

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคไข้เห็บโคในโคนม

Efficacy of tick fever vaccine in dairy cattle

มนทกานต์ จิระธันธ์* กิตติชัย อุ่นจิต มัญชรี ทัตติยพงศ์
จันทรา วัฒนเมธานนท์ กิ่งดาว หมอแก้ว สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ
Montakan Jiratanh* Kittichai Unjit Muncharee Tattiyapong
Juntra Wattanamethanont Kingdao Mohkaew Supawan Ngamjituea

Abstract

Backgrounds : Tick fever diseases caused by *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma marginale* are responsible for considerable economic losses in cattle production. One of the preventive measures is vaccination. In Thailand, as a vaccine importing country, the monitoring on safety and efficacy of the vaccine is important. This study aimed to perform purity test, safety test, and efficacy test on a trivalent frozen live attenuated tick fever vaccine, composed of *B. bigemina*, *B. bovis* and *A. centrale* from Australia against local strain of *B. bigemina* and *A. marginale*.

Methods : Stained thin smear, polymerase chain reaction and bacterial culture were conducted in purity test. For safety test, clinical signs, body temperature, and the packed cell volume (PCV) of 2 vaccinated dairy cattle were observed. In efficacy test, fourteen dairy cattle, 10 vaccinated and 4 unvaccinated, were assigned. Sera were collected pre-and 8 weeks post-vaccination in order to determine antibody levels against *B. bigemina* and *A. marginale* using IgG-ELISA (Svanovir®). These cattle were divided in half and each group, comprising 5 vaccinated and 2 unvaccinated, was challenged intravenously with either 5×10^8 parasites per 2 ml of *B. bigemina* or 7.6×10^7 parasites per 2 ml of *A. marginale*. Then, clinical signs, body temperature, and PCV were recorded.

Results : In purity test, no other contaminants, other agents and their DNA, except the vaccine producing agents were detected. In safety test, body temperature abnormalities, decreases in PCV and clinical signs were not shown. For efficacy test, levels of *B. bigemina* and *A. marginale* neutralizing antibodies in vaccinated cattle were increased above the cut off in contrast to those generated in unvaccinated cattle. The pre-and post-challenge studies of both vaccinated and unvaccinated cattle revealed no difference in body temperature ($p>0.05$) but statistically significant decrease in PCV ($p<0.05$). Mostly, these parameters in studied cattle were in normal range, however lowered PCV in the unvaccinated group challenged with *B. bigemina* was noted. Abnormal signs: e.g. depression, pale mucous membrane, anorexia, and dark color urine, were only observed in the unvaccinated cattle.

Conclusions : This study demonstrated that the tick fever vaccine could stimulate the immunity against Thai-local strains of the parasitic agents in dairy cattle.

Keywords : tick fever, *Babesia*, *Anaplasma*, vaccine, dairy cattle

กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 e-mail: montakanv@yahoo.com

Parasitology section, National Institute of Animal Health, Latyao, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author Tel. 0-2579-8908-14, e-mail: montakanv@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา : โรคไข้เห็บโคได้แก่โรคที่เกิดจากเชื้อ *Babesia bigemina*, *B. bovis* และ *Anaplasma marginale* เป็นต้น ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก หนึ่งใน การป้องกันโรค คือ การทำวัคซีน อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตวัคซีนได้เอง จึงต้องมีการศึกษาความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน การศึกษารั้วนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อนำวัคซีนเชื้อเป็นชนิดแช่แข็งที่ลดความรุนแรงลงจากประเทศออสเตรเลีย มาศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคไข้เห็บโคที่เกิดจาก *B. bigemina*, *B. bovis* และ *A. centrale* ต่อเชื้อ *B. bigemina* และ เชื้อ *A. marginale* สายพันธุ์ท้องถิ่น

วิธีการ : ทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน โดยตรวจหาเชื้อและสารพันธุกรรมของเชื้อที่ใช้ผลิตวัคซีน ด้วยวิธี stained thin smear, polymerase chain reaction และการเพาะเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน โดยฉีดวัคซีนในโคนม 2 ตัว สังเกตความผิดปกติของอุณหภูมิร่างกาย หาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume; PCV) และอาการทางคลินิก และทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในโคนม 14 ตัว โดยแบ่งเป็นกลุ่มฉีดวัคซีน 10 ตัว และกลุ่มไม่ได้ฉีดวัคซีน 4 ตัว เก็บซีรัมตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. bigemina* และ เชื้อ *A. marginale* ด้วยชุดทดสอบ IgG-ELISA (Svanovir®) ก่อนและ 8 สัปดาห์ หลังฉีดวัคซีน จากนั้นฉีดเชื้อพิษหัดเข้าทางเส้นเลือดโคทั้ง 14 ตัว โดยแบ่งเป็นฉีดเชื้อ *B. bigemina* 5×10^8 parasites ต่อ 2 มิลลิลิตร ในโคที่ได้รับวัคซีน 5 ตัว และโคที่ไม่ได้รับวัคซีน 2 ตัว และฉีดเชื้อ *A. marginale* 7.6×10^7 parasites ต่อ 2 มิลลิลิตร ในโคกลุ่มที่ได้รับวัคซีน 5 ตัว และในโคกลุ่มที่ไม่ได้วัคซีน 2 ตัว ทำการวัดอุณหภูมิร่างกาย หาค่า PCV และสังเกตอาการ

