# วารสารชีวผลิตภัณฑ์


| | |
|---|---|
| บรรณาธิการ | แอบ คงทน |
| บรรณาธิการผู้ช่วย | พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ |
| กองบรรณาธิการ | วรากิจ จันทรัศมี<br>โสภณ ท้วมแสง<br>สมใจ กมลศิริพิชัยพร<br>เดิมพล รัตนวงศ์ |
| สำนักงาน | กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพ ฯ |
| วัตถุประสงค์ | 1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการ ด้านการผลิตชีวภัณฑ์<br>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<br>Sophon Tuamsang<br>Somjai Kamolsiripichaiporn<br>Dermpol Ratanawonk |
| Business Office | Division of Veterinary Biologics<br>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.


**วารสารชีวผลิตภัณฑ์** : *ฉบับที่ 2 ประจำเดือน กันยายน 2538*

*พิมพ์เผยแพร่ เมษายน 2539*

# คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

**วารสารชีวผลิตภัณฑ์** เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของ กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออก ปีละ 2 ฉบับคือเดือนกันยายน และเดือนมีนาคม วัตถุประสงค์เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และหน่วยงานอื่น ที่คล้ายคลึงกัน เรื่องที่ผู้เขียนจะส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวภัณฑ์นั้นแยกได้เป็น 2ประเภท ตามลำดับความสำคัญ คือ

1. งานวิจัย (Technical papers) เป็นงานเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้กระทำขึ้นเอง
2. บทความ (Articles) เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสพการณ์ของผู้เขียน

## 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)** ให้เขียนนำหน้าตัวเรื่องเป็นการสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 200 คำ หรือ 3% ของตัวเรื่อง 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 เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านด้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน

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

5.6.2 การเขียนชื่อผู้เขียน กรณีเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อเต็ม โดยใช้ชื่อด้วนาหน้าตามด้วยชื่อสกุล 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) ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งที่มีชีวิตให้ใช้ตัว*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) และคำบุรพบท (preposition) ในบางกรณี เช่น ชื่อ species ซึ่งขึ้นด้วยตัวพิมพ์เล็กอยู่แล้ว ให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์เล็ก แต่หากคำเหล่านั้นเป็นคำแรกของชื่อเรื่องให้ขึ้นต้นด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ 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

## การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิ์ตรวจแก้ไขเรื่องที่ส่งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นสมควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิม หรือฉบับที่แก้ไขแล้วกลับคืนมายังผู้เขียน เพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

## ข้อกำหนดอื่น ๆ

ถ้าผู้เขียนท่านใดส่งต้นฉบับเกิน 8 หน้าพิมพ์ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายเองในส่วนที่เกินหน้าละ 200 บาท (กรณีที่ได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการ) โดยคณะกรรมการจะแจ้งให้ทราบเพื่อทำความตกลงกับเจ้าของเรื่องก่อน

# การเตรียมคอนจูเกต เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร ด้วยวิธี อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ เทคนิค

# CONJUGATE PREPARATION FOR DIAGNOSIS OF SWINE VIRAL DISEASES BY INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE

สุจิรา ปาจริยานนท์[1] วาสนา ภิญโญชนม์[1] อุราศรี ตันตสวัสดิ์[1]
Sujira Parcharyanon Wasana Pinyochon Urasri Tantaswadi

## ABSTRACT

Indirect fluorescent antibody conjugate for swine viral diagnosis was prepared by separating immunoglobulin G from goat anti-rabbit antiserum and conjugating with fluorescein isothiocyanate. The properties of fluorescent antibody conjugate were determined by the molar ratio of fluorochrome to protein(F/P molar ratio), the specificity and the antibody titer (staining titer). The specificity was tested with cultured Aujeszky's disease virus, swine fever virus and Japanese encephalitis virus and antisera against the three viruses. Using the same culture viruses, the optimum dilution of the staining titer was determined by box titration between the conjugate and the rabbit antisera. The F/P molar ratio was 1.557. Specific fluorescence was clearly seen in each of the three cultures reacted with the coresponding antisera. The maximum dilution at which specific fluorescence was observed was 1:80, this taken as one fluorescent antibody unit, the recommended dilution to be used in diagnosis is 1:20.

## บทคัดย่อ

เตรียม อินไรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร โดยแยกอิมมูโนโกลบูลิน G(IgG) ของแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย มาคอนจูเกตกับสารสี fluorescein isothiocyanate (FITC) ทดสอบคุณสมบัติของ ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต โดยหาสัดส่วนระหว่าง fluorochrome (F)

---

[1] กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพมหานคร 10900

และ protein (P) หาความจำเพาะของ ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มี เชื้อออเจสกี้ เชื้ออหิวาต์สุกร และเชื้อไข้สมองอักเสบของสุกร และหาสัดส่วนการย้อมที่เหมาะสมจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เติมเชื้อเช่นเดียวกับการหาความจำเพาะ โดยทำ Box titration ระหว่าง dilution ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต และซีรั่มกระต่ายต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด

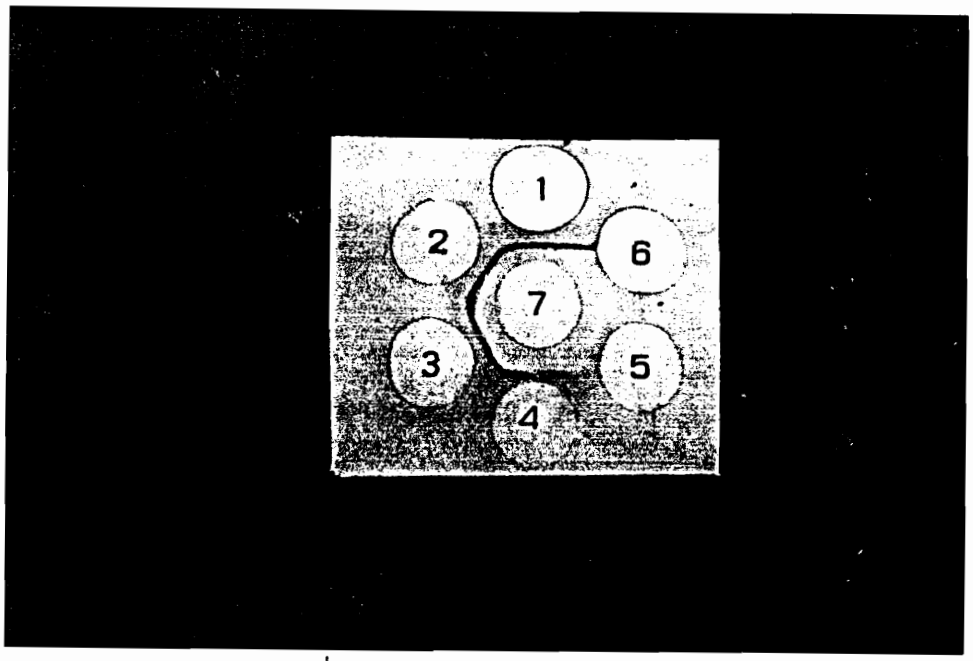
ผลการทดลองพบว่า ค่า F/P molar ratio เท่ากับ 1.557 ความจำเพาะของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ให้ผลการทดสอบชัดเจน โดยที่แอนติซีรั่มและเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีเชื้อที่สอดคล้องกันเท่านั้น ที่ให้ผลบวก ส่วนสัดส่วนการย้อมที่เหมาะสมของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต พบว่า dilution สูงสุดที่ให้ผลบวก (เข้ม) คือ 1:80 ซึ่งเป็น 1 fluorescent antibody (FA) unit เวลาชันสูตรใช้ 4 FA unit ซึ่งจะต้องเจือจางคอนจูเกต 1:20

## คำนำ

การใช้ปฏิกริยาของ แอนติบอดี้ ร่วมกับ แอนติเจน เพื่อแสดงให้เห็นถึงแอนติบอดี้ในซีรั่มหรือของเหลวอื่น ๆ ของร่างกายหรือเพื่อแสดงถึงแอนติเจนในเนื้อเยื่อหรือเซลล์หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ แตกต่างกัน ขึ้นกับ แอนติเจน-แอนติบอดี้ ที่เฉพาะเจาะจงนั้น ๆ วิธีการหนึ่งคือ การเลเบลแอนติบอดี้ ซึ่งอาจใช้เรดิโอไอโซโทป เอนไซม์ หรือฟลูออโรโครม การใช้เรดิโอไอโซโทป สามารถใช้ตรวจในกรณีที่สารมีปริมาณน้อย ๆ ได้ แต่มีข้อยุ่งยากตรงที่ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง ส่วนเอนไซม์ใช้หลักที่ว่าแอนติเจนและแอนติบอดี้ ที่เฉพาะเจาะจงสามารถทำให้เกิดสี ซึ่งเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และยังสามารถใช้ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์จำเป็นต้องผ่านขบวนการหลายขั้นตอน ดังนั้นการอ่านผลอาจจะผิดพลาดเนื่องจากการกระจายของเอนไซม์ (Weir 1978)

โรคไวรัสเป็นโรคระบาดร้ายแรง ซึ่งมีผลทำให้สัตว์ตายเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วและเป็นที่ทราบกันดีว่าไม่มียาใด ๆ ในการรักษาโรคไวรัสเหล่านี้ได้ ดังนั้นเมื่อเกิดโรคระบาดขึ้นจึงควรมีวิธีการตรวจที่ให้ผลรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ เทคนิค เริ่มใช้ในปี ค.ศ.1941 โดย Coons และผู้ร่วมงาน (Kawamura 1977) และตั้งแต่นั้นมาวิธีนี้ก็นิยมใช้กันแพร่หลายในการศึกษาวิจัยและตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ซึ่งเป็นปฏิกริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี้ที่เลเบลด้วยสีพิเศษฟลูออโรโครม แอนติเจน และแอนติบอดี้ที่สอดคล้องกันจะให้แสงเรืองเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ การใช้อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต สามารถตรวจโรคไวรัสของสุกรได้ทุกโรคให้ความรวดเร็วถูกต้องและแม่นยำสูง เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ

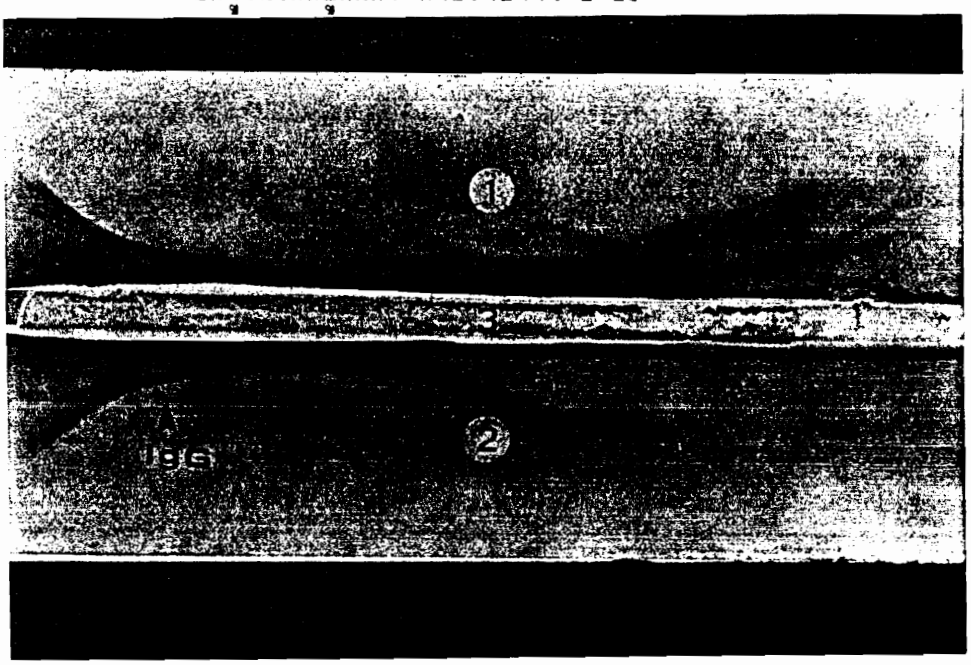
จุดประสงค์ของรายงานนี้ เพื่อเตรียมคอนจูเกตแบบอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี เทคนิค สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคไวรัสของสุกร ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลรวดเร็วต่อการวินิจฉัยโรค สามารถใช้วินิจฉัยโรคไวรัสสุกรทุกโรค ทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายและความยุ่งยากในการสั่งซื้อคอนจูเกตจากต่างประเทศ




รูปที่ 1 ผลการตรวจแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่ายโดยวิธี AGID

1-6 = dilution ของแอนติซีรั่มแพะต่อซีรั่มกระต่าย 1:8 ถึง 1:256

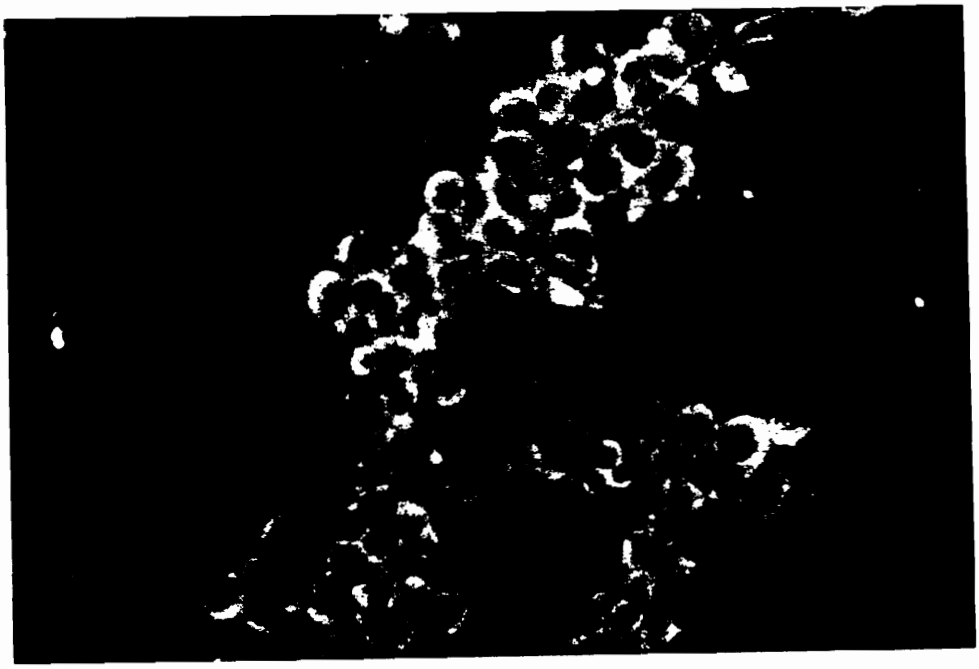
7 = อิมมูโนโกลบูลินกระต่ายเจือจาง 1:10




รูปที่ 2 การทดสอบ IgG ของแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่ายโดยวิธี immunoelectrophoresis 1 = ซีรั่มแพะปกติ

