Case study : Study on Suspected virulent strain of isolated FMDV, O/ME-SA/Ind-2001e Lineage, Outbreak in Prachuap Khiri Khan and Saraburi Province, Thailand, 2022

Nalinee Hongchumpon[1], Kingkarn Boonsuya Seeyo[1], Jeeranant Chottikamporn[1],
Nuttakarn Suwankitwat[2], Taweewat Deemagarn[2] and Janya Samanit[1]

Abstract

This study aimed to investigate the characteristics of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) belonging to the O/ME-SA/Ind-2001e lineage, which was isolated from outbreaks in Prachuap Khiri Khan and Saraburi provinces in 2022. The findings were intended to serve as a reference for monitoring potential future changes in viral properties. Four virus isolates were confirmed as FMDV serotype O using the ELISA serotyping method. Molecular analysis identified all four isolates as belonging to the O/ME-SA/Ind-2001e lineage, with nucleotide sequence similarities of 97.00 – 98.10 % to the RRL reference FMDV strain. Vaccine matching test demonstrated that the serotype O vaccine strain produced by the government showed a good match with the field isolates, suggesting that the current vaccine is likely effective in preventing the field virus in these outbreaks.

Furthermore, preliminary findings indicated that the virus samples obtained from deceased adult dairy cattle during the 2022 outbreaks in Prachuap Khiri Khan and Saraburi provinces may represent a virulent strain of FMDV. These results provide fundamental insights into the viral properties of the outbreak strain. Further studies focusing on the genetic determinants of virulence are recommended to enhance understanding of highly virulent strains and to support the development of effective prevention and control strategies.

Keywords: Foot-and-Mouth disease virus virulence O/ME-SA/Ind-2001e

[1]Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth disease in Southeast Asia, Pak Chong, Nakhonratchasima, 30130

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

Received:

Revised:

Accepted:

กรณีศึกษา : การศึกษาความรุนแรงและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดสระบุรี ปี 2565

นลินี หงษ์ชุมพล[1] กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย[1] จีรนันท์ โชติทิฆัมพร[1] ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์[2]
ทวีวัฒน์ ดีมะการ[2] จรรยา สมานิตย์[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี ปี 2565 และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ในอนาคต โดยนำตัวอย่างเชื้อไวรัสที่เก็บจากโคนมที่ป่วยและตายในการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ปี 2565 จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง มาตรวจทางห้องปฏิบัติการผลการตรวจหาและจำแนกเชื้อด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O และพบสารพันธุกรรมเชื้อ FMDV ด้วยวิธี real time RT-PCR การทดสอบเพื่อดูความรุนแรงของเชื้อ FMDV ในเซลล์ BHK-21 ด้วยวิธี plaque assay พบว่าไวรัสที่ได้เกิด Cytopathic effect ระดับ 50% ชั่วโมงที่ 30 และ 100% ชั่วโมงที่ 48 ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ยืนยันเป็นซีโรไทป์ O โทโปไทป์ Middle East-South Asia (O/ME-SA) สายพันธุ์ย่อย Ind-2001e มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบกับไวรัสอ้างอิงของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สายพันธุ์ O/ME-SA/ Ind-2001e เท่ากับ 97.00 - 98.10% เมื่อทดสอบ vaccine matching โดยเทียบกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ พบว่าทุกตัวอย่างให้ผล good matching แสดงให้เห็นว่าไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ยังคงให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสรุปเบื้องต้นได้ว่าเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากโคตายของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีในการศึกษานี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ FMDV สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่มีความรุนแรงมากขึ้น และช่วยประกอบการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรค รวมถึงเตรียมความพร้อมในการการปรับมาตรการควบคุม ป้องกันโรคที่เหมาะสมในอนาคต

คำสำคัญ: ไวรัสปากและเท้าเปื่อย ความรุนแรง O/ME-SA/Ind-2001e

[1]ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
[2]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดรุนแรงในสัตว์กีบคู่ ที่กำหนดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 เกิดจากเชื้อ foot and mouth disease virus (FMDV) ซีโรไทป์ที่พบการระบาดในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ซีโรไทป์โอ (O) เอ (A) และเอเชียวัน (Asia1) ซึ่งซีโรไทป์ Asia1 ไม่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2541 (ร่มพฤกษ์และวิไล, 2549) อาการสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยจะมีไข้สูง ซึม น้ำลายไหล เกิดตุ่มใสที่ลิ้น เหงือก ช่องปาก กีบ เต้านม กินอาหารไม่ได้ เดินขากะเผลก การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้เพื่อจำแนกและยืนยัน เชื้อไวรัสทำได้หลายวิธี เช่น ELISA typing, Virus isolation, Polymerase chain reaction (PCR), sequencing เป็นต้น เนื่องจากเชื้อ FMDV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด Ribonucleic acid (RNA) ที่มีความแปรปรวนสูงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงพบสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง (ร่มพฤกษ์, 2564) มีรายงานการระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001 พบระบาดครั้งแรกที่อินเดีย พ.ศ. 2544 แล้วแพร่กระจายไปทั่วโลก (Hemadri *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของสายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/Ind-2001d และ O/ME-SA/Ind-2001e ในภูมิภาคแอฟริกาเหนือ เอเชียตะวันออกกลางและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bachanek-Bankowska *et al*., 2018) การติดเชื้อ FMDV มีความรุนแรงค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปในโคมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 100% แต่พบอัตราการตายเพียง 0.2-5% เท่านั้น (กรมปศุสัตว์, 2566) โดยสัตว์ที่ตายส่วนใหญ่พบเป็นลูกสัตว์ซึ่งตายจากการติดเชื้อและมักพบกล้ามเนื้อหัวใจตายมีลักษณะวิการที่เรียกว่า tiger heart (Islam *et al*., 2017) ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ FMDV ชนิดรุนแรงและไม่รุนแรงใช้วิธี plaque assay โดยเพาะไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและย้อมสีเพื่อดูการเกิด cytopathic effect (CPE) ในเซลล์เพาะเลี้ยง ไวรัสสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงจะพบการเกิด plaque ที่มีบริเวณกว้างและมีความชัดเจนกว่าสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (Morioka *et al*., 2008) และการเปรียบเทียบความรุนแรงระหว่างเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะการหดตัวของเซลล์ Baby Hamster Kidney (BHK) หลังเพาะไวรัส (Qureshi *et al*., 2022)

ในประเทศไทยพบระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ตั้งแต่ปี 2561 ในจังหวัดแถบภาคตะวันตกและภาคใต้ ในปัจจุบันพบระบาดทั่วทุกภาคของประเทศ จากข้อมูลการตรวจวินิจฉัยในปี 2565 ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) ได้รับตัวอย่างจากท้องที่เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยจำนวน 314 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O จำนวน 162 ตัวอย่าง (51.59%) ซีโรไทป์ A จำนวน 45 ตัวอย่าง (14.33%) ไม่พบเชื้อจำนวน 31 ตัวอย่าง (9.87%) และไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ จำนวน 76 ตัวอย่าง (24.20%) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี เป็นจังหวัดที่พบการระบาดของซีโรไทป์ O และจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing เป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ซึ่งการระบาดของทั้งสองจังหวัดนี้มีโคนมโตเต็มวัยป่วยและตาย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความรุนแรงและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์โอ สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่ระบาดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรี ในปี 2565 และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสปากและเท้าเปื่อย

ตัวอย่างเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยจากโคนมจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 ตัวอย่าง และจากจังหวัดสระบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดได้ตรวจจำแนกเป็นซีโรไทป์ O สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e นำมาเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม บ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงเกิด CPE ประมาณ 80% แยกเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โดยแช่แข็ง

เซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 รอบ นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

การตรวจหาและจำแนกเชื้อ FMDV ด้วยวิธี ELISA typing

ใช้ rabbit trapping antibody ที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) เตรียมขึ้นเอง ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 โดยในแต่ละซีโรไทป์ ใช้ความเข้มข้นที่ 1:5,000 นำมาเคลือบหลุมของ ELISA plate ชนิด 96 หลุม (Thermo Scientific, Denmark) วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (หรือเก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS) เตรียมสารละลายแอนติเจนควบคุม (control antigen) และสารละลายน้ำเลี้ยงไวรัส โดยเติมลงใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแอนติเจนควบคุมแบบ 5-fold serial dilution ไป 3 dilution หยอดลงใน ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่า ในตู้บ่มเชื้อนาน 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติม guinea pig detecting antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ที่จะตรวจ โดยใช้ความเข้มข้นตามที่ได้ดำเนินการ titration ก่อนนำมาดำเนินการทดสอบ จากนั้นวาง ELISA plate ลงบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate (DAKO, Germany) หลุมละ 50 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงล้าง ELISA plate 7 ครั้ง แล้วเติม 0.01% tetramethylbenzidine substrate (TMB substrate) (Sigma-Aldrich, USA) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม stop solution (1M H_2SO_4) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate แล้วจึงนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (VersaMax, China) การรายงานผลเป็นไม่พบเชื้อหรือพบเชื้อและระบุเป็นซีโรไทป์ของเชื้อ

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี real-time Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR)

ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยสกัด RNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Omega, USA) เตรียม master mix จากนั้นเติม RNA product ที่สกัดได้ 5.0 µl ลงใน master mix ที่หยอดในหลุม multi-well plate นำ plate เข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler 480, Roche Diagnostic, Germany) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1) Reverse transcription อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

2) Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ

3) Denature and annealing อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ

4) Elongation อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ

การรายงานผล เป็นบวก (positive) หรือลบ (negative) โดยพิจารณาจากค่า Ct (จาก 45 รอบ)

- ค่า Threshold (Ct) ต่ำกว่า 40 รายงานเป็นบวก
- ค่า Threshold (Ct) สูงกว่า 41 หรือไม่สามารถวัดค่า Ct ได้ รายงานเป็นลบ
- ค่า Threshold (Ct) อยู่ในช่วง 40-41 ไม่สามารถสรุปผลได้ (inconclusive) หรือผลไม่แน่ชัด

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี nucleotide sequencing ส่วนยีน VP1

นำตัวอย่างเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่ได้ผ่านการเพาะแยกเชื้อไวรัสมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) โดยการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Omega, USA) และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน VP1 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ผสมกับน้ำยา master mix สำเร็จรูป Light Cycler Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) เพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง thermocycler (Bio-Rad, USA) จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) แล้วจึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ NK72; (Sequence 5'-3': GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC) จากนั้นกำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up kit (Zymo research corporation, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วนำไปหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole genome sequencing, WGS) ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS)