ผล : การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน พบเชื้อและสารพันธุกรรมของเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีน แต่ไม่พบเชื้อชนิดอื่น การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางอุณหภูมิ ค่า PCV และไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ของโคที่ทำการทดสอบทั้ง 2 ตัว และการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน หลังการฉีดวัคซีนพบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. bigemina* และ เชื้อ *A. marginale* ในโคกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีค่าสูงกว่าค่า cut off ในขณะที่กลุ่ม

ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนต่ำกว่าค่า cut off ในโคที่ฉีดเชื้อพิษหัด ทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางอุณหภูมิ ($p>0.05$) แต่มีการลดลงของค่า PCV ($p<0.05$) โดยค่าทั้งหมดยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ เว้นแต่ในโคที่ไม่ได้รับวัคซีนและฉีดเชื้อพิษหัดด้วย *B. bigemina* พบว่าค่า PCV อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าปกติ ส่วนอาการทางคลินิกพบว่าโคที่ฉีดวัคซีนไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในขณะที่โคกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนแสดงอาการซึม เยื่อเมือกซีด เบื่ออาหาร และปัสสาวะสีเข้มขึ้น

สรุป : ทั้งนี้พบว่าวัคซีนชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้โคนมสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคไข้เห็บโคสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

คำสำคัญ : โรคไข้เห็บโค, *Babesia*, *Anaplasma*, วัคซีน, โคนม

บทนำ

โรคไข้เห็บโค (tick fever diseases) เกิดจากการติดพยาธิในเม็ดเลือดโค ได้แก่ เชื้อ *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *Theileria* spp. and *Ehrlichia ruminantium*. พบได้ทั่วโลก โดยพบการระบาดรุนแรงในเขตร้อน สำหรับประเทศไทย โรคในกลุ่มนี้ทำให้โคเสียชีวิต ได้แก่ โรค Babesiosis เกิดจากการติดเชื้อ *B. bigemina*, *B. bovis*. นำโดยเห็บ *Rhipicephalus microplus* และโรค Anaplasmosis ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *A. marginale* นำโดยเห็บ *Rhipicephalus microplus* แมลงดูดเลือดและอุปกรณ์อื่น ๆ ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคไข้เห็บโคในฟาร์มโคนมต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ อาการที่เกิดขึ้นจากโรคทั้งสอง ได้แก่ ซึม ไข้สูง โลหิตจางอย่างรุนแรง เบื่ออาหาร โดยทั่วไปโคนมที่ติดเชื้อ *B. bigemina* จะพบฮีโมโกลบินในปัสสาวะ ส่วนโคนมที่ติดเชื้อ *B. bovis* จะพบอาการทางประสาท (OIE, 2018) และโคนมที่ติดเชื้อ *A. marginale* จะเกิดอาการโลหิตจางอย่างรุนแรง ไข้สูง น้ำนมลด และทำให้ถึงตายได้ (Soulsby, 1982) แม้โรคนี้สามารถรักษาได้โดยการใช้ยา แต่เมื่อแสดงอาการแล้ว อาจรักษาได้ไม่ทันเวลาที่ ดังนั้นการป้องกันโรคจึงมีความสำคัญ หนึ่งในมาตรการป้องกันโรค ได้แก่ การทำวัคซีน (Taylor et al., 2007) เชื้อ *Babesia* spp.

สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ได้ เช่น เชื้อ *B. bigemina* สายพันธุ์ที่พบในประเทศออสเตรเลียจะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสายพันธุ์แอฟริกาใต้ (de Vos *et al.*, 1982b) และเชื้อ *B. bovis* สายพันธุ์ที่พบในประเทศออสเตรเลียสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสายพันธุ์ทวีปอเมริกาใต้ (Bock and de Vos, 2001) และแอฟริกาใต้ (de Vos *et al.*, 1982a) แต่สำหรับเชื้อ *Anaplasma* spp. จะแตกต่างกันออกไป โดยเชื้อ *A. marginale* จะกระตุ้นให้โคเกิดภูมิคุ้มกันต่อสายพันธุ์เดียวกันเท่านั้น (Bock and de Vos, 2001) ในขณะที่ *A. centrale* สามารถกระตุ้นให้โคสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *A. marginale* ได้ (Callow, 1984; Bock and de Vos, 2001) สำหรับการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้หัดโคได้มีการพัฒนาโดยตลอดจนกระทั่งในปี 2010 จึงมีการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดโคชนิดเชื้อเป็นแช่แข็งที่ลดความรุนแรงลง (frozen live attenuated vaccine) ประกอบด้วยเชื้อไข้หัดโค 3 ชนิด ได้แก่ *B. bigemina* *B. bovis* และ *A. centrale* ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศต่าง ๆ เช่น ออสเตรเลีย แอฟริกาใต้ อาร์เจนตินา บราซิล และอูรุกวัย (Montenegro-James *et al.*, 1992) ในประเทศไทยพบการระบาดของพยาธิในเม็ดเลือดโคได้แก่ *B. bigemina* และ *A. marginale* ในระดับค่อนข้างมาก ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจสูง (เบญจพร และคณะ, 2561) ดังนั้น การทำวัคซีนเพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน จึงเป็นมาตรการหนึ่งที่น่าสนใจในการป้องกันโรคไข้หัดโคในฟาร์ม อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่มีการผลิตวัคซีนใช้เอง หากต้องการใช้วัคซีนดังกล่าวจะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงต้องนำวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ โดยก่อนการนำวัคซีนมาใช้จำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในด้านของความคุ้มโรคไข้หัดโคต่อสายพันธุ์ท้องถิ่นก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนไข้หัดโคในโคนม เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณา นำวัคซีนไปใช้ในการวางแผนป้องกันโรคไข้หัดโคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง โคนมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเซียน อายุ 3 เดือน สุขภาพแข็งแรง จำนวน 16 ตัว นำมาเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ อาหารที่ได้รับ ได้แก่ อาหารชั้นหญ้าสด และน้ำตามต้องการ การศึกษาในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ เลขที่การใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ EA 010/61 (R) และ EA 011/61 (R)

วัคซีน วัคซีนเชื้อเป็นชนิดแช่แข็งที่ลดความรุนแรงลง (frozen live attenuated vaccine) ได้รับมาจากศูนย์วิจัยโรคไข้หัดโค ประเทศออสเตรเลีย โดยวัคซีนผลิตจากเชื้อไข้หัดโค 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *B. bigemina* สายพันธุ์ G เชื้อ *B. bovis* สายพันธุ์ Dixie และเชื้อ *A. centrale* สายพันธุ์ Onderstepoort ในขนาด 1 โดส (2 มิลลิลิตร) ประกอบไปด้วย *B. bigemina* 2.5×10^6 parasites *B. bovis* 1×10^7 parasites และเชื้อ *A. centrale* 1×10^7 parasites

เชื้อพิษหัด เชื้อ *B. bigemina* สายพันธุ์ท้องถิ่น และเชื้อ *A. marginale* สายพันธุ์ท้องถิ่น ได้มาจากโคนมในจังหวัดนครราชสีมา การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถเก็บเชื้อ *B. bovis* สายพันธุ์ท้องถิ่นได้ เนื่องจากระยะเวลาตั้งแต่พบเชื้อในกระแสเลือดจนโคตายมีเวลาสั้นเพียง 1-2 วัน และเชื้อปรสิตชนิดนี้จะตายทันทีเมื่อโคตาย

การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน เป็นการนำวัคซีนมาตรวจหาเชื้อและสารพันธุกรรมของเชื้อที่ใช้ผลิตวัคซีนและชนิดอื่นที่อาจปนเปื้อนอยู่ในวัคซีน และเชื้อชนิดอื่น ได้แก่ *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *Trypanosoma* spp., *Theileria* spp. และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ โดยวิธี stained thin smear, polymerase chain reaction (PCR) (OIE, 2018) และการเพาะเชื้อแบคทีเรีย (Carter and Cole, 1990)

การทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน โดยฉีดวัคซีนในขนาดตามที่ผู้ผลิตกำหนด ในโคนมจำนวน 2 ตัว วัดอุณหภูมิร่างกาย เจาะเลือดเพื่อหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume; PCV) และสังเกตอาการที่ผิดปกติทางคลินิก เช่น มีไข้ กระวนกระวาย ซึม เบื่ออาหาร เป็นต้น วันเว้นวัน นาน 8 สัปดาห์

