วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 กันยายน 2535

The Journal of Veterinary Biologics Vol.3 No.2 Sept. 1992

* การจำแนกเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี้ และมัยโคพลาสม่า ไฮโอไรนิส ในบอดสุกร โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์.....1
* การหาขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซนต์ ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ 5
* การแบ่งชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีลิควิด เฟส นิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า.....10
* รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดี้ ในสุกรต่อไวรัส ออเจสกี้จากตัวอย่างซีรั่ม และตัวอย่างเลือดบนกระดาษด้วยวิธี อีไลซ่า, ซีรั่มนิวทรัลไลเซชั่นและลาเท็กซ์แอคกลูติเนชั่น....18
* การผลิตวัคซีนฝีดาษไก่โดยการเพาะบนเนื้อเยื่อ.....30
* ผลของการใช้น้ำยาละลายต่างชนิดกัน ต่อภูมิคุ้มกันวัคซีนนิวคาส-เซิล ผสมอาหาร (เสตรน V_4).....35
* การศึกษาวัคซีนกาฬโรคเป็ดในห่าน : การใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ด ชนิดเชื้อเป็นในห่าน.....40
* การทดลองเบื้องต้นในการผลิตวัคซีนโรคนิวคาสเซิลเชื้อตายชนิด น้ำมัน.....43
* ผลของวัคซีนนิวคาสเซิลในไก่หลังการให้วัคซีนมาเร็กซ์.....48
* ประสิทธิภาพของวัคซีนรวมนิวคาสเซิล และหลอดลมอักเสบชนิด น้ำมันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล.....53

เอกสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

ISSN 0858-1134

วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
บรรณาธิการผู้ช่วย	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	วรากิจ จันทรัศมี
	ไสภณ ท้วมแสง
	สมใจ กมลศิริพิชัยพร
	เดิมพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพ ฯ
วัตถุประสงค์	1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์
	2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคสัตว์
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ คือ เดือน มีนาคม และ เดือน กันยายน
พิมพ์ที่	โรงพิมพ์ดีพร้อม อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

THE JOURNAL OF VETERINARY BIOLOGICS

Editor in chief	Ab Kongthon
Assistance Editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial Board	Varakit Chuntarasmi
	Sophon Tuamsang
	Somjai Kamolsiripichaiporn
	Dermpol Ratanawonk
Business Office	Division of Veterinary Biologics
	Phyathai Bangkok Thailand

The Journal of Veterinary Biologics is a publication of the Division of Veterinary Biologics,Department of Livestock Developement intended to make available the results of technical work in the veterinary biological science. The Journal of Veterinary Biologics edition is issued 2 times per year in March and September.

5.6 เอกสารอ้างอิง (Literature cited)

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตามตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือชุดเดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้ใส่อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a,b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อต้นนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณีที่ผู้แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินโดยเอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้องเขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข ถ้าอ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น.หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว*เอน* หรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้า และให้ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอีกหอดหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือควรให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. ภาพประกอบ (Illustration)

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจริงใช้และผู้เขียนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำควรเป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 x 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารแหล่งงานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับคือเดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลักษณะความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง

2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

การเตรียมต้นฉบับ

1. **ต้นฉบับ** ควรพิมพ์ดีดบนกระดาษขนาด 8.5 x 11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ความยาวประมาณ 25 บรรทัดต่อหน้า มีความยาวทั้งหมด 8 หน้าพิมพ์ โดยประมาณ

2. **ชื่อเรื่อง** บอกทั้งภาษาไทยและอังกฤษ ควรกะทัดรัดและตรงกับเนื้อเรื่อง

3. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ภาษาไทยและอังกฤษ บอกชื่อเต็มและสถานที่ทำงาน

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ให้เขียนนำหน้าต้นเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของต้นเรื่อง ควรเขียนทั้งภาษาไทยและอังกฤษ

5. **เนื้อหา (Text)** สำหรับงานวิจัย ควรประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้

5.1 *คำนำ (Introduction)* เพื่ออธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ และอาจรวมการตรวจเอกสาร (literature review) เข้าไว้ด้วยกัน

5.2 *อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)* ควรประกอบด้วย

5.2.1 คำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2.2 คำอธิบายถึงวิธีการที่ใช้ทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่ถือว่าเป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่เข้าใจกันดีโดยทั่วไปอยู่แล้ว

5.3 *ผล (Results)* เป็นการเสนอผลการทดลอง ไม่ควรอธิบายยาวกว่าความจำเป็น ถ้ามีตาราง กราฟหรือรูปภาพก็ให้มีเนื้อหาและคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษ

5.4 *วิจารณ์ (Discussion)* เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายดังนี้

5.4.1 เพื่อให้ผู้อ่านเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง

5.4.2 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านหฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

5.4.3 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น

5.4.4 สรุปสาระสำคัญ และประจักษ์พยานของผลการทดลอง ผู้เขียน ควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 *คำขอบคุณ (Acknowledgement)* อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยและการเตรียมเอกสารลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมงานด้วย

5.6 เอกสารอ้างอิง *(Literature cited)*

5.6.1 การเรียงลำดับเอกสาร ไม่ต้องมีเลขที่กำกับ หรืออาจมีก็ได้ ให้เรียงลำดับชื่อผู้แต่งหรือผู้รายงานตา
ตัวอักษร เริ่มด้วยเอกสารภาษาไทยก่อน แล้วต่อด้วยเอกสารภาษาต่างประเทศ เอกสารอ้างอิงหลายเรื่องที่มีผู้แต่งคนเดียว หรือช
เดียวกันให้เรียงตามลำดับปีของเอกสาร ถ้ามีเอกสารอ้างอิงหลายเรื่องโดยผู้แต่งคนเดียวกัน หรือชุดเดียวกันภายในปีเดียวกัน ให้
อักษร ก, ข, ... ในเอกสารภาษาไทย และ a,b, ... ในเอกสารภาษาต่างประเทศ ไว้หลังปีของเอกสาร

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อด้วยนำหน้าตามด้วยชื่อสกุล ในกรณี
แต่งไม่ได้เขียนชื่อเต็ม หรือไม่อาจหาชื่อเต็มของผู้แต่ง อนุโลมให้ใช้ชื่อย่อได้ กรณีเอกสารภาษาต่างประเทศ ให้ใช้อักษรละตินใ
เอาชื่อสกุลขึ้นก่อน ตามด้วยชื่ออื่น ๆ สำหรับชื่อสกุลให้เขียนเต็ม ส่วนชื่ออื่น ๆ ให้เขียนเฉพาะอักษรตัวแรก ยกเว้นกรณีที่จำเป็นต้
เขียนเต็ม เช่น Van, de, der, von เป็นต้น

5.6.3 หลักเกณฑ์ที่สำคัญของการเขียนรายชื่อเอกสารอ้างอิงมีดังนี้

(1) ชื่อเมือง ชื่อรัฐ และชื่อประเทศ ให้เขียนเต็ม

(2) การอ้างหมายเลขหน้าของวารสารภาษาต่างประเทศ ถ้าอ้างเพียง 1 หน้า ใช้ p. หน้าตัวเลข
อ้างหลายหน้าใช้ pp. หน้าตัวเลข สำหรับวารสารภาษาไทยให้ใช้ น.หน้าตัวเลข ทั้งกรณีอ้างหน้าเดียวและหลายหน้า

(3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิตให้ใช้ตัว *เอน* หรือขีดเส้นใต้

(4) คำว่า *in vitro, in vivo* หรือคำอื่นที่คล้ายคลึงกันให้ใช้ตัว *เอน* หรือขีดเส้นใต้

(5) เอกสารที่มิใช่วารสาร ต้องบอกจำนวนหน้าด้วย โดยใช้ p. หลังตัวเลขแสดงจำนวนหน้า และ
ใช้ น. หลังตัวเลขสำหรับเอกสารภาษาไทย

(6) ชื่อ journal ต้องเขียนด้วยคำย่อ ยกเว้นชื่อที่ย่อไม่ได้

(7) ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษที่เอกสารนั้นอ้างถึงอักษรหนึ่งทุกคำ จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ (capita
letter) ยกเว้นคำที่เป็นคำนำหน้านาม (article) คำสันธาน (conjunction) และคำบุรพบท (preposition)
บางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านี้เป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้
ต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนเอกสารที่ผู้เขียนอ้างถึง หากมิใช่หนังสือควรให้พิมพ์เช่นเดียวกับชื่อเรื่องในวารสาร

(8) ชื่อ conference ให้เขียนเต็ม

6. **ภาพประกอบ (Illustration)**

6.1 ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นจริงใช้และผู้เขียนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง ขนาดภาพอย่างต่ำค
เป็นขนาดโปสเตอร์ (3.5 x 5 นิ้ว)

6.2 ภาพเขียน เขียนด้วยหมึกอินเดียบนกระดาษอาร์ตหนาพอควร ตัวหนังสือควรเขียนด้วย lettering guide

การส่งต้นฉบับ

ส่งที่ กองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์
ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง
อ.ปากช่อง
จ.นครราชสีมา 30130

การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับคืน หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อหาความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

การจำแนกเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี้ และมัยโคพลาสม่า ไฮโอไรนิสในปอดสุกร โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

A DIFFERENTIATION TECHNIQUE FOR MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AND MYCOPLASMA HYORHINIS IN PIG LUNG BY IMMUNOFLUORESCENT TEST

บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์[1] สุนีจิต คงทน[1]

Banchorn Likitdecharote Suneejit Kongthon

ABSTRACT

The present paper compares the fluorescence-serological detection of M.hyopneumoniae and M.hyorhinis in frozen lung sections with cultural procedure. In 161 lungs of swine, the agent of enzootic pneumonia, M.hyopneumoniae, was found almost exclusively in frozen sections (22 times). Only one strain was cultivable. M.hyorhinis was detected 59 times by culture but only 18 times in the sections. For the detection of M.hyopneumoniae therefor the immunofluorescent investigation of lung sections is the preferable method.

บทคัดย่อ

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบการจำแนกเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี้ และเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอไรนิส โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์กับเนื้อเชื้อปอดแช่แข็ง และการเพาะเชื้อจากตัวอย่างปอดทั้งหมด 161 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี้ได้ 42 ตัวอย่าง ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ในเนื้อเชื้อปอดในขณะที่เพาะเชื้อได้เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น แต่สำหรับเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอไรนิสสามารถตรวจพบได้ 59 ตัวอย่าง ด้วยการเพาะเชื้อและพบ 18 ตัวอย่าง โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ ดังนั้นในการตรวจหาและจำแนกเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม

คำนำ

โรคปอดบวมในสุกรที่เกิดจากเชื้อมัยโคพลาสม่า ไฮโอนิวโมนีอี้ (Mycoplasma (M.) hyopneumoniae) เป็นโรคที่มีการระบาดในสุกรเกือบทุกประเทศที่มีการเลี้ยงสุกรและเรียกกันว่าโรค เอ็นซูติกนิวโมเนียในสุกร (Enzootic pneumonia of swine (EPS) โรค EPS เป็นโรคที่รู้จักกันมานานก่อนที่จะสามารถแยกเชื้อได้ (Goodwin et al., 1965; Mare and Switzer, 1965) การติดต่อของโรคเกิดได้ทางระบบทางเดินหายใจ สุกรจะแสดงอาการจาม มีน้ำมูกไหล มีไข้และอ่อนแอ พบมากในสุกรขุน โรคจะไม่ทำให้สุกรตาย (Goodwin,1967) ในฟาร์มสุกรที่มีการติดเชื้อครั้งแรกจะแสดงอาการแบบเฉียบพลัน ส่วนฟาร์มที่มีเชื้ออยู่แล้วจะแสดงอาการแบบเรื้อรังในสุกรอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไปหลังหย่านม (Livingston et al., 1972) การแยกเชื้อจากปอดสุกรที่มีอาการมักจะพบเชื้ออื่นที่ปนอยู่ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าทำให้ไม่สามารถพบเชื้อ M.hyopneumoniae ได้ เชื้อที่พบเช่น M.hyorhinis สามารถพบได้ถึง 80% ในทางเดินหายใจของสุกร (Switzer and Ross., 1975) ส่วนเชื้อ M.flocculare และ M.hyopharyngis จะพบในบางกรณีเท่านั้น เนื่องจากเจริญเติบโตได้ยากเช่นกัน (Gois et al., 1975; Armstrong and Friis, 1981; Erickson et al., 1985) การนำวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ (Immunofluorescence) มาใช้ในการวินิจฉัยโรคนี้ จึงมีประโยชน์ในการตรวจเชื้อ M.hyopeneumoniae ที่เป็นสาเหตุของความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

---

[1] ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างปอดสุกร รับจากหน่วยพยาธิวิทยา จากสุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ อายุต่าง ๆ กัน จำนวน 161 ตัวอย่าง นำมาชันสูตรหาเชื้อโดยการเพาะเชื้อ และโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งตัดด้วยเครื่อง Cryostat

2. การเพาะเชื้อ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Modefied Friis medium และ Modified Hayflick medium (Binder et al., 1988) นำตัวอย่างปอดเพาะบนอาหารแข็ง (agar plate) และในอาหารเหลว (Fluid medium) จากอาหารเหลวเจือจางตัวอย่างเป็น 1/10 และ 1/100 ในอาหารอีก 2 หลอด นำมาอบเพาะที่ 37°C. ในบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นาน 4-5 วัน นำมาเพาะต่อบนอาหารแข็ง อบเพาะเช่นเดิมตรวจดูลักษณะโคโลนีทุก 2-3 วัน จนครบ 14 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอรีโอกำลังขยาย 18-15 เท่า การแยกชนิดของเชื้อใช้วิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ กับโคโลนีของเชื้อบนผิวอาหารแข็ง (Del Guidice et al., 1967) โดยใช้แอนติซีรั่มกระต่ายต่อเชื้อ M.hyopneumoniae, M.hyorhinis และ Acholeplasma (A.) laidlawii ตามวิธีของ Morton และ Foberts (1966)

3. การหาเชื้อมัยโคพลาสม่าด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ในเนื้อเยื่อปอด ตัวอย่างปอดนำมาตัดเป็นชิ้นบางประมาณ 4 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง Cryostat วางบนแผ่นสไลด์ 4 ชิ้น ทำตัวอย่างละ 2 แผ่น นำมาฟิกซ์ในเมทานอลหรืออะซีโตน แต่ละสไลด์หยดแอนติซีรั่มกระต่ายต่อเชื้อ M.hyopneumoniae 1 แผ่น, ต่อเชื้อ M.hyorhinis 1 แผ่น ใช้ความเจือจาง 1/75 ใน PBS (NaCL 0.2 g., $KHzPO_4$ 0.2 g., $Na_2HPO_4.12H_2O$ 2.9 g., KCL 0.2 g., distilled water 1000 ml.) อบที่ 37°C. 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากแห้งหยดคอนจูเกต (Goat Anti-Rabbit /FITC) ความเจือจาง 1/60 แล้วอบที่ 37°C. 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จุ่มย้อมด้วย 0.1% สี Evans Blue นาน 5 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตากแห้งจึงหยด Mounting medium (Glycetin-PBS 1:9) บนตัวอย่างชิ้นปอดแล้วปิดด้วย cover slip นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 100,250 และ 400 เท่า

ผลการทดลอง

จากตัวอย่างปอด 161 ตัวอย่าง ทำการชันสูตรทางพยาธิวิทยา พบว่ามี 79 ตัวอย่างที่แสดงว่าการปอดบวม สามารถแยกหาเชื้อมัยโคพลาสม่าได้ 60 ตัวอย่าง ซึ่ง 59 ตัวอย่างเป็น M.hyorhinis อีก 1 ตัวอย่างเป็น M.hyopneumoniae แยกชนิดโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์กับโคโลนีบนอาหารแข็ง

สำหรับการชันสูตรด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์กับเนื้อเยื่อปอดนั้น พบว่า 18 ตัวอย่างเป็น M.hyorhinis และ 22 ตัวอย่างเป็น M.hyopneumoniae อีกนอก 5 ตัวอย่าง พบทั้งสองชนิดร่วมกัน

วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์กับเนื้อเยื่อปอดโดยทั่วไป จะย้อมเฉพาะบริเวณผิวนอกของตัวอย่างรอบ bronchus และ bronchiole และบางทีจะติดของเหลวในหลอดลม ดังนั้นการย้อมบนเนื้อเยื่อควรตัดชิ้นปอดทั้งสองแนวจะทำให้มีโอกาสตรวจพบมากขึ้น ส่วนการย้อมพื้นด้วยสี Evans Blue จะทำให้ลดการเรืองแสงของเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ (background fluorescence) จะเห็นภาพดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ผิว Bronchiole ในเนื้อเยื่อปอดที่ไม่ผสมยากต่อเชื้อ M.hyopneumoniae

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดสในเนื้อเยื่อปอดและการเพาะเชื้อ ( ) ในสุกรอายุต่าง ๆ

	สุกรดูดนม	สุกรหย่านม	สุกรขุน	สุกรพันธุ์	รวม
M.hyopneumoniae	3(0)	2(0)	9(1)	3(0)	17(1)
M.hyorhinis	8(30)	2(14)	1(8)	2(7)	13(59)
M.hyopneumoniae + M.hyorhinis	1	3	1	0	5

การพบเชื้อ M.hyopneumoniae นั้น จะพบได้มากในสุกรอายุประมาณ 3-6 เดือน (สุกรขุน) ส่วน M.hyorhinis พบมากในสุกรดูดนมและเริ่มหย่านม (ตารางที่ 1)

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ M.hyorhinis-antiserum มี 13 จาก 18 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบทั้งวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดสและการเพาะเชื้อด้วย 5 ตัวอย่าง ตรวจพบเฉพาะวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดสเท่านั้น ส่วน 41 ตัวอย่าง สามารถเพาะเชื้อได้เพียงอย่างเดียว

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ M.hyopneumoniae-antiserum มี 22 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบโดยวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดส มีเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้นที่สามารถเพาะเชื้อได้ ดังนั้นการเพาะเชื้อนี้จึงไม่เพียงพอในการตรวจหาเชื้อ จำเป็นต้องอาศัยวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดสด้วย

สรุปและวิจารณ์

โรค EPS เป็นโรคสุกรที่มีผลกระทบกระเทือนทางเศรษฐกิจมาก มีหลักฐานการวินิจฉัยโรคโดยการเพาะเชื้อทั้งสองต่างๆ กัน (Gois et al., 1982; MacPherson and Hodges, 1985; Yamamoto and Ogata, 1980) แต่ในการวินิจฉัยโรคโดยการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียพบว่าหาได้ยากมาก เนื่องจากที่มาของตัวอย่างไม่เหมาะสมกับการเพาะเชื้อ เช่น เก็บไว้นานส่งมายังห้องปฏิบัติการหรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะกับสุกรมาก่อนราทั้งตัวเชื้อ M.hyopneumoniae เองก็มีลักษณะในการเจริญเติบโตที่ช้าอยู่แล้ว ถ้ามีเชื้ออื่นปะปนด้วยจะหาให้เพาะเชื้อไม่ได้ (Whittlestone, 1979)

ในการตรวจหาเชื้อครั้งนี้ พบเชื้อ M.hyopneumoniae เพียง 1 ตัวอย่าง (0.5%) โดยการเพาะเชื้อ ในขณะที่พบ 22 ตัวอย่าง (13.7%) โดยวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดส และพบเชื้อ M.hyorhinis 59 ตัวอย่าง (36.6%) โดยการเพาะเชื้อ 18 ตัวอย่าง (11.2%) โดยวิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดส ดังนั้นการเพาะเชื้อจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการหาเชื้อ M.hyorhinis เนื่องจากเชื้อนี้มีการเจริญเติบโตที่ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อ M.hyopneumoniae นั้นเจริญเติบโตได้ไม่ดี และทั้งยังปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่นได้ง่าย วิธีอิมมูโนเพอรออกซิเดสนี้จึงเหมาะสมในการตรวจโรคมากกว่า

เอกสารอ้างอิง

1. ARMSTRONG, C.H. and N.B. FRIIS (1981). Isolation of Mycoplasma flocculare from Swine in the United States. Am. J. Vet. Res. 42, 1030-1032.

2. BINDER, A.; B. LIKITDECHAROTE; H. KIRCHHOFF (1988). Mykoplasmen als Erreger von Arthritiden bei Schweinen. Prakt. Tierarst 69, 12-14.

3. ERICKSON, B.Z.; R.F. ROSS; D.L. ROSE; J.G. JULLY; J.M. BOVE (1986). Mycoplasma hyopharynis, a new species from swine. Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 55-59.

4. DEL GUIDICE; R.A.M.P. ROBILLARD; T.R. CARSKI (1967). Immunofluorescence identification of mycoplasma o agar by use of incident illumination. J. BACTERIOL. 93. 1205-1209.

5. GOIS, M.; F. SISAK; M.SOVADINA (1975). Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs o pigs with enzootic pneumonia. Zentralbl. Veterinarmed B 22, 205-219.

6. GOIS, M.; F. KUKSA; F.SISAK (1982). Micorobiological findings in the lungs of slaughter pigs. In : Proc 7th Int. Congr. Pig Vet. Soc. Mexico, 1982, 214.

7. GOODWIN, R.R.W.; A.P. POMEROY; P. WHITTLESTONE (1965). Production of enzootic pneumonia in pigs with mycoplasma. Vet. Rec. 77. 1247-1249.

8. GOODWIN, R.F.W. (1967). Die enzootische Pneumonie der Schweine. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 73,459-472

9. LIVINGSTON, C.W.; E.L. STAIR; N.R. UNDERDAHL; C.A. MEBUS (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia i swine. Am. J. Vet. Res. 33, 2249-2258.

การหาขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

DETERMINATION OF 50 PERCENT PROTECTIVE DOSE OF FOWL CHOLERA VACCINE

นิเทศ เลิศลิมชลาลัย[1] รัชนี อัตถิ[1] วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา[1]

Niteth Lertlimchalalai Ratchanee Atthi

Vuthiporn Rungvetvuthivitaya

ABSTRACT

The determination of 50 percent protective dose (PD_{50}) of fowl cholera vaccine was conducted in 12-week-old ducks in which 5 groups of ducks were immunized with different doses of vaccine. After two weeks, the ducks were challenged by intramuscularly injection with 100 LD_{50} of *Pasteurella multocida*, 8 : A and the protection was observed for 7 days. The results indicated that PD_{50} of the vaccine was 0.138 mg dry wt/dose which equal to 1.3×10 CFU/dose and 2.5 PD_{50} was the minimum dose of the vaccine which give 90 percent protection in duck.

บทคัดย่อ

ทำการทดลองหาขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ โดยดูผลความคุ้มโรคในเป็ดทดลองอายุ 12 สัปดาห์ 5 กลุ่มที่ถูกฉีดพิษด้วยเชื้อ *Pasteurella multocida*, 8:A ในสัปดาห์ที่ 2 ภายหลังได้รับวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ในขนาดต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณแอนติเจนในวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรค 50 เปอร์เซ็นต์ (PD_{50}) เท่ากับ 0.138 mg dry wt/dose หรือ 1.3×10^9 CFU/dose และความเข้มข้นอย่างน้อย 2.5 PD_{50} จึงจะให้ความคุ้มโรคในเป็ด 90 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์เป็ดไก่ ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ ปัจจุบันเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Pasteurella multocida*, 8:A ซึ่งแยกได้จากห้องที่ มีแนวโน้มความต้องการใช้วัคซีนสูงขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาการผลิตทั้งในด้านคุณสมบัติและปริมาณของเชื้อที่เหมาะสม เพื่อการผลิตวัคซีนที่มีคุณภาพและมีความเหมาะสมในด้านของต้นทุนการผลิตพร้อม ๆ กัน ตามหลักการผลิตวัคซีนโดยทั่วไป ปริมาณของแอนติเจนมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการคุ้มโรค ไม่ว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย สำหรับวัคซีนชนิดเชื้อตาย Layton (1984) และ Layton and Sandhu (1984) ก็ได้รายงานไว้เช่นกัน การหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อในวัคซีนที่ทำให้เกิดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ (PD_{50}) จึงมีความสำคัญมากในการผลิตวัคซีนทุกชนิด ใช้เป็นแนวทางในการปรับมาตรฐานของวัคซีนในระหว่างขั้นตอนการผลิต เพื่อหาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสม

ตามมาตรฐานของ British Veterinary Codex (1970) วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ จะต้องมีปริมาณเชื้อไม่น้อยกว่า 10^{10} CFU ต่อโด๊ส ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเฟอร์เมนเตอร์จะได้ปริมาณเชื้อมากขึ้น เมื่อจะนำมาทำเป็นวัคซีนก็สามารถเจือจางลงได้อีก การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองหาปริมาณ PD_{50} ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ โดยวิธีการฉีดเชื้อพิษทับในเป็ดทดลองหลังฉีดวัคซีน และดูเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค เพื่อกำหนดมาตรฐานการผลิตวัคซีนที่แน่นอนสำหรับห้องปฏิบัติการการผลิตวัคซีน จะเป็นการประหยัดแอนติเจน ลดต้นทุนการผลิต และอาจลดปริมาณการฉีดต่อโด๊สลงได้อีก นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ชนิดผสมอีกด้วย เช่น วัคซีนชนิดน้ำมัน เป็นต้น

---

[1] ศูนย์ผลิตชีววัตถุ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีน

วัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ชุดที่ 11/35 เป็นวัคซีนชนิด formalinized broth bacterin เตรียมจากเชื้อ P. multocida, type 8:A มีปริมาณเชื้อในวัคซีน 1.38 mg dry wt/ml ซึ่งหาโดยชั่งน้ำหนักวัคซีนภายหลังอบที่ 105°C. เวลา 24 ชั่วโมง หรือ 1.3×10^{10} CFU/ml จากการเปรียบเทียบค่า optical density ของวัคซีนที่ความยาวคลื่น 540 มาโนเมตร (OD_{540}) ด้วยกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{540} และค่า viable count ซึ่งสร้างขึ้นจากการเปรียบเทียบค่าทั้งสองของเชื้อ *P.multocida* ภายหลังเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ 37°C. เวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้จำนวนทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง (Figure 1)

สัตว์ทดลอง

เป็ดไร้พันธุกำเนิดผสมเชลล์ละเพศ อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 72 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว เลี้ยงขนกรงเดี่ยวยกพื้น โดยแยกเลี้ยงกรงละ 1 กลุ่ม เจาะเลือดเป็ดทุกตัวก่อนทำการทดลอง แยกซีรั่มนำมาตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *P.multocida* ด้วยวิธี tube agglutination test (Alexander and Soltys, 1973) เพื่อตรวจสอบเป็ดทดลองว่า ไม่มีภูมิคุ้มกันก่อนฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีน

ฉีดวัคซีนให้เป็ดทดลองกลุ่มที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 5 ในขนาดต่าง ๆ กันโดยเจือจางวัคซีนด้วยน้ำเกลือให้มีปริมาณเป็น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าตามลำดับ เป็ดกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนที่ไม่ได้เจือจาง ส่วนเป็ดกลุ่มที่ 2 ถึงกลุ่มที่ 5 ฉีดด้วยวัคซีนที่เจือจาง เป็น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าตามลำดับ โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้ออกหลังตัวละ 1 มล. เป็ดกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือแทนวัคซีน หลังจากนั้น 14 วัน ฉีดเชื้อพิษทับในเป็ดทดลองทุกกลุ่ม ดูจำนวนเป็ดที่ตายภายใน 7 วัน หลังฉีดเชื้อ