นำ DNA library ของตัวอย่างเชื้อ FMDV แต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 4 nM ด้วย resuspension buffer (Illumina, USA) จากนั้นนำ DNA library ที่เจือจางแล้ว ตัวอย่างละ 5 µl มาใส่ผสมรวมกันในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำ DNA library ที่ผสมเข้ากันแล้วปริมาตร 5 µl มาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากัน เพื่อทำให้ DNA library แยกเป็น DNA สายเดี่ยว (denature) นำ DNA library ที่เป็นสายเดี่ยวแล้วมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 16 pM ด้วย hybridization buffer (Illumina, USA) แล้วเติม PhiX control (Illumina, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นดูด DNA library ปริมาตร 600 µl ใส่ลงในกล่องชุดน้ำยา MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles) (Illumina, USA) แล้วนำกล่องไปใส่ในเครื่อง next-generation sequencer ยี่ห้อ Illumina รุ่น MiSeq (Illumina, USA) เพื่อตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมด้วยเทคนิค NGS โดยใช้วิธี paired-end sequencing (2x151bp) นำข้อมูลลำดับนิวคลีไทด์ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่อง next-generation sequencer ซึ่งอยู่ในไฟล์นามสกุล fastq มาประเมินคุณภาพของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม FastQC เวอร์ชัน 0.11.9 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) จากนั้นใช้โปรแกรม Geneious เวอร์ชัน 9.1.8 (Biomatters Ltd., New Zealand) ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีไทด์เพื่อประกอบเป็นจีโนม (genome assembly) ด้วยวิธี De novo assembly โดยใช้ Geneious assembler ร่วมกับวิธี map to reference assembly โดยใช้ Geneious mapper และวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนบนจีโนม (genome annotation) ด้วยวิธี transfer annotation จาก reference genome

การตรวจคุณสมบัติของไวรัสปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี Plaque assay

เพาะเซลล์ BHK-21 ในเพลทพลาสติกชนิด 96 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum 5% บ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80-100% เจือจางไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง และไวรัสควบคุมบวก ให้เป็น 1:8 ทุกตัวอย่าง จากนั้นเพาะในเซลล์หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์และชั่วโมงการเกิด CPE ที่ 24 ชั่วโมง 30 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง และบันทึกภาพถ่ายของเซลล์แต่ละตัวอย่างที่ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Olympus) จากนั้น fix cell ด้วย 4% paraformaldehyde และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เคาะเพลทเบา ๆ และนำไปบันทึกภาพถ่าย เพื่อใช้เปรียบเทียบพื้นที่การหลุดลอกของเซลล์เพาะเลี้ยงของไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง ไวรัสควบคุมบวกและเซลล์ควบคุมลบ

การหาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนด้วยวิธี LP-ELISA (Vaccine matching หรือ r-value) (ร่มพฤกษ์และสมใจ, 2555)

การหาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของไวรัสที่ระบาดในท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า vaccine matching หรือ r-value โดยใช้การคำนวณ

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

วิธีการแปลผล ดังนี้

- r-value ≥ 0.4 หรือ Good Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยายังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไวรัสในวัคซีน
- r-value ≥ 0.2-0.39 หรือ Moderated Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาปานกลางเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสในวัคซีน
- r-value < 0.2 หรือ Poor Matching เชื้อไวรัสในพื้นที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาสูงหรือจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสในวัคซีนที่ระบาด

ผล

ผลการตรวจหาและจำแนกเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นไวรัสปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O ผลการตรวจหาเชื้อ FMDV ด้วย real-time RT-PCR พบสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV มีค่า Ct เท่ากับ 22.04, 15.11, 23.92 และ 24.86 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบความรุนแรงในเซลล์เพาะเลี้ยงและการตรวจสอบคุณสมบัติด้วยวิธี Plaque assay เมื่อนำไวรัสมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ BHK-21 เพื่อดูการเกิด CPE เป็นเปอร์เซ็นต์และระยะเวลานับเป็นชั่วโมงของการเกิด CPE พบว่าไวรัสที่ได้จากสัตว์ตาย (sample 2 และ 4) เกิด CPE ที่ระดับ 50% ที่ชั่วโมงที่ 30 และที่ระดับ 100% ที่ชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 2) พบว่าเซลล์ที่เพาะไวรัส sample 2 และ 4 ซึ่งเป็นไวรัสที่เก็บจากสัตว์ตาย เกิดลักษณะหดตัวกลมและมีเซลล์หลุดลอกได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะด้วยไวรัส sample 1 และ 3 และ Negative control (รูปที่ 1) เมื่อเพาะไวรัสจนถึง 48 ชั่วโมง พบว่าทุกตัวอย่างทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงหดตัวและลอกหลุดจากพื้นผิว (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบและจำแนกเชื้อ FMDV ด้วยวิธี ELISA typing วิธี real-time RT-PCR และ วิธี nucleotide sequencing ส่วนยีน VP1 ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	ELISA typing	real-time RT-PCR (Ct value)
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	O	22.04
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	O	15.11
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	O	23.92
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	O	24.86

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิด CPE ของเซลล์ BHK-21 เมื่อเพาะด้วยไวรัสตัวอย่าง sample 1-4

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	% CPE		
			ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 30	ชั่วโมงที่ 48
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	-	10 %	50 %
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	5 %	50 %	100 %
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	-	20 %	70 %
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	5 %	50 %	100 %

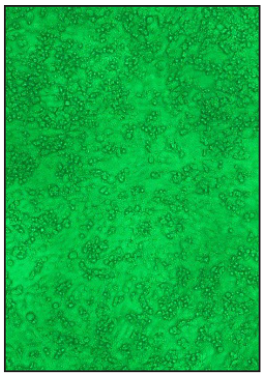
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) ของไวรัสตัวอย่าง Field virus sample 1, sample 2, sample 3, and sample 4 กับไวรัสอ้างอิงของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) และไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)