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน ก่อนฉีดวัคซีน เก็บซีรัมโคนมทั้ง 14 ตัว เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของเชื้อ *B. bigemina* และ เชื้อ *A. marginale* โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) ด้วยชุดทดสอบ Svanovir® (Sweden) ซึ่งเป็นการตรวจจับ IgG (IgG-ELISA) สำหรับชุดทดสอบ

Svanovir® *B. bigemina*-Ab เป็นชุดทดสอบที่ใช้ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของเชื้อ *B. bigemina* มีค่า sensitivity $\geq 96\%$ และค่า specificity $\geq 97.5\%$ (Svanovir, 2008a) สำหรับชุดทดสอบ Svanovir® *A. marginale*-Ab เป็นชุดทดสอบที่ใช้ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของเชื้อ *A. marginale* มีค่า sensitivity และค่า specificity $> 90\%$ (Svanovir, 2008b) จากนั้นฉีดวัคซีนให้โคจำนวน 10 ตัว ในขนาดตามที่ผู้ผลิตกำหนด และมีกลุ่มของโคที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนจำนวน 4 ตัว หลังจากนั้น 8 สัปดาห์ เก็บซีรัมโคทั้ง 14 ตัว เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของเชื้อทั้งสองชนิดอีกครั้ง

การอ่านและการแปลผลของ IgG-ELISA นำค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ได้จากปฏิกิริยา IgG-ELISA (Svanovir®, Sweden) ที่ช่วงความยาวคลื่น 405 nm มาเขียนกราฟแสดงค่า OD ในโคกลุ่มที่ฉีดวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน ก่อนและหลังการฉีดวัคซีนต่อเชื้อ *B. bigemina* และ *A. marginale* และหาค่า cut off เพื่อนำมาใช้ประกอบการวิเคราะห์ข้อมูล คำนวณได้จากค่าเฉลี่ย บวกด้วย 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ OD ในโคกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน หรือ $\bar{X} + 3 SD$ (Salih *et al.*, 2009)

การฉีดเชื้อพิษหีบ ทำการวัดอุณหภูมิร่างกาย และเจาะเลือดโคทั้ง 14 ตัว เพื่อหาค่า PCV ก่อนการฉีดเชื้อพิษหีบในโค โดยฉีดเข้าเส้นเลือด แบ่งเป็นฉีดเชื้อ *B. bigemina* 5×10^8 parasites ต่อ 2 มิลลิลิตร (de Vos *et al.*, 1982b) ในโคกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 5 ตัว และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน 2 ตัว และฉีดเชื้อ *A. marginale* 7.6×10^7 parasites ต่อ 2 มิลลิลิตร (Bock and de Vos, 2001) ในโคกลุ่มที่ฉีดวัคซีน 5 ตัว และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน 2 ตัว วัดอุณหภูมิร่างกาย และเจาะเลือดโคทั้ง 14 ตัว เพื่อนำมาหาค่า PCV ก่อนการฉีดเชื้อพิษหีบ และหลังการฉีดเชื้อพิษหีบ 4 สัปดาห์ นอกจากนี้สังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นทุกวัน ได้แก่ มีไข้ กระวนกระวาย เบื่ออาหาร และปัสสาวะสีเข้ม เป็นต้น

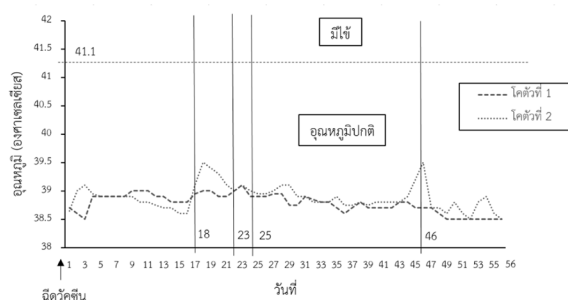
การวิเคราะห์ผลการฉีดเชื้อพิษหีบด้วยสถิติ นำค่าอุณหภูมิร่างกาย และค่า PCV ก่อนการฉีดเชื้อพิษหีบ และ 4 สัปดาห์หลังการฉีดเชื้อพิษหีบ มาคำนวณทางสถิติ Paired t-test เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*-value)

ผลและวิจารณ์

ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน ตรวจพบเชื้อ *B. bigemina*, *B. bovis* และ *A. centrale* ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในวัคซีน และไม่พบการปนเปื้อนของ *A. marginale*, *Trypanosoma* spp. และ *Theileria* spp. โดยวิธี stained thin smear และ PCR รวมถึงไม่พบเชื้อแบคทีเรียใด ๆ จากการเพาะเชื้อ ซึ่งบ่งบอกว่าวัคซีนมีความบริสุทธิ์