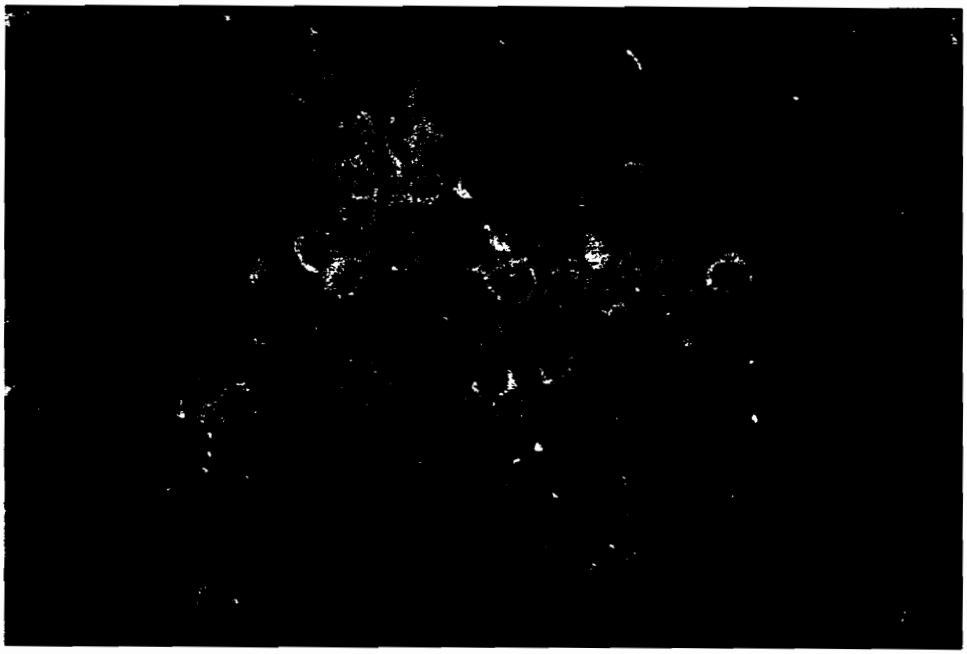
2 = IgG ของแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย

3 = ซีรั่มกระต่ายต่ออิมมูโนโกลบูลินแพะ



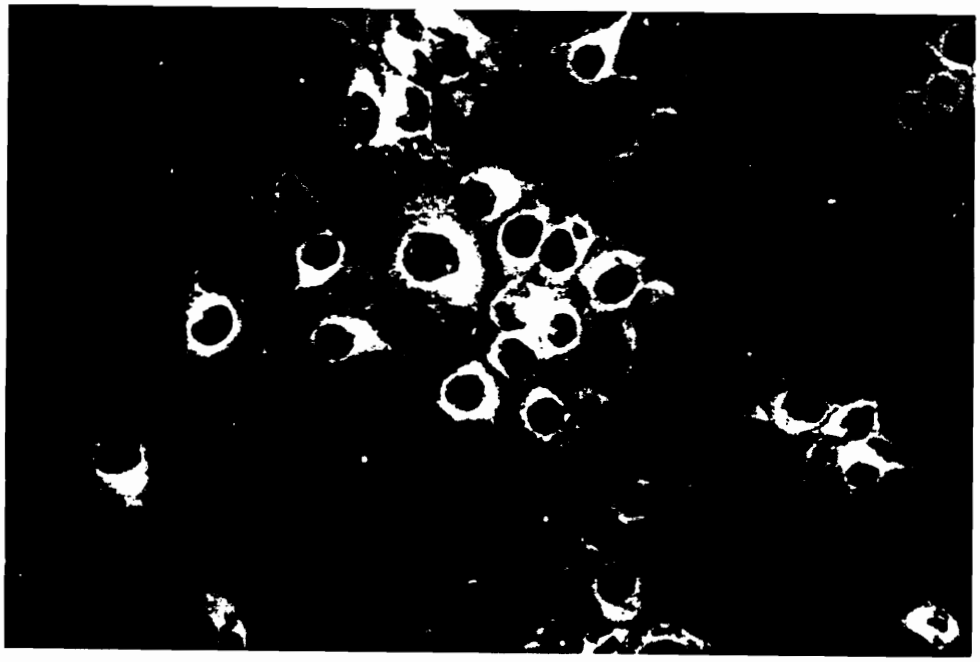
รูปที่ 3 เซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 มีเชื้อไวรัสออเจสกี้ และเติมแอนติซีรั่มออเจสกี้ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเกิด CPE พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยง x200

รูปที่ 4 เซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ไม่มีเชื้อไวรัสออเจสกี้ และเติมแอนติซีรั่มออเจสกี้ ไม่พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง x200

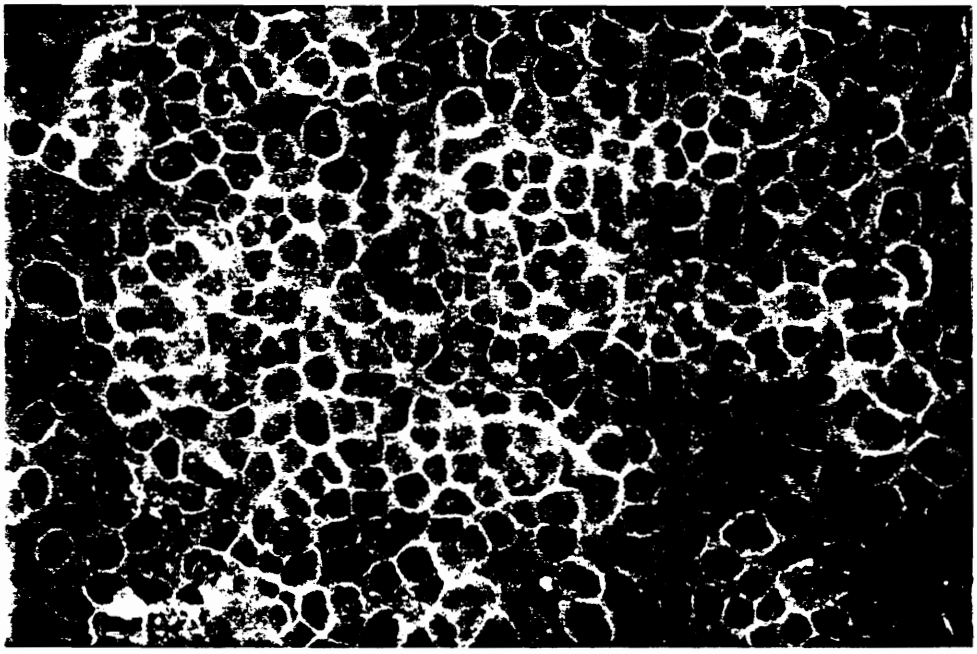


รูปที่ 5 เซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 มีเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และเติมแอนติซีรั่ม-อหิวาต์สุกร รูปร่างเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยง x200

รูปที่ 6 เซลล์เพาะเลี้ยง PK-15 ไม่มีเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร และเติมแอนติซีรั่ม-อหิวาต์สุกร ไม่พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง x200



รูปที่ 7 เซลล์เพาะเลี้ยง ESK มีเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ และเติมแอนติซีรั่ม ไข้สมองอักเสบ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเกิด CPE พบสีเขียวเรืองแสง บริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยง x200



รูปที่ 8 เซลล์เพาะเลี้ยง ESK ไม่มีเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ และเติมแอนติซีรั่ม ไข้สมองอักเสบ ไม่พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง x200

ตารางที่ 1 แสดงความจำเพาะของอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี คอนจูเกต ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ที่เติมเชื้อออเจสกี้ เชื้ออหิวาต์สุกร เชื้อไข้สมองอักเสบของสุกร เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ และแอนติซีรั่มต่อโรคทั้ง 3 ชนิด

| เซลล์เพาะเลี้ยงที่เติม | แอนติซีรั่ม | | | ซีรั่มกระต่ายปกติ |
|---|---|---|---|---|
| | ออเจสกี้ | อหิวาต์สุกร | ไข้สมองอักเสบ | |
| เชื้อออเจสกี้ | + | - | - | - |
| เชื้ออหิวาต์สุกร | - | + | - | - |
| เชื้อไข้สมองอักเสบ | - | - | + | - |
| เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ | - | - | - | - |

ตารางที่ 2 Box titration ของอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี คอนจูเกต แอนติชีรั่มออเจสกี้และชีรั่มกระต่ายปกติ

| dilution ของคอนจูเกตที่เตรียม | dilution ของแอนติชีรั่มออเจสกี้และชีรั่มกระต่ายปกติ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 |
| 1:5 | +++ *<br>- ** | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- |
| 1:10 | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +<br>- | -<br>- |
| 1:20 | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- |
| 1:40 | +++<br>- | ++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- |
| 1:80 | +++<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- |
| 1:160 | ++<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- |
| dilutionของคอนจูเกตที่สั่งซื้อ(1:160) | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- |

+++ ++ + = ผลบวก ( เข้ม ปานกลาง จาง ) * = แอนติชีรั่มออเจสกี้

\- = ผลลบ ** = ชีรั่มกระต่ายปกติ

ตารางที่ 3 Box titration ของอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี คอนจูเกต แอนติชีรั่มอหิวาต์สุกรและชีรั่มกระต่ายปกติ

| dilution ของคอนจูเกตที่เตรียม | dilution ของแอนติชีรั่มอหิวาต์สุกรและชีรั่มกระต่ายปกติ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 |
| 1:5 | +++ *<br>- ** | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- |
| 1:10 | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- |
| 1:20 | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- |
| 1:40 | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- |
| 1:80 | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- |
| 1:160 | ++<br>- | +<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- | -<br>- |
| dilutionของคอนจูเกตที่สั่งซื้อ(1:160) | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | +++<br>- | ++<br>- | +<br>- | -<br>- |

+++ ++ + = ผลบวก(เข้ม ปานกลาง จาง)

\- = ผลลบ

* = แอนติชีรั่มอหิวาต์สุกร

** = ชีรั่มกระต่ายปกติ

ตารางที่ 4 Box titration ของอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี คอนจูเกต แอนติชีรั่มไข้สมองอักเสบของสุกรและชีรั่มกระต่ายปกติ

| dilution ของ คอนจูเกตที่เตรียม | dilutionของแอนติชีรั่มไข้สมองอักเสบของสุกรและชีรั่มกระต่ายปกติ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 | 1:5120 | 1:10240 |
| 1:5 | +++ * | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| | - ** | - | - | - | - | - | - |
| 1:10 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:20 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:40 | +++ | +++ | ++ | + | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:80 | +++ | ++ | + | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| 1:160 | + | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| dilutionของ-คอนจูเกต ที่สั่งซื้อ(1:160) | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |

+++ ++ + = ผลบวก(เข้ม ปานกลาง จาง) * = แอนติชีรั่มไข้สมองอักเสบ

- = ผลลบ ** = ชีรั่มกระต่ายปกติ

## อุปกรณ์และวิธีการ

**กระต่ายทดลอง**

ใช้พันธุ์ New Zealand white น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม จำนวน 17 ตัว

**แพะทดลอง**

ใช้พันธุ์ Merino จำนวน 2 ตัว

**การเตรียมแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย**

เจาะเลือดกระต่ายทดลองจำนวน 2 ตัว และแยกซีรั่ม ตกตะกอนซีรั่มที่ได้ด้วย saturated ammonium sulfate 4 ครั้ง ครั้งแรกใช้ 50% และ 3 ครั้งหลังใช้ 33% dialyse เพื่อเอก ammonium sulfate ออก คำนวณหาโปรตีนโดย Biuret test (Garvey et al. 1980)

เจาะเลือดแพะทดลองจำนวน 2 ตัว เก็บไว้เป็นคอนโทรล ฉีดซีรั่มกระต่ายที่ตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และคำนวณจำนวนโปรตีนได้ 10 mg/ml โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังแพะตัวละ 2 มิลลิลิตร (มล.) 4 สัปดาห์ ต่อมาฉีดซ้ำอีกครั้งโดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วนเท่าเดิม 2 และ 4 สัปดาห์ต่อมา เจาะเลือดแพะ แยกซีรั่ม และตรวจไตเตอร์แอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่ายโดยวิธี agar gel immunodiffusion (AGID) หลุมที่ 1 ถึง 6 เติมแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย โดยทำ 2-fold dilution ตั้งแต่ 1:8 ถึง 1:256 หลุมที่ 7 เติมซีรั่มกระต่ายที่ตกตะกอนด้วย ammonium sulfate แยกอิมมูโนโกลบูลินและเจือจาง 1:10 ด้วย phosphate buffer saline (PBS) ดังรูปที่ 1

**การเตรียมแอนติซีรั่มออเจสกี้**

ฉีดวัคซีนออเจสกี้ชนิดเชื้อตายให้กระต่ายจำนวน 5 ตัว ๆ ละ 1 มล. เข้าใต้ผิวหนัง 2 สัปดาห์ต่อมาฉีดวัคซีนซ้ำให้อีกครั้ง 3 สัปดาห์ต่อมาฉีดพิษทับด้วย 100 $TCID_{50}$ ของเชื้อออเจสกี้ (Shope strain) 1 มล.เข้าใต้ผิวหนัง 2 และ4สัปดาห์ต่อมาเจาะเลือดกระต่ายเพื่อตรวจไตเตอร์ต่อโรคออเจสกี้ โดยวิธี serum neutralization test (Hill et al. 1977)

**การเตรียมแอนติซีรั่มอหิวาต์สุกร**

ฉีดวัคซีนอหิวาต์สุกร Lapinized Chinese strain ชนิดเชื้อเป็นซึ่งผลิตโดยงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร กรมปศุสัตว์ ไตเตอร์ $10^{5.5}$ $PID_{50}$/มล. ให้กระต่ายจำนวน 5 ตัว ตัวละ 1 มล. เข้าเส้นเลือด 2 สัปดาห์ต่อมาฉีดวัคซีนซ้ำอีกครั้ง และหลังจากนั้น 2 และ 4 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายตรวจไตเตอร์ต่อโรคอหิวาต์สุกร โดยวิธีไมโครนิวทรัลไลเซชั่นอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (พวงทิพย์ และคณะ 2533)

**การเตรียมแอนติซีรั่มไข้สมองอักเสบของสุกร**

ใช้เชื้อไข้สมองอักเสบ ที่เตรียมจากสมองลูกหนูดูดนม (สุจิรา และคณะ 2535) มาเจือจางด้วย PBS 100 เท่า เจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 1 และฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดดำที่ใบหูกระต่าย จำนวน 5 ตัว ตัวละ 1 มล. หลังจากนั้น 1 เดือน เจาะเลือดครั้งที่ 2 และฉีดเชื้อที่เจือจางด้วย PBS 10 เท่า เข้าเส้นเลือดกระต่าย ตัวละ 1 มล. 1 สัปดาห์ต่อมาเจาะเลือดครั้งที่ 3 ตรวจซีรั่มไตเตอร์ต่อโรคไข้สมองอักเสบ โดยวิธี ฮีแมกกลูติเนชั่นอินฮิบิชั่น (Clarke และ Casals 1958)