ตัวอย่าง Field virus	สายพันธุ์	% Identity		
		O/TAI/RRL/O/Ind/16-2/2020 (RRL)*	O/TAI/189/87**	O/Cathay**
Sample 1	O/ME-SA/Ind-2001e	96.70	83.50	81.50
Sample 2	O/ME-SA/Ind-2001e	97.00	83.80	81.80
Sample 3	O/ME-SA/Ind-2001e	98.10	83.40	82.40
Sample 4	O/ME-SA/Ind-2001e	97.10	83.70	82.00

* ไวรัสอ้างอิงของ ศออ. ** ไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)



sample 1 (ป่วย)



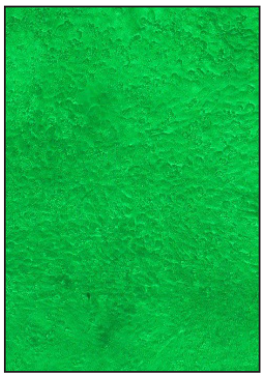
sample 2 (ตาย)



sample 3 (ป่วย)



sample 4 (ตาย)

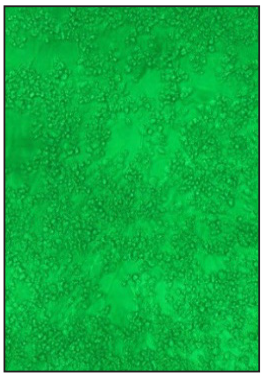


Negative control

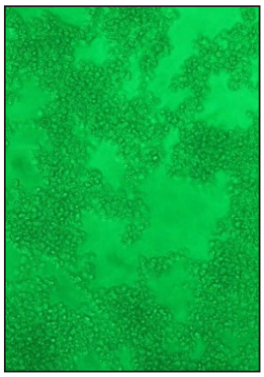


Positive control

รูปที่ 1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า ของการทดสอบ plaque assay หลังเพาะไวรัสในเซลล์ BHK-21 นาน 30 ชั่วโมง



sample 1 (ป่วย)



sample 2 (ตาย)



sample 3 (ป่วย)



sample 4 (ตาย)



