหลุด ไม่มีสิ่งแปลกปลอมในน้ำวัคซีน ลักษณะสีและสภาพของน้ำวัคซีนไม่เปลี่ยนแปลง ไม่แยกชั้น

4.2.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH measurement) มีสภาพความเป็นกรดด่างที่ pH 7.5 -8.5

4.2.6 ความบริสุทธิ์ (Purity test) เป็นการทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีนโดยปราศจากการปนเปื้อนของ Non structural protein (NSP) ตามมาตรฐาน OIE โดยใช้โคหรือสุกร 3 ตัว ฉีดวัคซีนอย่างน้อย 3 ครั้ง ในระยะเวลา 3-6 เดือน แล้วเจาะเลือดหลังจากฉีดวัคซีนเข็มสุดท้าย 30-60 วัน เพื่อทดสอบหา antibody ต่อ Non structural protein (NSP)ถ้า NS test ให้ผลลบ แสดงว่าแอนติเจนที่นำมาผสมวัคซีน มีความบริสุทธิ์(Purified) เพียงพอ

บทที่ 5

ปัจจัยที่มีผล
ต่อการใช้วัคซีนใน
การป้องกันและควบคุมโรค

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้วัคซีนในการป้องกันโรคและควบคุมโรค

บ่อยครั้งที่มักมีคำถามจากเกษตรกร ทำไมฉีดวัคซีนแล้วสัตว์ยังเป็นโรค แต่เมื่อย้อนถามกลับไปว่า คุณมีวิธีการจัดการฟาร์มอย่างไร สัตว์มีสภาพการเป็นอยู่อย่างไร และจัดเก็บรักษาวัคซีนอย่างไร ซึ่งจากหลาย ๆ คำตอบดูเหมือนกับว่า เกษตรกรไม่ค่อยให้ความสำคัญกับเรื่องนี้มากเท่าที่ควร แต่ความเป็นจริงแล้วคำถามเหล่านี้มีความเกี่ยงโยงกัน กล่าวคือ ถ้าสัตว์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีสภาวะเครียด ร่างกายก็จะอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันในร่างกายลดต่ำโอกาสการติดเชื้อก็จะสูง ต่อให้สัตว์ได้รับวัคซีนก็ใช่ว่าจะป้องกันโรคได้ ในทางกลับกันอาจยิ่งเพิ่มโอกาสการติดเชื้อมากขึ้น เช่นกันหากสัตว์ได้รับการดูแลอย่างดี แต่วัคซีนไม่มีประสิทธิภาพ จึงไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สูงพอที่จะป้องกันโรคได้ สัตว์ก็ป่วยได้เช่นกัน โดยเฉพาะในสัตว์บางชนิดซึ่งสายพันธุ์มีความไวต่อการติดเชื้อได้ง่ายก็จะส่งเสริมให้อาการรุนแรงยิ่งขึ้น

ดังนั้นการป้องกันหรือควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพ ต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องอย่างครอบคลุม 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยของวัคซีน และปัจจัยตัวสัตว์ เป็นลักษณะของ 3 ขาหยั่ง หรือ ขาตั้งกล้อง ซึ่งจะคำนึงถึงด้านใดด้านหนึ่งน้อยเกินไปไม่ได้เพราะจะทำให้ไม่สามารถป้องกันหรือควบคุมโรคอย่างได้ผล

ปัจจัยด้านตัวสัตว์ (Host)

ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์กับเชื้อไวรัสมีความสลับซับซ้อน สัตว์ทุกตัวที่ได้รับวัคซีนชนิดเดียวกันในขนาดที่เท่ากัน อาจตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ไม่เท่ากันเพราะมีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องหลายประการ

โดยส่วนใหญ่ สัตว์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อ (susceptible host) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นสัตว์กีบคู่ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสุกร ซึ่งแต่ละชนิดมีความไวต่อการติดเชื้อและแสดงอาการที่รุนแรง แตกต่างกัน แตกต่างกัน โดยเฉพาะในลูกสัตว์มักมีความไวต่อการติดเชื้อ ได้ดีกว่าในสัตว์โต ซึ่งเป็นผลมาจากความไม่สมบรูณ์ พร้อมทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไประบบภูมิคุ้มกันของลูกสุกรจะมีการพัฒนาจนสมบรูณ์แบบเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ส่วนในลูกโคใช้เวลาประมาณ 6 สัปดาห์ แต่อย่างก็ตามเพื่อดำรงความอยู่รอดในช่วงเวลาดังกล่าว ธรรมชาติจึงสร้างให้สัตว์สามารถถ่ายทอดภูมิคุ้มกันจากแม่ส่งผ่านไปยังลูก (maternally-derived antibody; MDA) ได้ โดยลูกโคและสุกรจะได้รับสารภูมิคุ้มกันจากแม่ผ่านนมน้ำเหลือง (colostrum) เข้าสผนังลำไส้ (gut mucosa)ของลูกสัตว์ จากการดูดนมแม่สัตว์ในช่วง 24- 36 ชั่วโมงหลังคลอด (Logan el aL, 1973) ซึ่งจะส่งผลให้ลูกสัตว์เกิดใหม่มีระดับของแอนติบอดี IgA, IgG และ IgM ในกระแสเลือดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24-72 ชั่วโมงหลังคลอด หลังจากนั้นจึงค่อยๆลดลงโดยขึ้นอยู่กับค่าครึ่งชีวิตของแอนติบอดีแต่ละ โดย IgG เป็นแอนติบอดีหลักที่อยู่ในน้ำนมเหลืองและมีค่าครึ่งชีวิตนานกว่าชนิดอื่น (ตารางที่) ทั้งนี้ระดับของแอนติบอดี ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ยังคงอยู่ในตัวลูกสุกรได้นานถึง 2 เดือน และในลูกโคนาน 5 เดือน (Ahl และ Wittman, 1987)

ตารางที่ แสดงค่าครึ่งชีวิตของ แอนติบอดีแต่ละชนิดใน MDA ของลูกสัตว์เกิดใหม่

สัตว์	ชนิดแอนติบอดี (วัน)