**การเตรียม อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต**

ใช้แอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย ตกตะกอนด้วย Saturated ammonium sulfate 50%และ 33% 1 ครั้งและ 3 ครั้งตามลำดับ dialyse เพื่อแยกเอาammonium sulfate ออก และผ่าน diethylaminoethyl (DEAE) cellulose (DE52)เพื่อแยก Immunoglobulin(Ig)G โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hudson และ Hay(1980) ทดสอบ IgG ที่ได้ด้วยวิธี immunoelectrophoresis (Jurd 1981) โดยเติมเติมซีรั่มแพะปกติในช่องวงกลมหมายเลข 1 IgGของแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่ายแล้ว นำมาคอนจูเกตกับสารสี FITC โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kawamura (1997) การทดสอบคุณภาพของอินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต

1. คำนวนสัดส่วนระหว่าง fluorochrome (F) ต่อ protein (P) โดยใช้สูตร F/P molar ratio = A/B x 0.441

A = จำนวน F โดยวัด optical density (OD) ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ที่ Wave length 495 nm คูณด้วย 5.71 ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น mg/ml

B = จำนวน P โดยวัด OD ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ส คอนจูเกตที่ Wave length 280 nm แล้วคำนวณ

โดยสูตร $\left[ OD_{280} - (OD_{495} \times 0.053) \right] \times 0.75$

ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น mg/ml

2. ทดสอบความจำเพาะของ อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต

**เชื้อออเจสกี้**

ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตสุกร (PK-15) โดยเติมเชื้อออเจสกี้ Shope strain (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. W.L. Mengeling NADC ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใช้ Multiplicity of infection MOI)=0.1 plaque-forming unit (PFU)ต่อเซลล์

**เชื้ออหิวาต์สุกร**

ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตสุกร (PK-15) โดยเติมเชื้ออหิวาต์สุกร ALD strain (จาก NIAH ประเทศญี่ปุ่น)

**เชื้อไข้สมองอักเสบของสุกร**

ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงไตลูกอ่อนสุกร (ESK) โดยเติมเชื้อไข้สมองอักเสบ AS-6 strain (จาก NIAH ประเทศญี่ปุ่น)

เซลล์เพาะเลี้ยง เลี้ยงใน multiwell slide ชนิด 10 หลุมต่อแผ่นหลังเติมเชื้อ 24-48 ชั่วโมง ล้าง slide ด้วย PBS และ fix ด้วย aceetone 10 นาที ปล่อยให้แห้งเติม primary antibody คือ แอนติซีรั่มออเจสกี้,แอนติซีรั่มอหิวาห์สุกร และแอนติซีรั่มไข้สมองอักเสบ ลงในเซลล์เพราะเลี้ยงที่มีเชื้อออเจสกี้ เชื้ออหิวาต์สุกร เชื้อไข้ไมองอักเสบ และเซลล์เพราะเลี้ยงปกติ ตามตารางที่ 1 แล้วอบในกล่องความชื้น 37°C 30 นาที ล้างด้วย PBS และเติม secondary antibody คือ อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดี้ คอนจูเกต อบในกล่องความชื้อที่ 37°C.30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งและน้ำกลั่น 1 ครั้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

3. ทดสอบสัดส่วนการย้อมที่เหมาะสม

โดยทำ box titration ของอินไพเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต และแอนติซีรั่มออเจสกี้ แอนติซีรั่มอหิวาต์สุกร และติซีรั่มไข้สมองอักเสบแบ่งการทดสอบเป็น 3 การทดลอง เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะ อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ทำ 2-fold dilution 1:5 ถึง 1:160 อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ที่สั่งซื้อใช้ dilution 1:160

การทดลองที่ 1

ใช้ multiwell slide ที่เตรียมจากเชื้อออเจสกี้ โดยทำ 2-fold diultion ของแอนติซีรั่มออเจสกี้ และซีรั่มกระต่ายปกติ 1:5 ถึง 1:320

การทดลองที่ 2

ใช้ multiwell slide ที่เตรียมจากเชื้ออหิวาต์สุกร โดยทำ 2-fold diultion ของแอนติซีรั่มออเจสกี้ และซีรั่มกระต่ายปกติ 1:20 ถึง 1:1280

การทดลองที่ 3

ใช้ multiwell slide ที่เตรียมจากเชื้อไข้สมองอักเสบของสุกร โดยทำ 2-fold dilution ของแอนติซีรั่มไข้สมองอักเสบ และซีรั่มกระต่ายปกติ 1:160 ถึง 1:10240

## ผลการดำเนินงาน

การเตรียมแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย ผลการตรวจไตเตอร์ โดยวิธี AGID ได้ 1:32 ดังรูปที่ 1 การเตรียมแอนติซีรั่มออเจสกี้ให้ไตเตอร์ 1:8 โดยวิธี ซีรั่มนิวทราลไลเซชั่น แอนติซีรั่มอหิวาต์สุกร ให้ไตเตอร์ 1:512 โดยวิธีไมโครนิวทราลไลเซชั่น อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ แอนติซีรั่มไข้สมองอักเสบของสุกรให้ไตเตอร์ 1:6400 โดยวิธี ฮี-แมกกลูติเนชั่น-อินฮิบิชั่น การแยก IgG จากแอนติซีรั่มแพะต่ออิมมูโนโกลบูลินกระต่าย ให้ผลดังรูปที่ 2

ผลการคำนวณ F/P molar ratio ได้เท่ากับ 1.557 ผลการทดสอบความจำเพาะของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ต่อเซลล์เพราะเลี้ยงที่เติมเชื้อออเจสกี้ เชื้ออหิวาต์สุกร เชื้อไข้สมองอักเสบ และเซลล์เพราะเลี้ยงปกติ ดังแสดงในตารางที่ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีเชื้อออเจสกี้และเติมแอนติซีรั่มออเจสกี้ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดลักษณะ Cytopathic effect (CPE) ไซโตพลาสม์ และนิวเคลียสติดสีเขียวเรืองแสง (รูปที่ 3) เปรียบเทียบกับคอนโทรล (รูปที่ 4) เซลล์เพราะเลี้ยงปกติและเติมแอนติซีรั่มออเจสกี้ รูปร่างเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง และไม่พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีเชื้ออหิวาต์สุกร และเติมแอนติซีรั่มอหิวาต์สุกร รูปร่างเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสม์ และนิวเคลียส (รูปที่ 5) เปรียบเทียบกับคอนโทรล (รูปที่ 6) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงและสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วนเซลล์เพราะเลี้ยงที่มีเชื้อไข้สมองอักเสบและเติมแอนติซีรั่มไข้สมองอักเสบ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและเกิด CPE พบสีเขียวเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสม์และนิวเคลียส (รูปที่ 7) เปรียบเทียบกับคอนโทรล (รูปที่ 8) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงและสีเขียวเรืองแสงบริเวณเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วนแอนติซีรั่มและเซลล์เพราะเลี้ยงที่มีเชื้อไม่สอดคล้องกัน ให้ผลลบทุกตัวอย่างการทดลอง

ผลการทดสอบสัดส่วนการย้อมที่เหมาะสมของ ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต dilution สูงสุดที่ให้ผลบวก (เข้มข้น) คือ dilution 1:80 ซึ่งเท่ากับ 1 FA unit เวลาตรวจใช้ 4 FA unit จึงเจือจางฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต 1:20 ซึ่งทั้ง 3 การทดลองให้ผลใกล้เคียงกัน ส่วน dilution ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ที่สั่งซื้อ เท่ากับ 1:160 แอนติซีรั่มออเจสกี้, อหิวาต์สุกร และไข้สมองอักเสบของสุกร ให้เจือจางเท่ากับ 1:40, 1:160 และ 1:280 ตามลำดับ (ตารางที่ 1-3)

## สรุปและวิจารณ์

อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ เทคนิค ใช้หลักการเดียวกับไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ เทคนิค คือ แอนติบอดี้สามารถจะจับกับสารสีฟลูออเรสเซนต์ที่เรียกว่าฟลูออโรโครม ได้โดยไม่ทำให้เสียคุณสมบัติทางอิมมูโนโลจี การรวมตัวของแอนติบอดี้กับสารสีดังกล่าว เรียกว่า คอนจูเกต ซึ่งสามารถทกปฏิกริยากับแอนติเจนได้เหมือนกับก่อนที่จะรวมตัวกับสารสีฟลูออเรสเซนต์ เมื่อหยดคอนจูเกตลงในเนื้อเยื่อหรือบนแผ่นสไลด์ และล้างส่วน

เกินของคอนจูเกตออก ส่วนที่เหลือคือ คอนจูเกต ที่ติดอยู่กับแอนติเจน ที่จำเพาะเจาะจงกัน เมื่อนำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ ที่มีแสงอุลตราไวโอเลต จะทำปฏิกริยากับฟลูออโร-โครม ให้แสดงเรื่องมองเห็นได้ (สมเนตร และคณะ 2524) วิธีนี้จะต่างกับวิธีไดเรคตรงที่ แอนติเจน และ primary antibody จะรวมตัวกันเปรียบเสมือนแอนติเจน ซึ่งเมื่อรวมกับ secondary antibody ที่สอดคล้องกันจะให้แสงเรื่องเช่นเดียวกันและให้ผล sensitive กว่าวิธีไดเรค 5-10 เท่า

จากการทดสอบความจำเพาะของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต พบว่าแอนติ-ซีรั่มและเซลล์เพาะเลี้ยง ที่มีเชื้อที่สอดคล้องกันเท่านั้น ที่ให้ผลบวกจำเพาะเจาะจงในแต่ละโรค โดยสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างเด่นชัด ส่วนการทดสอบสัดส่วนการย้อมที่เหมาะสม ทำให้ทราบ dilution ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต และ dilution ของแอนติซีรั่มที่เหมาะสมในการย้อม ในการเตรียมซีรั่มอหิวาต์สุกรและไข้สมองอักเสบจากกระต่าย ได้แอนติซีรั่มที่สูงพอสมควร ส่วนแอนติซีรั่ม ออเจสกี้ ให้ไตเตอร์ไม่สูงมาก (1:8) และส่วนใหญ่มีผล toxic ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงใน dilution แรก ๆ แต่ก็สามารถใช้ในการทดลองได้ ในการเตรียมแอนติซีรั่มแพะต่อซีรั่มกระต่ายได้ไตเตอร์ที่ไม่สูง ซึ่งอาจจะมีผลให้ dilution ของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ที่เตรียมค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับคอนจูเกตที่สั่งซื้อ

การทดสอบคุณสมบัติของฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ถึงแม้ว่าจะให้ dilu-tion ที่ไม่สูงมาก ก็สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ซึ่งวิธี อินไดเรค ฟลูออเรสเซนต์ ใช้ตรวจโรคไวรัสในสุกรได้ทุกโรคทั้งยังประหยัดเงินตราในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องมี primary antibody ซึ่งเตรียมจากกระต่าย และการย้อมให้เวลามากกว่าวิธีไดเรค ซึ่งในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก อาจทำให้ไม่สะดวกในการทดสอบ

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพญ.ทาริกา ประมูลสินทรัพย์ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายเลี้ยงสัตว์ทดลอง สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลอง และนายชัยวัฒน์ - แสวงดี ที่ได้ช่วยงานในห้องปฏิบัติการ

## เอกสารอ้างอิง

1. พวงทิพย์ เมธิยะพันธ์ ; สุจิรา ปาจริยานนท์ และวาสนา ภิญโญชนม์ 2533 การตรวจภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร โดยวิธีไมโครนิวทราลไลเซชั่น อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ สัตวแพทย์สาร 41(2):83-92.
2. สุจิรา ปาจริยานนท์ ; วาสนา ภิญโญชนม์ ; อุราศรี ตันตสวัสดิ์ และ Tomiaki Morimoto.2535 การเตรียมฟลูออเรสเซนต์ แอนติบอดี้ คอนจูเกต ในการวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบของสุกร สัตวแพทย์สาร 42(1):

3. สมเนตร บุญพรรคนาวิก 2524 อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เทคนิค โรงพิมพ์พิมเอศ แพร่ง-สรรพศาสตร์ ถนนตะนาว กท. p.178.

4. Clarke,D.H.; and Casals,J.1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-born viruses. Am.J.Trop.Med.Hyg 7:561-573.

5. Garvey, J.S.; Cremer, N.E.; and Sussdorf, D.H. 1980. Estimation of protein. In: Methods in Immunology. 3rd ed. W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts. pp.84-86.

6. Hill, H.T. ; Crandell. R.A. ; Kanitz C.L. ; Mcadaragh, J.P. ; Seawright, G.L. ; Solarzano, R.F. ; and Stewart. W.C. 1977. Recommended minimum standards for diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease) Proc. Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. 20:375-390

7. Hudson, L. ; and Hay, F.C. 1980 Isolation and structure of immunoglobulins. In Pratical immunology. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. pp.169-177.

8. Jurd, R.D. 1981 Immunoelectrophoresis. In Gel electrophoresis of proteins. Ed.Hames, B.D. and Rick Wood D.IRC press Oxford, Washington DC. pp.238-239

9. Kawamura, A.Jr. 1977. Fluorescent antibody techoipues and their applications. 2nd ed. University of Tokyo Press. p.292.

10. Weir, D.M.1978 Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In Handbook of experimental immunology 3rded. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. pp.15.1-15.30

# ศึกษาการติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง

กัญญา สุวินทรากร*[1] อนุทิน หาญวีระพล[1] สุจิรา ปาจาริยานนท์[2] วาสนา ภิญโญชน์[2]
Kunya Suvintarakorn Anootin Harnveeraphon Sujira Pachariyanaon
Wasana Pinyochon William L. Mengeling[3]

ABSTRACT

Persistently infected swine with hog cholera (attenuated China Strain) was studied from immune and non-immune pregnant sow at early, middle and late pregnancy (40 days, 60 days and 90 days of pregnancy). After 14 days and 28 days post intra-amniotically infection, fetal organ in each subgroups were collected for virus detection using FACCT and FATST method. Sera were collected from fetuses and piglets before colostral feeding for estimation of serum neutralizing titer (SN-titer). A sow in each group was living still delivery.

The results showed that, virus was detected in 2 form 16 sows, and SN titer detected in all 16 sows. The postinfected fetuses on days 14 and 28, virus was detected in almost every fetus but SN titer was not detected. Petechial haemorrhage was found on head and snout of many fetuses. Some mummified fetus was found but no virus was detected. In piglets before colostral feeding group, SN titer was detected only at early and middle pregnancy group (SN titer 0-32). Stillbirth and weak piglets were found in non-immune sow at early and middle gestation. The survival piglets were healthy and maternal antibody titer was detected.

