

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาของไวรัสโรคปากและ เท้าเปื่อยไต้ป A ที่แยกได้ในประเทศไทยระหว่างปี 2546-2548

สมใจ กมลศิริพิชัยพร^{1*} ร่มพฤษ อุดล²

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

ผู้รับผิดชอบบทความ: e-mail: somjaik@ksc.th.com โทร 0-25798908-14 โทรสาร 0-25798919

บทคัดย่อ

การศึกษาหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (r-value) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไต้ป A ที่ระบาดในท้องที่ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2546 - 2548 จำนวน 94 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับไวรัส A/118/87 และ A/Sakolnakorn/97 ที่ใช้ผลิตวัคซีนด้วยวิธี Liquid phase neutralizing ELISA (LPELISA) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่ระบาดในท้องที่กับ A/118/87 r-value อยู่ระหว่าง 0.25 -1 โดย 94% มี r-value มากกว่า 0.4 และเมื่อเปรียบเทียบกับ A/Sakolnakorn/97 มี r-value อยู่ระหว่าง 0.1-1 โดย 84% มี r-value มากกว่า 0.4 แสดงให้เห็นว่าไวรัสไต้ป A ที่ระบาดอยู่ในท้องที่ส่วนใหญ่ยังอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส ที่ใช้ผลิตวัคซีน จึงสามารถใช้ไวรัส A/118/87 และ A/Sakolnakorn/97 เป็น seed vaccine ได้และ A/118/87 มีความเหมาะสมในการผลิตวัคซีนไต้ป A ดีกว่า A/Sakolnakorn/97

คำสำคัญ: ค่าความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไต้ป A ประเทศไทย

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อกันได้ง่ายในสัตว์ปีก เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุกร เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งหมด 7 ไทป์ คือ O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 (Valee and Carre, 1922 ; Brooksby and Rogers, 1957) และจำแนกย่อยได้ถึง 64 subtypes ในประเทศไทยพบมีการระบาดอยู่ 3 ไทป์ คือ O, A และ Asia 1 การควบคุมและป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยที่สำคัญคือการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และการฉีดวัคซีนเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคกับสัตว์ในพื้นที่ให้ได้ 80% ของประชากรสัตว์ทั้งหมด วัคซีนที่ใช้ควบคุมโรคต้องมีปัจจัยที่สำคัญคือ มีคุณสมบัติทางแอนติเจนที่ครอบคลุมและอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไวรัสที่มีการระบาดในท้องที่ เนื่องจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กและเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนได้ง่ายโดยเฉพาะไทป์ A (Paton et al., 2005) ดังจะเห็นได้ว่าการจำแนกเป็นหลาย subtypes ส่งผลให้มีโอกาสพบความแตกต่างทางคุณสมบัติของแอนติเจนระหว่างไวรัสที่ระบาดในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน จึงจำเป็นต้องศึกษาหาความสัมพันธ์ทางชีววิทยาระหว่างไวรัสที่ระบาดในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนโดยแสดงผลเป็น r-value ซึ่งวิธีนี้จะได้ผลรวดเร็วและสามารถนำมาใช้เป็นข้อบ่งชี้ในการคัดเลือก seed virus ที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตวัคซีน (Kitching et al., 1988)