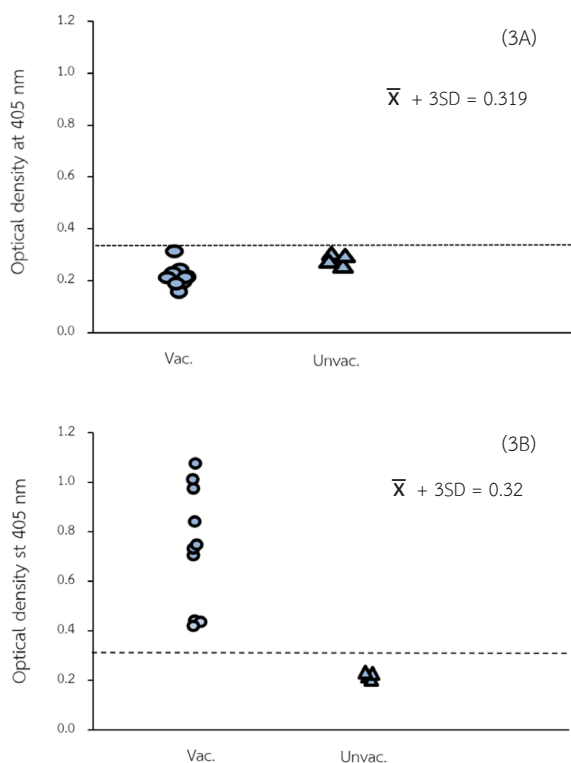
ผลการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน จากการวัดค่าอุณหภูมิร่างกายของโคทั้ง 2 ตัวตลอดการทดสอบตามรูปที่ 1 พบว่าโคทั้ง 2 ตัว มีอุณหภูมิสูงขึ้นในวันที่ 18 และวันที่ 23 หลังฉีดวัคซีน โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้จะลดลงจนเป็นปกติในวันที่ 25 หลังฉีดวัคซีน ทั้งนี้อธิบายได้ว่าเมื่อโคได้รับเชื้อ *B. bigemina* จะแสดงอาการหลังได้รับเชื้อประมาณ 2-3 สัปดาห์ (OIE, 2013) ซึ่งอุณหภูมิร่างกายที่สูงขึ้นนี้ยังไม่ถึงเกณฑ์ที่ผิดปกติ ตามมาตรฐานของโคที่มีสุขภาพดี โดยอุณหภูมิของโคเป็นไข้คือ 41.1°C (Barz, 2010) และอุณหภูมิร่างกายที่สูงขึ้นจะคงอยู่นานประมาณ 1 สัปดาห์ (Soulsby, 1982) นอกจากนี้ พบว่าโคตัวที่ 2 มีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นถึง 39.2°C ในวันที่ 46 หลังฉีดวัคซีน แต่ได้ลดลงในวันที่ 48 อาจเป็นผลจากการโคนมดังกล่าวมีการติดเชื้อมีแทรกซ้อน เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวโคแสดงอาการถ่ายเหลวร่วมด้วย

ผลการวัดค่า PCV ตามรูปที่ 2 พบว่าค่า PCV ของโคทั้ง 2 ตัวลดลงในวันที่ 18 (26.5% และ 26% ตามลำดับ) แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์ปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 24 - 46% (Navaree, 2007; Ramin *et al.*, 2012) ทั้งนี้ การติดเชื้อ *B. bigemina* จะทำให้ ค่า PCV ลดลงใน 2 สัปดาห์แรกหลังได้รับเชื้อ (Soulsby, 1982) นอกจากนี้ พบว่าโคทั้ง 2 ตัวมีค่า PCV ลดลง และมีอาการโลหิตจางอย่างรุนแรงในวันที่ 47 หลังการฉีดวัคซีน (22% และ 20% ตามลำดับ) ซึ่งถือว่าต่ำกว่าปกติ เกิดจากเชื้อ *Anaplasma* spp. ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อนี้ทำให้ค่า PCV ของโคลดลงในวันที่ 14-42 หลังได้รับเชื้อ (Brandt, 2009) อย่างไรก็ตาม ค่า PCV ที่พบลดลงนี้จะกลับสูงขึ้นจนอยู่ในเกณฑ์ปกติในวันที่ 55 หลังการฉีดวัคซีน นอกจากนี้ ไม่พบอาการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ ของโคทั้ง 2 ตัวระหว่างการทดลอง จากผลการทดสอบดังกล่าว บ่งชี้ว่าวัคซีนชนิดนี้มีความปลอดภัย