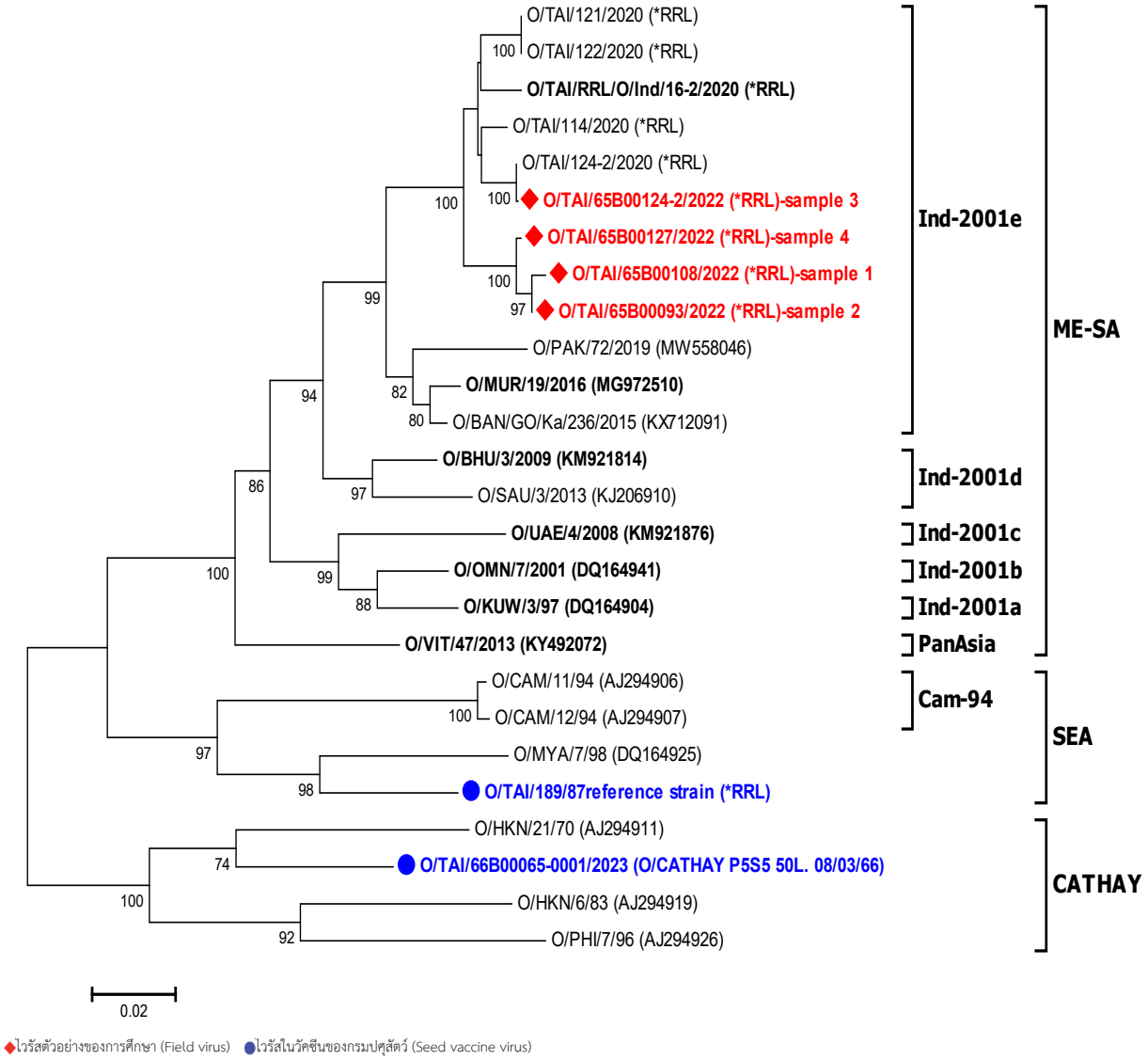
Negative control



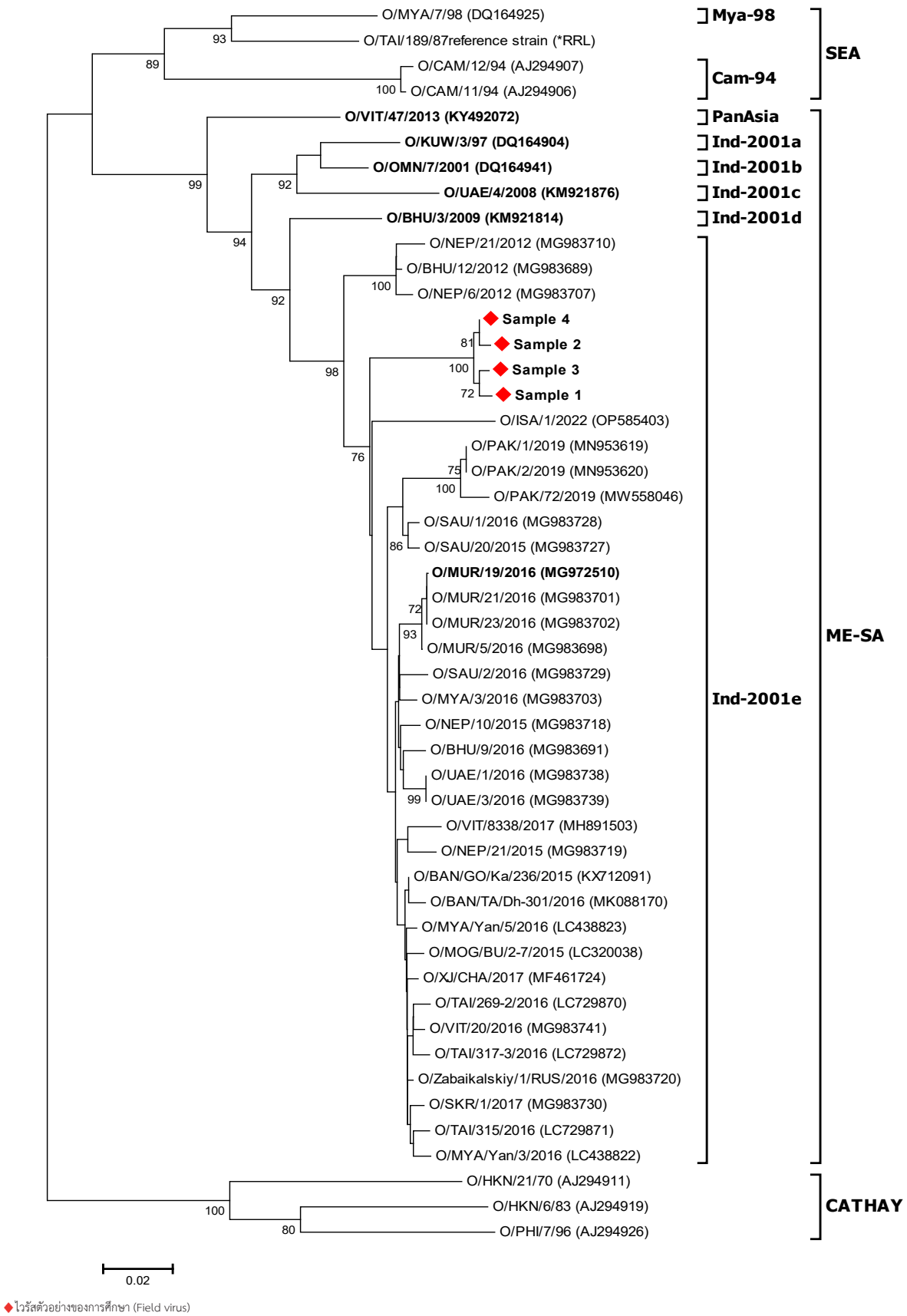
Positive control

รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า การทดสอบ plaque assay หลังเพาะไวรัสในเซลล์ BHK-21 นาน 48 ชั่วโมง

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ส่วนยีน VP1 และนำมาทำเป็น phylogenetic analysis เพื่อจัดกลุ่มของสายพันธุ์ไวรัสพบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง เป็นซีโรไทป์ O อยู่ในโทโปไทป์ Middle East-South Asia (O/ME-SA) (ตารางที่ 3) และอยู่คนละโทโปไทป์กับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (seed vaccine virus) ซึ่งอยู่ในโทโปไทป์ SEA และ CATHAY (รูปที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี whole genome sequencing กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ที่มีรายงานใน GenBank ที่พบในประเทศอื่น ๆ พบว่าเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ย่อย Ind-2001e ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบระบาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 Phylogenetic analysis ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ส่วนยีน VP1 ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4



รูปที่ 4 Phylogenetic analysis ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ส่วน whole genome sequencing ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4 เทียบกับเชื้อ FMDV สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ที่มีรายงานใน GenBank

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) พบว่ามีความเหมือนกับไวรัสอ้างอิงของ ศออ. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e เป็น 97.00-98.10% และมีความเหมือนกับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) สายพันธุ์ O/TAI/189/87 เป็น 83.40-83.80% และสายพันธุ์ O/Cathay เป็น 81.50-82.40% (ตารางที่ 3) และไวรัสตัวอย่างมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 95.30-96.00% เมื่อเทียบกับเชื้อ FMDV ที่มีรายงานใน GenBank (ตารางที่ 4) ผลการทดสอบ Vaccine matching กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) พบว่าไวรัสทุกตัวอย่างให้ค่า r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity) ของไวรัสตัวอย่าง Field virus (sample 1-4) กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ระบาดในต่างประเทศ (GenBank*) สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e