---

คำสำคัญ : การติดเชื้อแฝง, อหิวาต์สุกร
Key words : Persistent infection, Hog Cholera

1. ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง นครราชสีมา
Veterinary Biologics Center, Pakchong, Nakhonratchasima
2. สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ บางเขน กรุงเทพมหานคร
National Animal Health and Production Institute (NAHPI)
3. National Animal Disease Center, Ames-USDA

However, the virus was detected after birth until 60-120 days old. The most sensitive organ for viral detection were liver, lung and spleen respectively. FACCT was found to be more sensititive that FATST.

## บทคัดย่อ

ศึกษาการติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง โดยการทำให้ลูกอ่อนในท้องสุกร (Fetus) ติดเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดไซน่า สเตรน โดยฉีดเข้าถุงน้ำคร่ำขณะท้องระยะแรก (40 วัน) ระยะกลาง (60 วัน) และระยะสุดท้าย (90 วัน) จากแม่สุกร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไม่มีภูมิคุ้มกันโรคอหิวาต์สุกรและกลุ่มมีภูมิคุ้มกัน หลังจากฉีดเชื้อได้ 14 วัน และ 28 วัน เปิดผ่าชากแม่สุกรและ fetus เพื่อตรวจดูพยาธิสภาพและเก็บอวัยวะต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบหาไวรัสโดยวิธี Fluorescent antibody cell culture technique (FACCT) และ Fluorescent antibody tissue section technique (FATST) เก็บซีรั่มเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน (Serum Neutralizing titer, SN-titer) แม่สุกรที่ถูกฉีดเชื้อไซน่า สเตรน เข้าถุงน้ำคร่ำ ขณะท้อง 40, 60 และ 90 วัน ทั้งจากกลุ่มไม่มีภูมิและมีภูมิ ถูกปล่อยให้คลอดตามปกติระยะละ 1 แม่ และติดตามศึกษาผลในลูกสุกร

ผลการศึกษาภายหลังการฉีดไวรัสเข้าถุงน้ำคร่ำในขณะท้อง ระยะแรก ระยะกลาง และระยะสุดท้าย สำหรับแม่สุกรทั้ง 2 กลุ่ม พบไวรัส 2 แม่ จาก 16 แม่ และทุกตัวมี SN-titer ส่วน fetus หลังฉีดเชื้อนาน 14 วัน และ 28 วัน พบไวรัสเกือบทุกตัว และมีการแพร่ไปยัง fetus ตัวที่ไม่ฉีดด้วยแต่ตรวจไม่พบ SN-titer และตรวจพบจุดเลือดออกบริเวณหัวและจมูกใน fetus หลายตัวและพบลูกกรอกในบางแม่ ส่วนลูกสุกรที่คลอดตามปกติทั้งสองกลุ่ม ลูกสุกรก่อนกินนมน้ำเหลืองจากแม่ท้องระยะต้นและระยะกลางพบ SN-titer (0-32) แต่ระยะท้ายไม่พบ SN-titer และมีเปอร์เซ็นต์ตายหลังคลอดสูง จากแม่ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันท้องระยะแรกและระยะกลาง ส่วนลูกที่รอดชีวิตทุกตัวมี maternal antibody titer และมีสุขภาพดี แต่พบไวรัสจนอายุ 60-120 วัน สำหรับอวัยวะที่ตรวจพบไวรัสมากที่สุดคือ ตับ ปอด และม้าม ซึ่ง FACCT ให้ผลแม่นยำกว่า FATST

## คำนำ

อหิวาต์สุกร (swine fever, SF) เป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรงของสุกร การติดเชื้อมีทั้งชนิดรุนแรง ชนิดค่อนข้างรุนแรง ชนิดเรื้อรังและชนิดไม่แสดงอาการของโรค ชนิดรุนแรงเกิดจากเชื้อไวรัสที่รุนแรงซึ่งมีผลให้สัตว์ตายและแพร่เชื้อสูง แต่การติดเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำจะไม่เห็นอาการเด่นชัด (Van Oirschot, 1986) โดยเฉพาะถ้าเป็นแม่สุกรท้องเชื้อจะติดลูกอ่อน (fetus) และแฝงตัวอยู่จนคลอดออกมา จากนั้นไวรัสจะพัฒนาตัวเองจนทำให้เกิดอาการโรคอ่อน ๆ หรืออาการที่ไม่เด่นชัด (Carbrey *et al.*, 1977)

จากข้อมูลหลายประการที่ทำให้สงสัยว่าการระบาดของโรคอหิวาต์สุกร อาจเกิดจากเชื้อแฝงนี้ทำให้ยากต่อการป้องกันและควบคุมโรคระบาด จึงได้ทำการศึกษาและทดลองเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง ซึ่งจะทำให้ทราบถึงวิธีการแก้ไขปัญหาได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการทดลองเรื่องนี้เพื่อศึกษาขบวนการเกิดพยาธิสภาพ ภูมิคุ้มกันโรค และประเมินผลวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคอหิวาต์สุกรชนิดแอบแฝง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

**สัตว์ทดลอง** แม่สุกรสาวไม่มีภูมิคุ้มกันต่ออหิวาต์สุกร (SN-titer <2) จำนวน 8 แม่ และมีภูมิคุ้มกัน (SN-titer 128-1024) จำนวน 8 แม่

**เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร** เป็น seed ไวรัส เพื่อผลิตวัคซีนชนิดไขน่า สเตรน ผลิตโดยงานผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์

**เซลล์เพาะเลี้ยง** ใช้ cell line คือ swine testicle (ST) และ Porcine kidney (PK-15) จาก National Animal Disease Center (NADC) รัฐไอโอว่า สหรัฐอเมริกา

**Immunofluorescent conjugate** Anti hog cholera immunoglobulin conjugate ที่ใช้ใน Fluorescent antibody cell culture technique(FACCT) ผลิตโดยศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ ปากช่อง และใน Fluorescent antibody tissue section technique (FATST) ได้จาก NADC

### วิธีการ

ใช้แม่สุกร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไม่มีภูมิคุ้มกันต่ออหิวาต์สุกร จำนวน 8 แม่ และกลุ่มมีภูมิคุ้มกันจำนวน 8 แม่ แต่ละกลุ่มนำมาใช้เมื่อแม่สุกรตั้งท้อง 40, 60 และ 90 วัน จำนวน 3, 3 และ 2 แม่ตามลำดับ (Table 1) โดยวางยาสลบ เปิดผ่าหน้าท้องแล้วฉีดไวรัสไขน่า สเตรน เข้าถุงน้ำคร่ำเพื่อเข้าลูกอ่อนในท้องสุกร (fetus) แม่ละ 2 fetus

**การเก็บอวัยวะและซีรัม** เก็บ ไต ตับ ปอด หัวใจ ม้าม ทอนซิล ต่อมน้ำเหลือง และเก็บซีรัมจากลูกอ่อนและแม่จากทั้งกลุ่มมีภูมิและไม่มีภูมิภายหลังฉีดไวรัส 14 วัน (ขณะตั้งท้อง ระยะแรก ระยะกลาง และระยะสุดท้าย ระยะละ 1 แม่ รวม 6 แม่) และ 28 วัน (ตั้งท้อง ระยะแรก และระยะกลาง ระยะละ 1 แม่ รวม 4 แม่) โดย fetus เก็บจากสายสะดือ แม่สุกรที่เหลือปล่อยคลอดตามปกติรวม 6 แม่ เก็บซีรัมลูกก่อนกินนมน้ำเหลือง (precolostrum) และเก็บอวัยวะที่อายุต่าง ๆ กัน (Table 1)

Table 1 Experimental design of experiment sow

| Group | Sow No. | Day of injection after conception | Day of organ and serum collection |
|---|---|---|---|
| 1, 4 | 1, 9 | 40 | 14 |
| | 2, 10 | 40 | 28 |
| | 3, 11 | 40 | post partum |
| 2, 5 | 4, 12 | 60 | 14 |
| | 5, 13 | 60 | 28 |
| | 6, 14 | 60 | post partum |
| 3, 6 | 7, 15 | 90 | 14 |
| | 8, 16 | 90 | post partum |

Gr. 1-3 (No. 1-8) = non-immune sows
Gr. 4-6 (No. 9-16) = SF-immune sows

**การวางยาสลบแม่สุกร** ใช้ Azaperon (Stresnil$^{R}$) เป็นยากล่อมประสาทและ Metomidate (Hypnodril$^{R}$) เป็นยาสลบ

**การหาเชื้อไวรัส** FACCT 2 steps (กัญญา และอนุทิน, 2534) โดยนำเชื้อไวรัสเพาะเลี้ยงครั้งแรกใน ST cell line และครั้งที่ 2 ใน PK-15 แล้วย้อมด้วย anti-hog cholera fluorescein conjugate อ่านผลด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์

FATST โดยตัดอวัยวะที่จะหาเชื้อไวรัสด้วย Cryostat แล้ว fix ด้วย acetone และย้อมด้วย anti-hog cholera fluorescein conjugate อ่านผลด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์

**Serum neutralization test** ใช้ END method (Enhancement of Newcastle disease virus) โดยใช้เชื้ออหิวาต์สุกร สเตรน ALD และไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน Miyadera ทำการทดสอบในเซลล์ Primary ST (Kumagai *et al.*, 1961; Shimizu *et al.*, 1964)

## ผลการทดลอง

**การตรวจหาไวรัส** ภายหลังฉีดเชื้อไวรัสไซน่า สเตรน เข้าถุงน้ำคร่ำ 14 วัน และ 28 วัน ของการตั้งท้องที่ 40, 60 และ 90 วัน จะพบไวรัสที่อวัยวะต่าง ๆ ของลูกอ่อนเกือบทุกตัว (Table 2 และ 3) สำหรับลูกสุกรจากแม่ที่ปล่อยคลอดตามปกติ จะพบไวรัสจนถึงอายุ 90-120 วัน (Table 4 และ 5) และตรวจพบไวรัสจากแม่สุกรจำนวน 2 ใน 16 แม่

**การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน** ภายหลังรับเชื้อไซน่า สเตรน 14 วัน และ 28 วัน ลูกอ่อนทุกตัวตรวจไม่พบ SN-titer (Table 2 และ 3) สำหรับลูกสุกรจากแม่ที่ปล่อยคลอดตามปกติ ก่อนกินนมน้ำเหลือง พบ SN-titer ในบางตัวจากแม่ที่รับเชื้อขณะท้องระยะแรกและระยะกลาง แต่ไม่พบในระยะสุดท้ายเมื่อกินนมน้ำเหลืองแล้ว ตรวจพบ SN-titer (Table 4 และ 5) สำหรับแม่สุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน จะมี SN-titer (ยกเว้น แม่เบอร์ 4) และแม่ที่มีภูมิคุ้มกัน พบว่า SN-titer สูงขึ้นในตัวที่ปล่อยคลอดตามปกติ และต่ำกว่าเดิมในแม่ที่เปิดเก็บซากภายหลังรับเชื้อ 14 และ 28 วัน

**การผิดปกติของลูก** พบมากในกลุ่มรับเชื้อขณะท้องระยะแรก 64% ระยะกลาง 28% และระยะสุดท้าย 11% โดยกลุ่มแม่ไม่มีภูมิคุ้มกันพบความผิดปกติ 46% แต่กลุ่มแม่มีภูมิคุ้มกันพบเพียง 25% (Table 2 และ 3)

**เปรียบเทียบการตรวจ FACCT และ FATST** พบว่า FACCT ให้ผลสูงกว่า FATST โดยเปรียบเทียบจากลูกที่ให้ผลบวก 108 ตัว อวัยวะที่ให้ผลบวกสูงสุดคือ ตับ รองลงมาคือ ปอด ม้าม และไต (Fig.1)

## สรุปและวิจารณ์

### วิจารณ์

ไวรัสอหิวาต์สุกรไซน่า สเตรน ใช้สำหรับผลิตวัคซีนอหิวาต์สุกร ของกรมปศุสัตว์ที่นำมาใช้ในงานทดลองนี้ จากการตรวจเชื้อแล้วพบว่าจำนวนลูกที่ติดเชื้อไวรัสมีมากกว่าจำนวนลูกที่ฉีดไวรัสเข้าถุงน้ำคร่ำ แสดงว่าเชื้อสามารถติดต่อผ่านทางรกได้ทุกระยะของการตั้งท้อง เช่นเดียวกับไวรัสอหิวาต์สุกรที่รุนแรง (Cowart and Morehouse, 1967; Stewart, 1969; Bran *et al.*, 1971) และ Bergen strain ซึ่งเป็นเชื้ออหิวาต์สุกร จากท้องที่ที่มีความรุนแรงต่ำ พบว่าเมื่อฉีดเข้ากล้ามเนื้อจะผ่านทางรกได้ 66% (Van Oirschot, 1979)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ยาสลบและเปิดผ่าหน้าท้องแม่สุกรเพื่อฉีดเชื้อไซน่า สเตรนเข้าถุงเข้าน้ำคร่ำโดยตรงซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้ง เป็นแม่กลุ่ม 2 จำนวน 1 แม่ และกลุ่ม 4 จำนวน 3 แม่ ซึ่งต้องกล่าวไว้ เพราะอาจมีผลกับข้อมูลที่ได้

ภายหลังฉีดเชื้อไซน่า สเตรนพบว่ามี 5 แม่ ที่ลูกในครอกติดเชื้อทุกตัวซึ่งมาจากแม่กลุ่มท้องระยะแรกและกลาง การติดเชื้อไซน่า สเตรน ของตัวอ่อนไปยังตัวถัดไป จะเกิดเช่นเดียวกับไวรัสโรคอหิวาต์สุกร (Stewart, 1969), porcine parvovirus (Redman *et al.*, 1974; Bachman *et al.*, 1975) ส่วนอีก 11 แม่ ลูกในครอกไม่ติดเชื้อไวรัสทุกตัว โดยมี 3 แม่ที่แท้งก่อน จึงมีระยะเวลาติดเชื้อสั้นเพียง 4-11 วัน การแพร่เชื้อจึงไม่ทั่วทุกตัว ข้อที่น่าสังเกตุคือ พบในทุกแม่ที่รับเชื้อในระยะสุดท้าย ซึ่งสันนิฐานว่าระยะเวลาของการติดเชื้อไปยังตัวถัดไปน้อยมาก หรืออาจเป็นเพราะแม่สุกรท้องระยะสุดท้ายสามารถกำจัดไวรัสได้มากขึ้น หรือเพราะลูกอ่อนโตเต็มที่จึงมีความต้านทานเชื้อ แต่มีแม่สุกรอีก 4 แม่ จากกลุ่มระยะท้องแรกและกลางที่ลูกในครอกไม่ติดเชื้อทุกตัว ซึ่งอาจเนื่องจากมีลูกอ่อนบางตัว ติดเชื้ออย่างช้า ๆ ที่จะแพร่ไปยังตัวถัดไป (Van Oirschot, 1979)

