

เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน

คณิดา ภาสะฐิติ¹นพคุณ มูลสิน¹

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน โดยนำวัคซีนที่ละลายแล้วหยอดตาไก่อายุ 7 วัน ตัวละ 2 หยด (50 ไมโครลิตร) โดยแบ่งไก่เป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้กลุ่มที่ 1 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง (วันที่ 0, 14) กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14, 42) กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนจากบริษัทเอกชน ตามคำแนะนำของบริษัท 2 ครั้ง (วันที่ 0, 21) กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ทำวัคซีน ทั้ง 5 กลุ่ม ทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 เพื่อนำซีรัมไปตรวจหาความคุ้มโรคโดยวิธี Virus neutralization เพื่อหาค่า Neutralization Index (NI) และตรวจแอนติบอดี โดยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่า การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง และการทำวัคซีนของบริษัทเอกชน 2 ครั้งให้ความคุ้มโรคต่อเชื้อสเตรนท้องถิ่น โดยมีค่า NI เท่ากับ 2.90, 3.46, 5.10 และ 2.67 ตามลำดับ และความคุ้มโรคต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ มีค่า NI เท่ากับ 2.46, 2.25, 2.51 และ 3.34 ตามลำดับเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 70 วัน และทุกกลุ่มให้ความคุ้มโรคโดยมีค่า NI มากกว่า 2 ตั้งแต่วันที่ 14 หลังการทำวัคซีน จึงผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ASEAN ทั้งหมด สำหรับการตรวจแอนติบอดีโดยวิธี ELISA พบว่ามีเพียงกลุ่มไก่ที่ได้รับการทำวัคซีนจากบริษัทเอกชนเท่านั้น ที่มีค่า sample to positive ratio (S/P ratio) มากกว่า 0.20 ขณะที่ไก่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ มีค่า S/P น้อยกว่า 0.2 ทุกกลุ่ม อาจเนื่องจากแอนติเจนของชุดทดสอบเป็นสเตรนเดียวกับวัคซีนจากบริษัทเอกชน จึงควรพัฒนาชุดทดสอบแอนติบอดีให้ตรงกับสเตรนของวัคซีนกรมปศุสัตว์ การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ โดยให้วัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง และวัคซีนเอกชนสามารถให้ความคุ้มโรคตามเกณฑ์มาตรฐานได้ทุกกลุ่มการทดลอง แต่สำหรับวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์แนะนำให้ทำวัคซีนจำนวน 2 ครั้ง เพื่อการทำวัคซีนมีประสิทธิภาพ คุ้มค่ากับค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับการทำงานในพื้นที่

คำสำคัญ: วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน นิวทราไลซิง แอนติบอดี

อีไลซ่า นิวทราไลซิง อินเด็กซ์

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Avian infectious bronchitis, IB) เป็นโรคติดต่อแบบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนต้นของไก่ มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Infectious bronchitis virus (IBV) การติดต่อโรคนี้ จากการสัมผัสไก่ป่วยหรือ พาหะ ไก่ป่วยถ่ายเชื้อไวรัสปนมากับอาหาร น้ำ สิ่งร่อนนอน โดยการหายใจ ไก่แม่พันธุ์จะถ่ายเชื้อไวรัสผ่านไข่ได้ มีการแพร่กระจายในฝูงอย่างรวดเร็ว (ทัศนีย์และคณะ, 2539) ไก่ป่วยจะแสดงอาการน้ำมูกน้ำตาไหล อ้าปากหายใจ ในไก่ไข่ เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในท่อไข่ (oviduct) เป็นผลทำให้ผลผลิตไข่ลดลง เปลือกไข่มีสีซีด และไข่ขาวเหลว นอกจากนี้เชื้อไวรัสบางสายพันธุ์เพิ่มจำนวนในไตทำให้เกิดไตอักเสบ (interstitial nephritis) พบโรคนี้ได้ทั่วโลก ในฝูงไก่ที่ติดเชื้อไวรัส เชื้อจะแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว อัตราป่วยอาจสูงถึง 100% แต่มีอัตราการตายต่ำ อย่างไรก็ตามอัตราการตายอาจเพิ่มขึ้น ในกรณีที่ติดเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดไตอักเสบ (nephropathogenic type) หรือในรายที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสอื่นแทรกซ้อน (ช้องมาศและคณะ, 2551)