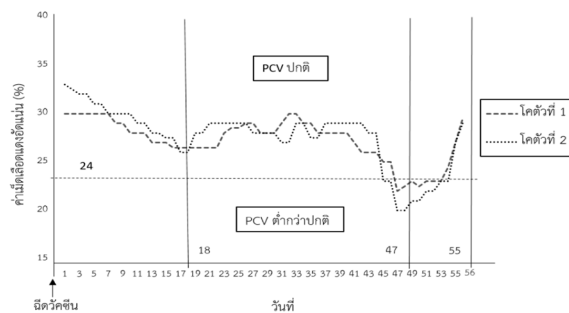


รูปที่ 1 ค่าแอนติบอดีร่างกายของโคตลอดการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในโคจำนวน 2 ตัว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน จากรูปที่ 3 และ 4 พบว่า การทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. bigemina* และ *A. marginale* ด้วย IgG-ELISA โดยดูจากค่า OD พบว่า ก่อนการฉีดวัคซีนโคทั้ง 14 ตัวมีค่า OD ต่ำกว่าค่า cut off ที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งเท่ากับ 0.319 (รูปที่ 3A) และ 0.341 (รูปที่ 4A) ตามลำดับ แสดงว่าโคทุกตัวที่ทำการศึกษาไม่มีแอนติบอดีในระดับที่สามารถป้องกันโรคได้ เมื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. bigemina* และ *A. marginale* ในโค 10 ตัวที่ได้รับการฉีดวัคซีนไปแล้ว 8



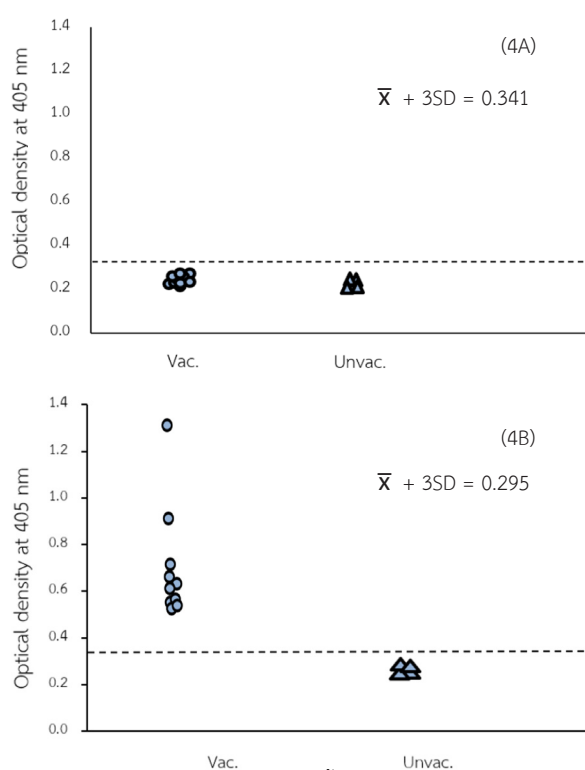
รูปที่ 3 ค่า OD จาก IgG-ELISA ต่อเชื้อ *B. bigemina* ของโค 14 ตัว (A) ก่อนการฉีดวัคซีน (B) หลังฉีดวัคซีน 8 สัปดาห์ (Vac. = กลุ่มที่ฉีดวัคซีน 10 ตัว; Unvac. = กลุ่มที่ไม่ฉีดวัคซีน 4 ตัว)



รูปที่ 2 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ตลอดการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในโคจำนวน 2 ตัว

สัปดาห์ พบว่าค่า OD สูงกว่าค่า cut off ซึ่งเท่ากับ 0.32 (รูปที่ 3B) และ 0.295 (รูปที่ 4B) ตามลำดับ แสดงว่าวัคซีนที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถกระตุ้นให้โคสร้างภูมิคุ้มกันได้ ส่วนโคที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนทั้ง 4 ตัว มีค่า OD ต่ำกว่าค่า cut off ทั้งหมด (รูปที่ 3B และ 4B) แสดงว่าโคที่ไม่ได้ฉีดวัคซีนไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้

ผลการทดสอบหลังจากการฉีดเชื้อพิษหัดให้ตามตารางที่ 1 พบว่า โคกลุ่มที่ฉีดวัคซีน และฉีดเชื้อพิษหัดทั้ง 2 ชนิด มีอุณหภูมิร่างกายไม่เปลี่ยนแปลง ($p > 0.05$)