**Table 2** Abnormality , SN-titer and virus (China strain) detection in fetuses and piglets of non-immune sows

| sow | Day of organ collection postinjection | Virus detection | | | | | SN-titer | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | sow | positive fetuses or piglets | | | Pig+/all | fetuses or piglets | sow |
| | | | normal | abnormal | mummified | | | |
| 1 | 14 | - | 4/4 | 7/7 | 0 | 11/11 | < 2 | 128 |
| 2 | 28 | - | 3/3 | 9/10 | 0/1 | 12/14 | < 2 | 128 |
| 3 | post partum | - | 5/5 | 2/2 | 0 | 7/7 | 0-4 | 512 |
| Total of 40 | | | 12/12 | 18/20 | | 30/32 | | |
| 4 | 5* | - | 3/4 | 4/9 | 0/1 | 7/14 | ND | <2 |
| 5 | 28 | - | 2/2 | 0 | 0 | 2/2 | < 2 | 64 |
| 6 | post partum | + | 5/5 | 5/5 | 0/1 | 10/11 | 4-32 | 512 |
| Total of 60 | | | 10/11 | 9/16 | | 19/27 | | |
| 7 | 14 | - | 7/10 | 0 | 0 | 7/10 | < 2 | 64 |
| 8 | post partum | - | 7/9 | 0 | 0 | 7/9 | < 2 | 64 |
| Total of 90 | | | 14/19 | 0 | | 14/19 | | |
| Total of 8 sows | | | 36/42 | 27/36 | | 63/78 | | |

* :- abortion ND :- no detection

**Table 3** Abnormality, SN-titer and virus(China strain) detection in fetuses and piglets of immune sows

| sow | day of organ collection postinfection | virus detection | | | | | SN-titer | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | sow | postive fetuses or piglets | | | pig+/all | fetuses (piglets) | sow | |
| | | | normal | abnormal | mummified | | | pre | post |
| 9 | 3 * | + | 2/2 | 1/1 | 0 | 3/3 | ND | 512 | 256 |
| 10 | 4 * | - | 0 | 4/6 | 0 | 4/6 | ND | 1024 | 1024 |
| 11 | 11* | - | 4/4 | 4/4 | 0/1 | 8/9 | ND | 512 | 1024 |
| Total of 40 | | | 6/6 | 9/12 | | 15/18 | | | |
| 12 | 14 | - | 5/11 | 0 | 0 | 5/11 | <2 | 1024 | 512 |
| 13 | 28 | - | 13/13 | 0 | 0 | 13/13 | <2 | 1024 | 512 |
| 14 | post partum | - | 4/6 | 0 | 0 | 4/6 | 16-32 | 128 | 2048 |
| Total of 60 | | | 22/30 | 0 | | 22/30 | | | |
| 15 | 14 | - | 4/5 | 0 | 0/4 | 4/9 | <2 | 512 | 128 |
| 16 | post partum | - | 4/6 | 0 | 0 | 4/6 | <2 | 1024 | 1024 |
| Total of 90 | | | 8/11 | 0/4 | | 8/15 | | | |
| Total of 8 sows | | | 36/47 | 9/16 | | 45/63 | | | |

* :- abortion ND :- no detection

**Table 4** Virus and SN-titer detection from piglets postpartum in non-immune sows

| sow no. | piglet no. | age day | SN-titer | | virus detection | remark |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | precol. | col.days | | |
| 3 | 1 | 0 | ND | ND | + | healthy |
| | 2 | 1 | ND | ND | + | weakness postnatal death |
| | 3 | 5 | 4 | ND | + | weakness postnatal death |
| | 4 | 30 | 4 | 128 | + | healthy |
| | 5 | 60 | <2 | 64 | + | healthy |
| | 6 | 90 | <2 | 4 | + | healthy |
| | 7 | 120 | <2 | 8 | + | healthy |
| 6 | 1 | 0 | ND | ND | + | prenatal death |
| | 2 | 0 | ND | ND | + | prenatal death |
| | 3 | 0 | ND | ND | + | preantal death |
| | 4 | 0 | ND | ND | - | mummified fetus |
| | 5 | 1 | ND | ND | + | weakness postnatal death |
| | 6 | 1 | 32 | ND | + | weakness postnatal death |
| | 7 | 2 | 32 | 128 | + | weakness postnatal death |
| | 8 | 14 | ND | ND | + | healthy |
| | 9 | 30 | 4 | 128 | + | healthy |
| | 10 | 60 | ND | 64 | + | healthy |
| | 11 | 90 | 32 | 8 | + | healthy |
| 8 | 1 | 0 | <2 | | + | healthy |
| | 2 | 14 | <2 | ND | + | healthy |
| | 3 | 30 | <2 | 16 | + | healthy |
| | 4 | 50 | <2 | ND | + | healthy |
| | 5 | 70 | <2 | 8 | + | healthy |
| | 6 | 90 | <2 | ND | + | healthy |
| | 7 | 110 | <2 | ND | + | healthy |
| | 8 | 120 | <2 | 8 | - | healthy |
| | 9 | 150 | <2 | ND | - | healthy |

precol. :- precolostrum col.days :- collected days

**Table 5** Virus and SN-titer detection from piglets postpartum in immune sows

| sow no. | piglet no. | age day | SN-titer | | virus detection | remark |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | precol. | col.days | | |
| 14 | 1 | 0 | 32 | - | + | healthy |
| | 2 | 14 | ND | 128 | + | healthy |
| | 3 | 30 | 16 | ND | + | healthy |
| | 4 | 60 | 32 | 16 | + | healthy |
| | 5 | 80 | 8 | 4 | - | healthy |
| | 6 | 100 | 16 | <2 | - | healthy |
| 16 | 1 | 0 | <2 | - | + | healthy |
| | 2 | 3 | <2 | ND | - | accidental death |
| | 3 | 5 | <2 | ND | - | accidental death |
| | 4-6 | 5 | <2 | ND | + | accidental death |

ND :- No detection

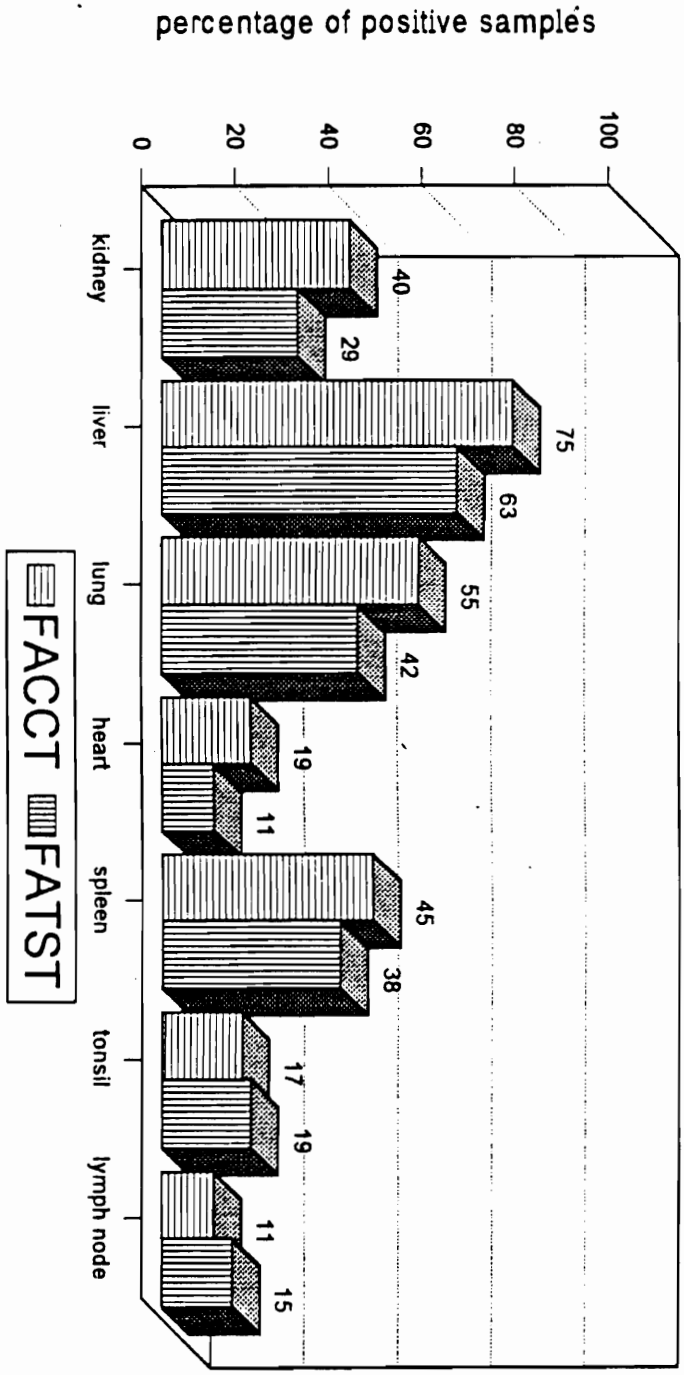



Fig. 1 A comparison of an average percentage of positive organs collected from all fetuses and piglets tested by FACCT and FATST

ในแม่สุกร ตรวจพบไวรัส 2 ตัว ตัวแรกเป็นแม่สุกรที่แท้งวันที่ 3 หลังรับเชื้อ ดังนั้นไวรัสจึงยังถูกขับออกไม่หมด ซึ่งตามรายงานของ Terpstra (1978) พบว่าเชื้อไขน่า สเตรน จะตรวจพบได้นาน 14 วันหลังจากฉีดวัคซีน ตัวที่สองเป็นแม่ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันรับเชื้อไวรัสขณะท้อง 60 วัน แล้วปล่อยคลอดตามปกติ หลังจากหย่านม เก็บอวัยวะมาตรวจ พบไวรัสที่ปอดและไต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสยังแฝงอยู่ซึ่งผลจะแย้งกับ Terpstra (1978) หรืออีกเหตุผลหนึ่งคืออาจติดต่อจากลูกสุกร ซึ่งตรวจพบไวรัสจนอายุ 3 เดือน ซึ่งถ้ากรณีนี้จะเป็นข้อมูลใหม่ว่าการติดเชื้อไขน่า สเตรน ในลูกอ่อน สามารถขับไวรัสออกมาติดต่อตัวอื่นได้ เพราะจากการทดสอบวัคซีนตามมาตรฐาน การฉีดวัคซีนไขน่า สเตรน จะไม่แพร่ไปยังตัวอื่น สำหรับ SN-titer ในแม่จะพบเหมือนการฉีดวัคซีนตามปกติ ยกเว้นแม่เบอร์ 4 ที่แท้งเมื่อวันที่ 5 หลังฉีดเชื้อตรวจไม่พบ SN-titer

ลูกสุกรจากแม่ที่รับเชื้อขณะท้องระยะแรกและกลางแล้วปล่อยคลอดตามปกติ พบว่าก่อนกินนมน้ำเหลืองมี SN-titer (0-32) หลายตัว ตัวที่มีแสดงว่าตัวอ่อนสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้เอง คือ จากท้องระยะแรกพบ 2 ใน 5 ตัว และท้องระยะกลางพบทุกตัวที่ตรวจ มีตัวที่อ่อนแอตายก่อนคลอดและภายในสัปดาห์แรก 9 ใน 24 ตัว (37%) พบอยู่ในอัตราสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Van Oirschot (1986) ตัวที่รอดชีวิต แข็งแรงสมบูรณ์แต่ตรวจพบไวรัสจนอายุ 60-120 วัน ส่วนลูกสุกรที่ติดเชื้อในระยะสุดท้ายของการตั้งท้อง ก่อนกินนมน้ำเหลืองไม่พบ SN-titer และพบไวรัสจนอายุ 110 วันซึ่งสอดคล้องกับ Van Oirschot and Terpstra (1977) ที่ได้รายงานว่า อหิวาต์สุกรที่ความรุนแรงต่ำสามารถแฝงเชื้อจนอายุ 2-11 เดือน

การทดลองนี้พบว่า fetus สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไขน่า สเตรน เมื่อ fetus อายุ 40 วัน เป็นบางตัว ที่อายุ 60 วัน ทุกตัว แต่ไม่พบการสร้างภูมิคุ้มกันใน fetus อายุ 90 วัน และภายหลัง fetus ทุกอายุ รับเชื้อไขน่า สเตรน นาน 14 และ 28 วัน ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับ Trautwein และคณะ (1977) ที่พบว่า fetus สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้ออหิวาต์สุกรเมื่ออายุ 65 วัน แต่ Van Oirschot (1979) พบเมื่อ fetus อายุ 90 วัน อย่างไรก็ตามจากหลายรายงานพบว่า fetus สามารถสร้างภูมิคุ้มกันเมื่ออายุ 60-75 วัน (Schultz *et al.*, 1971; Solomon, 1971; Binns, 1973) โดยสร้างภูมิคุ้มกันต่อหลายไวรัส เช่น parvovirus (Johnson and Collings, 1971; Redman *et al.*, 1974; Mengeling and Cultip, 1976) และ enterovirus (Dunne *et al.*, 1974)

ความผิดปกติของลูกเมื่อได้รับเชื้อไขน่า สเตรน ขณะเป็น fetus พบว่ามีเลือดคั่งบวมแดงทั้งตัว ตัวเล็ก ลูกกรอก ส่วนที่คลอดแล้วมีตัวเล็ก แคระแกรน จะพบมาในกลุ่มแม่ท้องระยะแรก 32 จาก 50 ตัว (64%) ซึ่งจะพบเชื้อไวรัสเกือบทุกตัว (27/32) แม่ท้องระยะกลางไม่มีภูมิคุ้มกันพบ 16 จาก 27 ตัว (59%) แต่แม่มีภูมิคุ้มกัน (กลุ่ม 5) พบสภาพลูกปกติ และจากแม่ระยะสุดท้าย พบน้อย 4 จาก 34 ตัว (11%) พบลูกกรอก 8 ตัวจาก 5 แม่ ไม่พบไวรัสในลูกกรอก ซึ่งสอดคล้องกับ Van Oirschot and Terpstra (1977) อาจเนื่องจากลักษณะของลูกกรอกนั้น เซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ เหี่ยวแห้งหมดสภาพแล้ว ทำให้ไวรัสไม่สามารถอยู่ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการติดเชื้อไซน่า สเตรน ขณะเป็นลูกอ่อน ระหว่างลูกจากแม่สุกรที่มีและไม่มีภูมิคุ้มกันต่ออหิวาต์สุกร พบว่าลูกจากแม่ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน พบเชื้อไวรัส 80% และพบความผิดปกติ 46% ซึ่งมากกว่าลูกจากแม่ที่มีภูมิคุ้มกัน ซึ่งพบเชื้อไวรัส 71% และความผิดปกติ 25%

เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อไซน่า สเตรน เมื่อได้รับเชื้อขณะเป็นลูกอ่อน โดย FACCT และ FATST จากอวัยวะต่าง ๆ ของลูกที่ให้ผลบวกจำนวน 108 ตัว พบว่าวิธี FACCT ให้ผลสูงกว่า (Van Oirschot, 1985) ซึ่งเนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์อวัยวะที่ตรวจพบมากคือ ตับ รองลงมาได้แก่ ปอด ม้าม และไต ซึ่งต่างจาก สเตรน แอล พี ซี และเชื้ออหิวาต์สุกรชนิดรุนแรงที่พบมากที่ทอนซิล (Lin and Lee, 1981; Van Oirschot, 1986)