เชื้อ IBV จัดอยู่ใน แฟมมีลี Coronaviridae ซับแฟมมีลี Orthocoronavirinae จีนัส Gammacoronavirus สปีชีส์ Avian coronavirus หรือเรียกว่า Avian infectious bronchitis virus หรือ Infectious bronchitis virus มีลักษณะสายพันธุ์กรรม (genome) เป็นแบบ RNA สายเดี่ยว มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิดคือ spike glycoprotein, envelope, membrane glycoprotein และ nucleocapsid protein โปรตีนส่วน spike (S) ที่อยู่บริเวณเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส ประกอบด้วย glycopolypeptide 2 ส่วนย่อย คือ S1 และ S2 โปรตีนส่วน S1 มีหน้าที่สำคัญในการจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (receptor) เพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ และเป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์สร้าง neutralizing antibodies ซึ่งเป็น protective immunity ที่ร่างกายสัตว์ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ IB และแอนติบอดีนี้ยังแสดงถึงซีโรไทป์จำเพาะของเชื้อไวรัสอีกด้วย (Cavanagh, 2007) เนื่องจากโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ เกิดจากเชื้อไวรัส จึงไม่มียารักษาเฉพาะ วิธีที่ดีที่สุด คือการควบคุมป้องกันโรค การทำวัคซีนร่วมกับการเน้นระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ ถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (ช้องมาศ, 2561) ปัจจุบัน ฟาร์มเลี้ยงไก่ส่วนใหญ่นิยมให้วัคซีนป้องกันโรค IBV ทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและวัคซีนเชื้อตาย ทำให้ระดับภูมิคุ้มกันค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในไก่ระยะไข่ ซึ่งหากไก่ระยะไข่ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรค IBV ติดเชื้อไวรัส จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเปลือกไข่และส่วนประกอบภายในไข่เท่านั้น โดยมีผลกระทบน้อยมากต่อการให้ผลผลิต (นิวัตร, 2551)

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ ได้ผลิตวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดดูดแห้ง สำหรับป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ วิธีใช้ในไก่กระທง โดยการหยอดตาหรือจุมัก ตัวละ 2 หยด ครั้งแรกเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 3-4 สัปดาห์ สำหรับไก่ไข่ให้วัคซีนสองครั้งแรกเช่นเดียวกับในไก่กระທง ครั้งที่สามเมื่ออายุ 6-8 สัปดาห์และซ้ำทุก 3 เดือน (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2562ก) ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ได้มีการรณรงค์ การทำวัคซีนในไก่ ตามท้องที่ต่างๆของประเทศทุก 3 เดือนทางสทช. ร่วมกับสำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ ได้ลงพื้นที่ ติดตามประสิทธิภาพวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และพบปัญหาในแต่ละท้องที่ไก่ที่ได้รับวัคซีนของกรมปศุสัตว์ มีระดับแอนติบอดีแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากจำนวนครั้งในการทำวัคซีน สายพันธุ์ไก่ อายุไก่ และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ หลังการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 1, 2, 3 ครั้ง และวัคซีนของบริษัทเอกชน จำนวน 2 ครั้ง (ตามคำแนะนำของบริษัท) แล้วทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 เพื่อนำซีรัมไปตรวจหาความคุ้มโรคต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี Virus neutralization (VN) และตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลในการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในท้องที่ และสร้างความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพของวัคซีนให้แก่เกษตรกรในการใช้วัคซีนของกรมปศุสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

1. วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นวัคซีนเชื้อเป็น สเตรนทองถิ่น ชนิดดูดแห้ง ซึ่งมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ fifty percent embryo infectious dose (EID₅₀) ต่อโดส ขนาดบรรจุ ขวดละ 100 โดส ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ชุดผลิตที่ 25/62 วันผลิต 21/2/62 วันหมดอายุ 21/2/63

2. วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นวัคซีนเชื้อเป็น สเตรนแมสซาชูเซตส์ (H120) ชนิดดูดแห้ง ปริมาณไม่น้อยกว่า $10^{3.5}$ EID₅₀ ต่อโดส ขวดละ 1,000 โดส ผลิตจากบริษัทเอกชน ชุดผลิตที่ 812820 วันผลิต 9/2561 วันหมดอายุ 3/2563

เชื้อไวรัส

1. ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนทองถิ่น ได้จากการแยกเชื้อในพื้นที่ซึ่งมีการเกิดโรค (Chindavanig, 1962)
2. ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนแมสซาชูเซตส์ ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท IDEXX จำกัด

สัตว์ทดลอง

1. ไก่ปลอดเชื้อเฉพาะโรค (SPF) ตามระบุ 18 โรค สายพันธุ์ Lohmann Selected Leghorn (LSL) จากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ สห. อายุ 7 วัน จำนวน 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มๆละ 10 ตัว ทำการทดลองที่อาคารทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยมีระบบการเลี้ยงแบบ Strict Hygienic Conventional และปลดสัตว์ทดลองด้วยวิธี การใช้สารเคมีประเภทยาฉีด (Injectable agent) (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ, 2014) ได้แก่ แอลกอฮอล์ (AVMA, 2020) ฉีดบริเวณกระดูกท้ายทอย (Occipital bone) และทำลายด้วยวิธีเผาซาก

2. ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ สายพันธุ์ LSL จากฝ่ายผลิตไก่และไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ สห.อายุ 9-10 วัน จำนวน 1,440 ฟอง โดยมีระบบการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อก่อโรคเฉพาะ และหลังเสร็จสิ้นการทดลองทำลายด้วยวิธีการเผา

การเตรียมและให้วัคซีน

1. นำวัคซีนผลิตจากกรมปศุสัตว์ มาจำนวน 3 ขวด ละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน ขวดละ 5 ซีซี นำวัคซีนที่ละลายแล้วทั้ง 3 ขวดมาผสมรวมเป็นขวดเดียวกัน เขย่าให้เข้ากัน และนำวัคซีนผลิตจากบริษัทเอกชน มาจำนวน 3 ขวด ละลายด้วยน้ำยาละลายวัคซีน ขวดละ 30 ซีซี นำมาผสมรวมเป็นขวดเดียวกันเช่นเดียวกับวัคซีนของกรมปศุสัตว์