ลำดับ	GenBank*	% Identity			
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
1	O/MYA/Yan/5/2016 (LC438823)	95.70	95.70	95.70	96.00
2	O/XJ/CHA/2017 (MF461724)	95.60	95.60	95.60	95.90
3	O/SAU/20/2015 (MG983727)	95.60	95.60	95.60	95.90
4	O/SKR/1/2017 (MG983730)	95.40	95.40	95.40	95.70
5	O/Zabaikalskiy/1/RUS/2016 (MG983720)	95.40	95.40	95.40	95.70
6	O/BAN/GO/Ka/236/2015 (KX712091)	95.40	95.40	95.40	95.70
7	O/MYA/3/2016 (MG983703)	95.30	95.30	95.30	95.70
8	O/BHU/9/2016 (MG983691)	95.30	95.30	95.30	95.60
9	O/UAE/3/2016 (MG983739)	95.30	95.30	95.30	95.60
10	O/SAU/1/2016 (MG983728)	95.30	95.30	95.30	95.60

* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore

ตารางที่ 5 ค่า r-value ของไวรัสตัวอย่าง sample 1-4 กับไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus) จากการทดสอบ Vaccine matching ด้วยวิธี LP ELISA

ตัวอย่าง Field virus	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	r-value			
			O/TAI/189/87**		O/TAI/189/87 + O/Cathay**	
			≥0.4	≥ 0.2-0.39	≥0.4	≥ 0.2-0.39
Sample 1	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ป่วย	1.0	-	1.0	-
Sample 2	ประจวบคีรีขันธ์	สัตว์ตาย	0.5	-	1.0	-
Sample 3	สระบุรี	สัตว์ป่วย	0.5	-	1.0	-
Sample 4	สระบุรี	สัตว์ตาย	0.5	-	1.0	-

** ไวรัสในวัคซีนของกรมปศุสัตว์ (Seed vaccine virus)

วิจารณ์ผลและสรุป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ในปี 2565 ที่มีตัวอย่างจากโคนม โคเนื้อและสัตว์กีบคู่อื่น ๆ ส่งตรวจเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O ถึง 51.59 % (ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2566) ซึ่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีเป็นจังหวัดที่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O และมีรายงานโคนมโตเต็มวัยป่วยและตายจากการระบาดในครั้งนี้ เมื่อนำตัวอย่างจากทั้งสองจังหวัดมาวินิจฉัยและจำแนกซีโรไทป์ ด้วยวิธี ELISA typing ยืนยันเป็นเชื้อ FMDV เป็นซีโรไทป์ O จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีน VP1 พบเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับไวรัสที่ระบาดภูมิภาคแอฟริกาเหนือ เอเชียตะวันออกกลางและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bachanek-Bankowska *et al.*, 2018) ผลการทดสอบเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี plaque assay เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเชื้อ FMDV ที่แยกได้จากสัตว์ตาย มีความรุนแรงทำให้เซลล์ BHK-21 หลุดลอกจากพื้นผิวเพาะเลี้ยง 100% ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อ FMDV ที่แยกได้จากสัตว์ป่วยที่พบการหลุดลอกเพียง 50-70% ซึ่งผลการทดสอบ มีความสอดคล้องกับหลายประเทศที่มีการศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O การศึกษาของ Morioka *et al.* (2008) ใช้วิธี plaque assay ในการแยกความแตกต่างของเชื้อไวรัส O/JPN/2000 พบว่าสายพันธุ์รุนแรงจะพบการเกิด plaque ที่มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง และ Qureshi *et al.* (2022) เปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ FMDV ในเซลล์ BHK-21 พบว่าซีโรไทป์ A มีความรุนแรงมากที่สุดและรุนแรงใกล้เคียงกับซีโรไทป์ โดยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ BHK-21 เมื่อ inoculation ด้วยเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ A, O และ Asia1

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FMDV ทั้ง 4 ตัวอย่างมาสร้างเป็น phylogenetic analysis (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ FMDV จากการระบาดครั้งนี้อยู่ในโทโปไทป์ ME-SA ซึ่งเป็นโทโปไทป์เดียวกับไวรัสอ้างอิงของ ศออ. ที่ยืนยันเป็นสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 96.70 – 98.10% แต่อยู่คนละโทโปไทป์กับ seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ O/TAI/189/87 อยู่โทโปไทป์ SEA และสายพันธุ์ O/CATHAY อยู่โทโปไทป์ CATHAY และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ เท่ากับ 83.40-83.80% และ 81.50-82.40% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยทั่วไปวัคซีนป้องกันโรค FMD จะไม่ให้ความคุ้มข้ามสายพันธุ์กัน (cross-protection) แม้จะเป็นซีโรไทป์เดียวกันก็ตาม (Cao *et al*., 2014) ซึ่งการระบาดของโรค FMD สายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ในประเทศเวียดนาม รัสเซีย คาซัคสถาน และมองโกเลีย จึงได้ปรับมาตรการควบคุมป้องกันโรคโดยคัดเลือกไวรัสที่จะนำมาผลิตวัคซีนใหม่ให้มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ระบาดเพื่อให้วัคซีน มีประสิทธิภาพในการป้องกันควบคุมโรคได้ดี (Palinski *et al*., 2019; Nikiforov *et al*., 2023) แต่ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ FMDV ที่ระบาดในครั้งนี้กับ seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ (vaccine matching) มีค่า r-value มากกว่า 0.4 (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม good matching แสดงให้เห็นว่า seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ยังคงให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อ FMDV ที่ระบาดในพื้นที่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของกิ่งกานต์และคณะ (2567) พบว่าเชื้อ FMDV สายพันธุ์ที่ใช้เป็น seed vaccine virus ของกรมปศุสัตว์ มีค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาที่ใกล้เคียงกับ O/ME-SA/Ind-2001 ที่แพร่ระบาดในประเทศไทย อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาพบว่าวัคซีนป้องกันโรค FMD ซีโรไทป์ O เป็นวัคซีนที่ป้องกันข้ามสายพันธุ์ได้ในวงกว้างจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย (กิ่งกานต์, 2567) Nagendrakumar *et al.* (2011) ทดลองฉีดวัคซีนสายพันธุ์ O1/Manisa ที่มีปริมาณไวรัสสูงให้กับสัตว์ทดลองพบว่าให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสสายพันธุ์ O1/Campos และสายพันธุ์ O/SEA/MYA-98 ซึ่งเป็นเชื้อ FMDV ที่อยู่ต่างโทโปไทป์ได้