	IgM	IgG	IgA
ลูกโค (Calf)	4.8	20	2.8
ลูกสุกร (Piglet)	3.6-6.4	6.6-22	2.1-3

ที่มา Curtis and Bourne, 1973

เป็นที่ทราบกันดีว่า MDA เป็นสารภูมิคุ้มที่มีการตอบสนองแบบจำเพาะ แต่ในขณะเดียวกัน MDA สามารถรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลูกสัตว์ด้วยเช่นกัน เนื่องจากใน MDA ที่ส่งจากแม่เป็นแบบ non-selection จึงอาจมีโมเลกุลของโปรตีนกลุ่มที่เป็นสารกดภูมิคุ้มกันปะปนมาในนมน้ำเหลือง เช่น cortisol, histamine, cytokine เป็นต้น (Clover & Zarkower, 1980) โดยปกติสารเหล่านี้จะมีผลรบกวนของ B-cell ในลักษณะแบบยับยั้งย้อนกลับ (negative feedback) (Uhr & Mohler, 1968) ซึ่งหากลูกสัตว์ได้รับวัคซีนในขณะที่ยังมี MDA หลงเหลือในระดับสูง MDA เหล่านี้จะไปยับยั้ง B-cell ไม่ให้มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในวัคซีนได้ อย่างไรก็ตามการรบกวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลูกสัตว์ขึ้นอยู่กับระดับ MDA ในตัวสัตว์เป็นสำคัญ เช่น เมื่อให้วัคซีนในลูกสุกรอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งมีระดับ MDA สูงจะส่งผลทำให้ไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน แต่ในขณะที่ให้วัคซีนในลูกสุกรอายุ 8 สัปดาห์ ระดับ MDA เริ่มลดลง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนจึงเกิดขึ้นได้บางส่วน

โดยทั่วไปค่าครึ่งชีวิตของ MDA ต่อโรคปากเท้าและเปื่อยในลูกโคอยู่ที่ 22 วันและ 21 วันในลูกสุกร ทั้งนี้ระดับของ MDA ในสุกรจะค่อยๆ ลดลง เมื่อน้ำหนักตัวสุกรเพิ่มขึ้น มากกว่าที่จะสลายไปเอง (Kitching and Salt,1995) และในวัวสาวท้องแรกจะส่งผ่าน MDA ไปสู่ลูกในปริมาณที่น้อยกว่าแม่วัวที่เคยท้องมากว่า 2 หรือ 3 ครั้ง ดังนั้นการออกแบบโปรแกรมการให้วัคซีนในลูกสัตว์ควรพิจารณาปัจจัยของ MDA เป็นสำคัญ และในขณะเดียวกันเจ้าของสัตว์ควรมีมาตรการการกีดกันเชื้ออย่างเข้มงวดและการดูแลสุขภาพสำหรับลูกสุกรที่ยังไม่สารมารถให้วัคซีนได้ ซึ่งอยู่ในระยะที่มีความอ่อนไหว

ต่อการติดเชื้อได้ง่าย โดยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์แนะนำในโค-กระบือ แพะ แกะ ฉีดครั้งแรกที่อายุ 4-6 เดือน ฉีดซ้ำอีกครั้งหลังจากฉีดครั้งแรก 3-4 สัปดาห์และฉีดซ้ำทุก 6 เดือน ในสุกรฉีดครั้งแรกที่อายุ 8 สัปดาห์ ครั้งที่สองที่อายุ 12 สัปดาห์และฉีดซ้ำทุก 6 เดือนในสุกร และในกรณีที่ สัตว์ท้องแก่อาจทำให้เกษตรกรกังวลเรื่องการฉีดวัคซีนอาจทำให้แท้งนั้น เป็นที่ยืนยันแน่ชัดแล้วว่าการฉีดวัคซีนในสัตว์ท้องแก่ไม่ทำให้สัตว์แท้ง แต่การแท้งอาจเกิดจากการควบคุมสัตว์ที่ผิดวิธีทำให้เกิดการกระทบกระแทกระหว่างการฉีดวัคซีน ดังนั้นการให้วัคซีนสัตว์ในสัตว์ที่ตั้งท้องจึงจำเป็นต้องดำเนินการอย่างระมัดระวังในเรื่องการควบคุมสัตว์ และควรลดปัจจัยที่จะทำให้สัตว์เกิดภาวะเครียดจากการควบคุม

ปัจจัยด้านวัคซีน (Vaccine)

วัคซีน เป็นสารหรือแอนติเจนที่ได้จากเชื้อหรือส่วนประกอบของเชื้อที่เมื่อให้เข้าไปในร่างกายแล้ว สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนนั้นได้ และสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากจุลชีพนั้นได้ หลักสำคัญของการให้วัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์คือ การให้วัคซีนแก่ประชากรสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคให้ได้มากที่สุด ดังนั้นก่อนการใช้วัคซีน จึงควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น

<u>สายพันธุ์เชื้อไวรัส</u>

เนื่องจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เป็นเชื้อประจำถิ่นซึ่งมีการระบาดวนเวียนอยู่ในประเทศไทยมี 3 ไทป์ ได้แก่ o, A และ Asia โดยแต่ละไทป์ไม่ให้ความคุ้มโรคข้ามกัน การเลือกใช้วัคซีนที่มีสายพันธุ์หรือไทป์ตรงกับสายพันธุ์ที่กำลังระบาดอยู่ในพื้นที่จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งจะส่งผลถึงประสิทธิการป้องกันและควบคุมโรคได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาค่า

คล้ายคลึงของสายพันธุ์ไวรัสที่บาดในพื้นที่กับสายพันธุ์ไวรัสของวัคซีนทางซีรัมวิทยา (relationship value: r- value) โดยการทดสอบด้วยวิธี Virus neutralisation test (VNT) และ Liquid phase blocking ELISA (LPBE) ซึ่งผล r จะต้อง $\geq$ 0.3 และ $\geq$ 0.4 ของแต่ละวิธีตามลำดับ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนที่เหมาะสมสำหรับผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ สามารถให้ความคุ้มกับสายพันธุ์ที่มีระบาดอยู่ในประเทศไทย (Linchongsubongoch et al, 2008)