จากรายงานของ Linchongsubongkoch et al. (2000) ศึกษา r-value ของไวรัสทั้งหมดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2537-2541 เป็นไทป์ A 13 ตัวอย่าง เทียบกับ A/Nakornpathom/87 ที่ใช้ผลิตวัคซีนในช่วงดังกล่าว พบ 9 ตัวอย่าง มีค่า r-value ต่ำกว่า 0.4 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินใจ (Samuel et al., 1990) แสดงว่าความสัมพันธ์ทางชีววิทยาแตกต่างจาก A/Nakornpathom/87 ผลจากการศึกษาทำให้มีการเปลี่ยน seed virus ที่ใช้ผลิตวัคซีน โดยคัดเลือกไวรัสที่ใกล้เคียงกับไวรัสท้องที่มากที่สุดคือ A/Sakolnakorn/97 หลังจากนั้นได้มีการเปลี่ยน seed virus ที่ใช้ผลิตวัคซีนอีกครั้งในปี พ.ศ. 2544 เป็น A/118/87 (Linchongsubongkoch, 2003) จะเห็นได้ว่าในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการเปลี่ยนแปลง seed virus ที่ใช้ผลิตวัคซีนไทป์ A หลายครั้ง อันเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนของเชื้อไวรัสและยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเชื้อไวรัสที่แยกได้จากท้องที่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งต่างจากไทป์ O ซึ่งสามารถใช้ seed virus ชนิด O/Udonthani/87 ผลิตวัคซีนตลอดมาจนถึงปัจจุบัน (ร่วมพฤษและวิไล, 2549) การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษา r-value ของเชื้อไวรัสไทป์ A ที่แยกได้จากท้องที่ในช่วงปี พ.ศ. 2546 - 2548 เทียบกับ seed virus ที่ใช้ผลิตวัคซีนในปัจจุบันคือ A/118/ 87 และ A/Sakolnakorn/97 ที่เป็น seed virus สำหรับวัคซีนเดิม เพื่อคัดเลือก seed virus ที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันและควบคุมโรคปากและเท้าเปื่อย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทยที่ใช้เป็น homologous vaccine strains คือไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ คือ A/118/87 ที่แยกได้จากจังหวัดสระบุรี จัดอยู่ในกลุ่ม A₁₅ BKK60 related group (Doughty et al., 1995) และ A/Sakolnakorn/97 ไวรัสที่ใช้เป็น heterologous field strains สำหรับการศึกษาค้นคว้าคือตัวอย่างไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ประเทศไทยที่ส่งมาทำการตรวจวินิจฉัยโรค และจำแนกชนิดที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในระหว่างปี พ.ศ. 2546 – 2548 จำนวน 94 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาผ่านลงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด primary lamb kidney cell และ baby hamster kidney-21(BHK-21)Clone13 จำนวน 5-9 passages เพื่อเพิ่มปริมาณและเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture fluid) มายืนยันชนิดของเชื้อไวรัส โดยวิธี Indirect double antibody sandwich ELISA (Roeder and Le Blanc Smith, 1987) และหาปริมาณของไวรัสแต่ละชนิดโดยเลือกความเข้มข้น (dilution) ที่ให้ค่า OD 1.0 - 1.5 แล้วจึงตรวจสอบหา r-value โดยวิธี LP ELISA

2. เตรียม Immune serum

เตรียมจากโคทดลองของงานทดสอบวัคซีน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยฉีดวัคซีนชนิด Trivalent (O, A, Asia 1) ให้โค จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 3 สัปดาห์ แล้วเจาะเลือด 21 วันหลังฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ปั่นแยกซีรัมแล้วนำไป inactivate โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที จากนั้นนำซีรัมไปตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. Liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA)

ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี double antibody sandwich ELISA ตามวิธีการของ Hamblin et al. (1986) โดยเจือจางซีรัม แบบ 2-fold serial dilution เพื่อทำปฏิกิริยากับไวรัสที่เป็น homologous vaccine strains และ heterologous field strains จากนั้นนำมาหา ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ตามวิธีการของ Kitching et al. (1988) ทุกตัวอย่างทำการทดสอบซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

4. การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r - value)

หาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา ระหว่างไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนกับไวรัสที่ระบาดในท้องที่ โดยการคำนวณจากค่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของซีรัมที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA และนำมาหาอัตราส่วนระหว่างไตเตอร์ที่ได้จากไวรัสท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เพื่อนำมาหา r-value และวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาตามวิธีของ Samuel et al. (1990) และ Doughty et al. (1995) ดังนี้

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

เกณฑ์การแปลผลจาก r - value ดังนี้

r = 0 - 0.19 Highly significant serological variation from the reference strain

r = 0.2 - 0.39 Significant difference from the reference strain but protection may be satisfactory if using a sufficiently potent vaccine

r = 0.4 - 1 Not significant difference from reference strain

ผลการทดลอง

ผลจากการยืนยันเชื้อพบว่าไวรัสทั้ง 94 ตัวอย่างเป็นไทป์ A และเมื่อนำมาหาความรุนแรงไวรัสมีค่า OD 1.0–1.5

ผลการหา r-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A ทั้ง 94 ตัวอย่าง กับไวรัสไทป์ A ที่ใช้ผลิตวัคซีน (A/118/87 และ A/Sakolnakorn/97) ด้วยวิธี LP ELISA พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเชื้อท้องที่กับ A/118/87 r-value อยู่ระหว่าง 0.25-1 โดย 94% (88/94) มี r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 1) แยกรายละเอียดในแต่ละปีพบว่า ปี 2546 เชื้อท้องที่ 63 ตัวอย่างมี r-value มากกว่า 0.4 ปี 2547 เชื้อท้องที่ 15 ตัวอย่าง มี r-value มากกว่า 0.4 และปี 2548 เชื้อท้องที่ 10 ตัวอย่างมี r-value มากกว่า 0.4