การฉีดเชื้อพิษทับ

ฉีดวัคซีน *P.multocida*, type 8:A (เชื้อเดียวกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีน) ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose broth ที่ 37°C. เวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 100 LD_{50} ในเป็ด เข้ากล้ามเนื้ออกให้เป็ดทดลองทุกตัว

ค่า LD_{50} ของเชื้อที่ใช้ฉีดพิษทับในเป็ดนี้ หาได้โดยฉีดเชื้อที่เจริญใน Tryptose broth 6 ชั่วโมง ด้วยปริมาณเชื้อต่าง ๆ กันให้กับเป็ดทดลองที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อน ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่ม ๆ แล้วดูอัตราการตายใน 7 วัน นำมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (Reed and Muench, 1938)

ผลการทดลอง

1. LD_{50} ของเชื้อพิษ

จากผลการหาค่า LD_{50} ของเชื้อ *P.multocida, type 8:A* ซึ่งใช้ในการฉีดพิษทับก่อนทำการทดลองครั้งนี้ คำนวณได้ค่า LD_{50} เท่ากับ $10^{-9.5}$ หรือ 1.04 CFU/ตัว (Table 1) และปริมาณเชื้อที่ใช้ในการฉีดพิษทับจริงเท่ากับ 122 CFU/ตัว ซึ่งถือได้ว่าไม่ต่ำกว่า 100 LD_{50} ในเป็ด

2. ขนาดภูมิคุ้มกัน 50 เปอร์เซ็นต์ (PD_{50}) ของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ โดยการฉีดเชื้อพิษทับในเป็ดทดลองที่ได้รับวัคซีนปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าประสิทธิภาพของวัคซีนชุดที่ทำการทดลองนี้ให้ความคุ้มโรค 91 เปอร์เซ็นต์ และความคุ้มโรคนี้จะลดลงเหลือต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณเชื้อในวัคซีนลดต่ำกว่า 0.345 mg dry wt หรือต่ำกว่า 3.3×10^9 CFU/dose (Table 2), และปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดภูมิคุ้มโรค 50 เปอร์เซ็นต์ (PD_{50}) ในเป็ด

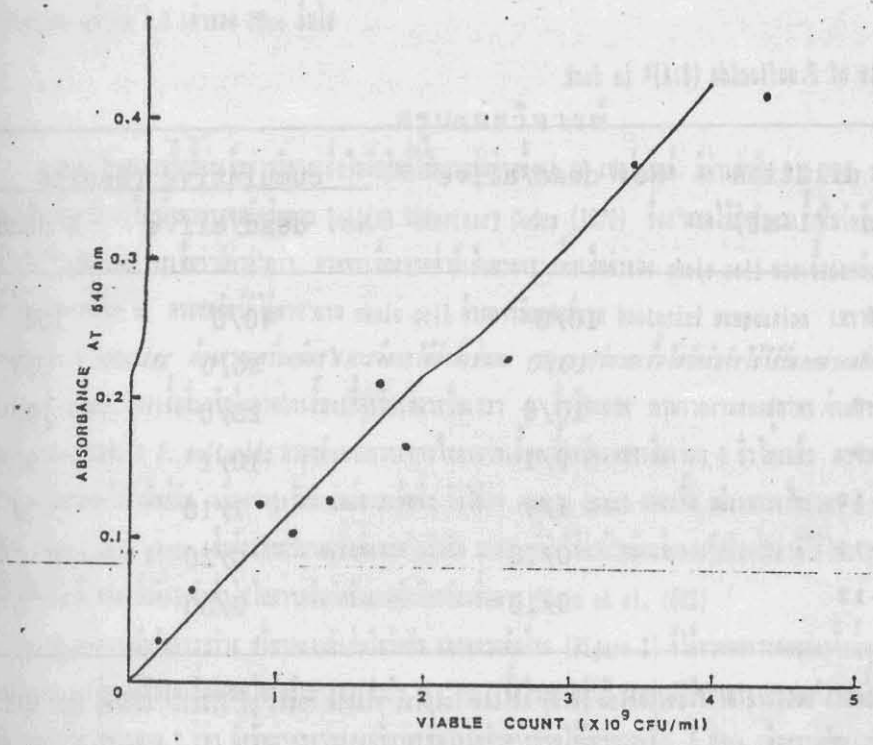


Figure 1 Standard curve used for the viable bacteria count estimation of P.multocida grown for 6 hours in liquid medium.

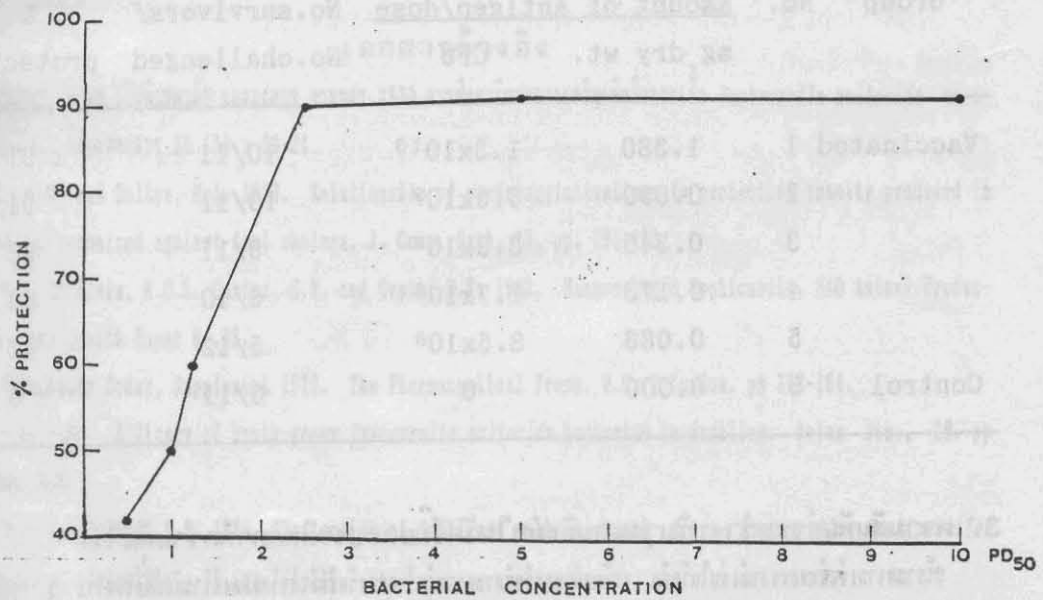


Figure 2 Relation of the antigen concentration to the protectivity of fowl cholera vaccine in duck

ซึ่งได้จากการคำนวณโดยวิธีเดียวกับการหา LD_{50} ของเชื้อดังกล่าวแล้ว เท่ากับ 0.138 mg dry wt/dose หรือ 1.3×10^9 CFU/dose

Table 1 LD_{50} of *P.multocida* (8:A)* in duck

bacterial dilution inoculated (1 ml)	No. dead/alive	cumulative results	
		No. dead/alive	% dead
10^{-6}	10/0	40/0	100
10^{-7}	10/0	30/0	100
10^{-8}	10/0	20/0	100
10^{-9}	9/1	10/1	91
10^{-10}	1/9	1/10	9
10^{-11}	0/10	0/20	0
10^{-12}	0/10	0/30	0

* six hours old broth culture of *P.multocida* (8:A) at the initial viable count of 3.3×10^9 CFU/ml were used as the inoculum

Table 2 Protection of ducks vaccinated with different doses of fowl cholera vaccine against challenge exposure to *P.multocida*

Group	No.	amount of antigen/dose		No.survivors/ No.challenged	% protection
		mg dry wt.	CFU		
Vaccinated	1	1.380	1.3×10^{10}	10/11	91
	2	0.690	6.5×10^9	10/11	91
	3	0.345	3.3×10^9	9/11	90
	4	0.173	1.7×10^9	6/10	60
	5	0.086	8.5×10^8	5/12	42
Control	6	0.000	0	0/11	0

3. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนติเจนในวัคซีนและประสิทธิภาพความคุ้มโรค

ปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนในวัคซีน จะมีผลต่อประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Protection และ antigen concentration (Figure 2) ซึ่งแสดงค่าเป็นเท่าของ PD_{50} จะเห็นว่า ความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงความคุ้มตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แม้จะเพิ่มปริมาณแอนติเจนแต่ความคุ้มก็เพิ่มปริมาณขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

กราฟนี้สามารถนำไปใช้ในการกำหนดปริมาณแอนติเจนในวัคซีนเพื่อการผลิตได้ เช่น ถ้าต้องการวัคซีนที่มีความคุ้มโรคตั้งแต่ 90% ขึ้นไป ควรให้มีปริมาณแอนติเจนตั้งแต่ 2.5 เท่าของ PD_{50} ขึ้นไป

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าปริมาณเชื้อในวัคซีนที่ให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 2.5 PD_{50} หรือ 3.25×10^9 CFU/-dose ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานวัคซีนตาม British Veterinary Codex (1970) ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณเชื้อในวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่ ไม่น้อยกว่า 10^{10} CFU/dose จะเห็นว่ามีค่าต่ำกว่า อาจจะเนื่องจากค่าที่เป็นมาตรฐานนั้นเป็นค่าของ whole cell ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในห้องปฏิบัติการผลิตวัคซีนอหิวาต์เป็ด ไก่ กรมปศุสัตว์มิได้หาจำนวน whole cell ด้วยการนับเซลล์จาก bacterial suspension เพราะเชื้อมีขนาดเล็ก การนับด้วยวิธี direct counting ต้องการเครื่องมือจำเพาะจึงจะได้ค่าที่แน่นอน การหาปริมาณเชื้อในวัคซีนจึงใช้วิธีที่แตกต่างออกไปโดยใช้ค่า Viable bacterial count ของเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแทน ตามรายงานของสุภาพร จ่างพานิช และคณะ (2530) growth curve ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์หลังจากการเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 7 ชั่วโมงแล้ว ความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับเวลาการเพาะจะไม่สัมพันธ์กัน เนื่องจากเริ่มมีเซลล์ตายเพิ่มขึ้น จึงใช้ค่า viable count ของเชื้อ หลังเพาะเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงที่ของ logarithmic phase เป็นด้านหนึ่งปริมาณเชื้อทั้งหมดในวัคซีน นอกจากนี้ยังใช้ค่าน้ำหนักแห้งของวัคซีนเป็นค่าที่ใช้ในการปรับมาตรฐานวัคซีนอีกค่าหนึ่งที่เชื่อถือได้ และเป็นที่ยอมรับทั่วไปในการผลิตวัคซีนแบคทีเรียชนิดเชื้อตาย (Bain et al, 1982)

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณแอนติเจนในวัคซีน และความคุ้มโรค (Figure 2) ที่ได้จากผลการทดลองครั้งนี้จะเห็นประโยชน์ในการผลิตวัคซีนมาก จะเห็นว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดในวัคซีนควรจะเท่ากับ 2.5 PD_{50} ซึ่งในทางปฏิบัติ ระหว่างปรับมาตรฐานของปริมาณเชื้อในวัคซีน ควรปรับให้เพิ่มค่ามากกว่าค่านี้ประมาณ 2 เท่า ดังนั้นมาตรฐานของปริมาณเชื้อในวัคซีนควรปรับให้มีปริมาณเชื้อ 5 PD_{50} เพื่อประหยัดแอนติเจนลดต้นทุนการผลิต เพราะถึงแม้จะเพิ่มปริมาณแอนติเจนขึ้นถึง 10 PD_{50} ก็ให้ความคุ้มโรคไม่แตกต่างกัน ในอนาคตหากมีการพัฒนาวัคซีนอหิวาต์เป็ดไก่เป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน ก็คาดว่าจะไม่ทำให้ปริมาณที่ใช้ในการฉีดสูงขึ้น ทั้งนี้จากการทดลองก็ได้ชี้ให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณแอนติเจนจากปริมาณเดิมในวัคซีนที่ใช้อยู่ปัจจุบันได้อีกอย่างน้อยเท่าตัว ทั้งนี้ยังต้องทำการทดลองซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลองก่อนที่จะใช้เป็นหลักการผลิตวัคซีนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สุภาพร จ่างพานิช, นิเทศ เลิศลินธลาลัย และองอาจ พรหมศร 2530 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pasteurella multocida* sero-type 8:A สัตวแพทยสาร 38 (3) : 20-24

Alexander, A.M. and Soltys, M.A. 1973. Relationship of serum agglutinations to protective immunity produced in turkeys immunized against fowl cholera. J. Comp. Path. 83, pp. 191-198.

Bain, R.V.S. De Alwis, M.C.L. Carter, G.R. and Gupta, B.K. 1982. Haemorrhagic Septicaemia, FAO Animal Production and Health Paper No.33.

British Veterinary Codex, Supplement 1970. The Pharmaceutical Press. W.C. 1 London. pp 162-164.

Layton, H.W. 1984. Efficacy of broth-grown *Pasteurella multocida* bacterins in duckling. Avian Dis., 28. pp 1086-1095.

Layton, H.W. and Sandhu, T.S. 1984. Protection of ducklings with a broth grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Dis., 28, pp 716-726.

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

การแบ่งชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธีลิควิดเฟสนิวทรอลไลซิ่ง อีไลซ่า

SUBTYPING OF TYPE ASIA I FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS BY LIQUID PHASE NEUTRALIZING ELISA TEST

วิไล ลินจงสุบงกช[1] สมใจ กมลศิริพิชัยพร[1] สุนันท์ รัมลำดวน[1] พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์[1]

Wilai Linchongsubongkoch Somjai Kamolsiripichaiporn

Sunan Romlamduan Payont Sinsuwonkwat

ABSTRACT

Antigenic variation of foot and mouth disease virus type Asia I in Thailand was examined using field virus isolated from 1990-1991. The liquid phase neutralizing ELISA test (LP ELISA) was used to determine r-value of the field isolated virus and the vaccine strain. The results were compared with the 2-dimensional microneutralization test. The range of r-value by LP ELISA was 0.61 to 1.56 and 92.86% of field isolated virus gave r-value greater than 0.70 while 7.14% of the virus gave r-value between 0.40 to 0.69. The results of r-value by SNT were ranged from 0.50 to 1.65 and 82.14% of field isolates gave r-value greater than 0.70 while 17.86% of the virus gave r-value range from 0.40 to 0.69. This indicated that the major groups of Asia I field isolated viruses were closely related to the virus vaccine strain.

บทคัดย่อ

การนำ liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) มาใช้ในการศึกษาชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียจากท้องที่ต่าง ๆ ซึ่งเกิดระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2533-2534 เปรียบเทียบกับวิธี 2-dimensional serum microneutralization test (SNT) ค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี (r-value) ระหว่างไวรัสจากท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก ให้ r-value อยู่ระหว่าง 0.61-1.56 พบว่า 92.86% ของไวรัสพื้นที่มีค่า r ≥ 0.70 และ 7.14% ของไวรัสมีค่า r อยู่ระหว่าง 0.40-0.69 เมื่อทำการตรวจโดยวิธี LP ELISA ส่วน r-value ที่ได้จากการตรวจโดยวิธี SNT มีค่าอยู่ระหว่าง 0.50-1.65 พบว่า 82.14% มีค่า r > 0.70 และ 17.86% มีค่า r อยู่ระหว่าง 0.40-0.69 แสดงให้เห็นว่าไวรัสไทป์เอเชียในพื้นที่ระบาดอยู่ในท้องที่ยังคงมีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีใกล้เคียงกันมากกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

คำนำ

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีทั้งหมด 7 ไทป์ คือ O,A,C,SAT1,SAT2,SAT3 และ Asia I ซึ่งแต่ละไทป์จะไม่ให้ความคุ้มข้ามซึ่งกันและกัน และยังแบ่งเป็นไวรัสชนิดย่อยต่าง ๆ มากมาย ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางด้านแอนติเจนในแต่ละสเตรนของไวรัสชนิดนั้น ๆ ไทป์ O มี 11 subtype, A มี 32 subtype,C มี 5 subtype,SAT1 มี 6 subtype,SAT2 มี 3 subtype, SAT3 มี 4 subtype และ Asia I มี 3 subtype (Pereira., 1977) การศึกษาด้านการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจนในแต่ละชนิดจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อจำนำมาใช้ในการแบ่งชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้า

---

[1] ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา 30130

เชื้อที่เกิดระบาดในท้องที่ต่าง ๆ ว่ายังคงมีคุณสมบัติทางด้านแอนติเจน หรือมีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีใกล้เคียงกับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนมากน้อยเพียงใด (Brooks by., 1968) ทำให้สามารถทราบสถานการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ว่าเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกันหรือแตกต่างไปจากไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือก seed ไวรัสสำหรับใช้ผลิตวัคซีน เพื่อให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพในการให้ความคุ้มโรคได้สูง จึงได้มีการนำวิธี Liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) test (Kitching et. al.) และวิธี serum neutralization (SNT) test (Rweyemamu., 1984) มาใช้ในการศึกษาการแบ่งชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไซย์เอเชียน และได้ทำการเปรียบเทียบการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) โดยวิธีดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไซย์เอเชียนจากท้องที่ต่าง ๆ ประมาณ 45 ตัวอย่าง ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่าง 2533-2534 ภายหลังจากถูกส่งมาที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อทำการตรวจวินิจฉัยและจำแนกชนิดแล้ว เชื้อไวรัสเหล่านี้ได้ถูกนำมาผ่านลงในหิรชุดัลเจอร์เซลล์ FLL-YFT และ BHK-21 จำนวน 4-7 passage เพื่อเพิ่มปริมาณและความรุนแรงของไวรัสก่อนที่จะนำไปศึกษาและตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA และ SNT ต่อไป

2. เตรียม Antiserum

Antiserum เตรียมจากโคทดลองที่ใช้ในการศึกษา duration immunity of trivalent vaccine โดยฉีดวัคซีน trivalent (O,A, Asia I) จากนั้นทำการฉีดวัคซีน trivalent ซ้ำในระยะ 3 เดือนหลังจากฉีดครั้งแรก ทำการเจาะเลือดในระยะ 6 เดือนหลังฉีดครั้งที่สอง แยกซีรั่มโคที่ได้นำไป inactivate โดยแช่ใน waterbath 56°C. เป็นเวลา 30 นาที เพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี SNT ส่วนซีรั่มโคที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี LP ELISA ต้องทำการ block ด้วย normal rabbit serum ก่อนเพื่อกำจัดปัญหา non specific binding และลดปัญหา background ในการตรวจสอบโดยวิธี ELISA test

3. Serum neutralization test (SNT)

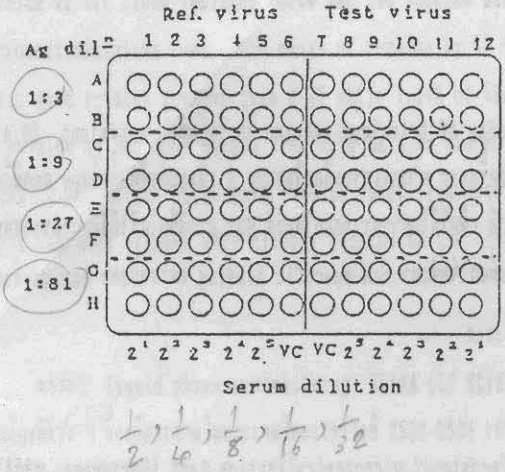
SNT เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี้โคเตอร์ โดยทำการตรวจโดยวิธี 2-dimensional microneutralization test (Rweyemamu.,1984) โดยทำการ dilute virus แบบ half log dilution และ dilute bovine serum แบบ 2 fold dilution โดยใช้ MEM เป็น diluent เติมไวรัสและซีรั่มในแต่ละ dilution ลงใน microplate ปริมาณเท่า ๆ กัน คือ 50 ul ต่อหลุม นำไป incubate ใน CO_2 incubator 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Cell suspension ของ BHK-21 ปริมาณ 100 ul ต่อหลุม จากนั้น incubate ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาย้อมด้วย 0.1% crystal violet ในสารละลาย 10% Formalin-saline อ่านค่า serum titer จากไวรัสวัคซีนและไวรัสท้องที่ จากค่า dilution สูงสุดของซีรั่มที่สามารถ neutralize ไวรัสได้ 50% ที่ความรุนแรงของไวรัสเป็น 100 TCID 50

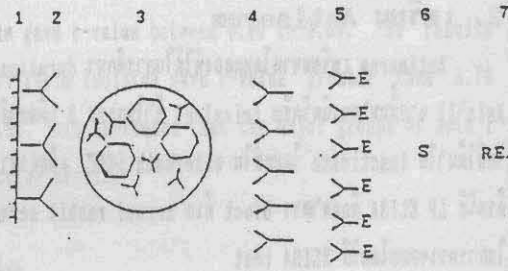
4. Liquid phase neutralizing ELISA (LP ELISA) test

ทำการตรวจสอบแบบ double antibody sandwich ELISA (Hamlin et. al., 1986) โดย coat rabbit anti Asia I serum ที่ dilution 1:5000 ลงบน solid phase ใน ELISA plate โดยใช้ coating buffer เขย่า 1 ชั่วโมงใน 37°C. incubator ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง จากนั้นเตรียม virus-serum mixture โดยเตรียมใน microplate อื่น ทำการ dilute virus ที่นำมาตรวจสอบแบบ 3 fold dilution และ serum แบบ 2 fold dilution (Kitching et.al., AFRC Pirbright, UK) โดยใช้ ELISA buffer ผสม test virus และ serum ในแต่ละ dilution ด้วยปริมาณเท่า ๆ กัน ในขณะเดียวกันให้เตรียม virus control ของแต่ละตัวอย่าง โดยใส่ ELISA diluent

แผ่นอีไร้ม เจือจางและ incubate ใน 37°C.เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง นำ virus-serum mixture ของแต่ละตัวอย่างมาใส่ใน ELISA plate ที่ได้ทำการ coat แล้ว ด้วย rabbit anti Asia I serum จากนั้น incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 37°C. incubator ล้างและเติม guinea pig anti Asia I serum (block ด้วย normal bovine serum) ที่ dilution 1:2000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างและเติม conjugate (anti guinea pig IgG Horseradish peroxidase conjugate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างและเติม substrate ที่เตรียมจากส่วนผสมของ 0.01% Tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้ 1N H_2O_2 เป็นตัว catalyst ปล่อยไว้ในอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1N H_2SO_4 อ่านค่า OD ที่ 450 nm โดยใช้เครื่องอ่าน Titertek Multiskan MC ELISA reader จากนั้นนำค่า OD ในแต่ละ dilution ของไวรัสที่ได้จาก control virus และ neutralize virus นำมาคำนวณค่า serum titer โดยใช้ Interpolation programme จาก computer โดยวิธีหาค่า OD ระหว่างจุด 2 จุดที่หารค่า โดยกำหนดว่าค่า serum titer จะอยู่ระหว่างจุด 2 จุดของ dilution ของซีรั่ม ที่มีค่า OD อยู่ระหว่าง 50% ของ OD maximum ในช่องของ virus control ใน dilution ที่ให้ค่า OD=1.5

รูปแบบฟอร์มและ diagram การทำ LP ELISA





1 Solid phase microtitre plate
2 Rabbit anti Asia I serum
3 Virus - serum mixture
4 Guinea pig anti Asia I serum
5 Anti guinea pig IgG enzyme conjugate
6 Substrate
7 Read OD by Titertek Multiskan MC

5. การหาความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value)

การหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) ระหว่างไวรัสจากเรือนที่กับไวรัสที่ใช้ทำวัคซีน โดยวิธี serum neutralization test และ liquid phase neutralizing ELISA test สามารถคำนวณค่า r-value โดยวิธีของ Brooksby (1968) ดังนี้

$$r = \frac{\text{serum titer against heterlogous (field) strain}}{\text{serum titer against homologous (vaccine strain}}$$

กำหนดค่า r-value ดังนี้

0.70-1.0 = very close relation (same subtype)

0.30-0.69 = close relation

0.10-0.29 = different relation

< 0.10 = very different relation

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแยกชนิดย่อยของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) เปรียบเทียบการตรวจสอบหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) เปรียบเทียบการตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA และ SNT โดยใช้เชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเชียน จาก โค กระบือ และสุกร ที่ได้จากท้องที่ต่าง ๆ ผลค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) ระหว่างไวรัสจากท้องที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน มีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ใกล้เคียงกันมาก จากตารางที่ 1 จากเชื้อไวรัสจำนวน 28 ตัวอย่าง ที่นำมาศึกษาค่า r-value และเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี โดยวิธี LP ELISA ให้ค่า r-value อยู่ระหว่าง 0.61-1.56 เมื่อค่า r ≥ 0.70 พบ 92.86% ของไวรัสทั้งหมด และเมื่อค่า r อยู่ระหว่าง 0.40-0.69 พบเพียง 7.14%

ส่วนการตรวจสอบโดยวิธี SNT ค่า r-value อยู่ระหว่าง 0.50-1.65 เมื่อค่า r ≥ 0.70 พบทั้งหมด 82.14% และเมื่อค่า r อยู่ระหว่าง 0.40-0.69 พบเพียง 17.86%

จากตารางที่ 2 แสดงผลการหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเชียน จากท้องที่จำนวน 34 ตัวอย่างที่เกิดระบาดในปี 2533 เมื่อตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA พบว่าให้ค่า r-value อยู่ระหว่าง 0.47-1.56 แสดงว่ายังมีความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ใกล้เคียงกันมาก

จากตารางที่ 3 แสดงผลการหาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี่ (r-value) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดเอเชียน จากท้องที่จำนวน 13 ตัวอย่างที่เกิดระบาดในปี 2534 ให้ค่า r-value อยู่ระหว่าง 0.67-1.39

Table 1 Comparison of r-value between LP ELISA and SNT test

	Sample	Species	Province	Region	r-value	
					LP ELISA	SNT
1	Asia/85*	C	Phetchaburi	7	1.0	1.0
2	Asia/60*	C	Bangkok	1	1.18	0.75
3	Asia/82*	P	Samutpakhan	2	1.19	1.06
4	95/90	C	Bangkok	1	0.90	1.22
5	105/90	C	Pathumthani	1	1.0	0.77
6	108/90	P	Angthong	1	1.09	1.65
7	112/90	C	Bangkok	1	1.01	0.88
8	121/90	C	Chai Nat	1	1.12	0.50
9	124/90	C	Lopburi	1	0.82	0.70
10	144/90	C	Bangkok	1	0.98	1.59
11	146/90	C	Saraburi	1	1.01	0.50
12	S-53/90	C	Prachinburi	1	1.20	1.02
13	S-96/90	C	Chonburi	2	0.70	1.19
14	113/90	C	Chayaphum	3	1.17	0.62
15	139/90	P	Nakhonratchasima	3	1.0	0.80
16	140/90	C	Nakhonratchasima	3	1.02	0.64

Table 1 Comparison of r-value between LP ELISA and SNT test (ns)