<u>สารเสริมภูมิคุ้มกัน (Adiuvant)</u>

สารเสริมภูมิคุ้มกันเป็นสารที่เสริมให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น แม้ว่าสิ่งสำคัญในการผลิตวัคซีนคือการคัดเลือกสายพันธุ์หรือแอนติเจนที่มีความสามารถสูงในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่อีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญเช่นเดียวกัน คือ แอดจูแวนต์ที่เหมาะสมในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันและคงการตอบสนองเป็นระยะเวลานานพอที่จะทำให้เกิดการตอบสนองในรูปแบบที่ต้องการได้ ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยปัจจุบันนิยมใช้เพียง 3 ชนิด (Barteling and Vreeswijk, 1991) ได้แก่ aluminum hydroxide $Al(OH)_3$ gel, saponin และ oil emulsion โดย $Al(OH)_3$ gel และ saponin เป็น adjuvant ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนชนิดน้ำ (aqueous vaccine) ส่วน oil emulsion ใช้ในการผลิตวัคซีนชนิดน้ำมัน (oil adjuvant vaccine) ซึ่งวัคซีนชนิดน้ำมันสามารถให้ความคุ้มโรคได้ดีในสุกร และให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ยาวนานกว่าชนิดน้ำ แต่อย่างไรก็ตามวัคซีนชนิดน้ำยังนิยมใช้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิได้ดีกว่า (Rodriguez and Gay, 2011)

<u>ช่องทางการฉีดวัคซีน (route)</u>

ช่องทางการฉีดวัคซีนมีหลายวิธี เช่น การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular (IM)), ฉีดเข้าในชั้นผิวหนัง (intradermal (ID)), ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous (SC)), การรับประทาน, หรือ การพ่นเข้าจมูก ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีน และคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แต่โดยทั่วไปวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค-กระบือ แพะ แกะ เป็นชนิดน้ำ ควรฉีดใต้ผิวหนังของสัตว์ ส่วนวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร เป็นชนิดน้ำมัน (oil) ซึ่งการฉีดวัคซีนฯ การฉีดเข้ากล้ามเนื้อของสุกร เพื่อให้การสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์วัคซีนมีประสิทธิภาพ

<u>ปริมาณวัคซีน</u>

โดยทั่วไปปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจน(146S) สำหรับการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบันอยู่ที่ 1- 10 ไมโครกรัมต่อโด๊ส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ antigenicity ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่จะมีปริมาณของแอนติเจนไวรัสไทป์ O และ SAT ต่อโด๊สที่สามารถให้ความคุ้มโรคได้จะสูงกว่าไทป์ A, C และ Asia1 ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนไม่ได้มีความสัมพันธ์กับความคุ้มโรคในลักษณะที่เป็นเส้นตรง (linear) (Doel, 2003; Rweyemamu and Ouldridge, 1982) ดังนั้น การให้ฉีดวัคซีนแก่สัตว์ควรทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพราะหากสัตว์ได้รับวัคซีนมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอาการอันไม่พึงประสงค์ หรือไปรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ โดยเฉพาะลูกสัตว์หรือสัตว์ที่มีร่างกายอ่อนแอ หรือสัตว์ที่เป็นโรคแบบไม่แสดงอาการ อาจเป็นการส่งเสริมให้มีความรุนแรงในสัตว์เพิ่มขึ้นได้ หรือในทางกลับกันการให้วัคซีนในปริมาณน้อยเกินไปนอกจากจะไม่ให้ความคุ้มโรคในสัตว์แล้ว ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์มีโอกาสติดเชื้อแฝงหรือเป็นพาหะ (carrier) ของโรคได้

การใช้วัคซีน

การใช้วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย มี 2 ลักษณะ คือ

1. ฉีดวัคซีนป้องกันโรคล่วงหน้า เป็นการฉีดวัคซีนป้องกันโรคก่อนเกิดอุบัติการณ์ของโรค (Pre-outbreak vaccination) โดยในโค-กระบือ ฉีดวัคซีนครั้งเมื่อแรกอายุ 4-6 เดือน และฉีดกระตุ้น (booster) อีกครั้งหลังฉีดครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนซ้ำทุกๆ 6 เดือน และในสุกร ฉีดวัคซีนครั้งแรกเมื่ออายุ 8 สัปดาห์ และฉีดกระตุ้น (booster) อีกครั้งหลังฉีดครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนซ้ำทุกๆ 6 เดือน

การฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ที่ไม่เคยรับวัคซีนเพื่อกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันสูงขึ้นเพียงพอต่อการคุ้มโรคและมีภูมิคุ้มกันยาวนานขึ้น โดยการทำวัคซีนครั้งแรกในลูกสัตว์ ต้องคำนึงถึงภูมิคุ้มกันจากแม่ (Maternal Imumune) ซึ่งจะมีผลในการกดภูมิคุ้มกันที่เกิดจากวัคซีนร่วมด้วยโดยทั่วไปจะฉีดครั้งแรกเมื่อภูมิคุ้มกันจากแม่ต่ำ หรือหดไปและต้องฉีดกระตุ้นครั้งหลังฉีดครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ เป็นการฉีดวัคซีนเพื่อรักษาระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ การฉีดวัคซีนซ้ำ (Revaccnation) เป็นการฉีดวัคซีนเพื่อรักษาระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์อยู่ในระดับสูงเพียงพอต่อความคุ้มโรค โดยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยจะฉีดวัคซีนซ้ำทุก 6 เดือน

2. ฉีดวัคซีนแบบวงแหวน (Ring Vaccination) เป็นการฉีดวัคซีนเพื่อควบคุมโรคในกรณีที่มีการระบาดของโรค (Post-outbreak vaccination) โดยฉีดในสัตว์ปกติล้อมรอบอุบัติการณ์โรค เพื่อลดจำนวนสัตว์ที่ไวต่อโรค ทำให้การกระจายของเชื้อไวรัสลดลง ซึ่งเป็นการฉีดวัคซีนเชิงยุทธวิธี ในการสร้างแนวของภูมิคุ้มกันโรค (Immune belt) อมรอบอุบัติการณ์ของโรค เป็นการประยุกต์แนวคิดเรื่องการสร้างภูมิคุ้มกันของฝูงมาใช้ในการควบคุมอุบัติการณ์ เพื่อให้สัตว์ปกติ ที่อยู่นอกวงแหวนปลอดภัยจากการติดเชื้อไวรัส โดยแนวภูมิคุ้มกัน Immune belt อาจมีรัศมี 20-50 กิโลเมตร และควรมี