## สรุป

การฉีดไวรัสไซน่า สเตรน เข้าถุงน้ำคร่ำขณะแม่สุกรตั้งท้องระยะแรก ระยะกลาง และระยะสุดท้าย ทั้งจากกลุ่มแม่มีภูมิและกลุ่มไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคอหิวาต์สุกร พบว่าเชื้อไวรัสจาก fetus ตัวที่ได้รับจะแพร่ไปยังตัวอื่น ไวรัสนี้จะแฝงจนถึงลูกสุกรอายุ 60-120 วัน ขณะ fetus รับไวรัสที่อายุ 40 และ 60 วัน สามารถสร้างภูมิคุ้มกันระดับต่ำต่อไวรัสนี้ และมีความผิดปกติและอัตราสูญเสียของลูกสุกรต่อครอกสูง โดยที่กลุ่มไม่มีภูมิจะสูงกว่ากลุ่มมีภูมิ สำหรับการตรวจหาเชื้อแฝงพบว่าวิธี FACCT ให้ผลสูงกว่า FATST และอวัยวะที่ตรวจพบมากคือ ตับ ปอด และม้าม ตามลำดับ การทดลองนี้เป็นเพียงเบื้องต้นซึ่งจะต้องศึกษาต่อไปว่าผลของการฉีดวัคซีนไซน่า สเตรน ให้ลูกสุกรที่ติดเชื้อแฝงเป็นอย่างไร และสุกรที่มีเชื้อแฝงนี้มีการขับไวรัสออกไปสู่ตัวอื่นหรือไม่

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อพัฒนาการเกษตร (ATT) จากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่สนับสนุนและให้ทุนบางส่วน รวมทั้งเจ้าหน้าที่และพนักงานศูนย์วิจัยพืชอาหารสัตว์ ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความสะดวกเรื่องคอกและการเลี้ยงดูสัตว์ทดลอง

## เอกสารอ้างอิง

กัญญา สุวินทรากร และอนุทิน หาญวีระพล, 2534 การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกรไซน่า สเตรนชนิดผ่านกระต่ายโดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชชสารสัตวแพทย์ 21(2):69-78

Bachmann, P.A., Sheffy, B.E. and Vaughan, J.T.,1975. Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. Infect. Immun., 12:455-460.

Binns, R.M., 1973. Cellular immunology in the pig. Proc. R. Soc. Med., 66:1155-1160.

Bran, L., Mihaita, S., Popa, M. and Totorcea, N., 1971. Trans-uterine and trans-placenter transmission of attenuated rabbit-adapted swine fever virus strains in pregnant sows. Arch. Vet. Bucuresti, pp. 11-20.

Carbrey, E.A., Stewart, W.C., Kresse, J.I. and Synder, M.L., 1977. Inapparent hog cholera infection following the inoculation of field isolated. E.E.C. Agricultural Research Seminar on Hog Choler/Classical Swine fever and African Swine Fever, EUR 5904, Brussels Luxembourg, pp. 214-229.

Cowart, W.O. and Morehouse, L.G., 1967. Effects of attenuated hog cholers virus in pregnant swine at various stages of gestation. J. Am. Vet. Med. Assoc., 151:1788-1794.

Dunne, H.W., Wang, J.T. and Huang, C.M., 1974. Early in utero infection of porcine embryos and fetuses with SMEDI (entero-) viruses:mortality antibody development and viral persistence. Am. J. Vet. Res., 35:1479-1481.

Johnson, R.H. and Collings, D.F., 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci., 12 : 570-572.

Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M., 1961. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of HC virus on New-castle disease virus in tissue culture. I. Estabilishment of standard procedure. J. Immunol. 87:245-256.

Lin, T.C. and Lee, C.T.1981. An overall report on the development of a highly safe and potency lapinized hog cholera control in Taiwan:NSC. Special Publication, No.5:29-31.

Mengeling, W.L. and Cutlip, R.C., 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus, Am. J. Vet. Res., 37:1393-1400.

Redman, D.R., Ichi, E.H. and Ferguson, L.C. 1974. Procine parvovirus:natural and experimental infections of the porcine fetus and prevalence in mature swine. Infect. Immun., 10:718-723.

Schultz, R.D., Wang, J.T. and Dunne, H.W., 1971. Development of the humoral immune response of the pig Am.J.Vet.Res.,32:1331-1338.

Shimizu, T.T., Kumagai, T., Ikeda, S. and Matumoto, M.1964. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. III. END neutralization test. Arch. Ges. Virusforch, 14:215-226.

Solomon, J.B., 1971. Foetal and Neonatal Immunology. Frontiers of Biology Series, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 254-261.

Stewart, W.C., 1969. Transplacental infection determined by isolation of hog cholera virus in neonatal pigs. Thesis, Iowa State University, Ames, 117 pp.

Terpstra, C. 1978. Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. Tijdschr Diergeneesks. 103:678.

Trautwein, G., Reichter-Reichhelm, H.B., Von Benten, K., Frey, H. and Liess, B., 1977. Experimental transplacental infection of foetal pigs with swine fever virus. E.E.C. Agricultural Research Seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever,EUR 5904, Brussels Luxembourg,pp.174-183.

Van Oirschot, J.T. and Terpstra, C., 1977. A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical, virolegical and pathological observation. Vet. Microbio., 4:117-132.
II. Effect on functions of the immune system. Vet. Microbio., 4:133-147.

Van Oirschot, J.T.1986. Hog Cholera. In: Disease of Swine, 6th ed. Leman, A.D. ed., Iowa State university Press, Iowa, pp. 293-297.

# การศึกษา เชิง เปรียบ เทียบ วัคซีนป้องกันโรคออ เจสกี้ชนิดต่างๆ

## (IV) การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดต่างๆ

# Comparative Studies on Various Kinds of Aujeszky's Disease Vaccine

## (IV) Studies on the efficacy of various kinds of modified live vaccine

จารุณี สาตรา[1] สุนีจิต คงทน[1]
Jarunee Satra Suneejit Kongthon

## Abtract

Efficacy of various kinds of modified live Aujeszky's disease vaccine was evaluated. All thirteen samples of vaccine contained the virus not less than $10^4$ $TCID_{50}$ / dose of which is equal to or higher than the minimum requirement of a producer, and higher than the minimum requirement of Asean standard. All vaccinated pigs were protected against local isolation of Aujeszky's disease virus, Nakhonpathom strain, although the vaccine induced a low titre of antibody. All modified live vaccines reduced clinical symptoms and shedding of the challenged virus.

## บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพ ของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดต่างๆ จำนวน 13 ตัวอย่าง พบว่าวัคซีนทกตัวอย่างมีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า $10^4$ $TCID_{50}$ / โด๊ส ซึ่งเท่ากับหรือสูงกว่า ปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนด และสูงกว่ามาตรฐานอาเซี่ยน แม้ว่า วัคซีนเชื้อเป็นจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ได้ในระดับที่ต่ำ แต่สุกรที่ฉีดวัคซีนทกตัวมีความคุ้มโรคต่อการฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้ สเตรนนครปฐมที่แยกได้จากท้องที่ วัคซีนเชื้อเป็นทุกชนิดช่วยลดอาการทางคลินิคและลดการขับออกของเชื้อไวรัสฉีดพิษทับ

---

1 ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 044-313297 โทรสาร 044-313298

## คำนำ

วัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดแรก ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในสหรัฐอเมริกา คือวัคซีนที่ผลิตจากสเตรน BUK ซึ่งได้จากเชื้อท้องที่ที่มีความรุนแรงและผ่านเชื้อในไข่ไก่ฟักกว่า 100 passages เป็นผลทำให้ลดความรุนแรงต่อสุกร (Skoda et al., 1964) วัคซีนสเตรน BUK ได้รับการพิสูจน์ว่า มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกร สุกรที่ได้รับวัคซีนจะสร้างแอนติบอดี้ในระดับที่ต่ำนานหลายเดือน (Wright et al., 1984) และสามารถป้องกันอาการทางคลินิค แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้ได้ทั้งหมด สัตว์ที่ได้รับวัคซีน ยังคงติดเชื้อท้องที่ได้และขับเชื้อไวรัสออกเป็นครั้งคราว (Baskerville et al., 1973) (Donaldson et al., 1985) (McFerran et al., 1979)(Sabo, 1969) วัคซีนเชื้อเป็นสเตรน K หรือ Bartha เป็นเชื้อที่แยกได้จากท้องที่ และลดความรุนแรงลง โดยผ่านเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (Bartha, 1961) ไม่มีความรุนแรงต่อสุกร แต่กระตุ้นความคุ้มโรคให้สุกรต่อเชื้อฉีดพิษทับ (Kojnok and Bartha, 1962) วัคซีนเชื้อเป็นมีความได้เปรียบในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบล้อเลียนธรรมชาติ โดยการเพิ่มจำนวนในโฮสต์ วัคซีนเชื้อเป็นมักจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ที่อยู่ได้นานกว่าและเป็นการสร้างแอนติบอดี้ตรงทางเข้าของการติดเชื้อตามธรรมชาติ ถ้าใช้วัคซีนตรงตำแหน่งนั้น การให้วัคซีนสเตรน Bartha ทางช่องจมูก (intranasal vaccination) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อพิษทับได้ดีกว่า การให้วัคซีนเชื้อเป็นหรือเชื้อตายทาง parenteral route จะช่วยลดระยะเวลาการขับออกของเชื้อไวรัสหลังการติดเชื้อท้องที่หรือการทดลองให้เชื้อพิษทับ และสามารถใช้ในสุกรที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับที่ต่ำ (Van Oirschot and Deleeuw, 1985) วัคซีนเชื้อเป็นจึงเป็นทางเลือกสำหรับการควบคุมอาการทางคลินิคในสุกร ซึ่งเกิดจากการระบาดของโรคออเจสกี้ชนิดเฉียบพลัน วัคซีนเชื้อเป็น ต้องการการเพิ่มจำนวนในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ เพื่อผลิตปริมาณแอนติเจนให้เพียงพอ สำหรับนำไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน วัคซีนเชื้อเป็นอาจจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวัคซีนเชื้อตายเมื่อให้แก่สัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันอยู่แล้ว (Ormiston, 1990)

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 ได้มีการนำเข้าวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ ในการป้องกันและกำจัดโรคในฟาร์มสุกรพันธุ์และสุกรขุน การทดลองครั้งนี้ก็เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดต่าง ๆ ซึ่งนำเข้ามาใช้ในประเทศไทย

## อุปกรณ์และวิธีการ

**สัตว์ทดลอง** - สุกรพันธุ์ผสมสามสายพันธุ์ (Large White, Landrace and Duroc Jersey) จากฟาร์มที่ปลอดจากการติดเชื้อโรคออเจสกี้ และไม่ได้ฉีดวัคซีน อายุ 8 สัปดาห์

**วัคซีน** - วัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น จำนวน 13 ตัวอย่าง ผลิตจาก

(1) ไวรัส สเตรน BUK-TK/650A เพาะเลี้ยงใน chick embryo fibroblast (CEF)

(2) ไวรัส สเตรน BUK-100-18MS เพาะเลี้ยงใน bovine kidney cell line (MDBK)

(3) ไวรัสสเตรน BUK ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine cell line (NL-ST-1)

(4) ไวรัส สเตรน NIA3-783 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine kidney cell line ($PD_5$)

(5) ไวรัส สเตรน Begonia ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine kidney cell line ($SK_6$)

(6) ไวรัสสเตรน Begonia ชนิดตัดยีนส์ที่สร้างเอ็นไซม์ไทมิดีนไคเนส และไกลโคโปรตีนวัน ($TK^-$, $gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine kidney cell line ($SK_6$)

(7) ไวรัส สเตรน PRV ชนิดตัดยีนส์ที่สร้าง เอ็นไซม์ไทมิดีนไคเนส และไกลโคโปรตีนเอ็กซ์ ($TK^-$, $gX^-$) เพาะเลี้ยงใน diploid porcine kidney cell line (PK)

(8) ไวรัส สเตรน Bartha-K61 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine kidney cell line (PK-15)

(9) ไวรัส สเตรน Bartha-K61 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน porcine kidney cell line ($PD_5$)

(10) ไวรัส สเตรน A-26 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน lamb foetus heart cell (IC01)

(11) ไวรัสสเตรน SPRV-013 ชนิดตัดยีนส์ที่สร้างเอ็นไซม์ไทมิดีนไคเนส และไกลโคโปรตีนเอ็กซ์($TK^-$, $gX^-$) เพาะเลี้ยงใน Vero cell

(12) ไวรัสสเตรน PRV-155 ชนิดตัดยีนส์ที่สร้างเอ็นไซม์ไทมิดีนไคเนส, ไกลโคโปรตีนเอ็กซ์ และไกลโคโปรตีนวัน ($TK^-$, $gX^-$, $gI^-$) เพาะเลี้ยงใน Vero cell

(13) ไวรัส สเตรน Bartha-K61 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงใน rabbit kidney cell line (RK-13)

**ไวรัส** - เชื้อไวรัส ที่ใช้ในการฉีดพิษทับ และการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ในซีรั่ม เป็นเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้สเตรนนครปฐม ที่แยกได้จากสุกรป่วยในท้องที่จังหวัดนครปฐม ผ่านในสุกร 1 passage ผ่านในกระต่าย 1 passage และผ่านใน porcine kidney cell line (PK-15) 3 passages แบ่งใส่ vial และเก็บที่อุณหภูมิ -80 ° C.