	Sample	Species	Province	Region	r-value	
					LP ELISA	SNT
17	120/90	C	Sakonnakhon	4	1.56	0.86
18	141/90	C	Chai Nat	4	0.63	0.83
19	147/90	C	Khon Kaen	4	0.80	1.12
20	1/91	C	Loei	4	0.95	0.59
21	S-57/90	P	Ratchaburi	7	0.89	0.78
22	S-61/90	P	Suphanburi	7	0.91	1.11
23	S-73/90	P	Nakhonpathom	7	0.99	0.84
24	S-76/90	P	Nakhonpathom	7	1.10	0.96
25	S-81/90	P	Ratchaburiom	7	0.89	1.17
26	S-85/90	P	Nakhonpathom	7	0.78	0.70
27	S-102/90	P	Nakhonpathom	7	1.14	0.75
28	S-133/90	C	Ratchaburi	7	0.61	1.06

r ≥ 0.70	26(92.86%)	23(82.14%)	* : Seed vaccine strain
r = 0.40-0.69	2(7.14%)	5(17.86%)	C : Cattle
r < 0.39	0	0	P : Pig

Table 2 The r-value of Asia I field isolates in 1990 by LP ELISA test

	Sample	Species	Province	Region	r-value
1	Asia/60	Cattle	Bangkok	1	1.18
2	95/90	Cattle	Bangkok	1	0.90
3	105/90	Cattle	Pathumthani	1	1.0
4	108/90	Pig	Angthong	1	1.09
5	112/90	Cattle	Bangkok	1	1.01
6	121/90	Cattle	Chai Nat	1	1.12
7	124/90	Cattle	Lpburi	1	0.82
8	141/90	Cattle	Chai Nat	1	0.63

Table 2 The r-value of Asia I field isolates in 1990 by LP ELISA test (ns)

	Sample	Species	Province	Region	r-value
9	144/90	Cattle	Bangkok	1	0.98
10	146/90	Cattle	Saraburi	1	1.01
11	151/90	Cattle	Ayuthaya	1	0.80
12	Asia/82	Pig	Samutprakhan	2	1.19
13	S-53/90	Cattle	Prachinburi	2	1.20
14	S-69/90	Cattle	Chonburi	2	0.70
15	S-100/90	Pig	Chonburi	2	1.09
16	S-88/90	Buffalo	Yasothon	3	1.53
17	133/90	Cattle	Chayaphum	3	1.17
18	123/90	Cattle	Nakhonratchasima	3	0.90
19	139/90	Pig	Nakhonratchasima	3	1.0
20	140/90	Cattle	Nakhonratchasima	3	1.02
21	120/90	Cattle	Sakonnakhon	4	1.56
22	147/90	Cattle	Khon Kaen	4	0.89
23	S-57/90	Pig	Ratchaburi	7	0.89
24	S-60/90	Pig	Nakhonpathom	7	0.47
25	S-61/90	Pig	Suphanburi	7	0.91
26	S-73/90	Pig	Nakhonpathom	7	0.99
27	S-76/90	Pig	Nakhonpathom	7	1.10
28	S-81/90	Pig	Ratchaburi	7	0.89
29	S-84/90	Pig	Nakhonpathom	7	1.06
30	S-85/90	Pig	Nakhonpathom	7	0.78
31	S-86/90	Pig	Suphanburi	7	0.98
32	S-102/90	Pig	Nakhonpathom	7	1.14
33	S-106/90	Pig	Suphanburi	7	1.05
34	S-113/90	Cattle	Ratchaburi	7	0.61

$r \geq 0.70 = 31(91.12\%)$

$r \sim 0.40\text{-}0.69 = 2\ (8.88\%)$

$r \leq 0.39 = 0$

Table 3 Comparison of r-value between LP ELISA and SNT test

Sample	Species	Province	Region	r-value
1 21/91	Cattle	Ayuthaya	1	0.76
2 S-2/92	Pig	Chachoengsao	2	0.87
3 27/91	Buffalo	Buri Rum	3	1.24
4 29/91	Cattl	Chayaphum	3	1.22
5 30/91	Cattl	Surin	3	0.88
6 1/91	Cattl	Loei	4	0.95
7 3/91	Buffalo	Udonthani	4	1.39
8 5/91	Cattle	Nakhonpanom	4	0.87
9 8/91	Cattle	Nong Khai	4	0.91
10 13/91	Cattle	Khon Kaen	4	1.01
11 18/91	Cattle	Mukdahann	4	1.00
12 S-7/91	Cattle	Nakhonpathom	7	1.17
13 S-10/91	Cattle	Phetchaburi	7	0.67

r $\geq$ 0.70 = 12(92.31%)

r $\sim$ 0.40-0.69 = 2(7.69%)

r $\leq$ 0.39 = 0

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาชนิดย่อย ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอเชียวันโดยวิธี LP ELISA test และ SNT พบว่าให้ r-value อยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน คือ 0.61-1.56 และ 0.61-1.56 และ 0.50-1.65 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสไทป์เอเชียวัน ที่ระบาดอยู่ทั่วทั้งคงให้ความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีใกล้เคียงกันมากกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีน คือ Asia I/85 (Brooksby., 1968) ซึ่งค่า r-value มากกว่า 0.50 ขึ้นไปสามารถบ่งได้ว่าไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน จะให้ความคุ้มโรคได้ทั่วถึงในการป้องกันการระบาดของโรคในสัตว์ทุกฝูงที่

การหาค่า serum titer โดยวิธี LP ELISA test นั้นสามารถทำการตรวจสอบได้ โดยใช้วิธี single dilution (Kitching et.al โดยการ dilute ซีรั่มเพียงอย่างเดียว และกำหนดค่า dilution ของไวรัสที่จะต้องใช้โดยการทำ antigen titration ก่อน ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสีย คือ บางครั้งความเข้มข้นของไวรัสที่นำมาใช้ในช่วงผสมกับซีรั่มนั้น virus titer ไม่คงที่ ทำให้การหาค่า serum titer เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงได้การพัฒนาวิธี 2-dimensional dilution มาใช้แทนวิธี single dilution เพราะสามารถคำนวณค่า serum titer ได้อย่างถูกต้องมากกว่า โดยสามารถหา virus titer ที่กำหนดเป็นมาตรฐานได้จากแต่ละ dilution ของ antigen โดยคำนวณจากค่า OD ระหว่างจุด 2 จุด ที่ให้ 50% OD maximum = 1.5 โดยใช้ Program computer ที่เรียกว่า interpolation (Lunt et al., manuscript in preparation)

การศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางซีโรโลยี โดยวิธี 2-dimensional SNT (Rweyemamu., 1984 และ Rweyemamu et al., 1978) พบว่าให้ความแม่นยำและถูกต้องได้ใกล้เคียงกับวิธี LP ELISA เพราะดูจากค่า r-value ในกลุ่มไวรัสจากตารางที่ 1 ซึ่งกลุ่มไวรัสที่ให้ค่า r > 0.70 พบ

92.86% และ 82.14% เมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธี LP ELISA และ SNT ตามลำดับ แสดงว่าให้ผลใกล้เคียงกันสามารถจะนำเอาวิธี SNT ได้ (Crowther., 1987) ซึ่งข้อดีของวิธี LP ELISA คือให้ความจำเพาะสูงและให้ non specific cross reaction ต่ำ ไม่ต้องคำนึงถึงเรื่องการ contaminate เกี่ยวกับอุปกรณ์และสารที่ใช้ตรวจสอบ สามารถอ่านผลได้รวดเร็ว ส่วนการที่ SNT นั้นให้ความจำเพาะสูงแต่การอ่านผลช้ากว่า และต้องคำนึงถึงอุปกรณ์และสารที่ใช้ตรวจสอบให้อยู่ในสภาวะปราศจากเชื้อ และสภาวะเซลล์พร้อมที่จะต้องมีคุณภาพดีจึงจะให้การอ่านผลได้ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองครั้งนี้ได้รับความร่วมมือระหว่างรัฐบาลออสเตรเลียและกรมปศุสัตว์ ภายในโครงการ Thai-Australian FMD Project และขอขอบพระคุณ Mr. Ross Antony ผู้เชี่ยวชาญออสเตรเลีย และ น.สพ. ลอบ คงพน ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Brooksby, J.B. (1968). Variants and immunity : Definition for Serological investigation. International symposium on foot and mouth disease. Variants and immunity. Lyon 1967. Symposium Series. Immun. Stand. 8, 1-10.

2. Crowther, J.R. (1987). ELISA in FMD diagnosis and differentiation and the use of monoclonal antibodies. In Foot and Mouth Disease. 17th Conference of the O.I.E. Foot and Mouth Disease Commission. Paris, 1-3 October 1986. O.I.E. Paris, 178-195.

3. Hamlin, C., Barnett, I.T.R. and Crowther, J.R. (1986). A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against foot and mouth disease virus. II Application. J. Immun. Meth. 93., 123-129.

4. Kitchning, R.P., Rendle., R. and Ferris, N.P. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. AFRC Institute for Animal Health, Pirbright, Working, Surrey, UK.

5. Pereira, H.G. (1977). Subtyping of foot and mouth disease virus. International Symposium on foot and mouth disease, Lyon, 1976. Develop. biol. Standard. 35, 167-174.

6. Rweyemamu, M.M. (1984). Antigenic variation in foot and mouth disease : studies base on the virus neutralization reaction. J. Biol. Stand. 12, 323-327.

7. Rweyemamu, M.M. Booth, J.C., Heak, M. and Pay T.W.F. (1978). Microneutralization tests for serological typing and subtyping of foot and mouth disease virus strains. J. Hygiene., Camb., 81, 107-122.

รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดี้ในสุกรต่อไวรัสออเจสกี้ จากตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างเลือดบนกระดาษด้วยวิธีอีไลซ่า, ซีรั่มนิวทรัลไลเซชั่นและลาเทคซ์แอคกลูติเนชั่น

PRELIMINARY REPORT ON THE DETECTION TO ANTIBODY AGAINST AUJESZKY VIRUS IN PIG SERA AND BLOOD ON FILTER PAPER USING ELISA, SERUM NEUTRALIZATION TEST AND LATEX-AGGLUTINATION-TEST

พิศมัย เลียมจรัสกุล[1] ยอดยศ มีพืช[2] จตุพร สมิตานนท์[2] อุทิศ ตรีนันทวัน[2]
วิรัตน์ บุ่นอุดม[2] ปติทาน อินทร์คง[2]

Pisamai Leamcharaskul Yodyot Meephuch Jatuporn Smitanon
Utis Trinantawan Virat Pun-udom Patitan Inkong

ABSTRACT

The results of three tests for Aujeszky's disease were analysed and compared. The presence of Aujeszky's antibodies was determined by "Enzyme-linked-immunosorbent assays" (ELISA), "Serum-neutralization-test" (SNT); and "Latex-agglutination-tests" (LT). Whole blood and sera samples were taken from 800 swine form 26 provinces. From a total samples, 26% of the serum and 18% of the blood eluate samples showed a positive result when tested by the ELISA method. Further testing was done on serum samples using SNT. Samples tested were those which gave negative, suspicious, or weakly positive results when tested by ELISA. Using SNT, 23% of these showed a positive result. Many serum and blood eluate samples were also tested by LT. The sensitivity of LT was between the sensitivity of SNT and ELISA.

บทคัดย่อ

ผลการตรวจสอบแอนติบอดี้ (antibody) โรคออเจสกี้กับตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างเลือดบนกระดาษ MDT (microdiluter-delivery-tester) จากสุกร 800 ตัวใน 26 จังหวัด โดยการใช้วิธีอีไลซ่า (Enzyme-linked-immunosorbent assay, ELISA), ซีรั่มนิวทรัลไลเซชั่น (Serum-neutralization-test, SNT) และลาเทคซ์แอคกลูติเนชั่น (Latex-agglutination test, LT) ได้ถูกวิเคราะห์และเปรียบเทียบโดยเมื่อทดสอบด้วย ELISA จะพบผลบวก 26% ในตัวอย่างซีรั่ม และ 18% ในตัวอย่างเลือด ตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลลบหรือ weakly positive หรือผลแย้งกันระหว่างตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างเลือดบน MDT ใน ELISA จะถูกคัดเลือดออกมาทดสอบต่อด้วย SNT พบว่าให้ผลบวก 23% ต่อมาคัดเลือกตัวอย่างมาทดสอบต่ออีกด้วย LT พบว่า LT ให้ผล sensitivity อยู่ระหว่าง SNT และ ELISA

คำนำ

โรคออเจสกี้เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกที่จังหวัดนครปฐม ซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงสุกรที่สำคัญ (6) จากนั้นโรคนี้ได้แพร่ระบาดเรื่อยมาโดยในราวปี พ.ศ.2522-2523 อาจารย์ชุมและคณะได้รายงานการระบาดของโรคนี้อีก 5 แห่ง (7) นอกจากนี้นั้นยังพบรายงานการระบาดอีกหลายแห่งใน 6 จังหวัดภาคใต้ของไทยในปี พ.ศ.2525 อีกด้วย (4) แต่

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130 [2] กองระบาดวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ เขตบางเขน กรุงเทพ ฯ

เดิมนั้นการศึกษาหรือสำรวจโรคออเจสกี้ในไทยมีขอบเขตไปในทางคลินิค และทำการวินิจฉัยโรคจากไวรัส (virus diagnosis) (5,6,7,9,10 และ 19) แต่เนื่องจากสุกรที่ป่วยเป็นพาหะของโรคสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้โดยที่ไม่แสดงอาการของโรค (carrier) ดังนั้นจึงมีผู้พยายามศึกษาถึงวิธีการตรวจสอบแอนติบอดี้ ต่อไวรัสออเจสกี้ เช่น Virus Neutralisation (VN) และ ELISA จากตัวอย่างซีรัม (2,3,22) เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดแยกสุกรที่เป็นโรคหรือให้ผลบวก (positive) ต่อการทดสอบออกจากสุกรปรกติ

ในงานทดลองนี้ มีจุดประสงค์ที่จะหาวิธีที่สะดวกสำหรับการเก็บตัวอย่างจำนวนมาก แม้ในภาวะสิ่งแวดล้อมหรือสุขาภิบาลไม่เหมาะสม เพื่อนำมาวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งสรุปผลการตรวจสอบทางซีรัมวิทยาของโรคออเจสกี้ และหาวิธีการคัดแยกสุกรที่เป็นพาหะหรือให้ผลบวกต่อการทดสอบออกมาจากสุกรปรกติ โดยใช้ตัวอย่างเลือดบนกระดาษ MDT และซีรัมจากสุกร 800 ตัว ซึ่งเก็บไว้จาก 86 ฟาร์ม ใน 26 จังหวัด มาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA, SNT และ LT รายงานนี้เป็นการศึกษาโรคออเจสกี้ครั้งแรกที่ใช้ ELISA-alkaline phosphatase และใช้ LT กับตัวอย่างที่สกัดได้จากเลือดสุกรบนแผ่นกระดาษ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. คัดเลือก filter paper ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่าง

โดยนำกระดาษ 3 ชนิด มาทดสอบ คือ

1.1 chromatography paper Whatman no. I (W., Whatman, England)

1.2 0.025 มล. microdiluter delivery tester (MDT, Dynatech, Switzerland)

1.3 antibiotika (AT, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)

กระดาษ W และ MDT จะถูกตัดเป็นขนาด 4.0x4.6 ซม.^{2} ส่วน AT มีลักษณะเป็นแผ่นวางกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. หยดเลือดลงบนกระดาษทั้งสาม จากนั้น W และ MDT จะถูกวางเก็บไว้ในกล่องใส่สไลด์ (diapositive magazine) และ AT จะถูกวางไว้ใน petridish เพราะขนาดเล็กมาก เมื่อเลือดแห้งสนิท นำ W และ MDT ไปตัดเป็นแผ่นวางกลมขนาดเล็ก (disc) อย่างละ 10 แผ่น ด้วยเครื่องเจาะกระดาษเข้าพิมเอกสารทั่วไป มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.5 มม. ชั่งน้ำหนัก disc และสังเกตลักษณะความคงตัวของกระดาษหลังหยดเลือดและเนื้อแห้ง

2. หาปริมาตรอิ่มตัวของเลือดใน MDT disc

โดยการนำ MDT ที่ยังไม่ได้หยดเลือดและที่ดูดซับเลือดอิ่มตัว ซึ่งปล่อยทิ้งให้แห้งแล้ว มาตัดเป็นแผ่น disc เช่นเดียวกับข้อ 1 อย่างละ 10 แผ่น ทำการชั่งน้ำหนัก และหาค่าเฉลี่ยทุกวัน คำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยของเลือดอิ่มตัวใน 1 disc ขณะเดียวกันนำ MDT ที่ไม่มีเลือดมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นหยดเลือดปริมาตร 0.030 มล.ลงบน MDT นั้น เมื่อเลือดแห้งสนิทนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งทำเช่นนี้ 10 ครั้ง คำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยของเลือดปริมาตร 0.030 มล. บน MDT จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้ทั้ง 2 ค่านี้ ไปคำนวณหาปริมาตรอิ่มตัวของเลือดใน 1 disc อีกครั้งหนึ่ง

3. การเก็บตัวอย่าง

ทำการคัดเลือกสุกรแบบสุ่มตัวอย่าง คือไม่จำกัดอายุ เพศ และพันธุ์ (Duroc, Largewhite, Landrace และ Hybrid) จาก 86 ฟาร์ม ใน 26 จังหวัด (ราวเดือนกุมภาพันธ์-เมษายน 2531) (ดูแผนที่ 1) โดยสุกรทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรง ไม่ได้แสดงอาการป่วยด้วยโรคออเจสกี้เลย สุกรจะถูกเจาะเลือดจาก jugular vein เลือดที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปแยกซีรัมเพื่อทำการตรวจสอบต่อไป อีกส่วนหนึ่งจะถูกหยดลงบน MDT ซึ่งถูกตัดเตรียมไว้ให้มีขนาด 4.0x4.6 ซม.^{2} ซึ่งเป็นขนาดพอดีสำหรับการเก็บไว้ในกล่องใส่สไลด์ เพื่อกันการปนเปื้อน (contamination) และสะดวกในการขนย้าย หลังจากหยดเลือดลงประมาณ 1/2-2/3 ของกระดาษแล้ว ขอบบนของกระดาษที่เหลือไว้จะถูกบันทึกหมายเลขของสุกร, ฟาร์ม, จังหวัดที่ตั้งของฟาร์ม และวันที่เก็บตัวอย่างเพื่อป้องกันความสับสน เมื่อเลือดแห้งดีแล้วแผ่นกระดาษตัวอย่างนี้จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในถุงพลาสติคที่ปิดสนิทมิดชิดเพื่อนำไปตรวจสอบต่อไป

4. คัดเลือกปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการสกัด(elution) ตัวอย่างเลือดบน MDT ดังต่อไปนี้

4.1 สารละลายบัฟเฟอร์ โดยการใช้สารละลายดังต่อไปนี้ทำการสกัดตัวอย่างเลือดบน MDT :- dilution buffer (Behring), 0.5 M NaCl, 1 M NaCl (pH > 6.4) และ PBS with 0.05% Tween 20 (pH 7.0)

นำสารละลายที่สกัดได้ไปหาไตเตอร์ (titer) โดยวิธี ELISA (Enzygnost-Anjeszky, Behring AG, Marburg, Germany) วัดค่าการดูดกลืนของแสง (optical density, OD) ที่ 405 นาโนเมตร (nm) ด้วย Titertek Multiskan (Flow Laboratories, Germany) เปรียบเทียบค่า OD โดยเฉพาะค่าที่ได้จาก non-specific reaction หรือ background OD (OD_b)

4.2 เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยหาไตเตอร์และค่า OD ของตัวอย่างเลือดบน MDT ที่เป็น weakly positive (OD = 0.209) และ strongly positive (OD = 1.850) ซึ่งถูกสกัดเย็นสารละลายด้วยเวลา 15,20,30,60,120 นาที และ 15 ชั่วโมง ที่ 37°C. และอุณหภูมิห้อง โดยการใช้ Enzygnost เปรียบเทียบไตเตอร์ และ OD ที่ได้กับตัวอย่างซีรั่มจากสุกรตัวเดียวกัน

4.3 การกดกระดาษ นำ MDT disc ที่ไม่ได้ผ่านเลือดมาจุ่มลงใน 0.20 มล. ของ dilution buffer ในหลุมของ microtiter plate (Greiner Co., Nuertingen, Germany) นาน 30,45 และ 60 นาที ปากคีบกดกระดาษในหลุม จากนั้นคีบเอากระดาษออก นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า OD เปรียบเทียบค่า OD กับสารละลายในหลุมที่ไม่กดกระดาษ จากนั้นนำตัวอย่างซีรั่ม 88 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดของสุกรตัวเดียวกันที่สกัดได้ด้วย dilution buffer ที่ 37°C. นาน 20 นาที (ไม่กดกระดาษขณะสกัด) มาทดสอบด้วย Enzygnost เปรียบเทียบผล บวก/ลบ (positive/negative) ที่ได้ (โดยใช้ positive-negative cut off = 0.2; OD < 0.2 ให้ผลเป็นลบ)

5. หาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการ incubate(optimal incubation time) ระหว่างขั้นตอนการจับตัวของแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี้ ของ ELISA ในการตรวจสอบสารละลายตัวอย่างเลือด

นำสารละลายที่สกัดได้ด้วย dilution buffer นาน 20 นาที ที่ 37°C. (เมื่อคิดค่า Haematocrit = 40% ความเข้มข้นของซีรั่มเป็น 1 : 88) และตัวอย่างซีรั่มจากสุกรตัวเดียวกัน (ความเข้มข้นของซีรั่มเป็น 1 : 44) มาเติมลงในหลุมของ microtiter plate (Enzygnost) ซึ่งมีแอนติเจนและแอนติเจนคอนโทรล (antigen control) coat อยู่แล้ว นำไป incubate นาน 60,90 และ 120 นาที ที่ 37°C. จากนั้นดำเนินขั้นตอนต่าง ๆ ตามวิธีการของ Enzygnost เปรียบเทียบค่า OD ทั้งหมดที่ได้

6. หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีรั่มจากสารละลายที่สกัดได้ ในการตรวจสอบด้วย ELISA

โดยการสกัดสารละลายของตัวอย่างเลือดจาก MDT 124 ตัวอย่าง ด้วยการใช้ disc 2 แผ่น จุ่มลงใน dilution buffer 1,056 มล. ในเอพเพนดอร์ฟหิวบ์ (eppendorf tube) ที่มีฝาปิด นาน 20 นาที ที่ 37°C. ทำการเจือจางให้ความเข้มข้นของซีรั่มในสารละลายที่สกัดได้เป็น 1:44, 1:88 และ 1:176 นำไปทดสอบด้วย Enzygnost พร้อมกับซีรั่มจากสุกรตัวเดียวกัน (1:44) เปรียบเทียบค่า OD ทั้งหมดที่ได้

7. การทดลองลดค่า OD_b ใน Enzygnost

เนื่องจากค่า OD_b ที่ได้จากตรวจสอบสารละลายที่สกัดได้มีค่าสูง จึงทำการทดลองเพื่อลดค่านี้ด้วยหลายวิธีการดังต่อไปนี้ คือ

7.1 ปั่น (centrifuge) สารละลายตัวอย่างเลือดด้วยความเร็ว 1,500 g นาน 5 นาที ก่อนการตรวจสอบจริงด้วย Enzygnost สังเกตค่า OD ที่ได้

7.2 เนื่องจากคาดว่าแอนติบอดีที่สกัดได้ในเอพเพนดอร์ฟหิวบ์ อาจเกาะติดแน่นกับผนังด้านในของหิวบ์ ทำให้เมื่อเวลานำเอาสารละลายที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย Enzygnost จะได้ specific reaction น้อยลง ดังนั้นจึงทำการสกัดตัวอย่างเลือดจาก MDT 1/2 หรือ 1 disc ในหลุมของ

microtiter plate (Enzygnost) ด้วย dilution buffer 0.2 ml. ที่ 37°C. ในเวลาต่าง ๆ กันระหว่าง 20-90 นาที ก่อนนำมาตรวจสอบด้วย Enzygnost สังเกตค่า OD ที่ได้จากการทดสอบ

7.3 ใช้สารละลาย 4% อัลบูมิน (BSA, bovine serum albumin) ใน PBS (pH 7.2) เป็น block protein โดยเติม BSA ลงใน microtiter plate นาน 30 นาที ก่อนขั้นตอนการเติมคอนจูเกท (conjugate) ใน enzygnost แล้วล้างออกด้วย washing solution (Behring) นอกนั้นยังคงวิธีการเดิมของ Enzygnost สังเกตค่า OD ที่วัดได้

8. หาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบตัวอย่างเลือดบน MDT ด้วย LT

เนื่องจากตามวิธีการใช้ LT (Aujeszky-Latex test, IffaMerieux) นั้น กำหนดให้ใช้ทดสอบตัวอย่างซีรัม undilute เท่านั้น ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างเลือดจาก MDT โดยนำเอา MDT 4 disc มาสกัดด้วย dilution buffer 0.24 มล. นาน 20 นาที ที่ 37°C. นำสารละลายที่สกัดได้ซึ่งมีความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:5 นี้ มาทดสอบต่อด้วย LT พร้อมกับตัวอย่างซีรัมที่ได้จากสุกรตัวเดียวกันนี้ (undilute) เปรียบเทียบผล บวก/ลบ และเวลาในการอ่านผล (agglutination time)

9. การตรวจสอบทางซีรัมวิทยา

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสออเจสกี้โดยการใช้ ELISA, SNT และ LT

9.1 ELISA เป็นวิธีแรกที่ใช้ตรวจสอบตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างเลือดบน MDT จากสุกร 800 ตัว โดยสำหรับตัวอย่างเลือดบน MDT ให้ใช้ MDT 2 disc จุ่มลงใน dilution buffer 1,056 มล. ในแอพเพนดอร์ฟหัวบิดที่มีฝาปิด จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C. นาน 20 นาที นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้และซีรัม ไปตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสออเจสกี้ด้วยวิธีการของ Enzygnost ซึ่งเป็น test kit ที่ประกอบด้วย microtiter plate มีลักษณะเป็นแผง6 แผง แต่ละแผงมี 2 แถว (2x8 หลุม) ซึ่งแถวหนึ่งถูก coat ไว้แล้วด้วยแอนติเจน และอีกแถวหนึ่งด้วยแอนติเจนคอนโทรล; แอนติเจน ได้จากเซลล์ไตของแฮมสเตอร์ (BHK-21 cell, Baby Hamster Kidney-21 cell) ที่ถูก infect ด้วย Herpes virus suis; คอนจูเกท (AP-conjugate) ได้จากการจับตัวกันระหว่างอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (AP, alkaline-phosphatase) กับแอนติบอดีต่อไวรัสออเจสกี้ที่ได้จากการฉีดกระต่ายทดลอง; ซับสเตรท (Substrate) มีลักษณะเป็นเม็ด (tablet) ของ para-Nitrophenyl phosphate ก่อนใช้ต้องละลายในบัฟเฟอร์ (substrate buffer) ซึ่งประกอบด้วย 100 มล. ของ Deithanolamine และ 102 มก. ของ $MgCl_2.6H_2O$ (0.5 mmol)/L Aqua dest., pH 9.8; dilution buffer สำหรับเจือจางซีรัมและ Enzyme-conjgate โดยเป็นส่วนผสมของ phosphate buffer กับ 40 มล. ของ Tween-20, 0.2 g. ของ Sodiumazide และ cattle protein/L, pH 6.8-7.2; washing solution เป็นส่วนผสมของ phosphate buffer ที่เข้มข้น (20X) กับ 200 มล. ของ Tween-20/L; stop solution คือ 2N NaOH; positive control serum