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคติดต่อในสัตว์กีบคู่ที่ก่อความเสียหายด้านเศรษฐกิจทั่วโลกซีโรไทป์โอ (O) เป็นซีโรไทป์ที่พบได้มากที่สุดในแถบเอเชีย ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ เช่น O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia, O/Cathay และ O/ME-SA/Ind-2001 (Li *et al*., 2023) ในกลุ่มโทโปไทป์ O/ME-SA/Ind-2001 ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ย่อย a, b, c, d และ e ที่พบระบาดมากขึ้นในแถบตะวันออกกลาง แอฟริกาเหนือ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ryoo *et al*., 2021) ประเทศไทยเริ่มพบการระบาดของสายพันธุ์ O/ME-SA/Ind-2001e ในจังหวัดแถบภาคตะวันตกและภาคใต้ซึ่งเป็นพื้นที่เขตชายแดนติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Ryoo *et al.* (2021) ที่พบการระบาดข้ามกลุ่มประเทศได้มากขึ้นจากสัตว์ป่า การเคลื่อนย้ายสัตว์ข้ามแดน และการขนส่งสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีน VP1 ยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้บ่งชี้ว่าไวรัส O/JPN/2000 มีความรุนแรงมากกว่า O/JPN/2010 (Nishi *et al*., 2019) และการเปลี่ยนแปลงของยีนส่วน 5’untranslated region (5’UTR) ของซีโรไทป์ O ที่ระบาดในประเทศจีนมีผลต่อความรุนแรงของไวรัส โดยพบการติดเชื้อแบบ host specific คือพบเชื้อในสุกรแต่ไม่พบในโค (Yang *et al*., 2020) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อ FMDV จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีในส่วนยีนที่มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นในอนาคตได้ เพื่อหาความเปลี่ยนแปลงของยีนที่ส่งผลให้เชื้อ FMDV มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการก่อโรค

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสรุปเบื้องต้นได้ว่าเชื้อ FMDV ซีโรไทป์ O สายพันธุ์ย่อย O/ME-SA/Ind-2001e ที่แยกได้จากโคตายของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสระบุรีในการศึกษานี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ FMDV สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อเป็นข้อมูล

สนับสนุนในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่มีความรุนแรงมากขึ้น และช่วยประกอบการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรค รวมถึงเตรียมความพร้อมในการการปรับมาตรการควบคุม ป้องกันโรคที่เหมาะสมในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ร่มพฤกษ์ อุดล และ วิไล ลินจงสุบงกช. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ระหว่างปีพ.ศ. 2547-2548. *สัตวแพทยสาร*. 57(1):15-23.

ร่มพฤกษ์ อุดล. 2564. องค์ความรู้:เอกสารวิชาการ:คู่มือผู้เชี่ยวชาญ สถาบันสุขภาพสัตว์. [Online] แหล่งที่มา : https://niah.dld.go.th/webnew/knowledge/expert-s-guide/foot-and-mouth-disease. 28 สิงหาคม 2566.

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2566. ภารกิจ. [Online] แหล่งที่มา : https://rrl.dld.go.th/webnew/organization-information/mission. 28 สิงหาคม 2566.

กรมปศุสัตว์. 2566. ระบบต้นแบบการวิเคราะห์เพื่อการพยากรณ์และเตือนภัยโรคปากและเท้าเปื่อย-โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) บทความที่ 1. [Online] แหล่งที่มา : http://predict.dld.go.th/%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%9B%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A2/%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B8%A3%E0%B8%B9%E0%B9%89%E0%B8%97%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%A7%E0%B9%84%E0%B8%9B%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%9B%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A2. 30 กันยายน 2566

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย. 2567. แนวทางการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยจากข้อมูลทางระบาดวิทยาในประเทศไทย. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ISBN 978-616-608-765-9.

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย จีรนันท์ โชติทิฆัมพร สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ มารุต พงศ์ พุ่มพวง ภาวนา ทศพิทักษ์กุล และ จรรยา สมานิตย์. 2567. การเปรียบเทียบคุณลักษณะทางแอนติเจนของสายพันธุ์วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O กับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O/ME-SA/Ind2001 ที่แพร่ระบาดในประเทศไทย. [Online] แหล่งที่มา https://rrl.dld.go.th/webnew/knowledge/academic-papers/210267

Bachanek-Bankowska, K., Di Nardo, A., Wadsworth, J., Mioulet, V., Pezzoni, G., Grazioli, S., Brocchi, E., Kafle, S.C., Hettiarachchi, R., Kumarawadu, P.L., Eldaghayes, I.M., Dayhum, A.S., Meenowa, D., Sghaier, S., Madani, H., Abouchoaib, N., Hoang, B.H., Vu, P.P., Dukpa, K., Gurung, R.B., Tenzin, S., Wernery, U., Panthumart, A., Seeyo, K.B., Linchongsubongkoch, W., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Scherbakov, A., King, D.P., and Knowles, N.J. 2018. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. [Online] Available: https://www.nature.com/articles /s41598-018-32693-8. August 15, 2023.