รูปที่ 4 ค่า OD จาก IgG-ELISA ต่อเชื้อ *A. marginale* ของโค 14 ตัว (A) ก่อนการฉีดวัคซีน (B) หลังฉีดวัคซีน 8 สัปดาห์ (Vac. = กลุ่มที่ฉีดวัคซีน 10 ตัว; Unvac. = กลุ่มที่ไม่ฉีดวัคซีน 4 ตัว)

ตารางที่ 1 แสดงอุณหภูมิร่างกายและค่า PCV ของโควันที่ยึดเชื้อพิษทัพบ และสัปดาห์ที่ 4 หลังยึดเชื้อพิษทัพบ

โค	กลุ่ม	จำนวน	ค่าที่วัดได้			
			อุณหภูมิ (°C)		PCV (%)	
			ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
โคที่ยึดวัคซิ่น	ยึดเชื้อพิษทัพบ <i>B. bigemina</i>	5	39.56 ± 0.29	39.38 ± 0.34	32.7 ± 2.39	27.2 ± 1.79
	ยึดเชื้อพิษทัพบ <i>A. marginale</i>	5	39.56 ± 0.64	39.7 ± 0.60	31.4 ± 1.67	27.2 ± 2.17
โคไม่ได้ยึดวัคซิ่น	ยึดเชื้อพิษทัพบ <i>B. bigemina</i>	2	39.5 ± 0.14	39.25 ± 0.64	34.5 ± 3.54	22 ± 2.83
	ยึดเชื้อพิษทัพบ <i>A. marginale</i>	2	39.7 ± 0.14	39.65 ± 0.21	32.5 ± 3.54	25.25 ± 3.89

หมายเหตุ ค่าปกติของอุณหภูมิร่างกายคือ 38.6 - 41.1 °C และ PCV คือ 24 - 46%

โดยค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ปกติ (Barz, 2010) และมีค่า PCV ลดลง ($p < 0.05$) แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์ปกติ (Navaree, 2007) ส่วนโคกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ยึดวัคซิ่นและยึดเชื้อพิษทัพบทั้ง 2 ชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิร่างกาย ($p > 0.05$) และมีการลดลงของค่า PCV ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน แต่ในโคกลุ่มที่ไม่ได้ยึดวัคซิ่นและยึดเชื้อพิษทัพบ *B. bigemina* มีการลดลงของค่า PCV ต่ำกว่าเกณฑ์ปกติ (ค่า PCV เท่ากับ 22 ± 2.83 %) แสดงว่าเชื้อ *B. bigemina* ไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างมาก ส่งผลให้เกิดอาการโลหิตจางสำหรับกลุ่มที่ไม่ได้ยึดวัคซิ่นที่ยึดเชื้อพิษทัพบ *A. marginale* มีค่า PCV ลดลง แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่า *A. marginale* ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเช่นเดียวกัน แต่ไม่รุนแรงเท่า *B. bigemina* สำหรับการสังเกตอาการทางคลินิกในโคที่ยึดวัคซิ่นและได้รับเชื้อพิษทัพบ ไม่พบอาการที่ผิดปกติ แต่ในโคกลุ่มที่ไม่ได้ยึดวัคซิ่นและได้รับเชื้อพิษทัพบมีอาการผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด โดยพบอาการซึม เยื่อเมือกซีด เบื่ออาหาร และปัสสาวะสีเข้มขึ้น จากผลการทดสอบดังกล่าว บ่งชี้ว่า วัคซิ่นชนิดนี้มีความคุ้มโรคต่อเชื้อ *B. bigemina* และเชื้อ *A. marginale* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบวัคซิ่นป้องกันโรคไข้เห็บโคชนิดเชื้อเป็นที่ลดความรุนแรงลงที่ได้รับมาจากศูนย์วิจัยโรคไข้เห็บโค ประเทศออสเตรเลียในครั้งนี้ พบว่ามีความบริสุทธิ์ปลอดภัย และสามารถกระตุ้นให้โคสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. bigemina* และ *A. marginale* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยได้ อย่างไรก็ตามการใช้วัคซิ่นชนิดเชื้อเป็นที่ลดความรุนแรงลงนี้อาจมีความเสี่ยงต่อการที่เชื้อจะกลับมารุนแรงได้อีก และอาจแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฟาร์มโชคชัย อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกตลอดการทดลองในด้านโคทดลองและอาหารสัตว์ ศูนย์วิจัยโรคไข้เห็บโคประเทศออสเตรเลียที่อนุเคราะห์วัคซิ่นป้องกันโรคไข้เห็บโค สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่จัดสรรงบประมาณในการดำเนินงาน เจ้าหน้าที่ของฟาร์มโชคชัยและเจ้าหน้าที่ของกลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันสุขภาพสัตว์ที่ให้ความร่วมมือด้วยดี รศ.ดร.พารณ ดีคำย่อย ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เจ้าหน้าที่ของกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเหลือในการเก็บและตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ (งานวิจัยนี้ทำภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างกรมปศุสัตว์และฟาร์มโชคชัย)