วิธีการ ในขั้นแรกให้เติม dilution buffer ลงใน plate ก่อน (0.15 มล. สำหรับการตรวจซีรัมหรือ 0.1 มล. สำหรับสารละลายตัวอย่างเลือดที่สกัดได้) จากนั้นเติม 0.05 มล. ของตัวอย่างซีรัม หรือ 0.1 มล. ของตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ ลงใน plate ทั้ง 2 แถว คือแอนติเจนและแอนติเจนคอนโทรล (ความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:44 หรือ 1:88 ตามลำดับ) นำไป incubate ที่ 37°C. นาน 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายจากหลุมทิ้ง จากนั้นนำสารล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง (0.2 มล./หลุม) นำไป incubate อีก ที่ 37°C. นาน 1 ชั่วโมง ดูดออกและทำการล้างแบบเดิมอีก 3 ครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน แล้วเติมสารละลายซับสเตรท (0.1 มล./หลุม) นำไป incubate ต่ออีกที่ 37°C. นาน 1/2 ชั่วโมง ขั้นสุดท้ายเติม stop solution (0.05 มล./หลุม) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ (enzyme) ทำการตรวจสอบตัวอย่างละ 2 หลุม (duplicate) เพื่อป้องกันการอ่านผลผิดพลาด

การอ่านผล วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วย Titertek Multiskan (ถ้า OD ที่ได้ < 0.2 ให้ผลเป็นลบ)

9.2 SNT การตรวจด้วยวิธี SNT นี้ ทำเฉพาะตัวอย่างซีรัมเท่านั้น โดยเลือกตัวอย่างซีรัมจำนวน 640 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลจากการตรวจสอบด้วย ELISA เป็นลบ (OD < 0.2) หรือ weakly positive (0.2 < OD < 0.4) หรือผลแย้งกันระหว่างตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างเลือดบน MDT ของ

สุกรด้วยเดียวกัน

วิธีการ ได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการปรกติที่ใช้ในศูนย์วินิจฉัยโรคของแคว้นบาวาเรีย (Landesuntersuchungsamt fuer das Gesundheitswesen Suedbayern) ที่ Oberschleissheim ประเทศเยอรมัน โดยมีหลักการดังนี้คือ แอนติเจน ได้จากไวรัสออเจสกี้ (Aujeszky-virus test strain BI4) ซึ่งผ่าน chick embryo fibroblast cell มาแล้ว 6 passages และ fetal calf lung cell 10 passages เก็บไว้ที่ -80°C. ก่อนนำมาใช้ทดสอบ (virus dose = 50 KID_{50}/0.025 ml.); มีเลี้ยงที่ใช้คือ Eagle's minimum essential medium (E'MEM), pH 7.2-7.4 ซึ่งประกอบด้วย Earle' salt, glutamine, 20 mM. Hepes และ 0.85 กรัม/ลิตร $NaHCO_3$ (Flow laboratories, Germany) ผสมกับ 5% หรือ 2% fetal calf serum, 5% lactalbumin-hydrolysate solution และ 0.2% solution (0.05 มล./มล.); เซลล์ คือ fetal calf lung cell มีความเข้มข้นเป็น 500,000 เซลล์/มล.; microtiter plate แบบหลุมแบน 96 หลุม (flat-bottom 96 well) (Falcon 3070; Becton Dickinson & Co., U.S.A.) ทำจาก polystyrene; ซีรั่ม ต้องถูก inactivate ที่ 56°C. นาน 30 นาทีก่อนการทดสอบ

เริ่มการตรวจสอบโดยซีรั่มจะถูกเจือจางเป็น 4 dilution คือ 1:1, 1:2, 1:4, และ 1:8 (0.025 มล./หลุม) ทำการตรวจสอบ dilution ละ 2 หลุมพร้อมกัน (duplicate) เติมแอนติเจนหลุมละ 0.025 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า plate (Dynatech, Switzerland) นำไป incubate ที่ 37°C. นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ 0.1 มล./หลุม ปิด plate และนำไป incubate ต่อที่ 37°C. โดยทุกการทดลองจะต้องมี positive และ negative serum control, ตัวอย่างซีรั่มที่ไม่มีแอนติเจนสำหรับเป็นคอนโทรลในทุก dilution, antigen titration 3 หลุมต่ำ dilution โดยเริ่มตั้งแต่ dilution ที่ใช้จนถึง 1:128 และ cell control อย่างน้อยที่สุด 8 หลุม

การอ่านผล ทำการอ่านผล CPE ด้วย กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ในเวลา 2-7 วัน เปรียบเทียบกับ control คำนวณค่า titer ที่ได้ของซีรั่มด้วยวิธีของ Spearman และ Kaerber (12)

9.3 LT คัดเลือกตัวอย่างซีรั่ม 59 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดบน MDT 123 ตัวอย่าง ไปทดสอบต่อด้วย LT ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่

- ให้ผลแตกต่างกันใน ELISA (ตัวอย่างเลือดบน MDT, BI และ/หรือตัวอย่างซีรั่ม, S) และ SNT (S) หรือ
- ให้ผลบวกใน ELISA (BI) และ ELISA (S) หรือ
- ให้ผลลบใน ELISA และ SNT

วิธีการ ตัวอย่างเลือดบน MDT 4 disc จะถูกสกัดด้วย dilution buffer 0.240 ml. ที่ 37°C. นาน 20 นาที ในแอพเพนเดร์พทิวบ์ที่มีฝาปิด (ความเข้มข้นของซีรั่มจากสารละลายสกัดนี้เป็น 1:5) สารละลายที่สกัดได้นี้กับตัวอย่างซีรั่ม (undilute) จะถูกทดสอบต่อด้วย Aujeszky-latex test ซึ่งเป็น test kit ที่ประกอบด้วย negative และ positive serum control, แผ่นทดสอบซึ่งใช้ทดสอบได้ 6 ตัวอย่าง/แผ่น, ไม้สำหรับคนตัวอย่างกับ latex suspension ให้ผสมเข้ากันและที่สำคัญคือ latex particle suspension ซึ่งบนผิวของ latex particle มี glycoprotein ของไวรัสออเจสกี้อยู่ จึงสามารถจับกับแอนติบอดี้ เกิด agglutination ได้

เริ่มการทดสอบโดยการเติม 0.030 มล. ของตัวอย่างลงบนแผ่นทดสอบ จากนั้นหยด latex suspension ลงไป 1 หยด ใช้ไม้คนให้เข้ากัน ขยับแผ่นทดสอบไปมาจนกว่าจะเห็น agglutination ขณะเดียวกันเตรียมcontrol โดยหยดpositive และ negative serum control อย่างละ 1 หยดลงบนแผ่นทดสอบ คอยสังเกตการเกิด agglutination หลังหยด latex suspension

การอ่านผล ทำที่อุณหภูมิห้อง สังเกตุ agglutination ด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบกับ control และใช้เวลาในการอ่านผล (agglutination time) สำหรับตัวอย่างซีรั่ม เป็น 6 นาที สำหรับตัวอย่างเลือดบน MDT เป็น 13 นาที

ผลการทดลอง

1. ผลการทดลองก่อนการตรวจสอบทางซีรั่มวิทยา

จะกล่าวโดยสรุปดังต่อไปนี้คือ (โดยไม่แสดงตารางผลการทดลองทั้งหมด)

1.1 กระดาษ กระดาษ W และ AT นั้น ไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่าง เพราะ W นั้นเป็นกระดาษบาง เมื่อดูดซับเลือดแล้วจะอ่อนตัวจับติดกับผนังกล่องใส่สไลด์ ทำให้น้ำหนักกระดาษที่ได้ไม่คงที่และไม่สามารถหาปริมาตรที่แน่นอนของเลือดที่ถูกดูดซับโดยกระดาษนี้ได้ เช่นเดียวกับ AT เนื่องจากมีขนาดเล็ก จึงต้องวางใน petridis เพื่อหยดเลือด ทำให้ติดแน่นกับ petridish ปริมาตรเลือดไม่คงที่ อีกทั้งขนาดที่เล็กทำให้ไม่สะดวกในการใช้ ส่วน MDT ค่อนข้างแข็งหนา เมื่อซับเลือดแล้วไม่อ่อนตัวติดกับผนังกล่องใส่สไลด์ น้ำหนัก disc ที่ชั่งได้ค่อนข้างคงที่ จากการคำนวณพบว่าปริมาตรอิ่มตัวของเลือดใน 1 disc ของ MDT ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 มม. (พื้นที่ประมาณ 25 มม.^{2}) มีค่าเท่ากับ 0.02 มล.

1.2 การสกัดตัวอย่างเลือดบน MDT การใช้ dilution buffer เพื่อสกัดตัวอย่างเลือดบน MDT นั้น จะให้ค่า OD_b ต่ำกว่าสารละลายตัวอื่น แม้ว่าสารละลายตัวอย่างเลือดที่สกัดได้สามารถให้ผลบวกได้ใน ELISA แต่ไตเตอร์ที่ได้จะต่ำกว่าไตเตอร์ของซีรั่มจากสุกรตัวเดียวกัน และเมื่อเป็นตัวอย่าง weakly positive พบว่าบางครั้งค่า OD<0.2 (ซึ่งสำหรับซีรั่มจะให้ผลเป็นลบ เมื่อค่านั้น <0.2) ไตเตอร์ของสารละลายตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ด้วยเวลา 15 นาที มีค่าต่ำกว่าไตเตอร์ที่ได้จากการสกัดในช่วงเวลาอื่น ๆ ซึ่งค่าต่าง ๆ ในช่วงเวลาอื่นนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าสำหรับการสกัดตัวอย่างนั้น ค่า OD ที่ได้จะสูงขึ้น เมื่อมีการกดกระดาษซ้ำและใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น จากผลการทดสอบสารละลายตัวอย่างเลือด 88 ตัวอย่าง ซึ่งสกัดได้ด้วย dilution buffer ที่ 37°C. นาน 20 นาทีนั้น เมื่อเปรียบเทียบผล บวก/ลบ กับตัวอย่างซีรั่ม เห็นได้ว่าค่า specificity ที่ได้จะสูง แต่ sensitivity นั้นต่ำกว่า ดังนั้นจึงเลือกสารละลาย dilution buffer ในการสกัดตัวอย่างเลือดออกจาก MDT โดยใช้เวลา 20 นาที ที่ 37°C. และไม่ต้องกดกระดาษซ้ำขณะสกัดตัวอย่าง

1.3 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างเลือดบน MDT ใน ELISA จากการทดลองหา incubation time ที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการจับตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ใน ELISA ของสารละลายที่สกัดได้ ไม่พบความแตกต่างของ OD ทั้งหมดหกล่าแบบมีนัยสำคัญ และเนื่องจากตามวิธีการของ Enzygnost ระบุให้ใช้ incubation time สำหรับซีรั่มเป็น 1 ชั่วโมงที่ 37°C. ดังนั้นจึงสรุปให้ใช้ incubation time และ temperature สำหรับสารละลายเลือดที่สกัดได้เช่นเดียวกับซีรั่ม เพื่อสะดวกในทางปฏิบัติ

ในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีรั่มจากสารละลายที่สกัดได้ ในการตรวจสอบด้วย ELISA พบว่าค่า OD ของตัวอย่างเลือดต่ำกว่าของตัวอย่างซีรั่ม และเมื่อเปรียบเทียบค่า OD ของตัวอย่างเลือดที่ความเข้มข้นของซีรั่มเป็น 1:44, 1:88 และ 1:176 พบว่าค่าที่ได้จาก 1:88 มีค่าสูงที่สุด แต่ค่า OD_b ของ 1:44 มากกว่าของ 1:88 และของตัวอย่างซีรั่ม (1:44) ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบด้วย Enzygnost สำหรับตัวอย่างเลือดที่สกัดได้จาก MDT เป็น 1:88

สำหรับการลดค่า OD_b นั้นพบว่าจากการทดลองด้วยวิธีต่าง ๆ ใน Enzygnost ไม่สามารถทำให้ค่านี้ลดลงได้

1.4 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างเลือดบน MDT ใน LT เมื่อเพิ่มเวลาการอ่านผลสำหรับสารละลายตัวอย่างเลือดที่สกัดได้เป็น 13 นาที จากเดิมสำหรับซีรั่ม 6 นาที จะให้ผล บวก/ลบ ได้ถูกต้องเช่นเดียวกันกับผลจากตัวอย่างซีรั่มของสุกรตัวเดียวกัน ดังนั้นในการตรวจด้วย LT จึงสรุปให้ใช้เวลาในการอ่านผล 13 นาที สำหรับสารละลายที่สกัดได้จาก MDT 4 disc ด้วย dilution buffer 0.240 ml. ที่ 37°C. นาน 20 นาที (ระดับความเข้มข้นซีรั่มของสารละลายนี้เป็น 1:5)

2. ผลการทดลองจากการตรวจสอบทางซีรั่มวิทยา

จากการทดสอบด้วย ELISA 800 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างซีรั่ม 210 ตัวอย่าง (26.3%) และสารละลายตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ 142 ตัวอย่าง (17.8%) ให้ผลบวก (ตารางที่ 1) เมื่อดูจากค่า percentage ของผลบวกที่ได้ sensitivity ของการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มจะสูงมากกว่าของตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ เนื่องจากระดับ OD_b ของเลือดสูงมากกว่าซีรั่ม

ตัวอย่างซีรั่มที่เคยให้ผลลบ, weakly positive (0.2<OD<0.4) หรือให้ผลแย้งกันระหว่างตัวอย่างซีรั่มกับตัวอย่างเลือดที่สกัดได้จากสุกรตัวเดียวกันใน ELISA ถูกนำมาทดสอบต่อด้วย SNT พบว่า 143 ตัวอย่าง (22%) จาก 640 ตัวอย่างให้ผลบวก (ตารางที่ 2)

นำตัวอย่างที่ให้ผลแตกต่างกันใน ELISA (B1 และ/หรือ S) และ SNT (S), ให้ผลบวกใน ELISA และให้ผลลบใน ELISA และ SNT ไปทด

สอบต่อด้วย LT พบว่าจาก 182 ตัวอย่าง (52 ตัวอย่างซีรั่มและ 123 ตัวอย่างเลือด) มี 63 ตัวอย่างให้ผลบวกอย่างชัดเจน (ตารางที่ 3) ตัวอย่
ที่ให้ผลบวกใน ELISA และผลลบใน ELISA, SNT จะให้ผลใน LT เป็นบวกและลบเช่นเดียวกันตามลำดับ

จากผลการทดสอบพบว่า SNT จะ sensitive ที่สุด โดยเมื่อเรียงลำดับ sensitivity ของวิธีการทดสอบทั้งสิ้นได้ผลดังนี้คือ

SNT(S) > LT(S) > ELISA (S) > LT (BI) > ELISA (BI)

เมื่อดูจากผลของ ELISA พบว่าผลบวกจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุของสุกรมากขึ้นคือ <1.5% ในลูกสุกรอายุ <1 เดือน ถึงเกือบ 62% ในสุกรอายุ
เดือน (ตารางที่ 4) เมื่อคำนวณค่า Chi-square ($\chi^2 = 8$, $p < 0.05$) พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะสูงตามอายุของสุกรอย่างมีนัยสำคัญ
การตรวจสอบจากวิธีการอื่น ๆ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ยกเว้นการตรวจตัวอย่างซีรั่มด้วย LT (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมใน 14)

สรุปและวิจารณ์

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในงานนี้ต้องการที่จะทราบว่า การใช้ตัวอย่างเลือดบนกระดาษทดแทนตัวอย่างซีรั่ม ในการตรวจสอบโรคออกเจสก็มีความ
เป็นไปได้เพียงใด ซึ่งหากใช้กระดาษทดแทนได้จริงแล้ว จะทำให้การเก็บตัวอย่างในภาคสนามทำได้โดยสะดวกรวดเร็วขึ้น ไม่ยุ่งยากในการเก็บตัวอย่
จำนวนมาก ๆ ไม่จำเป็นต้องจัดเตรียมอุปกรณ์มากมายสำหรับการเก็บซีรั่ม เช่น หลอดแก้ว, ตู้เย็น หรือห้อง -20°C.เป็นต้น โดยระหว่างเลือดบนกระด
ยังไม่แห้งสามารถเก็บไว้ในกล่องใส่สไลด์ก่อนจนกว่าจะแห้ง เพื่อกันแมลงและฝุ่น และเพื่อแยกตัวอย่างแต่ละตัวอย่างไม่ให้ปะปนกัน โดยไม่กินเนื้อที่
กระดาษนั้นควรมีความแข็งพอควร ไม่อ่อนตัวติดกับผนังกล่องใส่สไลด์ สามารถนำไปตรวจหาความเข้มข้นของซีรั่มจากตัวอย่างเลือดนั้น และนำไปเปรี
เทียบกับผลการทดลองจากตัวอย่างซีรั่มจริง ๆ ต่อไปได้ filter paper ที่คัดเลือกไว้ในที่นี้คือ MDT จากบริษัท Dynatech ซึ่งมีปริมาตรเลือดอิ่ม
ใน disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 มม. เป็น 0.02 มล.

จากนั้นจึงตรวจสอบต่อไปว่าวิธีการซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มในการวินิจฉัยโรค สามารถใช้ได้ดีกับตัวอย่างเลือดบน MDT หรือ
โดยทำการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไวรัสออเจสก็ ในขั้นต้นใช้ commercial test kit "AK-Enzygnost" เนื่องจาก ELISA เป็นวิธีการที่นิยม
กันในปัจจุบัน อีกทั้ง test kit ให้ผลที่เชื่อถือได้ดีมาก ใช้เปรียบเทียบผลการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี จากผลการทดลองเบื้องต้นเกี่ยวกับพารามิเต
ต่างๆ ในการทดสอบด้วย Enzygnost นำไปสู่เทคนิคที่ใช้สำหรับตัวอย่างเลือดดังนี้คือ MDT 2 disc ถูกสกัดได้ด้วย dilution buffer 1,056 ม
(โดยไม่มีการกด) ที่ 37°C. นาน 20 นาที กำหนดให้ค่าความเข้มข้นของซีรั่มใน microtiter plate เป็น 1:88 (เมื่อพิจารณาถึงค่า haem
tocrit 40%) ใช้เวลาในการ incubate 1 ชั่วโมง ที่ 37°C. ขั้นตอนของงานที่เหลือจะเหมือนกับวิธีการตรวจสอบซีรั่มตามที่ Behring กำหนด
ส่วนเทคนิคต่อมาคือ SNT นั้นใช้ทดสอบกับตัวอย่างซีรั่มเท่านั้น เนื่องจากวิธีการนี้ต้องใช้เวลาในการอ่านผลนานถึง 2-7 วัน อีกทั้งความยุ่งยากทางเ
นิค เช่น การเตรียมเซลล์และอื่นๆ จึงไม่สะดวกที่จะตรวจตัวอย่างเลือดบน MDT อีก วิธีการสุดท้ายคือ commercial test kit "Aujeszky Lat
test" ซึ่งเป็นวิธีการที่น่าสนใจเพราะสะดวกรวดเร็วและยังไม่เคยมีรายงานการใช้ LT นี้กับ MDT ในออเจสก็มาก่อน หากสามารถวินิจฉัยโรคจาก
อย่างกระดาษด้วย LT ได้จริงจะทำให้การตรวจสอบสะดวกและใช้เวลาน้อยลงกว่าปรกติมาก จึงได้ทดลองหาเทคนิคสำหรับตัวอย่างเลือด พบว่าต
ตรวจสอบตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของซีรั่มเป็น 1:5 และใช้เวลาในการอ่านผล 10-13 นาที ส่วนการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มจะเหมือนกับวิธีกา
กำหนดมาใน test kit

พบว่าจากตัวอย่างทั้งสิ้น 800 ตัวอย่าง ที่ถูกเก็บรวบรวมมาแบบสุ่มตัวอย่าง เมื่อใช้ Enzygnost จะให้ผลบวก 26% ในตัวอย่างซีรั่ม และ
ในตัวอย่างเลือด sensitivity ของการตรวจสอบตัวอย่างเลือดบน MDT ค่าประมาณ 66% เนื่องจากแม้ว่าตัวอย่างเลือดจะให้ผลบวกในตัวอ
strongly positive ก็ตาม แต่บางครั้งให้ผลลบในตัวอย่าง weakly positive แต่เมื่อพิจารณาถึง specificity พบว่ามีค่าประมาณ 99
และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น เช่น Bank พบว่าแม้ในการตรวจสอบตัวอย่างเลือดจะให้ค่า OD_6 สูงมากกว่าตัวอย่างซีรั่ม แต่ค่า corelation
เป็น 100% (11) นอกจากนั้น Oliver และคณะ (2530) รายงานถึงค่า corelation 100% เช่นเดียวกับ Bank (18)

จากผลการทดลองทำให้ได้แนวคิดว่าชนิดของกระดาษอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับผลการตรวจสอบได้ เนื่องจากรายงานของ Bank และ Oli
ใช้ W-No.1 และได้ผล corelation 100% ซึ่งกระดาษนี้บางมากและอ่อนตัว แต่ในงานนี้ใช้ MDT ซึ่งหนามีความแข็งดีดี วางในกล่องใส่สไลด์ได้

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างที่สกัดได้จากเลือดบนกระดาษด้วยวิธี ELISA

ชนิดของตัวอย่าง	รวม	ผลบวก	ผลลบ
ตัวอย่างซีรั่ม	800	210(26.25%)	590(73.75%)
ตัวอย่างสกัด	800	142(17.75%)	658(82.25%)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มด้วยวิธี SNT

ชนิดของตัวอย่าง	รวม	ผลบวก	ผลลบ
ตัวอย่างซีรั่ม	640	143(22.3%)	494(77.7%)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างที่สกัดได้จากเลือดบนกระดาษด้วยวิธี LT

ชนิดของตัวอย่าง	รวม	ผลบวก	ผลลบ
ตัวอย่างซีรั่ม	59	10(16.9%)	49(83.1%)
ตัวอย่างสกัด	123	53(43.1%)	70(56.9%)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบตัวอย่างซีรั่มด้วยวิธี ELISA เมื่อจัดลำดับชั้นอายุของสุกร ($X^2 = 8$, $p<0.05$)

อายุของสุกร (เดือน)	ตัวอย่างซีรั่มที่ถูกทดสอบด้วย ELISA		
	ผลบวก	ผลลบ	รวม
<1	3(1.43%)	20	23
>1-3	31(14.76%)	83	114
>3-8	46(21.90%)	191	237
>8	130(61.90%)	196	426
รวม	210	590	800

จากประสงค์ที่ต้องการดังกล่าวแล้วในข้างต้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า หากมีการปรับปรุงโดยใช้ชนิดของกระดาษที่มีความหนาน้อยกว่า MDT แต่ยังคงมีความแข็งตัวพอที่จะวางในกล่องใส่สไลด์ได้ อาจได้ผลการทดสอบที่ดีมากกว่า MDT และใกล้เคียงกับ W-No.1 ได้

ใน SHT พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกมากกว่า ELISA โดย 71 ตัวอย่างที่ให้ผลลบใน ELISA ยังคงให้ผลบวกใน SHT หลังจาก titrate พบว่า titer สูงถึง 1:16 แต่ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง undilute- 1:3 แม้ว่าจะเคยมีรายงานผลการตรวจสอบตัวอย่างสุกรจำนวนมากจากฟาร์มขนาดใหญ่ 3 ฟาร์ม หรือจากบริเวณส่วนกลางของประเทศ โดยใช้เทคนิค SHT และ ELISA แล้วก็จริง แต่พบว่าเทคนิคที่ใช้นั้นเป็นการใช้พวก peroxidase เช่น HRP ไม่ใช่ AP (1, 22) ส่วนผลจากการทดสอบด้วย LT จะให้ผลบวกและลบเมื่อใน ELISA (S และ B1) ให้ผลบวกและเมื่อใน ELISA (S และ B1) และ SHT ให้ผลลบตามลำดับ ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

เมื่อพิจารณาผลการทดลองระหว่าง SHT และ LT พบว่า SHT ให้ผลที่ sensitive มากกว่า LT ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Wilson และSchipper ซึ่งกล่าวว่าแม้sensitivity ของSHT มากกว่า LT ก็จริง แต่ LT ยังเป็นวิธีที่ถูกแนะนำ เนื่องจากเป็นวิธีการที่เร็วและง่ายกว่ามาก (21) และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบทั้งหมดพบว่า SHT จะ sensitive ที่สุด โดยสรุปเป็น diagram ของ sensitivity ได้ดังนี้คือ

SHT(S) > LT(S) > ELISA(S) > LT(B1) > ELISA(B1) (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมใน 14, 15)

แม้ว่าจุประสงค์ที่จะทดสอบดังกล่าวมาเป็นไปได้ในการนำตัวอย่างเลือดบน MDT มาใช้แทนซีรั่มนั้นบรรลุผลก็จริง แต่พบว่าผลการทดสอบจากตัวอย่างเลือดบน MDT นั้นมีค่า sensitivity ที่ต่ำกว่าซีรั่ม กล่าวคือ แม้จะใช้ได้แต่ผลที่ได้ไม่ดีเท่า สำหรับวิธีการที่ใช้ตรวจสอบนั้นยังใช้ได้ทั้ง ELISA และ LT โดยรายงานนี้เป็นการศึกษาโรคออเจสกี้ครั้งแรกที่ใช้ LT กับตัวอย่างที่สกัดได้จากเลือดสุกรบนแผ่นกระดาษ สำหรับ LT นั้นเป็นที่น่าเสียดายที่ได้รับ test kit จำนวนไม่มากพอที่จะตรวจสอบตัวอย่างได้ทั้งหมด แต่กระนั้นก็ผลการทดลองนี้ยังพอเป็นแนวทางว่า LT สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างเลือดได้ และยิ่งกว่านั้นยังให้ผลเป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือให้ผล sensitive มากกว่า ELISA อีกด้วย ดังนั้น LT จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจมาก ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็วมาก เพียง 10-13 นาทีเท่านั้น เหมาะสำหรับการวินิจฉัยโรคกรณีเร่งด่วนโดยเฉพาะในฟาร์มใหญ่ที่มีจำนวนตัวอย่างมาก ๆ