Cao, Y., Lu, Z., Li, D., Fan, P., Sun, P., Bao, H., Fu, Y., Li, P., Bai, X., Chen, Y., Xie, B., and Liu, Z. 2014. Evaluation of cross-protection against three topotypes of serotype O foot-and-mouth disease virus in pigs vaccinated with multi-epitope protein vaccine incorporated with poly(I:C). [Online]Available: https://www.sciencedirect.com/ science/article/abs/pii/S0378113513005464. January 22, 2024.

Hemadri, D., Tosh, C., Sanyal, A., and Venkataramanan, R. 2002. Emergence of a new strain of type O foot-and-mouth disease virus: Its phylogenetic and evolutionary relationship with the PanAsia pandemic strain. [Online] Available:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12206305/. August 15, 2023.

Islam, M.S., Habib, M.A., Islam, M.R., Mahmud, M.S., Saha, P.C., Ruba, T., Das, P.M., and Khan, M.A.H. 2017. Clinico-pathological Investigation of Foot and Mouth Disease and Serotype Identification of the Viruses in Cattle of Bangladesh. Immunology and Infectious Diseases. 5(2):16-23. [Online] Available: https://www.researchgate.net /figure/Lesion-specific-to-tiger-heart-disease-was-seen-in-the-heart-of-an-infected -and-death_fig3_321490516. September 30, 2024.

Knowles, N.J., Wadworth, J., Bachanek-Bankowska, K., and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 35(3) : 1-28.

Li, F., Li, Y., Ma, J., Wu, R., Zou, X., Liu, Y., Zhao, Q., and Zhu, Y. 2023. Molecular evolution, diversity, and adaptation of foot-and-mouth disease virus serotype O in Asia. [Online] Available: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389fmicb.2023.1147652/full. October 1, 2024.

Morioka, K., Fukai, K., Ohashi, S., Sakamoto, K., Tsuda, T., and Yoshida, K. 2008. Comparison of characters of the Plaque-Purified viruses from Foot and mouth disease virus O/JPN/2000. J. Vet. Med. Sci. 70(7) : 653-658.

Nagendrakumar, S.B., Srinivasan, V.A., Madhanmohan, M., Yuvaraj, S., Parida, S., and Antonello, D.N. 2011. Evaluation of cross protection between O1 Manisa and O1 Campos in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus vaccine incorporating different payloads of vaccinated O1 Manisa antigen. Vaccine. 29(10) : 1906-1912.

Nikiforov, V., Shcherbakov, A., Chvala, I., Kremenchugskaya, S., Korennoy, F., Mayorova, T., Timina, A., Tyulegenov, S., Abdrakhmanov, S., Berdikulov, M., Sainnokhoi, T., Gombo-Ochir, D., Tserenchimed, T., Prokhvatilova, L., and Sprygin, A. 2023. Insights into the molecular epidemiology of Foot-and-Mouth disease virus in Russia, Kazakhstan, and Mongolia in terms of O/ME-SA/Ind-2001e sublineage expansion. [Online] Available: https://www.mdpi.com/1999-4915/15/3/598. September 4, 2023.

Nishi, T., Morioka, K., Saito, N., Yamakawa, M., Kanno, T., and Fukai, K. 2019. Genetics determinants of virulence between two foot and mouth disease virus isolates which caused outbreaks of differing severity. [Online] Available: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/msphere.00294-19 [Online]. August 15, 2023.

Palinski, R.M., Bertram, M.R., Vu, L.T., Pauszek, S.J., Hartwig, E.J., Smoliga, G.R., Stenfeldt, C., Fish, I.H., Hoang, B.H., Phuong, N.T., Hung, V.V., Vu, P.P., Dung, N.K., Dong, P.V., Tien, N.N., Tho, N.D., Dung, D.H., and Arzt, J. 2019. First genome sequence of Foot-and-Mouth disease virus serotype O sublineage Ind-2001e from Southern Vietnam. [Online] Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406109/. September 4, 2023.

Qureshi, S.S., Khan, B., Khan, S., Rahman, H.U., and Subhan, M. 2022. Comparative study of the virulency of different serotypes of Foot and Mouth disease virus by using Baby Hamster Kidney-21 cell line. Sarhad Journal of Agriculture. Vol 38. Issue 3. P.778-782.

Ryoo, S., Lee, H., Lim, D.R., Lee, J.W., Bunnary, S., Tum, S., Lee, D.S., Hwang, H., Jeong, S.G., Nah, J.J., Ku, B.K., Kim, J.M., and Cha, S.H. 2021. Identification of the O/ME-SA/Ind-2001e sublineage of Foot-and-Mouth disease virus in Cambodia. [Online] Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34778434/. October 20, 2023.

Yang, F., Zhu, Z., Cao, W., Liu, H., Wei, T., Zheng, M., Zhang, K., Jin, Y., He, J., Guo, J., Liu, X., and Zheng, H. 2020. Genetic determinants of altered virulence of Type O Foot-and-Mouth Disease virus. [Online] Available: https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/jvi.01657-19. January 17, 2024.