ระยะเวลา ให้สัตว์ที่ได้รับวัคซีนสร้างภูมิคุ้มกัน 21 วัน และการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์ในบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือปนเปื้อนไม่ควรดำเนินการเนื่องจากการให้วัคซีนในสัตว์ที่อ่อนแอ จะไม่ทำให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันได้เต็มประสิทธิภาพ การให้วัคซีนในสัตว์จะทำให้สัตว์อ่อนแออาจทำให้สัตว์ดังกล่าวติดโรคได้ง่ายโดยแสดงอาการอย่างรวดเร็วและรุนแรง จึงพบว่าการฉีดวัคซีนให้สัตว์ในพื้นที่ที่มีการติดเชื้อจะเพิ่มโอกาสให้สัตว์เป็นโรคมากขึ้น

<u>การเก็บรักษา</u>

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นวัคซีนต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อรักษาคุณภาพของวัคซีนตั้งแต่ผลิตจนเข้าสู่ตัวสัตว์ ซึ่งต้องใช้ระบบห่วงโซ่ความเย็น (Cold Chain) เนื่องจากจะทำให้คุณภาพของวัคซีนลดลงอยู่ในอุณหภูมิที่สูงกว่า 2-8°C และอาจสูญเสียคุณภาพโดยสิ้นเชิงเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 0°C หรือต่ำกว่า

ระบบห่วงโซ่ความเย็น (Cold Chain) หมายถึงระบบที่ใช้ในการเก็บและการกระจายวัคซีนให้คงคุณภาพ ตั้งแต่ผู้ผลิตวัคซีนจนถึงตัวสัตว์เพื่อให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคอย่ามีประสิทธิภาพ ประกอบด้วยการจัดเก็บและการขนส่งที่เชื่อมต่อกัน เพื่อให้วัคซีนอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจนถึงตัวสัตว์

การขนส่งและการจัดเก็บวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่จะถูกจัดเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมตั้งแต่ขบวนการผลิต การรอทดสอบคุณภาพ และจัดส่งด้วยรถขนส่งที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ไปยังสำนักงานปศุสัตว์เขต สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด สำนักงานปศุสัตว์อำเภอตามลำดับต่อไปโดยคงอุณหภูมิของวัคซีนที่ 2-8°C ตลอดการขนส่งและการเก็บรักษา ดังนั้นการนำวัคซีนไปฉีดให้สัตว์จะต้องบรรจุในภาชนะรักษาความเย็น หรือกระติกน้ำแข็ง

ที่บรรจุไอซ์แพ็ค หรือน้ำแข็งที่ห่ออยู่ในถุงหุ้มอีกชั้น และไม่ควรให้วัคซีนสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง

รูปที่ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาวัคซีน ได้แก่ ห้องเย็นหรือตู้เย็น กระติกวัคซีนบรรจุไอซ์แพค (Ice pack) และเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิ

การเก็บวัคซีนไว้ในห้องเย็น

1. จัดเรียงวัคซีนแต่ละชนิดเป็นแถวๆ ให้มีช่วงว่างระหว่างแถว เพื่อให้ความเย็นไหลเวียนได้ทั่วถึง วางให้ห่างจากผนัง

2. วัคซีนที่ห้ามแช่แข็งควรวางให้ห่างจากจุดทำความเย็นเพราะอาจทำให้วัคซีนถูกแช่แข็งได้

3. วัคซีนที่หมดอายุก่อนให้จัดเรียงไว้ด้านนอก ส่วนวัคซีนที่เบิกมาใหม่ให้เก็ไว้ด้านในดูแลให้มีการจัดส่งหรือใช้แบบ First Expire Firs Out

4. บันทึกอุณหภูมิอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ทุกวัน เพื่อให้มั่นใจว่าวัคซีนอยู่นอุณหภูมิที่เหมาะสมตลอดเวลา

5. ถ้าอุณหภูมิห้องเย็นผิดปกติต้องแจ้งให้ช่างมาตรวจเช็ค หากแก้ไขไม่ได้ต้องทำการย้ายวัคซีนไปเก็บในห้องเย็นอื่น ตู้เย็น หรือหีบเย็นที่บรรจุไอซ์แพคไว้เรียบร้อยแล้ว และดำเนินการซ่อมโดยด่วน

6. วัคซีนที่เบิกใหม่ให้เก็บไว้ในส่วนลึก หรือด้านในของตู้เย็น และดูแลให้มีการใช้แบบ First Expire First Out

7. จัดเรียงวัคซีนแต่ละชนิดเป็นแถวๆ และให้มีช่วงว่างระหว่างแถว เพื่อให้วามเย็นไหลเวียนได้ทั่วถึง

8. บันทึกอุณหภูมิอย่างน้อยวันละ 2 ครั้งเช้า-เย็น ทุกวัน

9. ถ้าตู้เย็นมีอุณหภูมิผิดปกติ ต้องย้ายวัคซีนไปเก็บในตู้เย็นที่ความเย็นได้มาตรฐาน หรือในกระติกวัคซีนที่บรรจุไอซ์แพค และดำเนินการซ่อมตู้เย็นโดยด่วน

การเก็บวัคซีนในกระติกวัคซีน

วิธีบรรจุวัคซีนในกระติกรักษาความเย็น

1. นำไอซ์แพคที่แช่แข็งออกมาวางนอกตู้เย็นจนด้านนอกของไอซ์แพคเริ่มเปียก เรียงลงในกระติกวัคซีนไว้ด้านข้างทั้งสี่ด้าน

2. วางเทอร์โมมิเตอร์ลง กระติกวัคซีนแล้วปิดฝาประมาณ 10-15 นาที ตรวจอุณหภูมิให้ได้ 2-8°C.