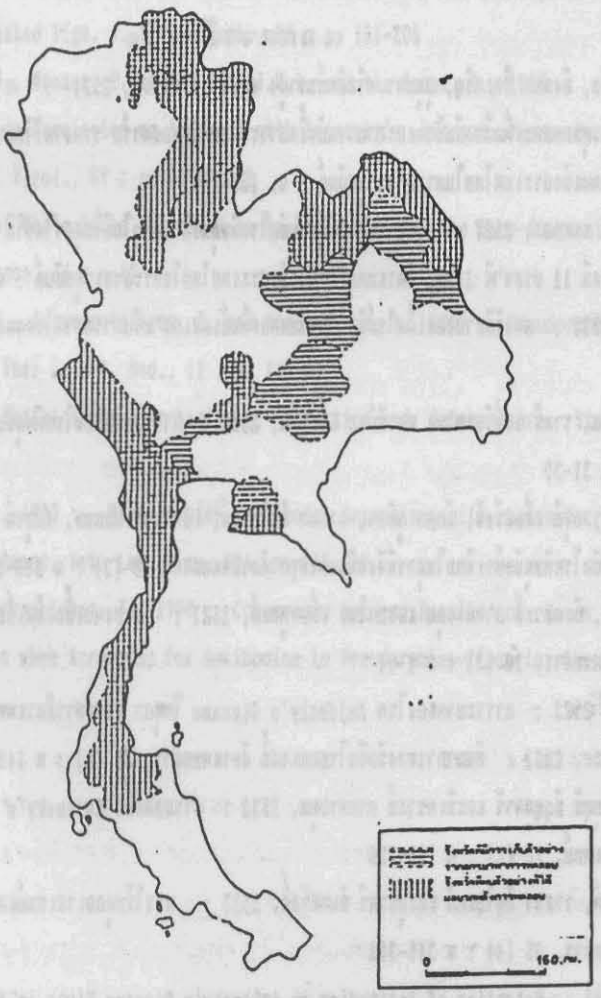
เพื่อหลีกเลี่ยงการวินิจฉัยโรคที่ผิดพลาด ผลการทดสอบแต่ละตัวอย่างจะถูกพิจารณาซ้ำอีก และโดยเหตุที่ในการทดสอบด้วย ELISA นั้น sensitivity ของการทดสอบตัวอย่างเลือดน้อยกว่าของซีรั่มจากสุกรตัวเดียวกัน ดังนั้นตัวอย่างจะถูกจัดว่าเป็นบวกได้ก็ต่อเมื่อผลจากการทดสอบอย่างน้อยที่สุดหนึ่งการทดสอบต่อไปนี้ให้ผลบวกคือ ELISA (S), LT(S), LT(B1) และ SHT (ที่ dilution > 1:2) นอกจากนั้นฟาร์มที่มีสุกรให้ผลบวกแม้แต่ตัวเดียวก็พิจารณาให้เป็นฟาร์มบวก และใน SHT แม้ว่าจะมี control ของตัวอย่างซีรั่มทุก dilution (1:1, 1:2 ฯลฯ) แต่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ 1:1 จะไม่ถูกตัดสินทันทีว่าเป็นบวก โดยถ้าผลจาก SHT ที่ 1:1 เป็นบวก ในขณะที่ผลการทดสอบอื่น ๆ ของตัวอย่างเดียวกันให้ผลลบ ตัวอย่างจากฟาร์มบวกและลบจะถูกตัดสินให้เป็น suspect และลบตามลำดับ พบว่า 44 ตัวอย่างจากฟาร์มใน 3 จังหวัด ให้ผลลบ ส่วนผลบวกพบใน 43 ฟาร์มจาก 86 ฟาร์มในจังหวัดที่เหลือ (ดูแผนที่ที่ 1 และรายละเอียดเพิ่มเติมใน 14)

เมื่อพิจารณาประวัติของสุกร พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดอาจไม่ได้มาจากสาเหตุของการติดเชื้อตามธรรมชาติ (natural infection) เพียงอย่างเดียว อาจมีสาเหตุมาจาก passive immunity หรือ active immunity จากการฉีดวัคซีน แต่อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาแล้วตัวอย่างบวกส่วนมากเป็นผลต่อเนื่องจากการระบาดของโรค เนื่องจาก ประการแรก แอนติบอดี้ของลูกสุกรดูดนมและลูกสุกรเล็กที่ได้จากแม่ตามธรรมชาติจะคงอยู่ในร่างกายราว 6-9 สัปดาห์ (13, 20) แต่จากค่า chi-square (I^2) ที่คำนวณได้จากการทดลองพบว่า ยิ่งอายุสุกรมากขึ้นโอกาสที่จะตรวจพบผลบวกก็ยิ่งมากขึ้นด้วย นั่นคือจำนวนผลบวกส่วนมากพบในสุกรอายุมาก จึงสรุปได้ว่าผลบวกที่ได้นั้นไม่ได้เป็นผลมาจาก maternal immunity ประการที่ 2 แม้ว่าในปัจจุบันสามารถแยกแอนติบอดี้ซึ่งได้จากการฉีดวัคซีนและจากการติดเชื้อตามธรรมชาติได้ โดยการใช้วัคซีนพันธุ์ธรรมชาติซึ่งไม่ได้ผลิตแอนติบอดี้ต่อ gI (ตรงข้ามกับการติดเชื้อตามธรรมชาติจาก field strain virus) (8,16,17) แต่ว่าก่อนการเก็บตัวอย่างมาทดลองครั้งนี้ยังไม่มีรายงานการใช้วัคซีนทางพันธุกรรมนี้เลย และเมื่อพิจารณาจากประวัติพบว่าสุกรจำนวนมากกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมดถูกซื้อจากเจ้าของสุกรรายย่อยในหมู่บ้านซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะไม่ฉีดวัคซีน ดังนั้นจำนวนสุกรที่ให้ผลบวกจึงมีโอกาสสูงที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ

ผลการทดลองจากรายงานนี้จึงเป็นแนวทางสำหรับงานวิจัย เพื่อปรับปรุงการวินิจฉัยโรคออเจสกี้ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะทางด้านวิธีการตรวจสอบและการใช้ตัวอย่างเลือดบนแผ่นกระดาษ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ บุญมี สัตยสุจจาริ และอาจารย์ ราตรี วงษ์ชรดาโรง ที่ช่วยอนุเคราะห์เอกสารค้นคว้าประกอบการศึกษานี้ อดีตอธิบดีกรม-



แผนที่ 1: แสดงจังหวัดที่มีการเก็บตัวอย่างจากสุกรมาทำการทดสอบและจังหวัดที่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกหลังการทดสอบ

ปศุสัตว์ ดร. ทิม พรรณศิริ, อดีตรองอธิบดีกรมปศุสัตว์ ดร. บิยะ อรัยยกานนท์, Frau Dr. Med. Vet. I.C.E. Renner-Mueller, Herr M. Reimann และ Prof. Dr. E. Munz ที่ช่วยเป็นที่ปรึกษาและสนับสนุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. เกรียงมาศ พันธุ์ชัย, อังสนา ฮ่อเจริญ, อุทุมพร ศรีสถิตย์นรากูร และวิราลี มหาศร, 2534 : การใช้วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมเชื้อตายชนิด gI- และชุดทดสอบเพื่อป้องกันโรคและสามารถแบ่งรู้สภาวะปลอดโรคของฟาร์ม รวมงานวิจัยการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18, สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ : น. 155-160

2. แก้วมณี กองสมัคร และคณะ, 2527 : การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในซีรั่มสุกรโดยวิธี ELISA ประมวลเรื่องประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2527, สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ : น 159-167

3. จารุณี สาตรา, 2530 : สองวิธีการของเล็นโยฟิลิคอินมูในชอยเบ็นท์เอสเสสำหรับการตรวจโรคออเจสกี้ในสุกร สัตวแพทยสาร, 38 (3) : น 29-35

4. ช้องมาศ อันตรเสน, ราตรี วงษ์ชรัตน์ทาง และนิมิตร เรื่องเงิน, 2530 : การระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในเขตภาคใต้ เวชสารสัตวแพทย์, 17 (1) : น 31-39

5. ทิพา ตันติเจริญยศ, อรุณี เดื่อนรังษี, ลัดดา มูลิกา, วาสนา ลิมปิสุรนนท์, เชาวนะ เมฆกมล, สมบูรณ์ สุธีรัตน์ และพอ จินดาวัฒ, 2524 : การศึกษาและวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรที่จังหวัดนครปฐม สัตวแพทยสาร, 32 (3) : น 243-253

6. บุญมี สัญญุตจจจารี, พิเคราะห์ อาจหรงคุณ และมาโนช เพื่องพุทธ์, 2521 : รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการพบโรคซึ่งมีลักษณะของโรคออกเจสกี้ในสุกร สัตวแพทยสาร, 29 (3) : น 1-11

7. บุญมี สัญญุตจจารี, 2523 : การระบาดของโรค Aujeszky's Disease ในสุกร เวชสารสัตวแพทย์, 10 (2) : น 102-118

8. ราตรี วงษ์ชรัตน์ทาง, 2531 : พัฒนาการของวัคซีนโรคออเจสกี้ สัตวแพทยสาร, 39 (4) : น 149-156

9. สละ กองสมัคร, บุญมี สัญญุตจารี และพิเคราะห์ อาจหรงคุณ, 2523 : การแยกเชื้อ Aujeszky's Disease Virus โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชสารสัตวแพทย์, 10 (2) : น 199-126

10. สุจิรา ชาจรียานนท์, วาสนา ลิมปิสุรนนท์ และอุราศรี ตันตสัวัสดิ์, 2527 : การใช้พลูออเรสเซนต์แอนติบอดีเทคนิค ในการวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร สัตวแพทยสาร, 35 (4) : น 345-352

11. Banks, M., 1985 : Detection of Antibodies to Aujeszky's Disease Virus in Whole Blood by ELISA Disc. J. Virol. Meth. 12 : pp 41-45

12. Bonin, O., 1973 : Quantitativ-virologische Methodik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag

13. Kojnok, J. and Surjan, J., 1962 : Untersuchungen ueberdie kolostrale Immunitaet bei der Aujeszkyschen Krankheit der Schweine. Mag. Allat. Labp., 17 : p 361

14. LeamcharasKul, P., 1989 : Epizootiologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikoerpern gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit in Seren und Bluteluaten thailaendischer Schweine mittels ELISA ("Enzygnost", Behring), Serum-Neutralisations-Test und "Aujeszky-Latex-Kit" (Iffa Merieux). Dissertation, Tieraerztl. Fakultaet der Universitaet Muenchen

15. Leamcharaskul, P., Renner-Mueller, I.C.E., Munz, E. and Reimann, M., 1990 : Epizootiologische Untersuchungen zum Nachweis von Antidoerpern gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit in Seren und Bluteluaten thailaendischer Schweine mittels ELISA ("Enzygnost", Behring), Serum-Neutralizations-Test und "Aujeszky-

Latex-Kit" (Iffa Merieux). J. Vet. Med., 37 : pp 418-429

16.Oirschot, J.T. Van, Houwers, D.J., Rziha, H.J. and Moonen, P.J.L.M., 1988: Delopment of an ELISA for Detection to Glycoprotein I of Aujeszky's Disease Virus : A Method for the Serological Differentiation between Infected and Vaccinated Pigs. J. Virol. Meth., 22 : pp 191-206

17.Oirschot, J.T. van, Rziha, H.J., Moonen, P.J.L.M., Pol, J.M.A. and van Zaane, D., 1986 : Differentiation of serum Antibodies from Pigs Vaccinated or Infected with Aujeszky's Disease Virus by a Competitive Enzyme Immunoassay. J. Gen. Virol., 67 : pp 1179-1182

18.Oliver,R.E.,1987: Evaluation of Whole Blood Collected on to Paper Disc for the Sero-diagnosis of Aujeszky's Disease By ELISA. Surveillance, 14 : p 10

19.Riengrojgitak, S., Sahapong, S., Sunyasootcharee, B. and Angsongkoon, S., 1982 : Pseudorabies in Swine : an ultrastructural study. Thai J. vet. Med., 12 : pp 240-246

20.Rolle, M. and Mayr, A. 1984. Medizinische Mikrobiologie, Infektion-und Seuchenlehre. Stuttgart, Verlag F. Enke

21.Wilson, S. and Schinpper, J.A., 1983 : Pseudorabies Antibody Screening with Latex-Macroagglutination. Proc. 3rd Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diag. USA, pp 215-219

22.Wongwatcharadumrong, R. and Moreno-Lopez, J., 1990 : Comparison between Results of Virus Neutralization Test and Those of Two ELISAs when Screening for Antibodies to Pseudorabies Virus in Thailand. J. Vet. Med., B 37, pp 760-766

การผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ โดยการเพาะบนเนื้อเยื่อ

PRODUCTION OF FOWL POX VACCINE FROM PRIMARY CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST (CEF) CELL CULTURE

นันทนา โปษณเจริญ[1] โสภณ ท้วมแสง[1]

Nantana Posanachareon Sophon Tuamseang

ABSTRACT

An experimental production of fowl pox vaccine from primary chicken embryo fibroblast (CEF) cell culture was achieved by inoculation of the seed virus, 10^4 EID_{50}/ml onto CEF cells of 10-day-old embryonated eggs. The virus was well adapted on its first passage. Cytopathic effect of infected cells began on the third day and occured completely on the fourth and fifth day. Production of fowl pox vaccine from this tissue culture adapted virus was satisfactory. The vaccine was tested and it passed the standard of vaccine quality control.

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตวัคซีนฝีดาษไก่จากเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟัก (CEF) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของไวรัสฝีดาษไก่ 10^4 EID_{50}/ml เพาะลงบนเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักจากตัพพะไก่อายุ 10 วัน ไวรัสสามารถปรับตัวเจริญได้ดีในการผ่านไวรัสลงเซลล์ครั้งแรก (First passage) โดยเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า Cytopathic Effect (CPE) ในวันที่ 3 และ เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างสมบูรณ์ (100% CPE) ในวันที่ 4 และ 5 จากการนำไวรัสที่เพาะได้จากเซลล์ตัวอ่อนไข่ไก่ฟักนี้มาทำเป็นวัคซีนและทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีกทุกประการ

คำนำ

เนื่องจากการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่จากไข่ไก่ฟักมีหลายขั้นตอนที่เป็นแหล่งให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ขั้นตอนการทำช่องอากาศเทียม (artificial air SAC) เป็นต้น ซึ่งทำให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ต่อมาจึงทำการศึกษาเพื่อผลิตวัคซีนฝีดาษไก่โดยวิธีการเพาะบนเซลล์ตัพพะไก่ (chicken embryo fibrobiast CEF) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวัคซีนฝีดาษไก่ชนิดแห้งตามมาตรฐาน ในการศึกษานี้นำวิธีการก้าวหน้าจากผลการทดลองของ Bang et al, 1951; Mayr, 1963; Hyde et al 1965; Tajima and Ushijima 1966; and, Gafford and Randall 1976 ที่พบว่าไวรัสฝีดาษไก่สามารถเจริญได้ดีในเซลล์ตัพพะไก่อายุ 10 วันมาใช้ คาดว่าวิธีนี้เป็นการเพาะไวรัสฝีดาษไก่ด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้า ประหยัดเวลา วัตถุดิบและสามารถขยายการผลิตวัคซีนแห้งตามมาตรฐานออกจำหน่าย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **ไข่ไก่ฟัก** ไข่ไก่ฟักที่ใช้ทำเซลล์ได้จากฟาร์มเอกชนที่ปลอดโรค

2. **ไวรัส** ไวรัสฝีดาษไก่ที่ใช้เพาะลงเซลล์ได้จากการเพาะ Seed lived virus บนเยื่อไข่ไก่ฟัก (chorioallantoic membrane) ซึ่งปลอดโรค (specific pathogen free) เมื่อบดเนื้อเยื่อที่มี pox ขึ้นแล้วนำไปทำเป็นสัสเพนชั่น (suspension) มาทดสอบการปนเปื้อนจากเชื้อไมโครพลาสมาและแบคทีเรียอื่น ๆ ด้วย PPLO broth and agar และ Thioglycollate broth มีปริมาณไวรัส 10^7 EID_{50}/ml

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

3. ไพรมารี่เซลล์คัลเจอร์ (Primary Cell Culture) วิธีการเตรียมเซลล์จากตัวอ่อนไก่อายุ 10 วัน ตามวิธีการของ "Youngner" ใช้สารประกอบ M199 with Earle's salt 9% เป็นน้ำเลี้ยงเซลล์ในเดียโต (growth medium) และ M199 4.7% เป็นน้ำเลี้ยงเซลล์ดาว (Maintainance medium) เพาะไพรมารี่เซลล์บนพื้นผิวขวดแก้วขนาด 25 ซีซี. จำนวน 50 ขวด ที่อุณหภูมิ 39°C. นาน 48 ชั่วโมง

4. ไก่ทดลองประสิทธิภาพของวัคซีน ใช้ไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาวจำนวน 30 ตัว และไก่พันธุ์ผสมจากฟาร์มเอกชน จำนวน 300 ตัว อายุ 2 สัปดาห์ ไม่จำกัดเพศ และไม่เคยได้รับวัคซีนฝีดาษไก่มาก่อน เลี้ยงในกรงมุ้งลวด

5. ขวดบรรจุวัคซีน พร้อมอุปกรณ์จุกยางและฝาสีกระสี ขนาด 5 ซีซี. จำนวน 100 ขวด

6. เครื่องดูดแห้งระบบอัตโนมัติ ยี่ห้อ Leybold ของเยอรมัน ใช้ระยะเวลาทำแห้งนาน 27 ชั่วโมง

7. สารคงสภาพ (Stabilizer) ใช้เป็นส่วนประกอบการทำแห้งวัคซีน ได้แก่ 20% เคซิโตน (casitone) 50 ซีซี.

8. สารละลาย tryptose phosphate broth (TPB) ใช้ไดเลทวัคซีน

วิธีการ

1. การเพาะไวรัสฝีดาษไก่บนเซลล์คัลเจอร์ (Infected in cell culture)

นำขวดแก้วที่มีเซลล์เจริญติดบนผิวแก้ว (monolayer of CEF) มาใส่ด้วยไวรัสฝีดาษไก่ที่มีปริมาณไวรัส 10^4 EID_{50}/ml ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ไวรัสดูดซึมเข้าเซลล์ (adsorbed virus) แล้วเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ดาว (M.M.) ขวดละ 5 ซีซี. นำเข้าตู้อบ 39°C. คอยตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาด 10x10 แล้วบันทึกไว้

เก็บเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทุกวันไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40°C. เพื่อหาปริมาณไวรัส

2. การเก็บซัสเพนชั่น

นำขวดแก้วที่มีเซลล์แช่แข็งไว้มาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อทำให้ละลาย (Thaw) ขณะที่น้ำแข็งเริ่มละลายให้เขย่าขวดไปมาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดออก แล้วไวรัสจะหลุดจากเซลล์อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ราบรามน้ำเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ผลิตวัคซีนต่อไป ซัสเพนชั่นที่ได้ครั้งแรกเรียก $FPTC_1$ ซัสเพนชั่น ครั้งแรกสามารถผ่านต่อโดยการเพาะใน monolayer ของเซลล์คัลเจอร์ใหม่ แล้วเก็บเซลล์คัลเจอร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เต็มที่ไว้ในตู้แช่แข็ง -40°C. จากนั้นนำมาทำให้ละลาย (Thaw) ซัสเพนชั่นที่ได้เป็น $FPTC_2$, $FPTC_3$----ฯลฯ ตามลำดับ เก็บซัสเพนชั่นแต่ละครั้งไว้หาปริมาณไวรัส

3. การผลิตวัคซีน (Fowl pox Vaccine Production)

รวมซัสเพนชั่น 3 ครั้ง ($FPTC_1$ ถึง $FPTC_3$) ผสมด้วยสารคงสภาพ (Stabilizer) 20% เคซิโตน อัตราส่วน 1 ต่อ 9 โดยปริมาตร แจกใส่ขวดบรรจุวัคซีนขนาด 5 ซีซี. จำนวน 100 ขวด ปิดจุกยางแล้วนำเข้าเครื่องดูดแห้ง (Freeze-drying machine) นาน 27 ชั่วโมง

นำวัคซีนแห้งมาทดสอบตามวิธีการดังนี้

(1) การทดสอบคุณสมบัติภายนอก ได้แก่ ลักษณะวัคซีน, สี, การเป็นสุญญากาศ, การตรวจหาปริมาณความชื้น

(2) การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน นำตัวอย่างวัคซีนแห้งมาละลายด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline เพื่อทดสอบดังนี้

2.1 ทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน

โดยการเพาะวัคซีนใน Thioglycollate broth, PPLO broth and agar และ Sabaraund broth เพื่อดูการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ตามลำดับ

2.2 ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน

ใช้วัคซีนที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของขนาดที่ใช้ปกติ แทงปีกไก่ทดลองจำนวน 10 ตัว เลี้ยงไว้ดูอาการ 2 สัปดาห์

2.3 ทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน

โดยแบ่งไก่ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่ทดลองจำนวน 10 ตัว ไม่ต้องหยอดวัคซีน ให้เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 ใช้ไก่ทดลองจำนวน 10 ตัวเช่นเดียวกัน นำวัคซีนมาละลายด้วยน้ำยาละลายกลีเซอรีน ความเข้มข้นปกติ 1 ต่อ 5 แทงปีกไก่ตัวละ 2 ครั้ง

เลี้ยงไก่ทั้งสองกลุ่มไว้ดูอาการนาน 10 วัน บริเวณที่แทงปีกจะเกิดตุ่มผื่นขึ้น เรียกว่า take หลังจากตุ่มผื่นขยายตัวแล้วจึงนำไก่ทั้งหมด (กลุ่มที่ 1 และ 2) ไปฉีดพิษทับด้วย Field virus, titer 10^5EID50/ml) โดยวิธีป้ายเชื้อพิษทับบนแผลไก่ทุกตัวที่ทำรอยแผลไว้ เลี้ยงไว้ดูผลใน 10 วัน

2.4 การไตเตรทหาปริมาณไวรัสในวัคซีนแห้ง และคำนวณตามวิธี Reech & Muench

4. การทดลองใช้วัคซีนแห้ง ผีดายไก่ชนิดผลิตจากเซลล์ในไก่พันธุ์ผสม อายุ 1 สัปดาห์ จำนวน 300 ตัว โดยแทงปีกไก่ 2 ครั้ง ด้วยวัคซีนแห้งที่ละลายดีแล้ว เลี้ยงไว้และสังเกตอาการนาน 1 เดือน

ผลการทดลอง

1. วงจรการเปลี่ยนแปลงของ CEF เมื่อใส่ไวรัสผีดายไก่บน monolayer เซลล์

ภายหลังการเพาะไวรัสผีดายไก่ 48 ชั่วโมง monolayer เซลล์ เริ่มเปลี่ยนแปลงจากรูปยาวรี (eclipse) เป็นกลม การปรากฏ CPE (Cytopathiceffect) นี้จะสมบูรณ์ในวันที่ 4-5 โดยเซลล์รวมกลุ่มและกลมเด่นชัดทุกเซลล์ ในวันที่ 6-7 เซลล์ที่ถูก infect นี้จะแยกตัวจากกันและหลุดลอยในน้ำเลี้ยงเซลล์ ส่วนเซลล์ที่ไม่ถูกไวรัสจะยังคงเป็น monolayer สุดท้ายเซลล์จะลอกหลุดเพราะเซลล์ตายในวันที่ 8-9 (necrosis)

2. การหาปริมาณไวรัสผีดายไก่ทุกระยะที่เกิดการเปลี่ยนแปลง

โดยนำซัสเพนชั่นไตเตรทในเซลล์

Showed the Virus Titer of Cell-Cultures

Hours	24-48	72	96	120	144-168
Virus titer TCID50/ml	-	$10^{2.15}$	$10^{3.50}$	$10^{4.15}$	$10^{2.0}$

3. เปรียบเทียบปริมาณไวรัสผีดายไก่ของซัสเพนชั่น FPTC1 ถึง FPTC5

The Fowl pox Virus Titer in Tissue Culture 5 passages FPTC1 to FPTC5

Hours	$FPTC_1$	$FPTC_2$	$FPTC_3$	$FPTC_4$	$FPTC_5$
The Virus titer TCID50/ml	$10^{4.20}$	$10^{4.15}$	$10^{3.5}$	$10^{3.30}$	$10^{3.0}$

4. การทดสอบคุณภาพวัคซีนแห้ง

- การทดสอบความบริสุทธิ์ของวัคซีน วัคซีนแห้งที่ผลิตได้ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา
- ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน ภายหลังการแทงปีกไก่ด้วยวัคซีนแล้ว 15 วัน ไก่ทุกตัวมีสุขภาพดี

- การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีน ภายหลังจากแทงปีกไก่ด้วยวัคซีนผีดาษไก่ 7-10 วัน จะปรากฏตุ่มผีดรงบริเวณที่แทงปีและตุ่มผีจะแห้งหายไปในเวลา 15 วัน เมื่อนำไก่ที่ตุ่มผีหายแล้วไปย้ายเชื้อพิษพิษพร้อมกับไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทำวัคซีน อีก 10 วันต่อมาพบว่าไก่กลุ่มควบคุมมีตุ่มผีดาษขึ้นตรงบริเวณย้ายเชื้อพิษ แต่ไก่กลุ่มที่ทำวัคซีนไว้แล้วจะไม่มีตุ่มผีขึ้น ทั้งนี้ไก่ทำวัคซีนทุกตัวต้องมีสุขภาพดี

- การหาปริมาณไวรัสของวัคซีนแห้งที่ผลิตได้จากเซลล์ จะมีปริมาณไวรัส $10^{3.5}$-10^{4}TCID$_{50}$/ml

5. การใช้วัคซีนผีดาษไก่ชนิดเพาะบนเนื้อเยื่อกับฝูงไก่พันธุ์ผสมอายุ 2 สัปดาห์

ไก่จำนวน 300 ตัวของสถานีวิจัยอาหารสัตว์ธัยบาย ได้รับรายงานว่าภายหลังการแทงปีกไก่แล้ว 1 สัปดาห์ จะพบตุ่มผีหรือ Take บริเวณที่แทงปีกและตุ่มผีแห้งหายใน 15 วัน ซึ่งไก่ทุกตัวเลี้ยงในกรงไม่มีมุ้งลวดป้องกันยุง มีสุขภาพดี และอีก 1 เดือนต่อมาไก่กลุ่มนี้ทุกตัวยังคงมีสุขภาพดีไม่มีตุ่มผีดาษปรากฏ แสดงว่าวัคซีนให้ความคุ้มโรคดี

	"Take" reaction	After Challenged (appeared pox Lesion)
กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม)	No.Take Reaction	10/10
กลุ่มที่ 2 (ให้วัคซีนผีดาษไก่)	accure "Take" Reaction	0/10

สรุปและวิจารณ์

การใช้ Seed ไวรัสผีดาษไก่ที่ได้จากการเพาะบน CAM ของไข่ไก่ฟักที่ปลอดโรคชนิดแห้ง (Freeze drying) มาปรับตัวโดยการเพาะบนเซลล์ตัพภะไก่อายุ 10 วัน (CEP) นั้นใช้ระยะเวลาผ่านเชื้อ (passage) เพียงครั้งเดียวไวรัสที่ได้จากการเพาะ CAM (FP/CAM) ก็สามารถปรับตัวเจริญบน CEP และ เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังการ infect ไวรัสแล้ว 48 ถึง 120 ชั่วโมง คือเซลล์เริ่มเปลี่ยนจากรูปยาวรี(eclipse) เป็นรูปกลมหลัง 48 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับรายงานของ Chang P.W and V. Jasty , 1970 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้น (Cytopathic effect หรือ CPE) นั้นปรากฏชัดเจนเริ่มในวันที่ 3 ภายหลังการเพาะเชื้อ เซลล์เปลี่ยนเป็นรูปกลมและกลมอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 4 ถึง 5 ต่อมาเซลล์จะลอกหลุด (Degeneration and necrosis) และถูกทำลายในวันที่ 8-9 (Mayr,1963)