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่แยกได้จากท้องที่กับ A/Sakolnakorn/97 พบ r-value ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.1-1 โดย 84% (79/94) ของเชื้อท้องที่มี r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 2) เมื่อแยกรายละเอียดในแต่ละปีพบว่าปี 2546 เชื้อท้องที่จำนวน 2 ตัวอย่าง มี r-value ต่ำกว่า 0.2 และเชื้อท้องที่ 59 ตัวอย่างมี r-value มากกว่า 0.4 ปี 2547 เชื้อท้องที่จำนวน 2 ตัวอย่าง มี r-value ต่ำกว่า 0.2 และเชื้อท้องที่ 10 ตัวอย่าง มี r-value มากกว่า 0.4 ปี 2548 เชื้อท้องที่ 10 ตัวอย่างมี r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 r-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2546 - 2548 เปรียบเทียบกับ seed virus ของกรมปศุสัตว์ (A/118/87)

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง	r-value range (%)		
		0-0.19	0.2-0.39	0.4-1
2546	64	0	1	63
2547	16	0	1	15
2548	14	0	4	10
รวม	94	0 (0%)	6 (6%)	88 (94%)

ตารางที่ 2 r-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2546 - 2548 เปรียบเทียบกับ seed virus ของกรมปศุสัตว์ (A/Sakolnakorn/97)

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง	r-value range(%)		
		0-0.19	0.2-0.39	0.4 -1
2546	64	2	3	59
2547	16	2	4	10
2548	14	0	4	10
รวม	94	4 (4%)	11 (12%)	79 (84%)

วิจารณ์

การศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) ครั้งนี้ใช้วิธี LP ELISA ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเดียวกับ World Reference Laboratory (WRL) ประเทศอังกฤษ (Kitching et al., 1988) และปัจจุบันมีการนำ r-value มาใช้ในการพิจารณา vaccine matching test โดยใช้หลักการเดียวกัน และกำลังถูกพิจารณาให้เป็นวิธีมาตรฐานโดยองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ(OIE) (Paton et al., 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ จากจำนวนตัวอย่างไทป์ A ทั้งหมด 94 ตัวอย่าง ที่รวบรวมระหว่างปี 2546 - 2548 จากพื้นที่เขต 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 จากการศึกษา r-value เมื่อเทียบกับ A/118/87 ซึ่งใช้เป็น seed virus สำหรับผลิตวัคซีน จำนวนตัวอย่าง 88/94 (94%) ของเชื้อที่ศึกษามี r-value มากกว่า 0.4 แสดงว่าเชื้อไวรัสในพื้นที่ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ A/118/87 ที่แยกได้จากจังหวัดสระบุรีในปี พ.ศ. 2530 และจัดอยู่ในกลุ่ม A₁₅ (BKK60) related group (Doughty et al., 1995) มีเพียง 6/94 (6%) ที่มี r-value ระหว่าง 0.2-0.39 โดยเป็นตัวอย่างจากเขต 1, 7 และ 8 (ตารางที่ 1) จากเกณฑ์การแปลผลแสดงว่าเชื้อท้องที่กลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ A/118/87 อย่างไรก็ตามพื้นที่ดังกล่าวยังสามารถใช้วัคซีนชนิดเดิมได้ แต่ต้องฉีดวัคซีนซ้ำเพื่อกระตุ้นให้มีระดับภูมิคุ้มกันสูงเพียงพอในการคุ้มโรค (Paton et al., 2005)

เมื่อพิจารณา r-value ของเชื้อท้องที่ที่นำมาศึกษาเทียบกับ A/Sakolnakorn/97 ซึ่งเป็น seed virus สำหรับผลิตวัคซีนที่แยกได้จากการระบาดที่จังหวัดสกลนครในปี พ.ศ. 2540 พบว่า 79/84 (84%) ของเชื้อมี r-value มากกว่า 0.4 ซึ่งน้อยกว่า A/118/87 และกลุ่มที่มี r-value 0.2-0.39 มี 12% และกลุ่มตัวอย่างที่มี r-value 0-0.19 มีถึง 4% ตัวอย่างกลุ่มหลังเป็นเชื้อที่แยกได้จากเขตพื้นที่ 3 และ 4 ติดกับชายแดนประเทศลาว นับเป็นกลุ่มที่แตกต่างจาก A/Sakolnakorn/97 มาก

จากการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถใช้ A/118/87 เป็น seed virus เพื่อผลิตวัคซีนได้ดีกว่า A/Sakolnakorn/97 เนื่องจากมีคุณลักษณะทางแอนติเจนที่ครอบคลุมเชื้อไวรัสท้องที่ได้มากกว่า และปัจจุบันสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ใช้ A/118/87 เป็น seed virus ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A ของกรมปศุสัตว์

สรุป

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ A ที่ระบาดในท้องที่ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2548 ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส A/118/87 และ A/Sakolnakorn/97 ที่ใช้ผลิตวัคซีนไทป์ A ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัส ทั้งสองชนิดยังคงเป็น seed virus ที่ดีในการผลิตวัคซีนไทป์ A ได้ และเมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้งสองชนิดพบว่า A/118/87 มีความเหมาะสมในการผลิตวัคซีนไทป์ A ได้ดีกว่า A/Sakolnakorn/97

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ น.สพ.ประจักษ์ ธิรทินรัตน์ น.สพ.พยนต์ สิ้นสูงศรีวัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช น.สพ.นพพร พัฒนประสิทธิ์ นางสาวปิยภรณ์ เจริญผล และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ร่วมพฤษ์ อุดล และ วิไล ลินจงสุบงกช. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปี 2547-2548 : สัตวแพทยสาร 57(1):15-21.
- Brooksby, J.B. and Rogers, J. 1957. Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950-1955. Methods of typing and cultivation of Foot and Mouth Disease Virus project 208 of OEEC, Paris. p. 31-34.
- Doughty, W.J., Lunt, R.A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L.J. and Kongthon, A. 1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 14 (3): 547-555.
- Hamblin, C., Barnett, I. T. R. and Hedger, R.S. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the antibodies against foot and mouth disease virus II. Application. J. Immunol. Methods. 93: 122-129.
- Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. Vaccine 6: 403-408.
- Linchongsubongkoch, W., Romlumdoan, S., Kamolsiripichaiporn, S. and Janukit, T. 2000. Antigenic variation of foot and mouth disease viruses from field outbreak in Thailand. Proceeding in 38th Kasetsart University Annual Conference. p.207-214.
- Linchongsubongkoch, W. 2003. Recent characteristic of FMD virus in Thailand. Proceeding of the 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. p.509-514.

-
- Paton, D.J., Valarcher, J.F., Bergmann, I., Matho, O.G., Zakharov, V.M., Palma, E.L. and Thomson, G.R. 2005. Selection of foot and mouth disease vaccine strains. A review. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* (3): 981- 993.
- Roeder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.* 43: 225-232.
- Samuel, A.R., Ouldrige, E.J., Arrowsmith, A.E.M., Kitching, R.P. and Knowles, N.J. 1990. Antigenic analysis of serotype O of foot and mouth disease virus isolates from the Middle East 1981–1988. *Vaccine* 8: 390-396.
- Valee, H. and Carre, H. 1922. Sur la Pluralite des virus aphteux. *C.R. Acad. Sci.* 174: 1498-1500.

Serological Correlation of Type A Foot-and-Mouth Disease Virus Isolated from Thailand during 2003-2005

Somjai Kamolsiripichaiporn^{1*} and Romphruke Udon²

¹ National Institute of Animal Health, Kasetklang, Jatujak , Bangkok ,10900

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

* Corresponding author: e-mail: somjaik@ksc.th.com Tel: 0-25798908-14 Fax: 0-25798919

Abstract

Serological correlation (r-value) of type A foot-and-mouth disease (FMD) virus was calculated based on 94 virus samples isolated from suspected cases of FMD in Thailand during 2003-2005. A liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) was used to compare these isolates with two reference seed vaccine strains (A/118/87 and A/Sakolnakorn/97). In comparison with A/118/87, the range of r-value of these isolates was 0.25–1 (94% having r-value greater than 0.4). Similar results were obtained when compared with A/Sakolnakorn/97, the range of r-value was 0.1-1 (84% having r-value greater than 0.4). The results indicated that most of the isolates during 2003-2005 had close antigenic relationship with currently used type A vaccine strains and A/118/87 appears to be a better choice for FMD vaccine production than A/Sakolnakorn/97

Key words: r-value, foot-and-mouth disease, type A, Thailand