3. นำวัคซีนใส่ถุงพลาสติก/ใช้กระดาษห่อ เพื่อป้องกันฉลากหลุดลอก และไม่ให้ขวดวัคซีนสัมผัสกับ ไอซ์แพคหรือน้ำแข็งโดยตรง ก่อนนำไปใส่กระติกวัคซีน

4. วางไอซ์แพค ทับบนถุงหรือท่อวัคซีนแล้วปิดฝา กระติกวัคซีนแล้วล็อคฝาให้แน่น

5. ตรวจสอบรอยรั่ว ถ้ามีให้ให้ผ้าเทปปิดให้สนิท

6. กรณีไม่มีไอซ์แพค ให้ใช้น้ำแข็งแนแต่ต้องมีปริมาณมากพอที่จะทำให้อุณหภูมิอยู่ระหว่างกว่า 2-8°C. โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ตรวจสอบ

รูปที่ ลักษณะการเก็บวัคซีนในกระติกวัคซีน

การเก็บวัคซีนกรณีที่ให้บริการ

รักษาให้อยู่ที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}C$ ตลอดเวลา ควรตั้งจุดบริการในที่ร่ม เปิดฝากระติกวัคซีนเมื่อจำเป็นเท่านั้นและควรปิดให้สนิท

กรณีฉุกเฉินในการขนส่งวัคซีน

<u>เครื่องยนต์รถเสีย</u> ให้เข็นรถเข้าร่ม (ถ้าทำได้) หาน้ำแข็งจากจุดที่ใกล้มาใส่ห้องเย็น ลากรถไปยังหมู่บ้านที่ใกล้และมีไฟฟ้า ขอต่อไฟฟ้าเข้ากับห้องเย็น และประสานงานกับ สสอ. หรือ ปศจ. ที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อย้ายวัคซีน หรือซ่อมรถกรณีซ่อมไม่นาน ในขณะซ่อมรถให้ต่อไฟฟ้าเข้ากับห้องเย็นตลอดเวลา

<u>ระบบทำความเย็นเสีย</u> (เครื่องยนต์รถไม่เสีย) หาน้ำแข็งจากจุดที่ใกล้มาใส่ห้องเย็น นำรถไป สสอ. หรือ ปศจ. ที่ใกล้ที่สุดเพื่อขนย้ายวัคซีนไปเก็บ

ที่ห้องเย็นหรือตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C. โดยเร็ว ยืมกระติกวัคซีนจาก สสอ. หรือ ปศจ. เพื่อนำวัคซีนไปส่งต่อโดยเร็ว

รถยนต์บรรทุกกระติกวัคซีนเสีย ถ้าจุดที่เสียใกล้บริเวณที่สามารถซ่อมได้โดยไม่ใช้เวลานานให้ลากรถไปยังจุดนั้น หาน้ำเข็งจากจุดที่ใกล้มาใส่กระติกวัคซีนเพิ่มโดยเร็ว ประสานงานขอเปลี่ยนรถและดำเนินการนำวัคซีนส่งต่อโดยเร็ว

กรณีไฟฟ้าดับ

ถ้าทราบล่วงหน้าว่าจะดับไม่เกิน 3 ชม. .ให้นำไอซ์แพคหรือขวดน้ำที่แช่แข็งมาวางไว้ชั้นล่างของตู้เย็นแล้วปิดประตูตู้เย็นจนกว่าไฟฟ้าจะมา หากดับเกิน 3 ชั่วโมง ให้ย้ายไปเก็บไว้ในกระติกวัคซีนพร้อมเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิ เพิ่มน้ำแข็งหรือเปลี่ยนไอซ์แพค เมื่อพบว่าอุณหภูมิใกล้จะสูงเกินกว่า 8°C.

เอกสารอ้างอิง

กมล อวัยวานนท์ 2513. การผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธีทิซชิวคัลเจอร์. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ และชีววิทยา ครั้งที่ 9 สาขาสัตว์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-6 กุมภาพันธ์ 2513, หน้า 201-211.

สมใจ ศรีหาคิม และ นพดล มีมาก 2535. การวิเคราะห์ทางระบาดวิทยาโรคปากและเท้าเปื่อยโคกระบือในประเทศไทยและมาตรการป้องกันและควบคุมโรค. ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กรมปศุสัตว์, ขอนแก่น.

อุดม จารุตามระ และประคัลภ์ สมิตินันท์. 2508. การผลิตวัคซีนป้องกันโรค

ปากและเท้าเปื่อย. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 4 สาขาพืชและชีววิทยา กับสาขาสัตว์ 27-29 มกราคม 2508, หน้า 465-470

Alexandersen, S., Donaldson, A.I., 2002, Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. Epidemiol Infect 128, 313-323.

Alexandersen, S., Oleksiewicz, M.B., Donaldson, A.I., 2001, The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. J Gen Virol 82, 747-755.

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

Arzt, J., Baxt, B., Grubman, M.J., Jackson, T., Juleff, N., Rhyan, J., Rieder, E., Waters, R., Rodriguez, L.L., 2011, The pathogenesis of foot-and-mouth disease II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. Transbound Emerg Dis 58, 305-326.

Balamurugan, V., Renji, R., Saha, S.N., Reddy, G.R., Gopalakrishna, S., Suryanarayana, V.V., 2003, Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in Pichia pastoris. Virus Res 92, 141-149.

Barteling, S.J., Vreeswijk, J., 1991, Developments in foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine 9, 75-88.

Beignon, A.S., Brown, F., Eftekhari, P., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Partidos, C.D., 2005, A peptide vaccine administered transcutaneously together with cholera toxin elicits potent neutralising anti-FMDV antibody responses. Vet Immunol Immunopathol 104, 273-280.

Berinstein, A., Tami, C., Taboga, O., Smitsaart, E., Carrillo, E., 2000, Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. Vaccine 18, 2231-2238.

Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I.A., Maclachlan, N.J., 2007, Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5

outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. Vaccine 25, 672-678.