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อย่างสมบูรณ์ในวันที่4-5 นั้นจะมีปริมาณไวรัสภายในเซลล์มากที่สุดและหลังจากนี้ปริมาณไวรัสจะลดลง(Chang P.W,1970) จึงเก็บชัสเพนชั่นระยะนี้ไว้โดยการแช่แข็ง แล้วทำให้ละลายด้วยวิธีเขย่าเพื่อให้เซลล์แตกไวรัสภายในเซลล์จะออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้เพราะ ไวรัสภายในเซลล์ (Intra Cellular Virus) มีมากกว่าภายนอกเซลล์ (Extracellular Virus) ประมาณ 1 Log (Chang P. Wand V. Jasty, 1970) ถ้าผ่านชัสเพนชั่น FPTC$_1$ ในคัลเจอร์ต่อไป แล้วเก็บเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยสมบูรณ์ และทำเช่นนี้ต่อไป จนถึง FPTC$_5$ จะพบว่าปริมาณไวรัสในระยะหลังๆลดลง ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตวัคซีน การทดลองพบว่า ชัสเพนชั่นของ FPTC$_1$ ถึง FPTC$_3$ จะมีปริมาณไวรัสสูงพอสำหรับการผลิตวัคซีน การที่ชัสเพนชั่นระยะแรกๆมีปริมาณไวรัสสูงเพราะชัสเพนชั่นแรกก่อผ่านต่อ มีปริมาณไวรัสพอเหมาะที่จะทำให้เซลล์คัลเจอร์เปลี่ยนแปลงและถ้าปริมาณไวรัสน้อยเกินไป เซลล์จะถูกทำปฏิกริยาน้อยเช่นกัน (Cunningham, 1973) ทำให้ชัสเพนชั่นต่อมามีปริมาณไวรัสลดลง

วัคซีนแห้งที่ผลิตได้มีคุณสมบัติดีกว่าวัคซีนเหลวและมีประสิทธิภาพของวัคซีนตรงตามมาตรฐานวัคซีนแห้งนี้มีปริมาณไวรัสอย่างน้อย $10^{3.5}$-10^{4}+TCID$_{50}$/ml ซึ่งเป็นปริมาณไวรัสดังกล่าวเพียงพอที่จะทำให้เกิด Take reaction อย่างดี (R.W Wintertield and S.B Hitchner)

เอกสารอ้างอิง

Bang, F.B., levy, E., and Gey, G.O. : Some Observations on Host-Cell-Virus-Relationships in Fowl Pox 1. Growth in tissue Culture. 2. The Inclusion Produced by the virus on the Chick Chorioallantoic Membrane. J. Immunol., 66, (1951) : 329-345

Cunningham, C.H. A laboratory Guide in Virology. 7th ed (1973). Burgess, Minneapolis

Cunningham, C.H.Avian Pox, In : Diseases of poultry 7th ed M.S Hofstad, B.W. Calnek, C.F. Helmboldt, W.M Reid and H.W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa (1978) : pp. 597-609

Chang, P.W., and V.Jasty. Multiplication of fowl pox virus in Chicken embryo fibroblastic cell cultures. Am.J. Vet.Res.31> (1970) : 1463-1467

Garfford, L.G., Sine Lair, F., and Randall, C.C. : Growth Cycle of Fowl pox virus and Change in Plaque Morphology and Cytopathology by Contaminating Mycoplasma. Virology, 37 (1969) : 464-472

Morita, C. Studies on fowl pox Viruses. Plaque formation of fowl pox Virus on Chick embryo Cell Culture. Avian Dis. 17,(1973) : 87-92

Mayr. A. and Kalcher, K. : Plaque Buildvng beiden Geftugelpockenviten-Arch Virusforschll, (1961) : 304-325

R.W. Wintertield and S.B. Hitchner. the Response of Chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox viruses. Avian Diseases : 17 (1964) : 237-241

Tajima, M, and T. Ushijima. Jpn J. Vet Sci 28 (1966) : 107-114

Youngner, J.S. : Monolayer Tissue Cultures. I Preparation and Standarddization of Suspensions of trypsin-Dispersed Monkey kidney Cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85, (1954) : 202-205

ผลของการใช้น้ำยาละลายต่างชนิดกันต่อภูมิคุ้มกันวัคซีนนิวคาสเซิลผสมอาหาร (สเตรน V_4)

EFFECT OF DIFFERENT DILUENTS ON THE IMMUNE RESPONSE AGAINST NEWCASTLE DISEASE VACCINE IN FEED (V_4- STRAIN)

วิมล ปริยกนก[1] กมลทิพย์ อนุสกุลเจริญพร[1]

Wimon Pariyakanok Kamonthip Anusakuncharoenporn

ABSTRACT

Effect of using rain-water and 5% skim milk as diluents for Newcastle disease vaccine, V_4- strain, mixed to different kinds of food broken white rice, commercial food and paddy rice, was studied.

When diluents was rain-water, the protection rates obtained in chicken received NCD vaccine in broken white rice, commercial food and paddy rice were 88, 75 and 40% respectively. For chickens vaccinated with NCD vaccine, diluted by 5% skim milks, mixed to broken white rice, commercial food and paddy rice were 45, 80 and 85% respectively.

The best result of immune response determined from protection rate at 3 weeks after challenged was obtained from chickens received vaccine diluted with rain-water and mixed to broken white rice.

บทคัดย่อ

ผลของการใช้น้ำฝนหรือ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ผสมอาหารชนิดต่างๆ คือ ปลายข้าว อาหารไก่สำเร็จรูป ข้าวเปลือก ผลของการศึกษามีดังนี้

เมื่อใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลาย เปอร์เซนต์การป้องกันโรคในไก่ที่ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลเมื่อผสมกับปลายข้าว อาหารไก่สำเร็จรูปและข้าวเปลือก คือ 88% 75% และ 40% ตามลำดับ สำหรับไก่ที่ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล ใช้ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลาย ผสมกับปลายข้าว อาหารไก่สำเร็จรูปและข้าวเปลือก มีเปอร์เซนต์การป้องกันโรคเท่ากับ 45% 80% และ 85% ตามลำดับ

ผลการตอบสนองของภูมิคุ้มโรคที่ดีที่สุด ตัดสินจากเปอร์เซนต์การป้องกันโรคหลังจากฉีดเชื้อพิษ 3 สัปดาห์ คือไก่กลุ่มที่ใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายวัคซีนผสมปลายข้าว

คำนำ

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคระบาดที่ร้ายแรงในไก่ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมและป้องกันโรคด้วย วิธีการทำวัคซีนหลักการทำวัคซีนในไก่มีหลายวิธี คือวิธีการฉีดหรือแทงปีก หยอดตาหรือจมูก ละลายน้ำ spray หรือ aerosol ได้เคยมีรายงานโดย Ibrahim และคณะ 1981 ถึงประสิทธิภาพของวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ได้ใช้วิธีการดังกล่าวข้างต้นว่า สามารถคุ้มโรคจากการฉีดเชื้อพิษและการระบาดของโรคได้ การทำวัคซีนด้วยวิธีละลายน้ำ spray หรือ aerosol นักใช้กับการทำวัคซีนในไก่เป็นจำนวนมาก เช่น ฟาร์มขนาดกลางและใหญ่ ซึ่งจะช่วยลดแรงงาน ง่ายและสะดวกต่อการทำวัคซีน แต่ไม่เหมาะสำหรับไก่พื้นบ้านที่เลี้ยงแบบปล่อย และเลี้ยงเป็นจำนวนน้อย

Aini และคณะ 1986 ได้พัฒนาวัคซีนสำหรับกิน ซึ่งไวรัสวัคซีนนี้ได้ผ่านเคลือบรวมกับอาหารสำเร็จรูป และไก่ที่ทำวัคซีนด้วยวิธีนี้สามารถป้องกัน

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

โรคนิวคาสเซิลได้ และยังได้ศึกษาในเวลาต่อมาว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าของระดับภูมิคุ้มโรคของไก่กลุ่มที่ทำวัคซีนด้วยวิธียอดจมูกหรือให้กิน สองกลุ่มสามารถป้องกันโรคได้เท่ากัน

การทำวัคซีนด้วยวิธีโยรยอาหารคลุกวัคซีนให้กินนั้น จะทำให้ไก่พื้นบ้านได้รับวัคซีนกันอย่างทั่วถึง รวมทั้งสามารถจะเลือกใช้ชนิดของอาหาร และน้ำยาละลายที่จะนำมาใช้ผสมวัคซีนซึ่งจะเป็นแนวทางเบื้องต้น สำหรับศึกษาวัคซีนนิวคาสเซิลสำหรับผสมอาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ได้มาจากบริษัท Pitman Moore ประเทศนิวซีแลนด์ นำมาผ่านเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ฟักต่อ 4 วัน แล้วเก็บน้ำจากไข่ (allantoic fluid) นำไปทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพจนได้ผลดี และตรวจหาปริมาณไวรัส โดยวิธี Sperman Karber meth (Finney, 1964) มี virus titer เท่ากับ $10^{9.3}$ EID_{50}/ml

2. น้ำยาละลายวัคซีนที่ใช้ น้ำฝน และน้ำฝนผสมหางนม 5%

3. อาหารที่ใช้มี 3 ชนิด คือ ปลายข้าว อาหารไก่สำเร็จรูป และข้าวเปลือก

4. ไวรัสเชื้อพันธุ์นิวคาสเซิลแยกได้จากอำเภอปากช่อง (Local strain)

5. ไก่ทดลองอายุ 1 วัน พันธุ์พื้นเมืองผสมไรด์ไอร์แลนด์เรด ไม่ทำวัคซีน นำมาเลี้ยงจนกระทั่งอายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 140 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว

วิธีการ

1. ก่อนให้กินวัคซีนผสมอาหารสุ่มเจาะเลือดไก่ทุกกลุ่ม เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ เพื่อตรวจหาค่า HI titer

2. ทดลองให้ไก่แต่ละกลุ่มกินอาหารแต่ละชนิด เพื่อจะได้ทราบว่าไก่แต่ละตัวกินอาหารแต่ละชนิดจำนวนเท่าใด

3. ทดลองผสมน้ำลงไปในอาหารแต่ละชนิด เพื่อจะดูว่าอาหารแต่ละชนิดจะดูดซับน้ำได้เท่าใด

4. คำนวนหาปริมาณอาหารและน้ำยาละลายที่ใช้ต่อไก่แต่ละตัว ดังนี้

ปลายข้าว	15 กรัม/น้ำ 1.875 ม.ล.	
อาหารสำเร็จรูป	40 กรัม/น้ำ 5	ม.ล.
ข้าวเปลือก	5 กรัม/น้ำ 0.06	ม.ล.

5. ใช้วัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ขนาด titer $10^{9.3}$ EID_{50}/ml จำนวน 0.2 ม.ล. ผสมกับน้ำยาละลาย 2 ชนิด คือ น้ำฝน และน้ำผสมหางนม 5%(ใส่หางนมเพื่อเคลือบวัคซีน) ตามสัดส่วนข้อ 4 คำนวนผสำหรับไก่จำนวน 20 ตัวต่อกลุ่ม ดังนั้นไก่แต่ละตัวจะกินวัคซีนขนาด $10^{7.3}$ EID_{50}/โด๊ส (ขนาดมาตรฐานของวัคซีนนิวคาสเซิล $10^{6.5-7.0}$ EID_{50}/โด๊ส)

6. ผสมวัคซีนกับน้ำยาละลายแล้วคลุกอาหารดังนี้ สำหรับไก่จำนวน 20 ตัว

ปลายข้าว	300 กรัม น้ำยาละลาย 37.5 ม.ล.	วัคซีน V_4 0.2 ม.ล.
อาหารสำเร็จรูป	200 กรัม น้ำยาละลาย 100 ม.ล.	วัคซีน V_4 0.2 ม.ล.
ข้าวเปลือก	100 กรัม น้ำยาละลาย 12 ม.ล.	วัคซีน V_4 0.2 ม.ล.

7. ให้ไก่ 6 กลุ่ม กินวัคซีนผสมน้ำยาละลายคลุกอาหารตามข้อ 6 ส่วนกลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มควบคุมกินอาหารสำเร็จรูปไม่ได้ผสมวัคซีน

กลุ่มที่ 1 กินปลายข้าวคลุกวัคซีนใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 2 กินปลายข้าวคลุกวัคซีนใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 3 กินอาหารไก่สำเร็จรูปคลุกวัคซีนใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 4 กินอาหารไก่สำเร็จรูปคลุกวัคซีนใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 5 กินข้าวเปลือกคลุกวัคซีนใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 6 กินข้าวเปลือกคลุกวัคซีนใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลาย

กลุ่มที่ 7 กินอาหารสำเร็จรูปไม่ได้คลุกวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม

8. ให้ไก่ทั้ง 6 กลุ่ม กินอาหารคลุกวัคซีนโดยใช้น้ำยาละลายต่างชนิดกัน 2 ครั้ง เมื่อไก่อายุ 6 และ 8 สัปดาห์

9. เจาะเลือดไก่ทั้ง 7 กลุ่ม หลังจากกินวัคซีนครั้งแรกไปแล้ว 2 สัปดาห์ เมื่อไก่อายุ 8 สัปดาห์ และเจาะเลือดอีกครั้งหลังจากกินวัคซีนครั้งที่สองไปแล้ว 2 สัปดาห์ เมื่อไก่อายุ 10 สัปดาห์ เพื่อเก็บ serum ไปตรวจหาค่า HI titer

10. นำไก่ทั้ง 7 กลุ่มไปฉีดเชื้อพิษ (Challenge) หลังจากกินวัคซีนแล้ว 2 ครั้ง เมื่อไก่อายุ 10 สัปดาห์ ด้วยขนาด 10^6EID$_{50}$/ตัว เข้ากล้ามตัวละ 0.5 C.C. ตรวจดูอัตราการเป็นโรค อัตราการตาย หลังจากฉีดเชื้อพิษ 21 วัน

ผลการทดลอง

1. HI antibody response

ค่า HI antibody ในลูกไก่ก่อนให้กินวัคซีนเมื่ออายุ 6 สัปดาห์ และหลังจากให้กินวัคซีนผสมอาหารครั้งแรกไปแล้ว 2 สัปดาห์ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ รานทั้งกินวัคซีนครั้งที่สองไปแล้ว 2 สัปดาห์ คือ เมื่ออายุ 10 สัปดาห์ ได้แสดงอยู่ในตารางที่ 1

ก่อนให้กินวัคซีนนิวคาสเซิลผสมอาหารค่า HI titer ในลูกไก่เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ทุกกลุ่มล้วนมากจะมีค่าเฉลี่ย(GMT) ตั้งแต่ 0-0.5 (Haemagglutination inhibition, geometric mean titer, log 2)

หลังจากให้กินวัคซีนครั้งแรกไปแล้ว 2 สัปดาห์ ค่า HI titer กลุ่มที่กินอาหารไก่สำเร็จรูปใช้น้ำฝน และ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายจะสูงกว่ากลุ่มอื่น กลุ่มที่กินข้าวเปลือกใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายวัคซีนสูงขึ้นเล็กน้อย ส่วนกลุ่มอื่น ๆ นั้นค่า HI titer สูงขึ้นเล็กน้อยหรือต่ำกว่าเดิม

หลังจากให้กินวัคซีนซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองผ่านไป 2 สัปดาห์ คือเมื่อไก่อายุ 10 สัปดาห์ จะพบว่าค่า HI titer สูงขึ้นอย่างชัดเจน คือ

กลุ่มที่กินอาหารไก่สำเร็จรูปใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนค่า GMT เท่ากับ 6.33

กลุ่มที่กินปลายข้าวใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายวัคซีนค่า GMT เท่ากับ 4.9

กลุ่มที่กินข้าวเปลือกใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนค่า GMT เท่ากับ 4.6

กลุ่มที่กินอาหารไก่สำเร็จรูปใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายวัคซีนค่า GMT เท่ากับ 4.16

กลุ่มที่กินข้าวเปลือกใช้หางน้ำนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนค่า GMT เท่ากับ 1.68

กลุ่มที่ค่า GMT ต่ำที่สุด คือ กลุ่มที่กินปลายข้าวใช้หางน้ำนมเป็นน้ำละลายวัคซีน

2. การป้องกันโรคหลังจากฉีดเชื้อพิษ

การตอบสนองของไก่ที่กินวัคซีนผสมอาหารชนิดต่าง ๆ และน้ำยาละลายต่างชนิดกันต่อการฉีดเชื้อพิษ ดูจากจำนวนไก่ที่รอดชีวิตและจำนวนไก่ทั้งหมดที่ฉีดเชื้อพิษ พร้อมทั้งเปอร์เซนต์การป้องกันโรคได้แสดงได้ตารางที่ 2

หลังจากฉีดเชื้อพิษไก่กลุ่มต่าง ๆ ที่ไม่มีความต้านทานโรคจะแสดงอาการซึมตายใน 2-4 วัน ขนพอง ขนยุ่ง กินอาหารน้อยลง บางตัวนั่งลงบน hock joint ท้องร่วง และตาย

จากตารางที่ 2 ไก่กลุ่มที่ 1 และ 2 ใช้น้ำฝนและ 5% หางนม เป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ผสมปลายข้าวให้กิน จะมีผลต่อเปอร์เซนต์การป้องกันโรคแตกต่างกันมาก คือ 88%, 45% ตามลำดับ

ไก่กลุ่มที่ 3 และ 4 ใช้น้ำฝนและ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 ผสมอาหารสำเร็จรูปให้กิน ผลต่อเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 75% และ 80% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การตอบสนองของลูกไก่ต่อวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 คลุกอาหารชนิดต่าง ๆ และใช้น้ำยาละลายวัคซีนต่างชนิดกัน ให้กินวัค
เมื่ออายุครบ 6 และ 8 สัปดาห์

กลุ่มที่	น้ำยาละลายวัคซีน	ชนิดของอาหาร	ค่า HI antibody [a]		
			ก่อนกินวัคซีน	หลังจากกินวัคซีน	
			อายุ 6 สัปดาห์ (GMT)	อายุ 8 สัปดาห์ (GMT)	อายุ 10 สัปดา (GMT)
1	น้ำฝน	ปลายข้าว	0	0.45	4.9
2	5% หางนม	ปลายข้าว	0.3	0	0.3
3	น้ำฝน	อาหารสำเร็จรูป	0	2.45	3.16
4	5% หางนม	อาหารสำเร็จรูป	0	2.16	6.33
5	น้ำฝน	ข้าวเปลือก	0.5	1.63	1.68
6	5% หางนม	ข้าวเปลือก	0	0.3	4.6
[b] 7	-	อาหารสำเร็จรูป	0.3	0	0

[a] Haemagglutination-inhibition, geometric mean titer, log 2

[b] กลุ่มควบคุม (control)

ตารางที่ 2 การตอบสนองของลูกไก่ต่อวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V_4 คลุกอาหารชนิดต่าง ๆ และใช้น้ำยาละลายต่างชนิดกัน ให้กินวัคซีนเมื่ออา
6 และ 8 สัปดาห์ และนำไปฉีดเชื้อพิษเมื่ออายุ 10 สัปดาห์ ด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิลขนาด 10^6 BID$_{50}$/โด๊ส

กลุ่มที่	น้ำยาละลาย	ชนิดของอาหาร	จำนวนไก่ที่รอดชีวิต/-จำนวนไก่ทั้งหมดที่ฉีดเชื้อพิษ	เปอร์เซนต์การป้องกันโรค
1	น้ำ	ปลายข้าว	16/18 [a]	85%
2	5% หางนม	ปลายข้าว	9/20	45%
3	น้ำ	อาหารสำเร็จรูป	15/20	75%
4	5% หางนม	อาหารสำเร็จรูป	16/20	80%
5	น้ำ	ข้าวเปลือก	8/20	40%
6	5% หางนม	ข้าวเปลือก	17/20	85%
[b] 7	-	อาหารสำเร็จรูป	0/10	0%

[a] ตาย 2 ตัว เนื่องจากเจาะเลือดก่อนฉีดเชื้อพิษ, [b] กลุ่มควบคุม (control)

ส่วนไก่กลุ่มที่ 5 และ 6 ใช้น้ำฝนและ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V4 ผสมข้าวเปลือก จะมีผลต่อเชอร์เรนต์ความคุ้มโรคแตกต่างกัน คือ 40% และ 85% ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์

การทดลองนี้ได้ใช้ไก่พันธุ์พื้นเมืองผสมไร้ดไอแลนด์เรด และให้กินวัคซีนละลายด้วยน้ำยาละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ 5% หางนม (จุดประสงค์เพื่อเคลือบวัคซีนให้คงสภาพ) ผสมอาหารชนิดต่าง ๆ กัน โดยแบ่งไก่ออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามชนิดของอาหารและน้ำยาละลายให้ไก่กินวัคซีนสองครั้งในทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มควบคุม การให้กินวัคซีนสองครั้ง เนื่องจาก Aini และคณะ 1987 ได้ศึกษาและชี้ให้เห็นว่าการให้กินวัคซีนเพียงครั้งเดียวนั้นไม่เพียงพอ ภูมิคุ้มโรคจะไม่สูงพอจึงต้องกินวัคซีนอย่างน้อยสองครั้ง เพื่อ booster อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนด้วยวิธีนี้ง่ายและสะดวก จะทำให้การทำวัคซีนทำได้เป็นอย่าง ๆ และสม่ำเสมอ

ไก่กลุ่มที่ให้ผลดอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรคได้ดีที่สุดคือ กลุ่มที่ใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V4 ผสมปลายข้าวให้กิน สามารถป้องกันโรคต่อการฉีดเชื้อพิษได้ 88% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปลายข้าวเป็นข้าวดิบและเป็นข้าวพัก จึงสามารถดูดซับน้ำและไวรัสได้ดี แต่เมื่อใช้ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลาย กลับให้ผลคุ้มโรคแค่ 45%

ไก่กลุ่มที่ให้ผลดอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรคได้ดีรองลงมา คือ กลุ่มที่ใช้ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V4 ผสมข้าวเปลือกให้กิน สามารถป้องกันโรคได้ 85% อาจจะเนื่องจากข้าวเปลือกมีผิวหยาบและแห้ง ดูดซับน้ำไม่ได้ดี จึงจำเป็นต้องอาศัย 5% หางนมเพื่อเคลือบไวรัสให้จับกับผิวของเมล็ดข้าวเปลือก แต่เมื่อใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายกลับให้ผลคุ้มกันโรคได้เพียงแค่ 40%

ส่วนไก่กลุ่มที่ให้ผลดอบสนองต่อภูมิคุ้มโรคได้ดีพอสมควร คือ ไก่กลุ่มที่ใช้ 5% หางนมเป็นน้ำยาละลายวัคซีนนิวคาสเซิลสเตรน V4 ผสมอาหารไก่สำเร็จรูปให้กินสามารถป้องกันโรคได้ 80% แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้น้ำฝนเป็นน้ำยาละลายสามารถป้องกันโรคได้ 75% ซึ่งผลแตกต่างกันน้อยมาก อาจเนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนและดูดซับน้ำและไวรัสได้ใกล้เคียงกัน

ดังนั้นการใช้น้ำยาละลายวัคซีนต่างชนิดกัน จะมีผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของอาหารด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์โรคสักดิ์ บำรุง ที่ได้ช่วยประสานงานทดลอง และนายสัตวแพทย์ประชุม อินทรโรดิ หัวหน้าศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ทับกวาง ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ไก่พันธุ์พื้นเมืองผสมไร้ดไอแลนด์เรด สำหรับการทดลองครั้งนี้จนประสบผลสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aini, I., Ibrahim, A.L., Fauziah, O., and Hussein. A. Aziz. 1986. Field trials with an oral Newcatle Disease vaccine. Proceedings of the Fifth International Conference on Livestock Production and disease in the Tropics, 127-129.

Aini, I., Ibrahim, A.L. and Spradbrow, P.B. 1987. Newcastle Disease in Poultry. A New Food Pellet Vaccine. Australian centre for International Agriculture Research. P31.

Allan, W.H., Lancaster, J.E., Toth, B. 1978. Newcastle Disease Vaccines. Their production and use. Rome, Food and Agricultrue Organization of the United Nations, p. 56, 83.

Ibrahim, A.L., Chulan, U., and Mustaffa-Babjee, A. 1981. An assessment of the Australian V4 strain of Newcastle disease virus as a vaccine by spray, aerosol and drinking water administration. Australian Veterinary Journal. 57, 277-80.

Finney, D.J. 1964. Statistical method in biological assay. 2nd ed. London. Griffin.

การศึกษาวัคซีนกาฬโรคเป็ดในห่าน
: การใช้วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นในห่าน :
THE STUDIES OF DUCK PLAGUE VACCINE IN GEESE
: THE USE OF ATTENUATED DUCK PLAGUE VACCINE IN GEESE :

สุวรรณี ท้วมแสง[1] โสภณ ท้วมแสง[1] นันทนา โปษณะจริญ[1]
Suwonnee Tuamsang Sophon Tuamsang Nantana Posanacharoen

ABSTRACT

Duck plague vaccine containing $10^{3.5}$TCID$_{50}$/dose showed 60% protection in geese. The protection rate, then, increased to 80% in geese with booster vaccination at 2 weeks interval. There were 100% protection in geese received duck plague vaccine containing $10^{4.5}$TCID$_{50}$/dose at 14 days after first and second vaccination.