เอกสารอ้างอิง

- เบญจพร ฤทธิสุทธิ ประยุทธ แซ่ไคว่ และกรรณิการ์ ณ ลำปาง. 2561. การตรวจหาปรสิตในเลือดโคพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ ภายใต้โครงการเฝ้าระวัง และควบคุมโรคระบาดสัตว์ที่ติดต่อถึงคน. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 35 (2): 32-45.
- Barz, D. 2010. "Vet's Voice: Monitor cattle temperature for health." [Online]. Available : <https://www.tsln.com/news/vets-voice-monitor-cattle-temperature-for-health/>. [4 August 2019].
- Bock, R. and de Vos, A.J. 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J.* 79 (12): 832-839.
- Brandt, J. 2009. "Bovine Anaplasmosis : EAZW Transmissible Disease Fact Sheet No. 68." [Online]. Available : <https://cdn.ymaws.com/www.eazwv.org/resource/resmgr/Files/>

- Transmissible_Diseases_Handbook/Fact_Sheets/068_Anaplasmosis_(Bovine).pdf. [4 August 2019].
- Callow, L.L. 1984. Arthropod-borne rickettsias of the blood. In: Protozoal and Rickettsial Diseases. Animal Health in Australia Vol. 5. Australia Bureau of Animal Health. Australian Government Publishing Service, Canberra. pp. 200-201.
- Carter, G.R. and Cole, J.R.Jr. 1990. Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology. 5th eds. Academic Press, Inc. Sandiego, California, USA. 620 pp.
- de Vos, A.J., Bessenger, R. and Fourie, C.G. 1982a. Virulence and heterologous strain immunity of South African and Australian *Babesia bovis* strains with reduced pathogenicity. *Onderstepoort J Vet Res.* 49: 133-136.
- de Vos, A.J., Combrink, M.P. and Bessenger, R. 1982b. *Babesia bigemina* vaccine: Comparison of the efficacy and safety of Australian and South African strains under experimental conditions in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 29: 155-158.
- Montenegro-James, S., Toro, M., Leon, E., Guillen, A.T., Lopez, R. and Lopez, W. 1992. Immunization of cattle with an inactivated polyvalent vaccine against anaplasmosis and babesiosis. *Ann NY Acad Sci.* 653: 112-121.
- Navaree, C. 2007. "Blood work: revelations, limitations of cattle." [Online]. Available : <http://veterinarynews.dvm360.com/blood-work-revelations-limitations-cattle>. [15 June 2019].
- World Organization for Animal Health (OIE). 2013. "Bovine babesiosis." [Online]. Available : https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE_BABESIOSIS.pdf. [27 August 2019]
- World Organization for Animal Health (OIE). 2018. "Chapter 3.4.2 Bovine Babesiosis." [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.02_BABESIOSIS.pdf. [29 June 2019].
- Ramin, A.G., Asri-Rezaei, S., Paya, K, Eftekhari, Z., Jelodary, M., Akbari, H. and Ramin, S. 2012. "Evaluation of anemia in cattle up to 4 months of age in Holstein Dairy herds." [Online]. Available : <http://www.vetscan.co.in/v7n1/Evaluation-of-Anemia-in-Cattle-up-to-4-Months-of-Age-in-Holstein-Dairy-Herds.pdf>. [27 August 2019].
- Salih, D., Abdel Rahman, M.B., Mohammed, A.S., Ahmed, R., Kamal, S. and El Hussein, A.M. 2009. Seroprevalence of tick-borne diseases among cattle in the Sudan. *Parasitol Res.* 104: 845-850.
- Soulsby, E.J.L. 1982. *Babesia bigemina*. In: Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th eds. Bailliere Tindall publication, London, England. pp. 712-715.
- Svanovir. 2008a. "The ELISA for screening exposure to *Babesia bigemina*." [Online]. Available : https://www.svanova.com/content/dam/internet/ah/svanova/dk_EN/documents/bovine/B.Bigemina_Infosheet_V2.pdf. [30 June 2019].
- Svanovir. 2008b. "Identifying *Anaplasma marginale* in cattle populations." [Online]. Available : https://www.svanova.com/content/dam/internet/ah/svanova/dk_EN/documents/bovine/A.Marginale_Infosheet_V2.pdf. [30 June 2019].
- Taylor, M.A., Coop, R.L. and Wall, R.L. 2007. Veterinary Parasitology. 3rd eds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp. 113-114; 157.