Bouma, A., de Smit, A.J., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J., 1999, Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. Vet Microbiol 66, 101-114.

Boyle, D.B., Heine, H.G., 1993, Recombinant fowlpox virus vaccines for poultry. Immunol Cell Biol 71 (Pt 5), 391-397.

Buenz, E.J., Howe, C.L., 2006, Picornaviruses and cell death. Trends Microbiol 14, 28-36.

Cao, Y., Lu, Z., Sun, J., Bai, X., Sun, P., Bao, H., Chen, Y., Guo, J., Li, D., Liu, X., Liu, Z., 2009, Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. Vet Microbiol 137, 10-17.

Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J.C., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Gomez, N., Salinas, J., Escribano, J.M., Borca, M.V., 1998, Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. J Virol 72, 1688-1690.

Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Trono, K., Dus Santos, M.J., Castanon, S., Sadir, A.M., Ordas, R., Escribano, J.M., Borca, M.V., 2001, Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. Viral Immunol 14, 49-57.

Challa, S., Barrette, R., Rood, D., Zinckgraf, J., French, R., Silbart, L., 2007, Non-toxic Pseudomonas aeruginosa exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. Vaccine 25, 3328-3337.

Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P.W., Zellner, M.K., Ward, G., Grubman, M.J., 1998, Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. J Virol 72, 4454-4457.

Chinsangaram, J., Moraes, M.P., Koster, M., Grubman, M.J., 2003, Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. J Virol 77, 1621-1625.

Clarke, B.E., Newton, S.E., Carroll, A.R., Francis, M.J., Appleyard, G., Syred, A.D., Highfield, P.E., Rowlands, D.J., Brown, F., 1987, Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. Nature 330, 381-384.

Clavijo, A., Wright, P., Kitching, P., 2004, Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. Vet J 167, 9-22.

Cubillos, C., de la Torre, B.G., Jakab, A., Clementi, G., Borras, E., Barcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., Blanco, E., 2008, Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. J Virol 82, 7223-7230.

Davison, S., Gingerich, E.N., Casavant, S., Eckroade, R.J., 2006, Evaluation of the efficacy of a live fowlpox-vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. Avian Dis 50, 50-54.

de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R., Grubman, M.J., 2006, The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. J Virol 80, 1906-1914.

DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., Mowat, N., 1986, Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. Science 232, 639-641.

Doel, T.R., 2003, FMD vaccines. Virus Res 91, 81-99.

Domingo, E., Baranowski, E., Escarmis, C., Sobrino, F., 2002, Foot-and-mouth disease virus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 25, 297-308.

Donaldson, A.I., Alexandersen, S., 2002, Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus. Rev Sci Tech 21, 569-575.

Dus Santos, M.J., Carrillo, C., Ardila, F., Rios, R.D., Franzone, P., Piccone, M.E., Wigdorovitz, A., Borca, M.V., 2005, Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. Vaccine 23, 1838-1843.

Francis, M.J., Hastings, G.Z., Syred, A.D., McGinn, B., Brown, F., Rowlands, D.J., 1987, Non-responsiveness to a foot-and-

mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T-cell determinants. Nature 330, 168-170.
Fry, E.E., Lea, S.M., Jackson, T., Newman, J.W., Ellard, F.M., Blakemore, W.E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A.M., Stuart, D.I., 1999, The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. EMBO J 18, 543-554.
Fry, E.E., Stuart, D.I., Rowlands, D.J., 2005, The structure of foot-and-mouth disease virus. Curr Top Microbiol Immunol 288, 71-101.
Grubman, M.J., Baxt, B., 2004, Foot-and-mouth disease. Clin Microbiol Rev 17, 465-493.
Grubman, M.J., Moraes, M.P., Schutta, C., Barrera, J., Neilan, J., Ettyreddy, D., Butman, B.T., Brough, D.E., Brake, D.A., 2010, Adenovirus serotype 5-vectored foot-and-mouth disease subunit vaccines: the first decade. Future Virology 5, 51-64.
Henderson, W.M., Galloway, I.A., Brooksby, J., 1948, Strains of virus of foot-and-mouth disease recovered from outbreaks in Mexico; pathogenicity and invasiveness. Proc Soc Exp Biol Med 69, 66-69.
Huang, Y., Liang, W., Wang, Y., Zhou, Z., Pan, A., Yang, X., Huang, C., Chen, J., Zhang, D., 2005, Immunogenicity of the epitope of the foot-and-mouth disease virus fused with a hepatitis B core protein as expressed in transgenic tobacco. Viral Immunol 18, 668-677.
Hughes, G.J., Mioulet, V., Kitching, R.P., Woolhouse, M.E., Alexandersen, S., Donaldson, A.I., 2002, Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. Vet Rec 150, 724-727.
Jorna, T., Benedictus, G., Bouma, A., Breeuwsma, A.J., Franken, P., Plaisier, A.J., Sutmoller, P., 2003, [Control of foot and mouth disease. Conclusions and recommendations of Working Group for Foot and Mouth Disease]. Tijdschr Diergeneeskd 128, 146-148.
Kitching, R.P., 1998, A recent history of foot-and-mouth disease. J Comp Pathol 118, 89-108.
Kitching, R.P., Alexandersen, S., 2002, Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. Rev Sci Tech 21, 513-518.