บทคัดย่อ

จากการทดลองวัคซีนกาฬโรคเป็ดที่ใช้ฉีดในห่าน พบว่าห่านที่ฉีดวัคซีนด้วยขนาดโด๊สในห้องที่ ($10^{3.5}$TCID$_{50}$/ตัว) จะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคเป็น 60 เปอร์เซนต์ และเมื่อฉีดวัคซีนกระตุ้นครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 2 อาทิตย์ด้วยขนาดเดิม จะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคเพิ่มเป็น 80 เปอร์เซนต์ ในขณะเดียวกันห่านที่ฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโด๊สห้องที่ เพียงครั้งเดียว ($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว) และอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งกระตุ้นด้วยขนาดเดิม ($10^{4.5}$ TCID$_{50}$/ตัว) ห่างจากครั้งแรก 2 อาทิตย์ จะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคเป็น 100 เปอร์เซนต์ทั้งสองกลุ่ม

คำนำ

โรคกาฬโรคเป็ด (Duck plague) ไม่เพียงแต่จะเกิดระบาดขึ้นในเป็ดได้เท่านั้น แต่สามารถทำให้ห่านเป็นโรคได้เช่นเดียวกัน จะมีอัตราการตายสูงเมื่อเกิดระบาดขึ้นในฝูงห่าน ทำให้สูญเสียเศรษฐกิจในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสในตระกูล Herpesvirus โรคนี้สามารถป้องกันได้โดยการการฉีดวัคซีนป้องกัน จากการศึกษาของสุวรรณี และคณะ (2531) พบว่าเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดที่แยกได้จากห่านจะมีความรุนแรงมากกว่าเชื้อที่แยกได้จากเป็ด และวัคซีนที่ใช้ฉีดในห่านต้องมีขนาด 10 เท่าของโด๊สในห้องที่ จึงจะทำให้ห่านมีความคุ้มโรคสมบูรณ์เป็น 100 เปอร์เซนต์ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการฉีดวัคซีนในห่านเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าต่อครั้งในการฉีด ดังนั้นการศึกษาการใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นด้วยขนาดโด๊สในห้องที่ โดยการกระตุ้นห่านจากการฉีดครั้งแรก 2 อาทิตย์ จึงได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบดูผลอัตราการให้ความคุ้มโรคที่เกิดขึ้นในห่าน เพื่อสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้เพื่อลดต้นทุนในการผลิตด้านสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดพร้อมใช้ (Jansen Strain) ซึ่งทำให้เข้มข้นโดยใช้ PEG 3,000 และผ่านการทดสอบคุณภาพแล้ว
2. ไวรัสเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดที่แยกได้จากห่าน จากจังหวัดสมุทรสาคร
3. ห่านทดลองอายุ 2 เดือน จำนวน 50 ตัว เป็นห่านซึ่งผลิตขึ้นจากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ และไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดมาก่อน
4. เซลล์ตัวอ่อนไก่ อายุ 11 วัน (chick embryo fibroblast)

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

วิธีการศึกษา

1. แบ่งห่านออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว โดยนำมาฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดด้วยขนาดดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนด้วยขนาดโด๊สห้องที่ ($10^{3.5}$TCID$_{50}$/ตัว)

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนด้วยขนาดโด๊สห้องที่ ($10^{3.5}$TCID$_{50}$/ตัว) หลังจากฉีดวัคซีนกระตุ้นด้วยขนาดเดิมห่างจากครั้งแรก 14 วัน

กลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโด๊สห้องที่ ($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว)

กลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโด๊สห้องที่ ($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว) หลังจากนั้นฉีดวัคซีนกระตุ้นด้วยขนาดเดิม($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว) ห่างจากครั้งแรก 14 วัน

เมื่อทำการฉีดวัคซีนครบทุกกลุ่มแล้ว14 วันนำห่านแต่ละกลุ่มไปฉีดเชื้อพิษกาฬโรคเป็ดที่แยกได้จากห่านจากจังหวัดสมุทรสาครด้วยขนาด 10^5GLD$_{50}$ ต่อตัว โดยมีห่านดูดคุม (Control group) จำนวน 10 ตัว

2. เจาะเลือดห่านก่อนฉีดวัคซีน, หลังฉีดวัคซีนครั้งแรก 14 วัน และหลังการฉีดวัคซีนกระตุ้นครั้งที่สอง 14 วัน

3. ตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี Neutralization test เพื่อหาค่า Neutralizing Index (NI) constant serum,varying virus

4. ดูอัตราการตายและรอดของกลุ่มห่านต่าง ๆ

ผลการทดลอง

จากตาราง ห่านที่ฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ดด้วยขนาดโด๊สห้องที่ ($10^{3.5}$TCID$_{50}$/ตัว) เพียงครั้งเดียว มีอัตราการให้ความคุ้มโรคเพียง 60 เปอร์เซนต์ ในกลุ่มที่ 2 เมื่อฉีดวัคซีนกระตุ้นห่างจากครั้งแรก 14 วัน ด้วยขนาดเดิมและนำไปฉีดเชื้อพิษทับ พบว่าห่านมีอัตราการให้ความคุ้มโรคสูงขึ้นจากเดิมเป็น 80 เปอร์เซนต์ และค่า Neutralizing Index (NI) หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรกจะมีค่าเพียง 1.465 และจะสูงขึ้นเป็น 2.15 หลังจากฉีดวัคซีนกระตุ้นในกลุ่มนี้

ห่านในกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับการฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโด๊สห้องที่($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว) มีอัตราการให้ความคุ้มโรคสมบูรณ์ 100 เปอร์เซนต์ และมีค่า NI เฉลี่ย 2.63 หลังการฉีดวัคซีน

ในกลุ่มที่ 4 ห่านที่ได้รับการฉีดวัคซีน 10 เท่าของโด๊สห้องที่ ($10^{4.5}$TCID$_{50}$/ตัว) และนำมาฉีดวัคซีนกระตุ้นด้วยขนาดเดิมห่างจากครั้งแรก 14

ตาราง แสดงค่า NI ก่อนและหลังการฉีดวัคซีน, อัตราการตาย และอัตราการให้ความคุ้มโรคของกลุ่มห่านที่ฉีดวัคซีนด้วยวิธีต่าง ๆ

Group	Vaccination Programme	NI before Vaccination	NI after Vaccination (14 days) ($\bar{x}$)	NI after 2nd Vaccination (14 days) ($\bar{x}$)	Mortality rate (%)	Protection rate (%)
1	$10^{3.5}$TCID$_{50}$/dose	1.085	1.2	-	40	60
2	$10^{3.5}$TCID$_{50}$ 14 days $10^{3.5}$TCID$_{50}$.	0.35	1.465	2.15	20	80
3	$10^{4.5}$TCID$_{50}$/dose	0.5	2.63	-	0	100
4	$10^{4.5}$TCID$_{50}$ 14 days $10^{4.5}$TCID$_{50}$.	0.52	2.05	2.75	0	100
5	No Vaccination (Control group)	1.005	-	-	100	0

วัน พบว่ามีอัตราการให้ความคุ้มโรคเป็น 100 เปอร์เซนต์ หลังการฉีดพิษกับ และค่า NI เฉลี่ยจะเท่ากับ 2.05 และ 2.75 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแ
และครั้งที่ 2 ตามลำดับ

ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน เมื่อนำไปฉีดเชื้อพิษกับจะมีอัตราการตายเป็น 100 เปอร์เซนต์

สรุปและวิจารณ์

ห่านที่ฉีดวัคซีนด้วยขนาดโดสห้องที่ ($10^{3.5}$TCID$_{50}$/ตัว) เพียงครั้งเดียวจะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคเพียง 60 เปอร์เซนต์ และในขณะเดี
กันเมื่อฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำด้วยขนาดเดิมห่างจากครั้งแรก 14 วัน พบว่าจะมีอัตราการให้ภูมิคุ้มโรคสูงขึ้นเป็น 80 เปอร์เซนต์ ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้น
สูงขึ้นจากเดิมโดยดูจาก NI ซึ่งจากเดิมมีค่า 1.465 สูงขึ้นเป็น 2.15 (จากตาราง) ในห่านที่ได้รับการฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโดสห้องที่ จ
อัตราการให้ภูมิคุ้มโรคที่สมบูรณ์เป็น 100 เปอร์เซนต์

จากการทดลองนี้พบว่า การนำวัคซีนเชื้อเป็นไปใช้ในห่านสามารถทำได้หลายทาง คือ ฉีดวัคซีนด้วยขนาดโดสห้องที่เป็นจำนวน 2 ครั้ง ห่
กัน 14 วัน ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันโรคได้ คือมีค่า Neutralizing Index มากกว่า 1.75 (Asplin, 1970) และมีอัตราภูมิคุ้มโ
เป็น 80 เปอร์เซนต์ และในอีกทางหนึ่งพบว่าการฉีดวัคซีนด้วยขนาด 10 เท่าของโดสห้องที่เพียงครั้งเดียวในห่าน จะมีอัตราการให้ความคุ้มโรคสมบู
100 เปอร์เซนต์ และมี Neutralizing Index 1.75 ซึ่งถือว่าสามารถคุ้มโรคได้ แต่ต้นทุนการผลิตวัคซีนในการใช้วัคซีนจะสูงขึ้น 10 เท่า ซึ่งจะ
กว่าวิธีแรก

การเลี้ยงสัตว์จะให้ได้กำไรมากก็คือ ต้องลดต้นทุนการผลิตในสิ่งที่ไม่จำเป็นออก แต่การใช้วัคซีนควบคุมโรคระบาดที่ร้ายแรง เช่น โรคกาฬโ
เป็ดถึงแม้จะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าปกติก็ต้องกระทำ เนื่องจากการใช้วัคซีนที่ไม่ถูกต้องซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียเพิ่มขึ้นอย่างมหาศาลในส่วนรวม
ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคซึ่งมากขึ้นไปสู่ในที่แห่งอื่น ๆ ทำให้สูญเสียเศรษฐกิจมากขึ้น ดังนั้นการใช้วัคซีนชนิดวิธีจึงจำเป็นสำหรับเกษตรกรอย่
ยิ่งในการป้องกันโรค

เอกสารอ้างอิง

สุวรรณี ห้วยแสง, สุดารัตน์ ชินศักดิ์ชัย, ฉาย จอมเกาะ และสละ กองสมัคร, 2531 : การศึกษาวัคซีนกาฬโรคเป็ดในห่าน เวชสารสัตวแพทย์
(2) : 151-156

Asplin, F.D. 1970. Veterinary Record 87, 182

Ball, L. 1984. Duck and gose experiments with duck plaque (duck enteritis) virus strain. Magyar Allatorovs
Lapja 39 (9) : 555-561

Kisary, J. and Zsak, L. 1983. Comparative studies on Duck viral enteritis (DVE) virus strains in geese. Avi
Pathology. 12 : 395-408

การทดลองเบื้องต้นในการผลิตวัคซีนโรคนิวคาสเซิลเชื้อตายชนิดน้ำมัน

A PRELIMINARY EXPERIMENT OF INACTIVATED OIL ADJUVANT NEWCASTLE DISEASE VACCINE PRODUCTION

II การเตรียมมาสเตอร์ซีดไวรัสนิวคาสเซิลจากเชื้อท้องที่

PREPARATION OF MASTER SEED NEWCASTLE DISEASE VIRUS FROM LOCAL STRAIN.MB

วิมล ปริยกนก[1] กมลทิพย์ อนุสกุลเจริญพร[1] จารุณี สาตรา[1]

Wimon Pariyakanok Kamonthip Anusakuncharoenporn Jarunee Satra

ABSTRACT

In the preparation of Newcastle disease virus (master seed) from local strain by limiting dilutions method, the virus was passaged by inoculation in SPF eggs and SPF chickens to regain a maximum infectious activity. The so called purified virus was prove not to be contaminated by any extraneous microoganisms. High virus yield of $10^{9.7}$ and $10^{9.9}$ ELD_{50}/ml was satisfied

บทคัดย่อ

การเตรียมมาสเตอร์ซีดไวรัสโรคนิวคาสเซิลด้วยวิธี limiting dilutions จากเชื้อท้องที่หาได้โดยนำเชื้อผ่านเข้าไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อและไก่ปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อที่มี infectious activity สูง เชื้อไวรัสที่ได้ถือว่าบริสุทธิ์และตรวจแล้วพบว่า ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย รา มัยโคพลาสมา และไวรัสชนิดอื่น ๆ ปริมาณไวรัสที่ได้สูงถึง $10^{9.7}$ และ $10^{9.9}$ ELD_{50}/ml ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

คำนำ

เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่กระทง มักประสบปัญหาการระบาดของโรคนิวคาสเซิลทั้ง ๆ ที่มีโปรแกรมการให้วัคซีนเชื้อเป็นต่างประเภทแก่ไก่กระทงอย่างเคร่งครัด สาเหตุอาจมาจากระยะเวลาของภูมิคุ้มโรคของวัคซีนเชื้อเป็นอยู่ได้ไม่นาน แต่การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคให้สัตว์ด้วยวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในระดับสูง และระยะเวลาของภูมิคุ้มโรคอยู่ได้นานกว่าวัคซีนเชื้อตาย หรือวัคซีนเชื้อเป็น (Levy and Zakay Bones, 1979 Box and Purninger, 1975) ทำให้สัตว์มีความต้านทานต่อโรคได้ดี

การเตรียมการผลิตวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันนี้ได้เลือกใช้เชื้อพิษนิวคาสเซิล ที่แยกได้ในท้องที่ซึ่งอาจจะมีเชื้ออื่นปนเปื้อนอยู่ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการเตรียมมาสเตอร์ซีด

การเตรียมมาสเตอร์ซีดนับเป็นหัวใจสำคัญในการผลิตวัคซีน เพื่อผลิตให้ได้วัคซีนที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพ ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย รา และมัยโคพลาสมา ตลอดจนไวรัสชนิดอื่น seed strain ที่ใช้จะต้องทำให้บริสุทธิ์ และมี infectious activity สูง เพื่อกระตุ้นให้สัตว์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดี

---

[1] ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัสได้นำมาจากห้องที่ 2 ตัวอย่าง คือ

1. NDV_1 เป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่อายุ 35 วัน จากฟาร์มอำเภอพัฒนานิคม จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อปี พ.ศ. 2533

2. NDV_2 เป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่อายุ 38 วัน จากฟาร์มอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2534

เนื่องจากงานผลิตวัคซีนนิวคาสเซิล ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ มี local strain ที่แยกได้จากอำเภอปากช่อง เมื่อปี พ.ศ. 2527 และยังจุขุนใช้สำ ฉีดเชื้อพิษ (challenged virus) ของวัคซีนนิวคาสเซิลที่ผลิตใช้อยู่ จึงสมควรนำมาศึกษาร่วมด้วย เพื่อจะได้เก็บไว้เป็น Positive control NDP (N.D. Pakchong)

ดังนั้นในการเตรียม Master seed virus นี้ จะมีเชื้อไวรัสที่แยกได้จากห้องที่ต่าง ๆ 3 แห่ง และได้นำมาศึกษาก่อนที่จะคัดเลือกว่าสา เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น seed ผลการศึกษาทดลองดังนี้

Virus	Haemagglutination test (HA)	Haemagglutionation inhibition test (HI)	Virus titer (EID_{50}/ml)	ความคุ้มโร (%)
NDV_1	+	+	$10^{8.7}$	100
NDV_2	+	+	$10^{7.3}$	78
NDV	+	+	$10^{9.5}$	100

* ใช้ ND antiserum จากงานผลิตวัคซีนนิวคาสเซิล กองผลิตชีวภัณฑ์

จากตารางข้างบนนี้จึงได้ตัดสินใจเลือก NDV_1 และ NDP มาเตรียม Master seed virus เนื่องจากเมื่อนำไวรัสทั้ง 3 ตัวอย่างไปทดลอง เชื้อเข้าไข่ไก่ฟัก เก็บเชื้อไวรัส ทำเชื้อไวรัส และผสมสูตรวัคซีนน้ำมัน แล้วนำไปทดลองฉีดเข้าลูกไก่ หลังจากนั้น 21 วัน นำไปฉีดเชื้อพิษ NDV_2 ไ ความคุ้มโรคต่ำกว่ามาตรฐาน รวมทั้งปริมาณไวรัสก็ต่ำกว่า NDV_1 และ NDP

3. ตู้ฟักไข่ ที่สะอาดขนาดบรรจุ 144 ฟอง จำนวน 2 ตู้

4. ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ (SPF eggs) จำนวน 1446 ฟอง

5. ลูกไก่ปลอดเชื้อ(SPF chickens) จำนวน 16 ตัว โดยนำไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อมาฟักเอง 4 ครั้ง และนำไปแยกเลี้ยงต่างหากในคอกที่สะอ เป็นพิเศษ

6. Reference positive serum ของเชื้อแต่ละชนิด คือ Newcastle disease virus, Infectious larynxgo-tracheiti Infectious bursal disease, Avian influenza, Egg drop syndrome และ Reo virus

7. Conjugate antichick IgG FITC

ผลการทดลอง

1. นำเชื้อไวรัส NDV_1 และ NDP มาเพาะเลี้ยงในไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน ใช้ไข่ไก่ฟัก SPE (specific pathogen free) จำนวนตัวอ และ 10 ฟอง

2. เก็บเชื้อไวรัสจากน้ำในไข่ไก่ฟัก (allantoic fluid) หลังจากฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ 3 ครั้ง ในไข่ไก่ฟัก

ด้วยวิธี limiting dilutions ใช้ไข่ไก่พักอายุ 9-10 วันครั้งละ 28 ฟองต่อตัวอย่าง นำเชื้อไวรัสมาทำให้เจือจางที่ dilution สูงสุดแต่ $10^{-7.7}$ ถึง $10^{-9.8}$ และนำแต่ละ dilution ไปฉีดเข้าไข่ไก่พัก dilution ละ 7 ฟอง นำไข่เข้าพักต่อ ส่องดูไข่ทุกวันเช้า-เย็น ไข่ที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงแรกคัดทิ้ง เก็บเชื้อไวรัสจากไข่ฟองที่เจือจางสูงสุดและทำให้ไข่ไก่พักตายภายใน 48 ชั่วโมง (ปกติ incubation period ของเชื้อพิษนำคาสเซิลในไข่ไก่พักประมาณ 40-60 ชั่วโมง)

3. นำเชื้อไวรัสที่เก็บได้จากข้อ 2 ไปผ่านเข้าไก่ SPF อายุ 4 สัปดาห์อีก 2 ครั้ง เพื่อทำให้เชื้อมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยทำให้เชื้อไวรัสเจือจางขนาด 10^{-7} ฉีดเข้าไก่ SPF จำนวนตัวอย่างละ 2 ตัว ไก่จะตายภายหลังฉีดเชื้อ 3 วัน (incubation period ของโรคนำคาสเซิลที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติในไก่เท่ากับ 2-15 วัน) เก็บม้ามและปอดอย่าง asepsis นำไปสกัดและทำให้เชื้อเจือจาง 1:100 นำกลับไปฉีดเข้าไข่ไก่พัก SPF ซ้ำอีกหนึ่งรอบดังแต่ข้อ 1-3

4. นำม้ามและปอดจากรอยที่ 2 มาสกัด และทำให้ไวรัสเจือจางที่ 1:100 นำมาฉีดเข้าไข่ไก่พัก SPF อายุ 11 วัน เก็บเชื้อไวรัสจากน้ำในไก่พัก (allantoic fluid) ก็จะได้ Master seed virus ของ NDV_1 และ NDP

5. นำ Master seed virus มาทำให้เจือจางที่ 10^{-3} ผ่านเข้าไข่ไก่พัก SPF เพื่อเก็บ allantoic fluid สำหรับผลิตวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมันต่อไป

ผล

ทดสอบคุณภาพของ Master seed virus (MSV) ผลการทดสอบมีดังนี้

1. ทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Sterility test) นำตัวอย่าง MSV(NDV_1) และ MSV(NDP) มาเพาะเลี้ยงลงใน Thioglycollate broth incubate ที่ 37°C. ใช้เวลา 7 วัน ตรวจไม่พบเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรีย

2. ทดสอบความปนเปื้อนของเชื้อมัยโคพลาสมา นำตัวอย่างเชื้อ MSV(NDV_1) และ MSV(NDP) มาเพาะลงใน PPLO broth incubate ที่ 37°C. ใช้ 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน ตรวจไม่พบเชื้อมัยโคพลาสมา

3. ทดสอบ identity และปราศจากเชื้อไวรัสอื่น ๆ

ใช้วิธีการ neutralization ซึ่งเป็นวิธีเฉพาะระหว่างไวรัส และ hyperimmune serum ของเชื้อไวรัสโรคนำคาสเซิล เมื่อนำไปฉีดเข้าไข่ไก่พัก SPF ด้วย neutralized inoculum เข้า allantoic route และ CA membrane ไข่ไก่พักยังคงเติบโตเป็นปกติ

นอกจากนี้ยังใช้วิธี Indirect FA test เพื่อทดสอบว่ามาสเตอร์ซีดไวรัสนี้ปราศจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น

จากผลการตรวจโดยใช้วิธี Indirect FA test แล้วไม่พบการปนเปื้อนของไวรัสชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ คือ Infectious larynxgotracheitis (ILT) Infectious bronchitis (IB) Infectious bursal disease(IBD) Avian influenza (AI) Egg drop syndrome (EDS) และ ReO virus

4. การหาปริมาณไวรัสของมาสเตอร์ซีดไวรัส คือ MSV(NDV_1) และ MSV(NDP)

ทำการ titrate ไวรัสในไข่ไก่พักปลอดเชื้อ และคำนวนหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีของ Spearman Karber ซึ่งจะช่วยเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำในการคำนวนหา Virus end point และดีกว่าใช้วิธีการของ Reech and Munch (Finney, 1964)

Virus titre ของ MSV(NDV_1) เท่ากับ $10^{9.7}$ ELD_{50}/ml

Virus titre ของ MSV(NDP) เท่ากับ $10^{9.9}$ ELD_{50}/ml

สรุปและวิจารณ์

Allan และคณะ (1978) ได้แนะนำการเตรียมมาสเตอร์ซีดโดย นำเชื้อไวรัสผ่านเข้าไข่ไก่พักและลูกไก่ปลอดเชื้อ เพื่อเพิ่ม infectious activity การนำเชื้อผ่านไข่ไก่พักปลอดเชื้อด้วยวิธี limiting dilution นั้น จุดประสงค์เพื่อทำให้ได้เชื้อ genetically pure และปราศจาก

การปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ จากงานวิจัยครั้งนี้พอจะถือได้ว่า มาสเตอร์ซีดที่ได้นั้นมีเชื้อที่มี infectious activity สูง และปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย รา ยีสโคพลาสมา และไวรัสอื่น ๆ อีก 6 ชนิด จึงไม่พอเป็นที่น่าพอใจ

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้มาสเตอร์ซีดไวรัสนิวคาสเซิลจากเชื้อท้องถิ่น สำหรับนำไปใช้ผลิตวัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน เพื่อป้องกันและควบคุมโรคนิวคาสเซิล แต่มีข้อควรระวังคือ จะต้องทดสอบให้แน่ใจว่าวัคซีนดังกล่าวทำเชื้อไวรัสที่ใช้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังนำไปใช้เป็น seed challenge ในการผลิตวัคซีนเชื้อเป็น หรือนำไปทำให้เชื้ออ่อนกำลังลง (attenuate) ด้วยวิธี limiting dilution ทำให้ลดความรุนแรงของเชื้อพิษ เพื่อผลิตเป็นวัคซีนเชื้อเป็น Mesogenic vaccine (Reeve et al. 1974 ได้ใช้วิธีนี้ลดความรุนแรงของเชื้อ virulent Essex 70 strain

โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ Chick embryo fibroblast (CEF) บน cover slip แล้ว inoculate MSV(NDV$_1$) และ MSV(NDP) ลงใน CEF cells แยกคนละชุด นำไป incubate ที่ 37°C. ใช้เวลา 18 ชั่วโมง Fix ด้วย cold acetone แล้วเติม reference positive serum ของเชื้อแต่ละชนิด ย้อมด้วย conjugate antichick IgG FITC อ่านผลจากกล้อง fluorescent ผลการทดลองมีดังนี้

Sample	Positive serum	Result
NDV$_1$	ND	+
NDV$_1$	ILT	-
NDV$_1$	IB	-
NDV$_1$	IBD	-
NDV$_1$	AI	-
NDV$_1$	EDS	-
NDV$_1$	ReO	-
NDP	ND	+
NDP	ILT	-
NDP	IB	-
NDP	IBD	-
NDP	AI	-
NDP	EDS	-
NDP	ReO	-
Cell control	ND	-
Cell control	ILT	-
Cell control	IB	-
Cell control	IBD	-
Cell control	AI	-
Cell control	EDS	-
Cell control	ReO	-

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท เอ.เอช.ซี. จำกัด ในเครือบริษัทสหฟาร์ม จำกัด ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ ลูกไก่ทดลอง และอุปกรณ์การวิจัยบางชนิด และ น.สพ.ฉาย จอมเกาะ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย รามพิง สหพุ.สุนีจิต คงทน ที่ช่วยประสานงานทำให้การทดลองครั้งนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B. 1978. Newcastle Disease vaccine. Their production and use. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ROME ; 10p 10-19, 50

Box, P.G. and Furminger, I.G.S. 1975. Newcastle disease antibody levels in chicken after vaccination with oil emulsion adjuvant killed vaccine. Veterinary record, 96 : 108-111

Levy, R. and Zakay Rones, Z. 1973. Immunization of chickens with an inactivated oil-adjuvant Newcastle disease virus vaccine. Avian Dis. 17 : 598-604

Minimum Requirements for Biological Products for Animal use. 1970. National Veterinary Assay Laboratory. Ministry of Agriculture and Forestry. Kokuubunji, Tokyo 185, JAPAN. p 46-49

Hanson, R.P. 1978. Newcastle disease. In Hofstad, M.S. ed. Disease of poultry. Seventh edition. Ames, Iowa State University Press, 513-35

ผลของวัคซีนนิวคาสเซิลในไก่หลังการให้วัคซีนมาเร็กซ์

EFFECT OF NEWCASTLE DISEASE VACCINE IN CHICKS PRIMLY VACCINATED WITH MAREK'S VACCINE

นงลักษณ์ ชลสินธุ์[1] สุนีจิต คงท
Nonglak Cholsindhu Suneejit Kongth

ABSTRACT

Chickens had been vaccinated with Newcastle disease Lasota strain at 7 day of age, these chicken pri vaccinated with Marek's vaccine at age day-1. The GMT HI antibody to NDV almost the same in both vaccina and non-vaccinated NDV-chicks. All groups of chicken had good protection to NDV challenge,even the GMT HI a tibody not so high.