2. นำวัคซีนที่เตรียมแล้ว มาหยอดตาไก่ ตัวละ 2 หยด (50 ไมโครลิตร) แบ่งไก่เป็น 5 กลุ่มๆละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง ห่างกัน 14 และ 28 วันตามลำดับ นับจากให้วัคซีนครั้งแรก กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนผลิตจากบริษัทเอกชน 2 ครั้ง ตัวละ 1 โดส ห่างกัน 21 วัน ตามคำแนะนำของบริษัท กลุ่มที่ 5 หยอดตาไก่ด้วยน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม) และทั้ง 5 กลุ่ม ทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70

การทดสอบหาความคุ้มโรคโดยวิธี Virus neutralization (VN) (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2559)

ทำการทดสอบหาความคุ้มโรคโดยวิธี VN ทั้งหมด 6 ครั้ง จากตัวอย่างซีรัมไก่ที่เจาะเลือดในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ในแต่ละครั้งมีการไตเตรท virus control 2 ชุด และ virus mixture 10 ชุด จากไก่ทดลองกลุ่ม 1 – 5 โดยใช้ไวรัสอ้างอิงสเตรนทองถิ่น และสเตรนแมสซาชูเซตส์ แบ่งเป็น virus control 1 ชุด และ virus mixture 5 ชุดในแต่ละสเตรน

1. การเตรียมซีรัม

เตรียมซีรัมที่ต้องการทดสอบ โดยการเก็บเลือดจากไก่ SPF ตำแหน่งเส้นเลือดดำบริเวณปีก (wing vein) ตัวละ 2 ซีซี ซึ่งในแต่ละกลุ่มนำมาใส่ลงใน petridish เดียวกัน นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37°C นาน 4-6 ชั่วโมง เมื่อส่วนของซีรัมแยกตัวแล้ว จึงดูดเก็บซีรัมใส่หลอดทดลอง จากนั้นนำไป inactivated ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที (OIE, 2018)

2. การไตเตรทไวรัส โดยการเตรียมไวรัสอ้างอิงสเตรนท้องถิ่น และสเตรนแมสซาซูเซตส์ ได้มาจากฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30°C ก่อนนำมาใช้ ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-20 นาที แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยการไตเตรทไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่สเตรนท้องถิ่น และสเตรน แมสซาซูเซตส์ ดังนี้

2.1 การไตเตรทชุด virus control โดยการใช้ไวรัสอ้างอิงในการไตเตรทไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ สำหรับเป็นแอนติเจนทดสอบแบบ 10 fold dilutions ด้วยสารละลาย PBS ตั้งแต่ dilution ที่ 10^{-1} – 10^{-7} โดยใช้ไวรัส 0.5 มล. และสารละลาย PBS 4.5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า¹

2.2 การไตเตรทชุด virus mixture โดยนำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-4} จากข้อ 2.1 มา dilution ละ 0.5 มล. ผสมกับตัวอย่างซีรัมที่จะทำการทดสอบ 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

3. การฉีดไข่ โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ ทาง Allantoic cavity โดยการใช้กระบอกฉีดยา Tuberculin พร้อมเข็มขนาด 26Gx0.5 นิ้ว ดูดสารละลายไวรัสที่เจือจาง แทะเข็มเข้าไขไก่ฟัก ให้ทะลุเยื่อ Air sac เข้าไปใน Allantoic cavity แบ่งฉีดเป็น 2 ชุดดังนี้

3.1 ฉีดชุด virus control นำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ 10^{-4} – 10^{-7} dilution เข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 9-10 วัน dilution ละ 5 ฟองๆ ละ 0.1 มล. นำเข้าตู้ฟักไข่² ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน .

3.2 ฉีดชุด virus mixture นำไวรัสที่เจือจางตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-4} dilution เข้าไขไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 9-10 วัน dilution ละ 5 ฟองๆ ละ 0.1 มล. นำเข้าตู้ฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน

4. คำนวณหาค่า virus titer

4.1 ส่องไข่ และบันทึกการตายของตัวอ่อนก่อน/หลังฉีดเชื้อทุกวัน จนครบ 7 วัน แล้วนับจำนวนไข่ตาย

4.2 คำนวณหาปริมาณ virus titer ของชุด virus control และ virus mixture ซึ่งมีหน่วยเป็น $\text{EID}_{50}/0.1$ มล. ตามวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938; Ramakrishnan, 2016; OIE, 2018)

4.3 นำค่า virus titer ของ virus control ลบด้วย virus mixture ผลต่างระหว่างค่า virus titer ของ virus control และ virus mixture ที่ได้คือค่า Neutralization index (NI) ซึ่งซีรัมไก่ที่ได้รับวัคซีนที่มีความคุ้มโรคตามมาตรฐานจะมีค่า NI ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป (ASEAN, 2018)