Kitching, R.P., Hughes, G.J., 2002, Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. Rev Sci Tech 21, 505-512.
Kitching, R.P., Hutber, A.M., Thrusfield, M.V., 2005, A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease. Vet J 169, 197-209.
Li, Y., Stirling, C.M., Denyer, M.S., Hamblin, P., Hutchings, G., Takamatsu, H.H., Barnett, P.V., 2008a, Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost. Vaccine 26, 2647-2656.
Li, Y.G., Tian, F.L., Gao, F.S., Tang, X.S., Xia, C., 2007, Immune responses generated by Lactobacillus as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. Vaccine 25, 902-911.
Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., Liu, J., 2008b, Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. PLoS One 3, e2273.
Longjam, N., Deb, R., Sarmah, A.K., Tayo, T., Awachat, V.B., Saxena, V.K., 2011, A Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools. Vet Med Int 2011, 905768.
Lunt, R.A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L.J., 1994, A modified liquid phase (LP) blocking ELISA used to assess type O foot-and-mouth disease virus antigenic variation in Thailand. Vet Microbiol 42, 79-90.
Ma, M., Jin, N., Shen, G., Zhu, G., Liu, H.J., Zheng, M., Lu, H., Huo, X., Jin, M., Yin, G., Ma, H., Li, X., Ji, Y., Jin, K., 2008, Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. Vet Immunol Immunopathol 121, 1-7.
Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002, Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 30, 1292-1305.
Mahy, B.W., 2005, Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. Curr Top Microbiol Immunol 288, 1-8.
Mason, P.W., Grubman, M.J., Baxt, B., 2003, Molecular basis of pathogenesis of FMDV. Virus Res 91, 9-32.
Mingxiao, M., Ningyi, J., Juan, L.H., Min, Z., Guoshun, S., Guangze, Z., Huijun, L., Xiaowei, H., Minglan, J., Xu, L.,

Haili, M., Yue, J., Gefen, Y., Kuoshi, J., 2007, Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. Antiviral Res 76, 59-67.

Mohana Subramanian, B., Madhanmohan, M., Sriraman, R., Chandrasekhar Reddy, R.V., Yuvaraj, S., Manikumar, K., Rajalakshmi, S., Nagendrakumar, S.B., Rana, S.K., Srinivasan, V.A., 2012, Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. Antiviral Res 96, 288-295.

Moraes, M.P., Mayr, G.A., Mason, P.W., Grubman, M.J., 2002, Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. Vaccine 20, 1631-1639.

Moraes, M.P., Segundo, F.D., Dias, C.C., Pena, L., Grubman, M.J., 2011, Increased efficacy of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease capsid subunit vaccine expressing nonstructural protein 2B is associated with a specific T cell response. Vaccine 29, 9431-9440.

Murphy, C., Bashiruddin, J.B., Quan, M., Zhang, Z., Alexandersen, S., 2010, Foot-and-mouth disease viral loads in pigs in the early, acute stage of disease. Vet Rec 166, 10-14.

Musser, J.M., 2004, A practitioner's primer on foot-and-mouth disease. J Am Vet Med Assoc 224, 1261-1268.

Niborski, V., Li, Y., Brennan, F., Lane, M., Torche, A.M., Remond, M., Bonneau, M., Riffault, S., Stirling, C., Hutchings, G., Takamatsu, H., Barnett, P., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., 2006, Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. Vaccine 24, 7204-7213.

Pacheco, J.M., Brum, M.C., Moraes, M.P., Golde, W.T., Grubman, M.J., 2005, Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. Virology 337, 205-209.

Paiba, G.A., Anderson, J., Paton, D.J., Soldan, A.W., Alexandersen, S., Corteyn, M., Wilsden, G., Hamblin, P., MacKay, D.K., Donaldson, A.I., 2004, Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). J Virol Methods 115, 145-158.

Parry, N.R., Ouldridge, E.J., Barnett, P.V., Clarke, B.E., Francis, M.J., Fox, J.D., Rowlands, D.J., Brown, F., 1989, Serological prospects for peptide vaccines against foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol 70 (Pt 11), 2919-2930.

Pearson, L.D., Roy, P., 1993, Genetically engineered multi-component virus-like particles as veterinary vaccines. Immunol Cell Biol 71 (Pt 5), 381-389.

Pena, L., Moraes, M.P., Koster, M., Burrage, T., Pacheco, J.M., Segundo, F.D., Grubman, M.J., 2008, Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. Vaccine 26, 5689-5699.

Porta, C., Kotecha, A., Burman, A., Jackson, T., Ren, J., Loureiro, S., Jones, I.M., Fry, E.E., Stuart, D.I., Charleston, B., 2013, Rational engineering of recombinant picornavirus capsids to produce safe, protective vaccine antigen. PLoS Pathog 9, e1003255.

Remond, M., Kaiser, C., Lebreton, F., 2002, Diagnosis and screening of foot-and-mouth disease. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 25, 309-320.

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

Rweyemamu, M.M., Ouldridge, E.J., 1982, Serological analysis of recent type O foot-and-mouth disease virus isolates from Europe. Vet Rec 111, 163-165.

Sellers, R.F., Donaldson, A.I., Herniman, K.A., 1970, Ihalation, persistence and dispersal f foot-and-mouth disease virus by man. J Hyg (Lond) 68, 565-573.

Sellers, R.F., Herniman, K.A., Mann, J.A., 1971, Transfer of foot-and-mouth disease virus in the nose of man from infected to non-infected animals. Vet Rec 89, 447-449.

Siger, L., Bowen, R., Karaca, K., Murray, M., Jagannatha, S., Echols, B., Nordgren, R., Minke, J.M., 2006, Evaluation of the efficacy provided by a Recombinant Canarypox-Vectored Equine West Nile Virus vaccine against an experimental West Nile Virus intrathecal challenge in horses. Vet Ther 7, 249-256.

Sorensen, K.J., Madekurozwa, R.L., Dawe, P., 1992, Foot-and-mouth disease: detection of antibodies in cattle sera by blocking ELISA. Vet Microbiol 32, 253-265.
Stephensen, C.B., Welter, J., Thaker, S.R., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E., 1997, Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. J Virol 71, 1506-1513.
Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C., Sumption, K.J., 2003, Control and eradication of foot-and-mouth disease. Virus Res 91, 101-144.
Taylor, J., Christensen, L., Gettig, R., Goebel, J., Bouquet, J.F., Mickle, T.R., Paoletti, E., 1996, Efficacy of a recombinant fowl pox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against velogenic and respiratory challenge. Avian Dis 40, 173-180.
Taylor, J., Trimarchi, C., Weinberg, R., Languet, B., Guillemin, F., Desmettre, P., Paoletti, E., 1991, Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. Vaccine 9, 190-193.
Thomson, G.R., Vosloo, W., Bastos, A.D., 2003, Foot and mouth disease in wildlife. Virus Res 91, 145-161.
Vagnozzi, A., Zavala, G., Riblet, S.M., Mundt, A., Garcia, M., 2012, Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. Avian Pathol 41, 21-31.
Wang, C.Y., Chang, T.Y., Walfield, A.M., Ye, J., Shen, M., Chen, S.P., Li, M.C., Lin, Y.L., Jong, M.H., Yang, P.C., Chyr, N., Kramer, E., Brown, F., 2002, Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. Vaccine 20, 2603-2610.
Ward, G., Rieder, E., Mason, P.W., 1997, Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. J Virol 71, 7442-7447.
Weli, S., Tryland, M., 2011, Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. Virology Journal 8, 49.
Wu, Q., Moraes, M.P., Grubman, M.J., 2003, Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): in vitro

characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. Virus Res 93, 211-219.