บทคัดย่อ

ในการให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้าและสเตรน F แก่ไก่อายุ 7 วัน ซึ่งได้รับและไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ที่อายุ 1 วัน ไม่พบความแตกต่างกันของระดับแอนติบอดี้หรือเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษนิวคาสเซิล แต่ระดับของแอนติบอดี้จะไม่ค่อยสูงมากนัก เนื่องจากให้วัคซีนไก่ที่อายุยังน้อยและใช้เพียงครั้งเดียว แต่อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถจะให้เปอร์เซนต์ความคุ้มโรคได้ในระดับสูง

คำนำ

ปัจจุบันนี้โรคนิวคาสเซิลและโรคมาเร็กซ์ก็ยังเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ เนื่องจากพบว่าโรคมาเร็กซ์ถ้าเกิดขึ้นแล้ว จะมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของไก่ด้วย (1,3,8,10,11,14) จึงได้มีการใช้วัคซีน มาเร็กซ์ฉีดมากในไก่อายุ 1 วัน ส่วนปัญหาของโรคนิวคาสเซิลนั้นก็พบว่า แม้จะมีการทำวัคซีนแล้วก็ตามก็ยังพบว่ามีการระบาดของโรคเกิดขึ้น ซึ่งก็อาจจะเป็นไปได้ว่าได้เกิดมีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามาจากการใช้วัคซีนที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกันในไก่อายุยังน้อย ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ของไก่ต่อนิวคาสเซิล หลังจากที่ได้การทำวัคซีนมาเร็กซ์ที่อายุ 1 วันมาแล้วพร้อมทั้งดูความคุ้มต่อการฉีดพิษนิวคาสเซิล เพื่อที่จะหาข้อมูลสนับสนุนในการจัดทำโปรแกรมการให้วัคซีนในไก่อีกประการหนึ่งด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

ก. ไก่และไข่ทดลอง

ใช้ไก่ทดลองคละเพศพันธุ์ White Leghorn อายุ 1 วัน และไข่ไก่ฟักที่ปลอดจากโรคนิวคาสเซิลและมาเร็กซ์ของฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง

ข. เซลล์คัลเจอร์

ใช้เซลล์จากไข่ไก่ฟัก (CEF) ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่อธิบายในเรื่อง Cell-culture Methods ของ Schat และ Purchase (12)

ค. วัคซีนทดลอง

1. วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น B1 type Lasota strain ของต่างประเทศ

---

[1] ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

2. วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น F Strain ของกรมปศุสัตว์

3. วัคซีนมาเร็กซ์ชนิด cell associated เตรียมจาก serotype I

ง. Vaccine assay

วัคซีนที่จะใช้ในการทดลอง จะนำมาตรวจหาปริมาณไวรัส และความปลอดภัยก่อนตามมาตรฐานใน Code of federal regulations (5)

จ. เชื้อพิษนิวคาสเซิล

ใช้ virulent NDV ที่ผ่านในไข่ไก่ฟัก 1 ครั้ง สำหรับฉีดพิษทับจากหน่วยผลิตวัคซีนนิวคาสเซิล ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง กรมปศุสัตว์ โดยการฉีดเข้ากล้ามตัวละ 0.5 มล. ซึ่งจะมีปริมาณไวรัส $10^{4.0}$EID$_{50}$ ต่อตัว

ฉ. ผลการฉีดพิษทับ

จะอ่านผลจากการฉีดพิษทับโดยดูจากอัตราการตาย หรือการเกิดโรคเนื่องจากการฉีดเชื้อพิษนิวคาสเซิล ซึ่งไก่จะมีอาการซึม, เบื่ออาหาร, ท้องเสีย หรือมีอาการทางระบบหายใจ โดยจะอ่านผลหลังการฉีดเชื้อพิษ 14 วัน โดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค

ช. การทดสอบทางซีรั่มวิทยา

ตรวจหาระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มของไก่แต่ละตัวโดยวิธี HI (Haemagglutination Inhibition) ในไมโครไตเตอร์เพลทโดยใช้ 8 HA unit (2) และความเจือจางของซีรั่มเริ่มจาก 1:2 และวิเคราะห์ผลของ HI ในรูป GMT(Geometric Mean Titers) ตามวิธีการของ Villegas และ Purchase (13)

ซ. แผนการทดลอง

แบ่งไก่ทดลองเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ โดย

1. ให้วัคซีนมาเร็กซ์แก่ลูกไก่อายุ 1 วัน จำนวน 40 ตัวโดยฉีดเข้าใต้ผ้าพังผืดตัวละ 0.2 มล.

2. ไม่ให้วัคซีนมาเร็กซ์ที่อายุ 1 วัน จำนวน 50 ตัวโดยเลี้ยงแยกกันหลังจากนั้น 7 วันนำไก่ทั้งหมดมาให้วัคซีนนิวคาสเซิล ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่ที่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์จำนวน 20 ตัวนำมาหยอดจมูกด้วยวัคซีนเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้า (MD+NL)

กลุ่มที่ 2 ใช้ไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์จำนวน 20 ตัวนำมาหยอดจมูกด้วยวัคซีนเชื้อเป็นลาโซต้า(NL)

กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่ที่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์จำนวน 20 ตัวนำมาหยอดจมูกด้วยวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน F (MD+NF)

กลุ่มที่ 4 ใช้ไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์จำนวน 20 ตัวนำมาหยอดจมูกด้วยวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน F (NF)

กลุ่มที่ 5 ใช้ไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนเลยเป็นกลุ่มเปรียบเทียบจำนวน 10 ตัว

หลังจากให้วัคซีนเชื้อเป็นนิวคาสเซิลทั้ง 2 สเตรน เป็นเวลา 14 วัน นำไก่ทุกกลุ่มมาฉีดพิษทับด้วยเชื้อพิษนิวคาสเซิลขนาดตัวละ 0.5 มล. ($10^{4.0}$EID$_{50}$) เลี้ยงดูอาการอีก 14 วัน จึงอ่านผลเป็นเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค

ทำการเจาะเลือดไก่ทุกกลุ่มก่อนให้วัคซีนนิวคาสเซิล และหลังให้วัคซีนนิวคาสเซิล 1 และ 2 อาทิตย์ เพื่อนำมาตรวจหาค่า HI antibody

ผลการทดลอง

ในระหว่างให้วัคซีนมาเร็กซ์เมื่อลูกไก่อายุ 1 วันแล้วให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นที่อายุ 7 วัน พบว่าไก่ทดลองไม่มีอาการป่วยหรือแพ้วัคซีนเลยจนถึงวันฉีดพิษทับนิวคาสเซิล

จากตารางที่ 1 พบว่า เมื่อให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรนลาโซต้า (NL) ในไก่ที่ได้รับหรือไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์มาก่อนเลยระดับ GMT HI antibody ของไก่ต่อวัคซีนนิวคาสเซิลก็เพิ่มขึ้นสูงในระดับที่น่าพอใจ สำหรับไก่ที่มีระดับแอนติบอดี้จากแม่ โดยในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์เมื่ออายุ 1 วัน จะให้ค่า GMT HI สูงกว่ากลุ่มไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์เพียงเล็กน้อย และเมื่อนำไปฉีดพิษทับ 2 อาทิตย์หลังได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล พบว่าอัตราการตายและเกิดโรคของทั้ง 2 กลุ่มเกือบไม่แตกต่างกันเลย และมีเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค 100% และ 95% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ในขณะที่ไก่กลุ่มเปรียบเทียบตายหมด 100% ในวันที่ 4 และที่ 5 หลังฉีดพิษทับ

ตารางที่ 1 ระดับ Geometric Mean HI Titer ของนิวคาสเซิลสเตรนลาโซต้า

Vaccination		GMT HI to NDV		
MDV at age day-1	NL* at age day-7	Pre-vacc	1 week post-vacc	2 week post-va
+	+	1.6	13.9	68.6
-	+	4.6	27.9	48.5
-	-	2.8	4.3	4.9

*NL = นิวคาสเซิลสเตรนลาโซต้า

ตารางที่ 2 ระดับ Geometric Mean HI titer ของนิวคาสเซิลสเตรน F

Vaccination		GMT HI to NDV		
MDV at age day-1	NF* at age day-7	Pre-vacc	1 week post-vacc	2 week post-va
+	+	3.7	64.0	78.
-	+	3.0	14.9	34.
-	-	3.0	4.2	4.

* NF = นิวคาสเซิลสเตรน F

เมื่อเปลี่ยนจากวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นของต่างชนิดเพศมาใช้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน F ของกรมปศุสัตว์ในไก่ที่ได้รับวัคซีนมาเร็ก อายุ 1 วันและไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ ก็พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันกับวัคซีนนิวคาสเซิลของต่างชนิดเพศ และพบว่าในกลุ่มที่ได้ วัคซีนมาเร็กซ์ มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มไม่ได้รับวัคซีนเด็กน้อย (ตารางที่ 2) และเมื่อนำวัคซีนนิวคาสเซิลหลังหน้าวัคซีนสเตรน F 2 อาทิตย์ พ ไก่ทั้ง 2 กลุ่มให้ผลที่ไม่แตกต่างกันเลยคือ ไม่มีไก่ฉีดวัคซีนตายเลย ในขณะที่ไก่กลุ่มควบคุมตาย 100% ทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 4)

สรุปและวิจารณ์

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาเฉพาะระดับภูมิคุ้มกันของไก่ต่อเชื้อนิวคาสเซิลเท่านั้น ซึ่งได้เคยมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการระงับการสร้างภูมิคุ้มกันในไ ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ที่อายุ 1 วัน แล้วให้วัคซีนนิวคาสเซิลที่อายุ7 หรือ 21 วัน พบว่ามีระดับแอนติบอดีต่อนิวคาสเซิลวัคซีนต่ำ และยังสามารถติดเชื้อได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ ซึ่งจะมีความทนทานต่อการเกิดโรคได้มากกว่า (1,3,6) ซึ่งเกี่ยวกับการลดการสูญเสียในการเลี้ ไก่นั้น Werner et al. (14) ก็ได้ยืนยันโดยการทดลองในไก่ broiler เกี่ยวกับบทบาทของ immunity ของโรคมาเร็กซ์นี้ควรจะต้องถือว่าม

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์ความคุ้มของน้ำตาสเชิลลาไธด้าสเตรนหลังฉีดพิษหับ

Vaccination		No. dead/Total	% Protection
MDV at age day-1	NL at age day-7		
+	+	0/20	100
-	+	1/20	95
-	-	10/10	0

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์ความคุ้มของน้ำตาสเชิลสเตรน F หลังฉีดพิษหับ

Vaccination		No. dead/Total	% Protection
MDV at age day-1	NF at age day-7		
+	+	0/20	100
-	+	0/20	100
-	-	10/10	0

เพราะเชื้อมาเร็กซ์มีผลต่อ T-cell system(4) และ Okashi(8) ก็ได้พบการเกิด Suppression ของ Natural killer cell เมื่อได้รับเชื้อมาเร็กซ์ ซึ่งสเตรนมีความรุนแรงต่างกันก็ทำให้เกิด immunosuppression ต่างกันด้วย (10,11) นอกจากนี้ Kleven et al.(7) ก็ได้พบการเกิด transient depression ของ humoral immunity ในไก่ที่ได้รับวัคซีน HVT

สำหรับผลการทดลองในครั้งนี้นั้นไม่พบอย่างเด่นชัดนักว่า ได้มีการเกิดการระงับการสร้างภูมิคุ้มกันของไก่ต่อเชื้อน้ำตาสเชิลหลังได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ เพราะระดับแอนติบอดีต่อน้ำตาสเชิลมีการเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันในไก่กลุ่มที่ได้รับหรือไม่ได้รับวัคซีนมาเร็กซ์ แม้ว่าระดับแอนติบอดีจะไม่ค่อยสูงนัก ซึ่งอาจเนื่องจากให้วัคซีนน้ำตาสเชิลในไก่ที่อายุยังน้อย ซึ่งอายุของไก่ขณะให้วัคซีนน้ำตาสเชิลจะมีผลต่อระดับแอนติบอดีด้วย ตามการทดลองของ Paulillo et al,(9) อย่างไรก็ตามเมื่อนำไก่เหล่านี้มาฉีดพิษหับน้ำตาสเชิล 14 วัน หลังได้รับวัคซีนก็ยังสามารถให้ความคุ้มได้สูงเกิน 95% ทุกกลุ่ม

เอกสารอ้างอิง

1. Bassiouni, A.A. ; Awaad, M.H.H. ; Amer, M.M. ; Yassien, S. ; Afifi, M.A.A. (1987). "Some factors influences of Immunosuppression in chickens. I. Immunosuppression of Newcastle disease vaccination by Turkey herpes virus (Marek's disease vaccine)." Assiut Veterinary Medical Journal : 19 (37) 189-195

2. Beard, C.W. (1989) "Serologic procedures . In : A Laboratory Manualfor the Isolation and Identification Avian Pathogens, 3rded. H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domernuth and J.E. Pearson., eds. "American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania pp 192-194

3. Bumstead, J.M. ; Payne, L.N. (1987) "Production of an immune suppressor factor by Marek's disease lymphoblastoid cell lines." Vet. Immunol-Immunopatho l : 16 : (1-2) p 47-66

4. Buscaglia, C. ; Calnek, B.W. ; Schat, K.A.(1988) "Effect of immunocompetence on the establishment and maintenance of latency with Marek's disease herpesvirus." Journal of General virology. 69 (5) 1067-1077

5. Code of federal regulations, Animals and Animal Products, 9 Parts 1 To 199 Revised as of January 1, 199 The office of the Federal Register National Archives and Records Administration.

6. Jakowski, R.M., Fredrickson, T.N. and Luginbuhl, R.E. (1973). "Immunoglobulin response in experimental infection with cell-free and cell-associated Marek's disease virus." Jour of Immunol. 111 : 238-248

7. Kleven, S.H. ; Eidson, C.S. ; Anderson, D.P. and Fletcher, O.J. (1972). "Decrease of antibody response Mycoplasma synoviae in chickens infected with Marek's disease herpesvirus." Am. Jour. Vet. Res : 33 2037-2042

8. Ohashi, K. ; Mikami, T. ; Kodama, H. ; Izawa, H. (1987) "Suppression of NK (Natural killer) activity spleen cells by chicken fetal antigen present an Marek's disease lymphoblastoid cell line cells." International Journal of cancer : 40 (3) 378-382

9. Paulillo, A.C. ; Pinto, A.A. ; Berchieri, A. ; Jr. ; Richtzenhain, L.J. ; Montassier, H.J. ; Ariki, J. Barbosa, J.C. ; Nakaghi, L.S.O. ; Quintana, J.L. (1987) "Newcastle Disease. III The influence of age primary vaccination on immune response of broiler chicks." Ars Veterinaria. 3 (1) 69-72

10. Powell, P.C. and Lombardini, P. (1986). "Isolation of very virulent pathotypes of Marek's disease vir from vaccinated chickens in Europe." Vet. Rec. 118 : 688-691

11. Rivas, A.L. ; Fabricant, J. (1988) "Indication of immunodepression in chickens infected with vario strains of Marek's disease virus." Avian Diseases : 32 (1) 1-8

12. Schat, K.A. ; and Purchase, H.G. (1989). "Cell-culture Methods. In : A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rded H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domernuth and J. Pearson., eds." Am. Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania. pp171-172

13. Villegas, Pand Purchase, H.G. (1989) "Titration of Biological suspensions. In : Laboratory Manual for t Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rded. H.G. Purchase, L.H. Arp,. H. Domernuth and J. Pearson., eds." American Association of Avian Pathologists. University of Pennsylvania. pp189-191

14. Werner, P. ; Werner, O. ; Schmidt, U. ; Hahnefeld, H. ; Pick, H.; Tesner, S. (1987) "Riems Marek's disea vaccine a significant contribution to improving the efficiency of intensive poultry production." Archi Experiment. Vet : 41 (5) 635-639

ประสิทธิภาพของวัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบชนิดน้ำมันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล

EFFICACY OF ND-IB COMBINED INACTIVATED OIL EMULSION VACCINE AGAINST NEWCASTLE DISEASE VIRUS

นงลักษณ์ ชลสินธุ์[1] สุนีจิต คงทน[1]

Nonglak Cholsindhu Suneejit Kongthon

ABSTRACT

Inactivated Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus were evalvated for the efficacy in combination vaccine. Vaccinated chickens give very high Haemagglutination. Inhibition geometric mean titer at 3 weeks post-vaccination. The Result very excellent in the chicken had been vaccinated with lived Newcastle disease vaccine. The protection to local NDV challenge were higher than 90%.

บทคัดย่อ

ในการใช้วัคซีนนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในรูปของวัคซีนรวมเชื้อตายชนิดน้ำมัน พบว่าให้ผลดีมากโดยจะมีการตอบสนองของระดับ HI GMT antibody ต่อเชื้อนิวคาสเซิลสูงมากโดยเฉพาะ เมื่อมีการใช้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นมาก่อน และมีเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคหลังจัดพิษได้สูงเกิน 90%

คำนำ

นิวคาสเซิลเป็นโรคระบาดร้ายแรงที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีก(1,3,8) ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เกือบทั่วโลก ส่วนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อก็ทำความสูญเสียต่อเศรษฐกิจการเลี้ยงไก่ไข่เป็นอย่างมาก ปัจจุบันทั่วโลก ได้มีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อกันหลายชนิดทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตาย ทั้งในรูปวัคซีนเดี่ยว หรือวัคซีนรวมทั้งสองชนิด โดยเฉพาะวัคซีนเชื้อตายนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (2,6,7,10) รวมทั้งในประเทศไทย โดยยังไม่มีโปรแกรมที่แน่นอนว่าจะให้ครั้งเดียวโดยไม่ได้ให้วัคซีนนิวคาสเซิลหรือวัคซีนรวมเชื้อเป็นมาก่อน หรือจะให้หลังจากได้มีการทำวัคซีนเชื้อเป็นมาก่อนแล้ว ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนรวม ND-IB เชื้อตายชนิดน้ำมันที่ให้ในรูปแบบต่าง ๆ กัน ต่อเชื้อนิวคาสเซิล โดยการตรวจหาระดับ HI antibody ในซีรัมหลังได้รับวัคซีน และความคุ้มโรคหลังจากการจัดพิษด้วยนิวคาสเซิล local strain

อุปกรณ์และวิธีการ

ก. ไก่ทดลอง

ใช้ไก่ทดลองคละเพศอายุ 4 สัปดาห์ จากหน่วยเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองของ ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง จำนวน 210 ตัว

ข. วัคซีนทดลอง

วัคซีนที่ใช้ทดลองเป็นวัคซีนของต่างประเทศ คือ

1. วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B[1]

---

[1] ศูนย์ตรวจสอบคุณภาพชีวภัณฑ์ ปากช่อง กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

2. วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อตายชนิดน้ำมัน

3. วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น

4. วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นชนิดน้ำมัน

ค. เชื้อพิษน้ำคาสเซิล

เชื้อที่ใช้ในการฉีดพิษทับน้ำคาสเซิล เป็นเชื้อ local strain ที่ isolate ได้ โดยหน่วยผลิตวัคซีนน้ำคาสเซิล ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ปากช่อง กรมปศุสัตว์ โดยการฉีดเข้ากล้ามตัวละ 0.5 มล.ซึ่งมีปริมาณไวรัส $10^{4\cdot0}$EID$_{50}$/0.5 มล.

ง. การตัดสินผลการฉีดพิษทับ

การตอบสนองต่อการฉีดพิษทับด้วยเชื้อน้ำคาสเซิล local strain จะวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ความคุ้มโรค โดยดูจากอัตราการตายและการแสดงอาการของโรคน้ำคาสเซิล เช่นมีอาการท้องเสีย, หายใจลำบาก, ซึม ataxia, paralysis, involuntary movements และมีอาการ con โดยจะดูอาการภายในเวลา 14 วันหลังฉีดพิษทับ

จ. การทดสอบทางซีรั่มวิทยา

โดยการตรวจหาค่า HI (Haemagglutination Inhibition) แอนติบอดี้ของไก่ทดลองแต่ละตัวโดยวิธีไมโครไดเลอร์เพลท เทคนิค โดยใช้ 8 HA Unit (4) ความเจือจางของซีรั่มเริ่มจาก 1:2 การวิเคราะห์ผลของ HI จะคิดเป็นค่า GMT (Geometric Mean Titers) ตามวิธีการของ villegas และ Purchase(11)

ฉ. แผนการทดลอง

แบ่งเป็น 3 การทดลองด้วยกันคือ การทดลองที่ 1 แบ่งไก่เป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่ 20 ตัวให้วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B_1 หยอดจมูก หลังจากนั้น 2 อาทิตย์ ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อตายชนิดน้ำมันโดยฉีดเข้าใต้หนัง ตัวละ 0.5 มล.

กลุ่มที่ 2 ใช้ไก่ 20 ตัวให้วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B_1 หยอดจมูก หลังจากนั้น 2 อาทิตย์ ให้วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อตายชนิดน้ำมัน

กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B_1 เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 4 ใช้ไก่จำนวน 10 ตัวไม่ให้วัคซีนเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

การทดลองที่ 2 แบ่งไก่ทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัวให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น หลังจากนั้น 2 อาทิตย์ ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อตาย

กลุ่มที่ 2 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น หยอดจมูก หลังจากนั้น 2 อาทิตย์ให้วัคซีนน้ำคาสเซิลเชื้อตายชนิดน้ำมันโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล.

กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น หยอดจมูก เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 4 ใช้ไก่จำนวน 10 ตัวไม่ให้วัคซีนเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

การทดลองที่ 3 แบ่งไก่ทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น หยอดจมูก

กลุ่มที่ 2 ใช้ไก่จำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อตายชนิดน้ำมัน ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ตัวละ 0.5 มล.

กลุ่มที่ 3 ใช้ไก่ทดลองจำนวน 20 ตัว ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น หยอดจมูก หลังจากนั้น 1 อาทิตย์ให้วัคซีนรวมน้ำคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อตายชนิดน้ำมันฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล.

กลุ่มที่ 4 ใช้ไก่จำนวน 10 ตัวไม่ให้วัคซีนเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

ทำการเจาะเลือดไก่ทุกกลุ่มก่อนให้วัคซีนและก่อนฉีดพิษทับ เพื่อนำมาตรวจหาระดับ HI แอนติบอดี้โดยการฉีดพิษทับจะฉีดหลังจากให้วัคซีนครั้งที่ 2

แล้วเป็นเวลา 21 วัน และอ่านผลเปอร์เซนต์ความคุ้มโรค หลังฉีดพิษหับเป็นเวลา 14 วัน

ผลการทดลอง

หลังจากการให้วัคซีนชนิดต่าง ๆ ในไก่ทุกกลุ่ม ไม่แสดงอาการผิดปกติหรือมีการตายเนื่องจากแห้วัคซีนตลอดการทดลอง ในการทดลองที่ 1 เมื่อให้วัคซีนเชื้อตายชนิดน้ำมัน ไม่ว่าจะเป็นน้ำคาสเชิลอย่างเดียว หรือน้ำคาสเชิลรวมกับพลอดดมอลิกเสบติดต่อ ในไก่ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นน้ำคาสเชิลมาก่อน พบว่ามีค่า HI GMT สูงมากอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนน้ำคาสเชิลเชื้อเป็นเพียงอย่างเดียวและเมื่อนำไปฉีดพิษหับก็จะให้เปอร์เซนต์ความคุ้มโรคสูงเกิน 90%

ในการทดลองที่ 2 เมื่อให้วัคซีนรวม ND-IB เชื้อตายชนิดน้ำมันหรือ ND เชื้อตายในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นในรูปวัคซีนรวม ND-IB พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 คือ จะมีค่า HI GMT และเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคสูง ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายร่วมด้วย

ในการทดลองที่ 3 ให้วัคซีนรวม ND-IB ทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตายชนิดน้ำมัน โดยให้อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือให้ทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตาย พบว่าในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนรวม ND-IB เชื้อเป็นเพียงอย่างเดียว จะมีค่า HI GMT ต่ำเพียง 52.0 แต่ทั้ง 3 กลุ่มให้ความคุ้ม 100% ต่อการฉีดพิษหับ

ตารางที่ 1 Geometric Mean Titer(GMT) ก่อนฉีดพิษหับและเปอร์เซนต์ความคุ้มโรคต่อ NDV หลังฉีดพิษหับในไก่กลุ่มต่าง ๆ

Vaccine group	HI GMT At challenge	No. Dead/Total	% Protection after challenge
ND(L)+ND-IB(O.E)	724.1	0/20	100
ND(L)+ND(O.E)	548.7	1/20	95
ND(L)	45.3	3/20	85
Control	4.0	10/10	0
ND-IB(L)+ND-IB(O.E)	388.0	2/20	90
ND-IB(L)+ND(O.E)	548.7	1/20	95
ND-IB(L)	42.2	3/20	85
Control	4.9	10/10	0
ND-IB(L)	52.0	0/20	100
ND-IB(O.E)	588.1	0/20	100
ND-IB(L)+ND-IB(O.E)	294.1	0/20	100
Control	5.3	10/10	0

(L) หมายถึง Lived vaccine

(O.E) หมายถึง Oil emulsion vaccine

สรุปและวิจารณ์

ได้เคยมีรายงานเกี่ยวกับการลดของ HI titer ของน้ำคัสเชล เมื่อใช้ในลักษณะรวมกับไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ โดยเฉพาะในวัคซีนเชื้อเป็น ND-IB พบว่า IBV ในวัคซีนอาจจะทำให้การตอบสนองต่อเชื้อน้ำคัสเชลลดลง (5, 9) อย่างไรก็ดีในทั้ง 3 การทดลองไม่พบว่า IBV ในวัคซีนรวมมีผลต่อการตอบสนองของไก่ต่อเชื้อน้ำคัสเชล

การศึกษาถึงการนำเอาเชื้อ NDV และ IBV มาผลิตเป็นวัคซีนรวมได้มีมานาน แล้ว (6, 10) ซึ่ง Gough et al.(6) ได้พบว่าจะทำให้มีการเพิ่มการตอบสนองต่อเชื้อ IBV ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ความเข้มข้นและชนิดของแอนติเจน ที่นำมาทำเป็นวัคซีนรวมก็มีผลต่อการตอบสนองของแอนติบอดี้ (12, 13) จากตารางพบว่าหลังจากฉีดพิษทับด้วย NDV local strain ไก่ทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนให้เซอร์เรชันต์ความคุ้มโรคเกิน 85% และไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนตายหมดสิ้น

สรุปผลของการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วัคซีนรวมน้ำคัสเชลและหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อตายชนิดน้ำมันสามารถที่จะให้ระดับแอนติบอดี้ได้สูง และให้ความคุ้มโรคน้ำคัสเชลได้ดีไม่แพ้วัคซีนชนิดเดี่ยว โดยจะให้ในไก่ที่ได้รับหรือไม่ได้รับวัคซีนน้ำคัสเชลเชื้อเป็นมาก่อนก็ได้

Referrences

1. Allan, W.H. Newcastle disease vaccines, their production and use. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 1978
2. Beard, C.W. Immunity to Newcastle disease. Am. J. Vet. Res. 36 : 509-512. 1975
3. Beard, C.W. and Hanson, R.P. Newcastle disease. In : Disease of Poultry, 8th ed. M.S. Hofstad, H.J. Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid, and H.W. Yoder, Jr, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa.pp452-470.1984
4. Beard, C.W. Serologic procedures. In : A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed. H.G.Purchase, L.H.Arp, C.H.Domermuth, and J.E.Pathologists, University of Pennsylvania pp 192-194. 1989
5. Bengelsdorff, H.J. Protective effect of vaccination and the antibody production after combined administration of Newcastle disease and infectious bronchitis vaccines. Bluebook for the veterinary Profession (in German) 22 : 144-151. 1972
6. Gough, R.E., Allan, W.H. and Nedulciu,D. Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and Infectious bronchitis inactivated vaccines. Avian Pathol.6:131-142.1977
7. Gough, R.E., Wyeth, P.J., and Bracewell, C.D. Immune response of breeding chicked to trivalent oil emulsion vaccines : Response to infectious bronchitis. Vet. Rec. 108 : 99-101. 1981
8. Hanson, R.P., Spalatin, J., and Jacobson, G.S. The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus. Avian Dis. 17 : 354-361. 1973
9. Hitchner, S.B., White, P.G., and Lozano, E.A. Screening test on modified strains of infectious bronchitis virus. ASL. Research Representative, American Scientific Laboratories, Inc., Mdison, Wis March 1955
10. Uchinuno, Y., Yamada, S., Fujikawa, H., and Koda, Y. Newcastle disease. Infectious bronchitis inactivated combined vaccines. J. Jpn. Vet. Med. Assoc .26 : 124-128. 1973

11. Villegas, P., and Purchase, H.G. Titration of Biological suspensions. In : A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rded. H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth and J.E. Pearson., eds. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania. pp 189-191.1989

12. Winterfield, R.W. Vaccination of chickens with Newcastle Disease and Infectious bronchitis vaccine administered singly and in combination. Poultry Sci. 63 : 182-184. 1984

13. Xie, Z. and Stone, H.D. Immune Response to Oil-Emulsion Vaccines with single or Mixed Antigen of Newcastle Disease, Avian Influenza, and Infectious Bronchitis. Avian Dis. 34 : 154-162, 1990