การตรวจหาระดับแอนติบอดี โดยวิธี ELISA (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, 2561)

ตรวจแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อวิธี Indirect ELISA โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป³ ตามขั้นตอน ดังนี้ เจือจางตัวอย่างซีรัม ด้วย sample dilution reagent ในอัตราส่วน 1:50 ในไมโครเพลท โดยใช้ซีรัม 5 μl ต่อ sample dilution reagent 245 μl จากนั้นเจือจางต่อ โดยการนำซีรัมที่เจือจาง 1:50 มา 10 μl รวมกับ sample dilution reagent 90 μl ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1:500 แล้วนำซีรัมที่เจือจางแล้วใส่ลงใน ELISA plate สำเร็จรูปหลุมละ 100 μl ใส่ตัวควบคุมผลบวกและตัวควบคุมผลลบ ลงใน ELISA plate อย่างละ 2 หลุมๆ ละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างเพลทด้วย wash solution 3 ครั้ง และเติม Anti-chicken Alkaline Phosphatase conjugate หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างเพลทด้วย wash solution 3 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (pNPP) หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution หลุมละ 100 μl นำ ELISA plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง

¹IKA MS1, Germany

²Deltavet, Thailand

³Biochek®, UK

⁴ASYS UVM340, UK

ELISA reader⁴ ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร นำค่า OD ที่อ่านผลได้ไปคำนวณหาค่า Sample to positive ratio (S/P ratio) ตามสูตรดังนี้

$$S/P = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมบวก} - \text{ค่าเฉลี่ย OD}_{405} \text{ ของซีรัมควบคุมลบ}}$$

การแปลผล

ค่า S/P ratio มีค่าน้อยกว่า 0.2 แปลผลเป็นลบ แสดงว่า ซีรัมไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ และในกรณีที่ค่า S/P ratio มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.2 แปลผลเป็นบวก แสดงว่า ซีรัมมีแอนติบอดีต่อเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่

ผล

ผลการทดสอบหาความคุ้มโรคด้วยวิธี VN จากการทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันของกรมปศุสัตว์ ในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ ในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ทั้งการทำวัคซีน จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยให้ความคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการทำวัคซีนของบริษัทเอกชน สามารถคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลองเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1) และจากการสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อน เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน พบว่า ตัวอ่อนไขไก่ฟักมีลักษณะแคระแกรน และขมัวตัวแน่น แตกต่างจากตัวอ่อนไขไก่ฟักปกติ ดังรูปที่ 1

สำหรับผลการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ในวันที่ 0, 14, 28, 42, 56 และ 70 ทั้งการทำวัคซีน จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือตรวจไม่พบแอนติบอดีตลอดระยะเวลาการทดลอง ต่างจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ให้ผลบวกตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

ตามมาตรฐาน ASEAN (2018) กำหนดเกณฑ์การทดสอบความคุ้มโรค (potency test) ของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดเชื้อเป็น วัคซีนต้องมีค่า Neutralization index (NI) จากการทดสอบด้วยวิธี VN ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป จึงถือว่าผ่านการทดสอบ และมีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ทั้ง 1, 2 และ 3 ครั้ง ผ่านการทดสอบทั้งหมด โดยให้ความคุ้มโรคได้ตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง เช่นเดียวกับวัคซีนของบริษัทเอกชน (ตารางที่ 1) การทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ทั้ง 1, 2 และ 3 ครั้ง ให้ค่า NI มากกว่า 2 ทั้งหมด แต่การทำวัคซีน 2 และ 3 ครั้งจะให้ความคุ้มโรคสูง ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายที่เรียกว่า Anamnestic response (Winterfied et.al., 1976) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ IBV เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immune response) และระบบแอนติบอดี (Chhabra et al., 2015) ไม่ว่าจะเป็น IgG, IgA และ CD8 T-Lymphocyte ทั้งที่เกิดจากรับเชื้อโดยธรรมชาติ หรือวัคซีน จึงควรทำวัคซีนกรมปศุสัตว์มากกว่า 1 ครั้ง เพื่อรักษาระดับ Neutralizing antibody ให้อยู่ในระดับสูง และยาวนาน แต่ในการปฏิบัติงานในท้องที่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่าย และเวลา ดังนั้นเพื่อให้การทำวัคซีนมีประสิทธิภาพ คำนึงถึงค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับภาระงานในท้องที่สำหรับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ จึงแนะนำให้ทำวัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน หรือปฏิบัติตามคำแนะนำการใช้วัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถคุ้มโรคได้เทียบเท่าวัคซีนของบริษัทเอกชน และมีภูมิคุ้มกันที่ยาวนานมากขึ้น สามารถป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับรายงานของ De Wit and Cook (2014) กล่าวถึงปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการทำวัคซีน ได้แก่ สายพันธุ์ไก่ อายุ ความถี่ในการให้วัคซีน ระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ (maternal immunity) ประสิทธิภาพของวัคซีน และสภาพแวดล้อมที่เลี้ยงที่มีสุขลักษณะที่ดี