Yang, N.-S., Wang, J.-H., Lin, K.-F., Wang, C.-Y., Kim, S.-A., Yang, Y.-L., Jong, M.-H., Kuo, T.-Y., Lai, S.-S., Holland Cheng, R., Chan, M.-T., Liang, S.-M., 2005, Comparative studies of the capsid precursor polypeptide P1 and the capsid protein VP1 cDNA vectors for DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. The Journal of Gene Medicine 7, 708-717.

Zhang, G.Z., Zhang, R., Zhao, H.L., Wang, X.T., Zhang, S.P., Li, X.J., Qin, C.Z., Lv, C.M., Zhao, J.X., Zhou, J.F., 2010, A safety assessment of a fowlpox-vectored Mycoplasma gallisepticum vaccine in chickens. Poult Sci 89, 1301-1306.

Zhang, Y.L., Guo, Y.J., Wang, K.Y., Lu, K., Li, K., Zhu, Y., Sun, S.H., 2007, Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus. Scand J Immunol 65, 320-328.

Zheng, M., Jin, N., Zhang, H., Jin, M., Lu, H., Ma, M., Li, C., Yin, G., Wang, R., Liu, Q., 2006, Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. J Virol Methods 136, 230-237.

ภาคผนวก

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสำหรับสุกร

เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน ผลิตจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซึ่งเตรียมจากเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เข้มข้นบริสุทธิ์และทำให้หมดฤทธิ์ด้วยสาร Binary EthyleneImine (BEI)

สรรพคุณ : ใช้ฉีดป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับสุกร

ส่วนประกอบ : วัคซีน 1 โด๊ส(2 มล.)ประกอบด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอ และเอเซียวันและละไทป์ไม่น้อยกว่า 10^7 $TCID_{50}$

วิธีการใช้

1. สุกรขุน ฉีดตั้งแต่อายุ 8 สัปดาห์ และซ้ำเมื่ออายุ 12 สัปดาห์
2. สุกรพันธุ์ ฉีดเช่นเดียวกับสุกรขุน และซ้ำทุก 4-6 เดือน ควรฉีดก่อนการผสมพันธุ์

ข้อเสนอแนะและแนวทางแก้ไขในภาวะโรคระบาด

1. ควรปรับโปรแกรมการใช้วัคซีนกับสุกรให้เหมาะสมกับสภาวะเหตุการณ์ในขณะนั้น เช่นในกรณีที่จำเป็นต้องฉีดวัคซีนให้ลูกสุกรอายุต่ำกว่า 8 สัปดาห์ ซึ่งระยะนี้พบว่ามีภูมิคุ้มกันจากแม่ลดลง แม้มีภูมิคุ้นกันอยู่บ้าง

แต่ก็ไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรคจึงต้องฉีดซ้ำ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งแรก ถ้าเลี้ยงสุกรเกิน 4 เดือน

2. ควรฉีดซ้ำในระยะ 2-3 เดือน หลังจากฉีดครั้งที่ 2 ขนาดฉีด ตัวละ 2 มล. เข้ากล้ามเนื้อ

ความคุ้มโรค สัตว์จะมีความคุ้มโรคหลังจากฉีดวัคซีน 3-4 สัปดาห์ และอยู่ได้นาน 6 เดือน

การเก็บรักษา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ห้ามเก็บในช่องแช่แข็งขนาดบรรจุขวดละ 150 มล. (75 โด๊ส)

ข้อควรระวัง กรณีที่จะฉีดวัคซีนก่อนระยะเวลาที่กำหนดไว้ จะต้องคำนึงถึงระดับภูมิคุ้มกันที่ลูกได้รับจากน้ำนมเหลืองซึ่งจะมีผลรบกวนต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของวัคซีน

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค-กระบือ แพะ แกะ

เป็นวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำ (Aqueous vaccine) ผลิตจากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเตรียมจากเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เข้มข้น บริสุทธิ์ และทำให้หมดฤทธิ์ด้วยสาร Binary Ethylene Imine (BEI)

สรรพคุณ : ใช้ฉีดป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย สำหรับโค กระบือ แพะ แกะ

ส่วนประกอบ : วัคซีน 1 โด๊ส (2 มล.) ประกอบด้วยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน แต่ละไทป์ไม่น้อยกว่า 10^7 $TCID_{50}$

วิธีการใช้

1. ฉีดวัคซีนครั้งแรกตั้งแต่อายุ 4 เดือน ถึง 6 เดือน
2. ฉีดครั้งที่ 2 กลังจากฉีดครั้งแรก 3-4 สัปดาห์ และฉีดซ้ำทุก 6 เดือน
3. ในกรณีที่เกิดโรคระบาด ให้ฉีดวัคซีนซ้ำทันทีทุกตัวขนาดฉีด ตัวละ 2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง

ความคุ้มโรค สัตว์จะมีความคุ้มโรคหลังจากฉีดวัคซีน 3-4 สัปดาห์ และอยู่ได้นาน 6 เดือน

การเก็บรักษา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ห้ามเก็บในช่องแช่แข็ง

ขนาดบรรจุ ขวดละ 150 มล.(75 โด๊ส) หรือ ขวดละ 40 มล.(20 โด๊ส)

ข้อควรระวัง อาจเกิดอักเสบตรงบริเวณที่ฉีดวัคซีน ร่วมกับมีไข้เล็กน้อย และเบื่ออาหาร แต่ไม่เป็นอันตราย