**การตรวจหาระดับแอนติบอดี้โดยวิธีซีรั่มนิวตรอลไลเซชั่น**

**ตรวจหาระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้** ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ โดยวิธี**ซีรั่มนิวตรอลไลเซชั่น** (จารุณี และคณะ, 2533) ตามวิธีการดังนี้

1. นำซีรั่มสุกรไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56° C นาน 30 นาที
2. เจือจางซีรั่มแบบ 2 เท่า โดยทำในไมโครเพลทขนิด 96 หลุม แต่ละความเจือจางทำใน 2 หลุม ๆ ละ 0.05 ซี.ซี.
3. เติมไวรัสโรคออเจสกี้หลุมละ 0.05 ซี.ซี. โดยมีปริมาณไวรัส 200 $TCID_{50}$
4. ผสมโดยใช้เครื่องเขย่าเพลท แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 1 ชั่วโมง
5. เติม PK-15 cell suspension ปริมาณ $10^5$ เซลล์/ซี.ซี. หลุมละ 0.1 ซี.ซี. แล้วปิดเพลทให้สนิทด้วย plate sealer นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 วัน
6. ตรวจดู CPE ทุกวันนาน 5 วัน และคำนวนค่าระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938) ระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ในซีรั่ม คือ ส่วนกลับของความเจือจางสูงสุดของซีรั่ม ที่คงมีแอนติบอดี้ ที่สามารถนิวตรอลไลซ์เชื้อไวรัสได้ 50% (50% end point)

## การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันโดยวิธีอีไลซ่า

ตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน โดยวิธีอีไลซ่า (จารุณีและสุนีจิต, 2534) โดยใช้ชุดตรวจสอบอีไลซ่า (Pseudorabies Virus Antibody Test Kit ClinEase - PRV) และ อ่านผลโดยการคำนวณค่า S/C ratio ตามสูตรดังนี้

$$S/C\ Ratio = 2.0 \times \frac{(\bar{X}\ O.D.\ Sample - \bar{X}\ O.D.\ Negative)}{(\bar{X}\ O.D.\ Positive - \bar{X}\ O.D.\ Negative)}$$

ซีรั่มสุกรตัวอย่างที่มีค่า S/C Ratio เท่ากับ หรือมากกว่า 1.0 อ่านผลเป็นบวก (positive sample)

ซีรั่มตัวอย่าง ที่มีค่า S/C Ratio น้อยกว่า 1.0 อ่านผลเป็นลบ (negative sample)

ถ้าค่า S/C Ratio อยู่ระหว่าง 0.8 และ 1.0 ควรจะพิจารณาคาดว่าอาจเป็นตัว positive ได้ จะต้องตรวจซ้ำโดยเจาะเลือดมาตรวจซ้ำอีกครั้ง

<u>การทดลองที่ 1</u> เป็นการตรวจหาปริมาณไวรัสในวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยเจือจางเชื้อไวรัสแบบ 10 เท่า ใส่เชื้อไวรัสแต่ละความเจือจาง ลงในไมโครเพลท จำนวน 8 หลุม ๆ ละ 0.05 ซี.ซี. เติม PK-15 cell suspension ซึ่งมีปริมาณเซลล์ $10^5$ เซลล์/ซี.ซี. หลุมละ 0.1 ซี.ซี. แล้วปิดไมโครเพลท ด้วย plate sealer นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37° Cนาน 5 วัน โดยตรวจดู CPE ทุกวัน เมื่อครบ 5 วันคำนวณค่า $TCID_{50}$ ตามวิธีของ Reed และ Muench(1938) ปริมาณไวรัส คือส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิด CPE 50%

การทดลองที่ 2 เป็นการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรของวัคซีนสเตรน BUK-TK/650A (1) และวัคซีนสเตรน BUK-100-18MS(2) โดยใช้สุกรกลุ่มละ 8 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามตัวละ 1 โด๊ส และมีสุกรกลุ่มละ 5 ตัว ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม ฉีดพิษทับให้สุกรทุกตัวหลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ สังเกตอาการหลังฉีดพิษทับนาน 14 วัน

การทดลองที่ 3 เป็นการทดสอบความคุ้มโรคในสุกร ของวัคซีนสเตรน BUK, $gI^-$ (3) และวัคซีนสเตรน NIA3-783, $gI^-$ (4) โดยใช้สุกรกลุ่มละ 5 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามตัวละ 1 โด๊ส และมีสุกรกลุ่มละ 5 ตัว ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม ฉีดพิษทับให้สุกรทุกตัวหลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ สังเกตอาการหลังฉีดพิษทับนาน 14 วัน

การทดลองที่ 4 เป็นการทดสอบความคุ้มโรคในสุกร ของวัคซีนสเตรน Begonia, $gI^-$ (5) วัคซีนสเตรน Begonia, $TK^-$, $gI^-$ (6) วัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (8) วัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (9) วัคซีนสเตรน A-26, $gI^-$ (10) วัคซีนสเตรน SPRV-013, $TK^-$, $gX^-$ (11) วัคซีนสเตรน PRV-155, $TK^-$, $gX^-$, $gI^-$ (12) และวัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (13) โดยใช้สุกรกลุ่มละ 5 ตัว ฉีดวัคซีนเข้าใต้หนังตัวละ 1 โด๊ส และมีสุกรกลุ่มละ 5 ตัว ซึ่งไม่ได้ฉีดวัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม ฉีดพิษทับให้สุกรทุกตัวหลังฉีดวัคซีน 5 สัปดาห์ สังเกตอาการหลังฉีดพิษทับนาน 21 วัน

การทดลองที่ 5 เป็นการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรของวัคซีนสเตรน PRV, $TK^-$, $gI^-$ (7) โดยใช้สุกรจำนวน 4 ตัว ฉีดวัคซีนเข้ากล้ามตัวละ 1 โด๊ส สุกรอีก 5 ตัว ไม่ได้ฉีดวัคซีนและเป็นกลุ่มควบคุม ฉีดพิษทับให้สุกรทุกตัวหลังฉีดวัคซีน 5 สัปดาห์ และสังเกตอาการ 21 วัน

หมายเหตุ ในการฉีดพิษทับให้สุกรทุกกลุ่มการทดลอง (การทดลองที่ 2-5) ใช้เชื้อไวรัสโรคออเจสกี้สเตรนนครปฐมในขนาด $10^7$ $TCID_{50}$ หยอดเข้าช่องจมูก ทำการเจาะเลือดก่อนฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีนและหลังฉีดพิษทับ นำไปตรวจหาระดับนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ และตรวจหาเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูก หลังการฉีดพิษทับ วันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 เมื่อครบกำหนด 21 วัน นำสุกรที่เหลือทุกตัว ผ่าชากตรวจดูรอยโรคตามอวัยวะต่าง ๆ และตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการผ่านเชื้อในเซลล์ PK-15 ในการทดสอบวัคซีนสเตรน BUK, $gI^-$ (3) วัคซีนสเตรน NIA3-783, $gI^-$ (4) วัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (8) และวัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (9) ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันโดยวิธีอีไลซ่าด้วย

## ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาปริมาณไวรัส ของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น จำนวน 13 ตัวอย่าง ปรากฏว่าวัคซีนทุกชนิดมีปริมาณไวรัสเท่ากับหรือสูงกว่าปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนดและสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยอาเซียน ซึ่งกำหนดไว้ไม่ต่ำกว่า $10^{2.5}$ $TCID_{50}$/dose (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น ปรากฏว่า วัคซีนสเตรน BUK-TK/650A (1) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้โดยมีค่าเฉลี่ยของระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ หลังฉีดวัคซีน 2 และ 6 สัปดาห์ เท่ากับ

3.8 และ 8.7 ตามลำดับ และหลังฉีดพิษทับ 7 วัน เท่ากับ 86.6 (ตารางที่ 3) สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัว มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรในกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรง โดยมีอัตราการตาย 40% ตรวจพบรอยโรค และตรวจแยกเชื้อไวรัส ได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูกในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

วัคซีนสเตรน BUK-100-18MS(2) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้โดยมีค่าเฉลี่ยของระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้หลังฉีดวัคซีน 2 และ 6สัปดาห์ เท่ากับ 1.7 และ 4.2 ตามลำดับ และหลังฉีดพิษทับ 7 วัน เท่ากับ 64 (ตารางที่ 3) สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยตรวจพบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่าง ๆ ได้จากสุกร 1 ใน 8 ตัว และตรวจพบเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูก ได้จากสุกร 6 ใน 8 ตัว ในขณะที่ สุกรในกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรง โดยมีอัตราการตาย 40% ตรวจพบรอยโรคและตรวจแยกเชื้อไวรัส ได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูกในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

วัคซีนสเตรน BUK, $gI^-$ (3) และสเตรน NIA3-783, $gI^-$ (4) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ โดยมีค่าเฉลี่ย ของระดับ ซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ หลังฉีดวัคซีน 2 สัปดาห์ เท่ากัน คือ 2.4 หลังฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ เท่ากับ 4 และ 3.6 ตามลำดับ และหลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ เท่ากัน คือ 6.4 ผลการตรวจซีรั่มสุกรโดยวิธีอีไลซ่า ปรากฏว่า หลังฉีดวัคซีน 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ทุกตัวอย่างซีรั่ม มีค่า S/C Ratio ต่ำกว่า 1.0 (ตารางที่ 3 และ 4) สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัว มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรงโดยมีอัตราการตาย 40% ตรวจพบรอยโรค และตรวจแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก ในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

วัคซีนสเตรน **Begonia**, $gI^-$ (5) สเตรน **Begonia**, $TK^-$, $gI^-$ (6) สเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (8) สเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (9) สเตรน A-26, $gI^-$ (10) สเตรน SPRV-013, $TK^-$, $gX^-$ (11) สเตรน PRV-155, $TK^-$, $gX^-$, $gI^-$ (12) และสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ (13) ให้ความคุ้มโรคต่อไวรัสโรคออเจสกี้ สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรในกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรง โดยมีอัตราการตาย 40% ตรวจพบรอยโรค และตรวจแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูกในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

วัคซีนสเตรน PRV, $TK^-$, $gX^-$ (7) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ โดยมีค่าเฉลี่ย ของระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ หลังฉีดวัคซีน 2 และ 5 สัปดาห์ เท่ากับ 4 และ 22.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัว มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆรวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรในกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรง โดยมีอัตราการตาย 20% ตรวจพบรอยโรคและตรวจแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูกในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

วัคซีนสเตรน Bartha - K61, gI⁻ (8) ผสมสารละลายของเหลว หยอดเข้าช่องจมูกหรือฉีดเข้ากล้าม หรือผสมสารละลายน้ำมันฉีดเข้ากล้าม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ โดยมีค่าเฉลี่ยของระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้หลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ เท่ากับ 2, 6.4 และ 3.6 ตามลำดับ และหลังฉีดพิษทับ 2 สัปดาห์ เท่ากับ 25.6, 51.2 และ 28.8 ตามลำดับ ในขณะที่วัคซีนสเตรน Bartha-K61, gI⁻ (9) ผสมสารละลายของเหลว หรือผสมสารละลายน้ำมัน เมื่อฉีดเข้ากล้าม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ โดยมีค่าเฉลี่ยของระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ หลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ เท่ากับ 3.6 และ 4.4 ตามลำดับ และหลังฉีดพิษทับ 2 สัปดาห์ เท่ากับ 30.4 และ 35.2 ตามลำดับ ผลการตรวจซีรั่มสุกรโดยวิธีอีไลซ่าปรากฏว่า หลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ ทุกตัวอย่างซีรั่มมีค่า S/C Ratio ต่ำกว่า 1.0 และหลังฉีดพิษทับ 2 สัปดาห์ ทุกตัวอย่างซีรั่ม มีค่า S/C Ratio สูงกว่า 1.0 (ตารางที่ 5) สุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับโดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูก ในขณะที่ สุกรกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยรุนแรง โดยมีอัตราการตาย 40% ตรวจพบรอยโรค และตรวจแยกเชื้อไวรัส ได้จากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก ในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 1:** ผลการตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสในวัคซีน และปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนด ของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดต่างๆ

| ลำดับที่ | สเตรนของวัคซีน | * ปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนด | * ปริมาณไวรัสในวัคซีน |
|---|---|---|---|
| 1 | BUK-TK/650 | 5.0 | 6.5 |
| 2 | BUK-100-18MS | 2.8 | 4.0 |
| 3 | BUK,gI- | 5.0 | 6.5 |
| 4 | NIA3-783 | 5.5 | 5.5 |
| 5 | BEGONIA,gI- | 5.0 | 6.5 |
| 6 | BEGONIA,TK-,gI- | 4.5 | 5.0 |
| 7 | PRV,TK-,gX- | 4.5 | 4.5 |
| 8 | BARTHA-K61 | 5.5 | 5.5 |
| 9 | BARTHA-K61 | 5.5 | 5.5 |
| 10 | A-26,gI- | 5.3 | 5.5 |
| 11 | SPRV-013 | 4.2 | 5.5 |
| 12 | PRV-155 | 4.7 | 5.0 |
| 13 | BARTHA-K61 | 5.5 | 5.5 |

หมายเหตุ * Log $TCID_{50}$/dose

**ตารางที่ 2:** ผลการทดสอบความคุ้มโรคในสุกรของวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้ เชื้อเป็นชนิดต่างๆ

| ลำดับที่ | สเตรนของวัคซีน | การตรวจพบเชื้อไวรัสและอัตราการตายในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนหลังการฉีดพิษทับ | | | การตรวจพบเชื้อไวรัสและอัตราการตายในกลุ่มควบคุมหลังการฉีดพิษทับ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | จากอวัยวะ | จากช่องจมูก | อัตราการตาย | จากอวัยวะ | จากช่องจมูก | อัตราการตาย |
| 1 | BUK-TK/650A | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 2 | BUK-100-18MS | 1/8 | 6/8 | 0/8 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 3 | BUK, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 4 | NIA3-783, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 5 | BEGONIA, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 6 | BEGONIA, TK-, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 7 | PRV, TK-, gX- | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 5/5 | 5/5 | 1/5 |
| 8 | BARTHA-K61, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 9 | BARTHA-K61, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 10 | A-26, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 11 | SPRV-013,TK-,gX- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 12 | PRV-155,TK-,gX-,gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| 13 | BARTHA-K61, gI- | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |

**ตารางที่ 3:** ผลการตรวจหาระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ในสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นชนิดต่างๆ

| สเตรนของวัคซีน | ค่าเฉลี่ยระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ก่อนฉีดวัคซีน | หลังฉีดวัคซีน (สัปดาห์ที่) | | | | หลังฉีดพิษทับ (วันที่) | |
| | | 2 | 4 | 5* | 6* | 7 | 14 |
| BUK-TK/650A (1) | < 2 | 3.8 | ND | ND | 8.7 | 86.6 | ND |
| BUK-100-18MS (2) | < 2 | 1.7 | ND | ND | 4.2 | 64.0 | ND |
| BUK, gI- (3) | < 2 | 2.4 | 4 | ND | 6.4 | ND | ND |
| NIA3-783, gI- (4) | < 2 | 2.4 | 3.6 | ND | 6.4 | ND | ND |
| PRV, TK-, gX- (7) | < 2 | 4.0 | ND | 22.6 | ND | ND | 22.6 |
| BARTHA-K61, gI- (8) | < 2 | ND | ND | ND | 6.4 | ND | 51.2 |
| BARTHA-K61, gI- (9) | < 2 | ND | ND | ND | 3.6 | ND | 30.4 |

* หลังฉีดวัคซีน 5 หรือ 6 สัปดาห์ ฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้สเตรนนครปฐม ในขนาด $10^7$ $TCID_{50}$ โดยการหยอดเข้าช่องจมูก

ND = ไม่ได้ตรวจ

**ตารางที่ 4:** ผลการตรวจหา แอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน และระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ ในสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น สเตรน BUK ($gI^-$) และสเตรน NIA3-783 (gI-)

| สเตรนของวัคซีน | ค่าเฉลี่ย S/C Ratio | | | ค่าเฉลี่ย SN Titer | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | หลังฉีดวัคซีนสัปดาห์ที่ | | | หลังฉีดวัคซีนสัปดาห์ที่ | | |
| | 2 | 4 | 6 | 2 | 4 | 6 |
| BUK, gI- | .064 ±.06 | .121 ±.13 | .115 ±.04 | 2.4± .89 | 4±2.45 | 6.4±2.19 |
| NIA3-783 | .139 ±.06 | .063 ±.03 | .091 ±.03 | 2.4±1.67 | 3.6±2.61 | 6.4±2.19 |
| กลุ่มควบคุม | .012 ±.01 | .019 ±.01 | .132 ±.07 | < 2±0 | < 2±0 | < 2±0 |