การตรวจด้วยวิธี VN ในการทดลองนี้เลือกใช้ไวรัสอ้างอิง 2 สเตรน ได้แก่ สเตรนท้องถิ่นและสเตรนแมสซาชูเซตส์ เพื่อทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกรมปศุสัตว์ และวัคซีนบริษัทเอกชน เพื่อให้เกิดความครบถ้วนสมบูรณ์ของกระบวนการทดสอบทั้งที่เป็น Homologous strain (ใช้ไวรัสอ้างอิงสเตรนเดียวกับวัคซีน) และ Heterologous strain (ใช้ไวรัสอ้างอิงคนละ สเตรนกับวัคซีน) โดยพบว่าความคุ้มโรคที่เกิดจากการทำวัคซีนทั้งของกรมปศุสัตว์ และบริษัทเอกชนโดยใช้ไวรัสอ้างอิงทั้ง 2 สเตรน ให้ผลในแนวทางเดียวกัน แต่การใช้ไวรัสอ้างอิงที่มีสเตรนตรงกับสเตรนที่ผลิตวัคซีน จะให้ค่าความคุ้มโรคสูงกว่าการใช้ไวรัสอ้างอิงต่างกับสเตรนที่ผลิตวัคซีน (ตารางที่ 1) โดยค่า NI อาจสูงถึง 4.5 - 7 เมื่อใช้ Homologous strain และอาจต่ำกว่า 1.5 ได้ ถ้าเป็น Heterologous strain ระหว่างไวรัสอ้างอิงกับวัคซีน (OIE, 2018) การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ตรวจไม่พบแอนติบอดีตลอดระยะเวลาการทดลอง ต่างจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ให้ผลบวกตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 2) สาเหตุที่วัคซีนของกรมปศุสัตว์ ตรวจไม่พบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA อาจเกิดจากการทดสอบที่มีความเฉพาะต่อซีโรไทป์ (Serotype-specific test) ซึ่งเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่มีหลายซีโรไทป์ และเชื้อต่างซีโรไทป์กันจะไม่ให้ภูมิคุ้มกันโรคข้ามกัน (ช้องมาศและคณะ, 2551) โดยตามรายงานผลงานวิจัยของรัชชัยและคณะ (2558) ได้ทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนโครงสร้างส่วนไกลโคโปรตีน spike (S1) โดยการวิจัยได้วิเคราะห์แยกกลุ่มลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ท้องถิ่นจากวัคซีนกรมปศุสัตว์ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์แมสซาชูเซตส์ สอดคล้องกับงานวิจัยของช้องมาศและคณะ (2551) ได้ศึกษาซีโรไทป์จากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ระบาดในไก่ทางภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 5 ตัวอย่างด้วยวิธี Virus neutralization โดยใช้ไวรัสอ้างอิง 5 สเตรน คือ Massachusetts, Connecticut, H52, H120 และวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ พบว่า 2 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็น ซีโรไทป์เดียวกับไวรัสวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ส่วนอีก 3 ตัวอย่างไม่จัดอยู่ในซีโรไทป์ใดๆ และตัวอย่างเชื้อไวรัส 5 ตัวอย่างนี้ไม่ได้เป็นซีโรไทป์เดียวกันกับสเตรนแมสซาชูเซตส์ แสดงให้เห็นว่าสเตรนแมสซาชูเซตส์ กับ สเตรนของวัคซีนกรมปศุสัตว์อยู่คนละกลุ่มกัน แอนติเจนที่ใช้เคลือบผิวชุดทดสอบ ELISA ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นสายพันธุ์แมสซาชูเซตส์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ผลิตวัคซีนของบริษัทเอกชน แต่วัคซีนของกรมปศุสัตว์ผลิตจากสายพันธุ์ท้องถิ่น ซึ่งเป็นไวรัสคนละกลุ่มสายพันธุ์จากเชื้อไวรัสที่ใช้แอนติเจนมาผลิตเป็นชุดทดสอบ ELISA ทำให้ตรวจพบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA เฉพาะไก่ที่ทำวัคซีนของบริษัทเอกชน ดังนั้นกรมปศุสัตว์ควรพัฒนาชุดทดสอบ ELISA โดยใช้สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจหาแอนติบอดีในฝูงสัตว์หลังจากทำวัคซีน

การใช้วัคซีนเพื่อควบคุม และลดการสูญเสียเนื่องจากการระบาดของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ยังเป็นเรื่องที่มีความยุ่งยากเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมเรื่อยมา และยังคงเป็นปัญหาอีกต่อไป เนื่องจากการใช้วัคซีนที่มีความคุ้มโรคไม่ดีพอ และไม่ครอบคลุมสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในท้องที่ (Field strain) ที่มากพอ และใช้ไม่ถูกต้องเหมาะสม เช่น เจือจางมากเกินไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนกลับของไวรัสจากสเตรนอ่อนกำลัง เป็นสเตรนรุนแรง และทำให้พันธุกรรมของไวรัสไม่เสถียร (Genetic instability) (Bijlenga, et al., 2004) ในประเทศไทย จากการศึกษาของ Munyahongse และคณะ (2020) พบว่า IBV เกิดการ Recombination ระหว่างไวรัส GI-19 และ GI-13 ทำให้เกิด variant strain ใหม่ซึ่งสร้างความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่มากขึ้น เพื่อให้การทำวัคซีนเกิดประสิทธิผลมากที่สุด จากการทบทวนคำแนะนำการทำวัคซีน (Update vaccination strategies) โปรแกรมแนะนำการทำวัคซีนล่าสุด ณ ปัจจุบันคือ การใช้วัคซีนเชื้อเป็นในไก่กระทงและไก่สาวแรกรุ่น ส่วนวัคซีนเชื้อตายควรใช้ variant strain เตรียมเป็น Autogenous inactivated vaccine เพื่อควบคุมโรคในไก่ไข่และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Jackwood and De Wit, 2020)