**ตารางที่ 5:** ผลการตรวจหา แอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน และระดับชีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ ในสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นสเตรน Bartha-K61 ชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ($gI^-$) เพาะเลี้ยงในเซลล์ PK-15 และเซลล์ $PD_5$ เมื่อใช้น้ำยาละลายชนิดของเหลวหรือน้ำมัน

| ชนิดของเซลล์ที่ใช้เตรียมวัคซีน | ชนิดของน้ำยาละลาย | วิธีให้วัคซีน | ค่าเฉลี่ย S/C Ratio | | ค่าเฉลี่ย SN titer | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | หลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ | หลังฉีดพิษทับ 2 สัปดาห์ | หลังฉีดวัคซีน 6 สัปดาห์ | หลังฉีดพิษทับ 2 สัปดาห์ |
| PK-15 | Fluid | หยอดจมูก | .005 ±.08 | 1.523±.33 | 2.0 ± 0 | 25.6 ±8.76 |
| PK-15 | Fluid | เข้ากล้าม | .054 ±.03 | 1.563±.33 | 6.4±2.19 | 51.2217.53 |
| PK-15 | Oil | เข้ากล้าม | .053 ±.02 | 1.832±.29 | 3.6±0.89 | 28.8 27.15 |
| PD5 | Fluid | เข้ากล้าม | .047 ±.04 | 1.839±.60 | 3.622.97 | 30.4±21.47 |
| PD5 | Oil | เข้ากล้าม | .186 ±.18 | 1.397±.07 | 4.4t2.19 | 35.2±17.53 |
| กลุ่มควบคุม | - | ไม่ได้ฉีด | .015 ±.01 | 1.673f.20 | < 2 ± 0 | 3.6 ±2.61 |

## วิจารณ์

วัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้ง 13 ตัวอย่าง มีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/dose ซึ่งเท่ากับหรือสูงกว่า ปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนด และสูงกว่ามาตรฐานของอาเซียน ซึ่งกำหนดไว้ว่า ไม่ต่ำกว่า $10^{2.5}$ $TCID_{50}$/dose (Asean Standard of Vaccines, 1991) ซึ่งปริมาณไวรัสในวัคซีนเชื้อเป็นนี้มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของวัคซีนด้วย เนื่องจากวัคซีนเชื้อเป็นต้องการการเพิ่มจำนวนในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ เพื่อผลิตปริมาณแอนติเจนให้เพียงพอ สำหรับนำไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ถ้ามีปริมาณไวรัสในวัคซีนต่ำเกินไป เมื่อให้แก่สัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันอยู่แล้ว วัคซีนเชื้อเป็น อาจมีประสิทธิภาพลดลง (Ormiston, 1990)

วัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น สเตรน BUK-TK/650A และสเตรน BUK-100-18MS สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ ต่อไวรัสโรคออเจสกี้ ได้ในระดับที่ต่ำ ซึ่ง Wright และคณะ (1984) ก็ได้รายงานไว้ว่า สุกรที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน BUK จะสร้างแอนติบอดี้ในระดับที่ต่ำนานหลายเดือน สุกรที่ฉีดวัคซีนสเตรน BUK-TK/650Aทกตัว มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกมาทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรที่ได้รับวัคซีนสเตรน BUK-100-18MS จำนวน 1 ใน 8 ตัว ตรวจพบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ และตรวจพบเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูกจากสุกรจำนวน 6 ใน 8 ตัว โดยสุกรในกลุ่มควบคุม แสดงอาการป่วยรุนแรง และมีอัตรา

การตาย 40% และตรวจพบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับทางช่องจมูก ในสุกรกลุ่มควบคุมทุกตัว แสดงว่า วัคซีนเชื้อเป็นทั้งสองชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการช่วยลดอาการทางคลินิคและลดการขับออกของเชื้อฉีดพิษทับ โดยวัคซีน สเตรน BUK-TK/650A มีประสิทธิภาพดีกว่าวัคซีนสเตรน BUK-100-18MS สุกรที่ฉีดวัคซีนสเตรน BUK, gI⁻ และวัคซีนสเตรน NIA3-783, gI⁻ เมื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน โดยวิธีอีไลซ่า มีค่า S/C Ratio ต่ำกว่า 1.0 แสดงว่าไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน

สุกรขุนที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็นถึงแม้ว่าจะกระตุ้นระดับซีรั่มแอนติบอดี้ที่ต่ำ แต่ก็มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ โดยสุกรทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงหลังการฉีดพิษทับ ซึ่ง Martin และคณะ (1986) ก็ได้รายงานไว้ว่า การตอบสนองของแอนติบอดี้ในสุกรที่ฉีดวัคซีนไม่สัมพันธ์กับความคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโรคออเจสกี้ที่รุนแรง อย่างไรก็ตาม การให้วัคซีนเชื้อเป็นจะกระตุ้นความคุ้มในระดับเซลล์(CMIR) ถึงแม้ว่าจะกระตุ้นระดับซีรั่มนิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ที่ต่ำแต่ก็สามารถให้ความคุ้มโรคแก่สุกร และ Ormiston (1990) ก็ได้รายงานไว้ว่า วัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบล้อเลียนการติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยการเติมจำนวนในโฮสต์ และกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ได้นาน วัคซีนเชื้อเป็นจึงเหมาะสม ที่จะใช้ในการต่อต้าน การระบาดของโรคออเจสกี้ชนิดเฉียบพลัน ในท้องที่

วัคซีนสเตรน Bartha-K61 เพาะเลี้ยงในเซลล์ PK-15 ซึ่งผสมสารละลายของเหลว เมื่อฉีดเข้ากล้าม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ ได้สูงกว่าการหยอดเข้าจมูก และสูงกว่าการผสมวัคซีนในสารละลายน้ำมัน ในขณะที่ วัคซีนสเตรน Bartha - K61 เพาะเลี้ยงในเซลล์ $PD_5$ เมื่อผสมกับสารละลายของเหลวและฉีดเข้ากล้าม จะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ ได้ในระดับที่ต่ำกว่าการผสมวัคซีนในสารละลายน้ำมัน แสดงว่า ชนิดของสารละลายและวิธีการให้วัคซีน มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ในสุกรที่ได้รับวัคซีน อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานไว้ว่า แอดจูแวนท์ มีความจำเป็นสำหรับการสร้างแอนติบอดี้ให้มีความเข้มข้นมากขึ้น และอาจทำหน้าที่ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ ในรูปของ macrophages และ T cells (Platt, 1984)(Sharpee et al.,1986) แต่ Van Oirschot และ Deleeuw (1985) ก็รายงานไว้ว่า การให้วัคซีน Bartha strain โดยการหยอดจมูก สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฉีดพิษทับได้ดีกว่า การให้วัคซีนเชื้อเป็นหรือเชื้อตายทาง parenteral route ระดับซีรั่มแอนติบอดี้หลังฉีดพิษทับ ในสุกรทุกตัวสูงกว่าก่อนฉีดพิษทับมาก แสดงว่า เมื่อสุกรที่ฉีดวัคซีนได้รับเชื้อฉีดพิษทับเข้าไป เชื้อไวรัสจะเข้าไปช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดี้มากขึ้น จากผลการตรวจซีรั่มสุกรหลังฉีดวัคซีนเชื้อเป็นทั้งสองชนิดนี้ โดยวิธีอีไลซ่า ค่า S/C Ratio ของทุกซีรั่มตัวอย่าง ต่ำกว่า 1.0 แสดงว่าไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันหลังฉีดวัคซีน ในขณะที่ค่า S/C Ratio ของทุกตัวอย่างซีรั่ม หลังฉีดพิษทับสูงกว่า 1.0 แสดงว่า มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันหลังฉีดพิษทับ ทำให้สามารถใช้วิธีอีไลซ่า ในการตรวจแยกระหว่างสุกรที่ฉีดวัคซีนแต่ไม่ติดเชื้อ กับสุกรที่ติดเชื้อท้องที่ไวรัสโรคออเจสกี้

## สรุป

วัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อเป็น ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้ง 13 ตัวอย่าง มีปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/dose ซึ่งเท่ากับหรือสูงกว่าปริมาณขั้นต่ำที่ผู้ผลิตกำหนด และสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยอาเซี่ยน วัคซีนเชื้อเป็น สเตรน BUK-TK/650A และสเตรน BUK-100-18MS กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ได้ในระดับที่ต่ำโดยสุกรที่ฉีดวัคซีนทุกตัวมีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ สุกรที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็น สเตรน BUK-TK/650A ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับทางช่องจมูก ในขณะที่สุกรที่ฉีดวัคซีนสเตรน BUK-100-18MS สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ ได้จากสุกร 1 ใน 8 ตัว และตรวจพบเชื้อไวรัสที่ขับทางช่องจมูกจากสุกร 6 ใน 8 ตัว สุกรที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน BUK, $gI^-$ และสเตรน NIA3-783, $gI^-$ ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดตัดยีนส์ไกลโคโปรตีนวัน ตรวจไม่พบแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน จึงสามารถใช้ในการตรวจแยกสุกรที่ฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อกับสุกรที่ติดเชื้อท้องที่ โดยสุกรที่ฉีดวัคซีน ถูกกระตุ้นการสร้าง นิวตรอลไลซิ่งแอนติบอดี้ได้ในระดับค่อนข้างต่ำแต่มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก สุกรที่ฉีดวัคซีนสเตรน Begonia, $gI^-$ สเตรน Begonia, $TK^-$, $gI^-$ สเตรน PRV, $TK^-$, $gX^-$ สเตรน A-26, $gI^-$ สเตรน SPRV-013, $TK^-$, $gX^-$ สเตรน PRV-155, TK-, $gX^-$, $gI^-$ และ สเตรน Bartha-K61, $gI^-$ มีความคุ้มโรคต่อเชื้อฉีดพิษทับ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ขับออกทางช่องจมูก วัคซีนสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ เตรียมในเซลล์ PK-15 เมื่อผสมสารละลายของเหลวและฉีดเข้ากล้าม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ได้สูงกว่าการหยอดเข้าจมูก และสูงกว่าการผสมวัคซีนในสารละลายน้ำมันและฉีดเข้ากล้าม ในขณะที่วัคซีนเชื้อเป็นสเตรน Bartha-K61, $gI^-$ เตรียมในเซลล์ $PD_5$ เมื่อผสมกับสารละลายของเหลวและฉีดเข้ากล้าม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ได้ต่ำกว่าการผสมวัคซีนในสารละลายน้ำมันและฉีดเข้ากล้าม สุกรทุกตัว ไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันหลังฉีดวัคซีน แต่มีการสร้างแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน หลังฉีดพิษทับ ทำให้สามารถ ตรวจแยกสุกรที่ฉีดวัคซีนแต่ไม่ติดเชื้อ กับสุกรที่ติดเชื้อท้องที่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมและกำจัดโรคออเจสกี้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ท่านอธิบดีกรมปศุสัตว์ และท่านผู้อำนวยการกองผลิตชีวภัณฑ์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย พนักงานศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ ที่ช่วยในการเจาะเลือดและช่วยงานในห้องปฏิบัติการ นายสัตวแพทย์ อัตพงศ์ นาคะปักษิณ และนายสัตวแพทย์ สิทธิพร อนันต์จินดาที่ช่วยในการจัดพิมพ์ต้นฉบับ คณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ และท่านผู้เชี่ยวชาญ แอบ คงทน ที่ช่วยในการตรวจแก้ไขต้นฉบับ

# เอกสารอ้างอิง


จารุณี สาตราและสุนีจิต คงทน 1991 (2534) การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวัน ของไวรัสโรคออเจสกี้โดยวิธีอีไลซ่า (1) การใช้ ClinEase-PRV เพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไกลโคโปรตีนวันสำหรับการตรวจแยกทางซีรั่มวิทยาระหว่างสุกรที่ติดเชื้อและสุกรที่ฉีดวัคซีนหรือไม่ติดเชื้อ รายงานวิจัย การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ : 131-145.

จารุณี สาตรา วรรณวิมล ทองคง และ สุนีจิต คงทน 1990 (2533) การศึกษาเชิงเปรียบเทียบวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้ชนิดต่างๆ III ผลการตรวจสอบวัคซีนป้องกันโรคออเจสกี้เชื้อตาย 4 ชนิด เวชสารสัตวแพทย์ 20 (4): 497-511.

Asean Report of the fourth AD - HOC Meeting Standard of Vaccine. Jakarta, Indonesia, 1991.

Bartha, A. 1961. Attempts at attenuating the virulence of Aujeszky's disease. Magy Allatory Lab., 16: 42-45.

Baskerville, A., McFerran, J. B. and Dow, C. 1973. Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull., 43:465-480.

Donaldson, A. I., Wardley, P. C., Martin, S. and Harkness, J. W. 1985. Influence of vaccination on Aujeszky's disease virus and transmission. Vet. Rec., 115:121-124.

Kojnok, J. and Bartha, A. 1962. Immunization experience with attenuated Aujeszky's disease, virus. Magy Allatory Lab., 17: 19-20.

Martin, S., Wardley, R. C. and Donaldson, A. I. 1986. Functional antibody responses in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. Research in Veterinary Science., 41: 331-335.

McFerran, J. B., Dow, C. and McCeracken, R. M. 1979. Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2: 327-334.

Ormiston, R. R.1990. Pros and cons of inactivated, attenuated and genetically engineered Aujeszky's disease vaccines. OIE-FAVA symposium on the control of major livestock disease in Asia: 51-68.

Platt, K.B.1984. The evaluation of a lectin-agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. Vet. Microbiol., 9: 35-51.

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

Sabo, A. 1969. Persistence of per orally administered virulence pseudorabies virus in organism of non-immune and immunized pigs. Acta. Virol.,13:269-277.

Sharpee, R.L., Nelson, L.D. and Cerber, J.D. 1986. Evaluation of a subunit.vaccine against Aujeszky's disease (pseudorabies) in swine. Proc Int. Pig Vet Soc., :353.

Skoda, R., Brauner, I. and Sadecky, E. 1964. Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. I. Attenuation of virus and some properties of attenuated strains. Acta Virol.,8:1-9.

Van Oirschot, J. T. and Deleeuw, P. W. 1985. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titers. Vet. Microbiol., 10:401-408.

Wright, J. C., Thawley, D. C. and Solorozano, R. F. 1984. Immunoresponse of sows and their offsprings to pseudorabies virus: Serum neutralization response to vaccination and field virus challenge. Can. J. Comp. Med., 48: 184-191.