สรุป

การศึกษานี้เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ สามารถให้ความคุ้มโรคได้เทียบเท่าวัคซีนเอกชน โดยแนะนำให้วัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน เพื่อให้การทำวัคซีนมี

ประสิทธิภาพ คำนวณค่าใช้จ่าย เวลา และสอดคล้องกับการทำงานในพื้นที่ ส่วนการตรวจแอนติบอดีเพื่อติดตาม ประเมินผลการให้วัคซีนควรใช้วิธี Virus neutralization หรือวิธี ELISA ที่ใช้ชุดทดสอบที่ผลิตจากแอนติเจนที่ตรงกัน (homologous) กับสายพันธุ์ของไวรัสวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่าย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย คณะกรรมการพัฒนาวิชาการที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ รศ.สพ.ญ.ดร. กรรณภรณ์ สุริยผล ที่มอบเอกสารอ้างอิง ประกอบการเขียนรายงานฉบับเต็ม คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้ คำแนะนำการใช้สัตว์ทดลอง รวมทั้งข้าราชการและพนักงาน ฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก และกลุ่มสัตว์ทดลอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ชื่องามศ อันตรเสน ศศิวิมล ทองมี บัณฑิต นวลศรีฉาย และมนจิรา อินทรสาร 2551 วิเคราะห์ยีนส่วน S1 ของเชื้อ ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่ในภาคใต้ของประเทศไทย วารสารสัตวแพทย์ 18(3): 163-176
- ชื่องามศ อันตรเสน 2561 Infectious bronchitis บทความโรคสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก จ.ราชบุรี กรมปศุสัตว์
- <http://vrd-wp.dld.go.th/webnew/index.php/th/public-article> 21 พฤศจิกายน 2561
- ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ สุรีย์ ธรรมศาสตร์ ปันนัท ธนเจริญวัชร จิรา คงครอง และเอกรินทร์ วัฒนพลาชัยกุล (บรรณาธิการ) 2539 คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย
- ธวัชชัย โพธิ์เฮือง สุชีวา จันทร์หนู และสุวิทย์ โชติฉันท 2558 ลักษณะทางโมเลกุลของยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไตซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 13(2) : 81-91
- นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย 2551 การพัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบ แอนติบอดีติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 11-29
- http://cuir.car.chula.ac.th/bitstream/123456789/8698/3/Nivat_ELISA.pdf 30 พฤศจิกายน 2562
- ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล 2014 การการุณฆาต (Euthanasia) โดยการใช้สารเคมี
- แหล่งที่ ๓ ๑ www.nlac.mahidol.ac.th/acth/index.php/km-Lab-animals/39-km-animals/130-euthanasia-physical-method-2 24 เมษายน 2563
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2559 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการทดสอบหาความคุ้มโรคของวัคซีนเชื้อเป็นหลอด อักเสบติดต่อกันในไก่ (SOP-QCP-095) ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-5
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2561 มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโรค Infectious bronchitis virus ของไก่ปลอดเชื้อเฉพาะด้วยชุดทดสอบ ELISA ยี่ห้อ Biochek (SOP-QCP-108) ฝ่ายทดสอบ คุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-6
- สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ 2562 คู่มือการใช้วัคซีนกรมปศุสัตว์ หจก.วนิดาการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ 2562ข มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน เรื่องการ Ten-fold Dilution (SOP-QC-002) ฝ่าย
ทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-3

American Veterinary Medical Association. 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020
Edition. Pp35

<http://www.avma.org/sites/default/files/2002-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf>.

24เมษายน 2563

ASEAN. 2018. ASEAN Standard requirements for infectious bronchitis vaccine, Live. In Manual of
ASEAN standard for animal vaccine, Livestock Publication series No. 2A, 3rd ed. pp. 3-5.

Bijlenga, G., Cook, J.K., Gelb, J. and De Wit, J. J. 2004. Development and use of the H strain of avian
infectious bronchitis virus from The Netherlands as a vaccine : a review. 2004. Avian Pathology.
33: 550-557.

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 38: 281-297.

Chhabra, R., Forrester, A., Lemiere, S., Awad, F., Chantrey, J. and Ganapathy. K. 2015. Mucosal,
cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus
vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain.
Clinical and Vaccine Immunology. 22: 1050-1059.

Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. J.Thai Vet. Med. Assoc.
12: 1-7.

De Wit, J. J. and Cook, J.K. 2014. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis
vaccination and challenge experiments. Avian Pathology. 43: 485-497.

Jackwood, M. W., De Wit, S. 2020. Infectious Bronchitis. In : David E. Swayne, chief editors. Diseases of
Poultry. 14. UK: Wiley-Blackwell. pp. 167-188

Munyahongse, S., Pohuang, T., Nonthabenjawan, N., Sasipreeyajan, J. and Thontiravong, A. Genetic
characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014-2016 : identification of a novel
recombinant variant. 2020. Poultry Science. 99: 1888-1895.

Office International des Epizooties, OIE. 2018. Avian infectious bronchitis. In manual of diagnostic
tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 3.3.2 . pp. 796-809

Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. Am. J.
Hyg. 27:493-497.

Ramakrishnan, M. A. 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J.
virol. 5(2): 85-86

Winterfield, R. W., Fadly, A. M. and Hoerr, F. J. 1976. Vaccination and revaccination with a Holland (H)
strain of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 20: 369-374.

ตารางที่ 1 ความคุ้มโรคนำไปปลดเชื้อเฉพาะ ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนท้องถิ่นและสเตรนเมสซาซูเซตส์จากการทำวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และบริษัทเอกชน ตามลำดับ

กลุ่มที่	การให้วัคซีน	ไวรัสอ้างอิง	ค่า Neutralization index (NI)					
			วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	วันที่ 56	วันที่ 70
1	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง วันที่ 0	สเตรนท้องถิ่น	1.95	5.78	2.25	3.45	3.85	2.90
		สเตรนเมสซาซูเซตส์	1.10	2.00	2.40	2.00	2.30	2.46
2	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง วันที่ 0 และ 14	สเตรนท้องถิ่น	1.28	5.38	2.78	5.15	5.46	3.46
		สเตรนเมสซาซูเซตส์	1.13	2.25	3.49	2.30	2.18	2.25
3	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง วันที่ 0, 14 และ 42	สเตรนท้องถิ่น	1.28	5.38	2.60	5.07	5.73	5.10
		สเตรนเมสซาซูเซตส์	0.85	2.61	4.54	2.40	2.25	2.51
4	ให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง วันที่ 0 และ 21	สเตรนท้องถิ่น	1.10	5.78	2.63	5.73	4.00	2.67
		สเตรนเมสซาซูเซตส์	0.80	5.07	4.48	5.87	3.85	3.34
5	กลุ่มควบคุม (ไม่ทำวัคซีน)	สเตรนท้องถิ่น	0.85	1.28	1.13	1.28	1.13	1.10
		สเตรนเมสซาซูเซตส์	1.13	1.28	1.10	1.80	1.15	1.40
หมายเหตุ	ค่า Neutralization index (NI) มากกว่า 2.00 ถือว่าให้ความคุ้มโรค (ASEAN, 2018)							

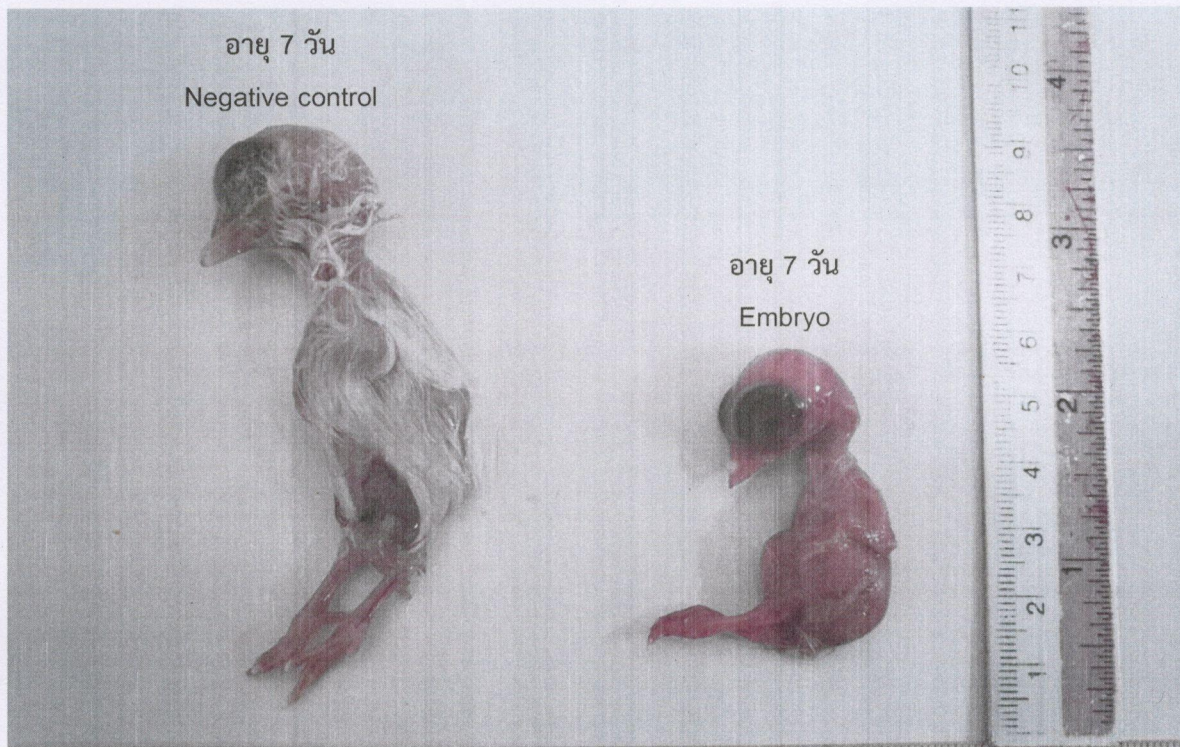
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย S/P ratio (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ 0, 14, 28, 42, 56, และ 70 วัน หลังการให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ของกรมปศุสัตว์ 1, 2 และ 3 ครั้ง และให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง

กลุ่มที่	การให้วัคซีน	ค่าเฉลี่ย S/P ratio (Mean $\pm$ SD)					
		วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	วันที่ 56	วันที่ 70
1	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 1 ครั้ง	0.0536 $\pm$ 0.0373	0.0673 $\pm$ 0.0606	0.0696 $\pm$ 0.0535	0.0707 $\pm$ 0.0571	0.0631 $\pm$ 0.0605	0.0731 $\pm$ 0.0384
2	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 2 ครั้ง	0.0561 $\pm$ 0.0371	0.0391 $\pm$ 0.0265	0.0577 $\pm$ 0.0307	0.0576 $\pm$ 0.0480	0.0713 $\pm$ 0.0267	0.0540 $\pm$ 0.0365
3	ให้วัคซีนกรมปศุสัตว์ 3 ครั้ง	0.0586 $\pm$ 0.0402	0.0603 $\pm$ 0.0797	0.0614 $\pm$ 0.0604	0.0520 $\pm$ 0.0415	0.0563 $\pm$ 0.0387	0.0609 $\pm$ 0.0506
4	ให้วัคซีนบริษัทเอกชน 2 ครั้ง	0.0594 $\pm$ 0.0376	0.3250 $\pm$ 0.1782	0.5219 $\pm$ 0.1831	0.4731 $\pm$ 0.2134	0.5143 $\pm$ 0.1506	1.1664 $\pm$ 0.3674
5	กลุ่มควบคุม (ไม่ทำวัคซีน)	-0.1816 $\pm$ 0.0116	-0.1545 $\pm$ 0.0220	0.0198 $\pm$ 0.0712	0.0289 $\pm$ 0.0126	0.0383 $\pm$ 0.0114	0.0239 $\pm$ 0.0197

หมายเหตุ

ค่า S/P ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 0.2000 แสดงว่าซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

ค่า S/P ratio น้อยกว่า 0.2000 แสดงว่าซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ



รูปที่ 1 embryo อายุ 7 วัน negative control (ซ้าย) embryo อายุ 7 วัน ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (ขวา)

Comparison of neutralizing antibody titer in specific pathogen- free chicken after vaccination with Department of Livestock Development and commercial infectious bronchitis vaccine

Kanita Bhasathiti¹ Noppakun Moolsin¹

Abstract

This study aimed to compare the neutralizing antibody titer in specific pathogen-free (SPF) chickens after vaccination between the Department of Livestock Development (DLD) and infectious bronchitis virus (IBV) commercial vaccine. Fifty SPF chickens were divided into five groups of 10 chickens each. Group 1 was vaccinated by a local strain live IBV vaccine (DLD) once. Group 2 was vaccinated by the DLD vaccine twice, and group 3 was immunized by the DLD vaccine thrice, while group 4 was vaccinated by Massachusetts strain (H120) live IBV commercial vaccine twice as recommended. Group 5 was free from the IBV vaccine (control). Blood samples were collected on days 0, 14, 28, 42, 56, and 70 after vaccination. Sera samples of all animal groups were inspected for immune responses and protection by virus neutralization assay to defined the value as Neutralization index (NI). Moreover, the chicken sera were detected for total antibody against IBV antigen by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique.

The results showed that chicken vaccinated with DLD vaccine 1, 2, and 3 times compare with IBV commercial vaccine vaccinated 2 times protected from IBV local strain; NI were 2.9, 3.46, 5.10, and 2.67, respectively. Meanwhile, all vaccinated groups protected from IBV mass strain, NI were 2.46, 2.25, 2.51, and 3.34, respectively. All sera showed NI above 2 at day 14 post-vaccination until day 70 implies that both vaccines complied with regulatory standards. The antibody detection by ELISA considers positive only sera from chicken group 4, vaccinated with the Massachusetts strain, with S/P greater than 0.2, whereas all sera samples vaccinated with a local strain were negative. It is possible that owing to the coating antigen on the ELISA plate is the homologous antigen as a commercial vaccine (mass). Consequently, the In-house ELISA with local strain IBV should be developed.

Therefore, IBV vaccination by administering one, two, and three doses of vaccine produced by the Department of livestock development compared to the commercial vaccine can protect chicken in all experimental groups. However, two doses two weeks apart with the IBV DLD vaccination are recommended due to providing efficacy and cost-effectiveness as a practical approach in the field.

Keywords: infectious bronchitis vaccine, Neutralizing antibody, ELISA, Neutralization Index

¹ Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima 30130