The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 31
Issue 4 *December, 2001*

Article 2

12-1-2001

ANTIBODY TITRES IN BROILERS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS 4/91 AND MASSACHUSETTS IN THAILAND

Thawat Lekdumrongsak

Jiroj Sasipreeyajan

Prachak Poomvises

Achara Tawatsin

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Lekdumrongsak, Thawat; Sasipreeyajan, Jiroj; Poomvises, Prachak; and Tawatsin, Achara (2001) "ANTIBODY TITRES IN BROILERS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS 4/91 AND MASSACHUSETTS IN THAILAND," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 31: Iss. 4, Article 2.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1861
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol31/iss4/2

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่เนื้อ ในประเทศไทย

ธวัช เล็กดำรงศักดิ์ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ประจักษ์ พุ่มวิเศษ อัจฉรา ธวัชสิน

Abstract

Thawat Lekdumrongsak Jiroj Sasipreeyajan Prachak Poomvises Achara Tawatsin

ANTIBODY TITRES IN BROILERS OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS 4/91 AND MASSACHUSETTS IN THAILAND

Thirty, one-day-old broilers were divided into 3 groups, 10 birds each. Group 1 was vaccinated twice with a live infectious bronchitis virus vaccine, (IBV)-serotype Massachusetts, strain H120 when one day old and a live IBV-strain Massachusetts vaccine when ten days old. Group 2 was vaccinated once with a live IBV-strain Massachusetts vaccine when ten days old. Group 3 were non-vaccinated controls. Blood samples were taken from birds on days 1, 10, 21, 28, 35 and 42. Samples were tested by a virus neutralization(VN) test, for strains 4/91 and Massachusetts(M41) neutralizing antibodies and were tested by an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for IBV antibodies. Samples from broiler farms which were vaccinated once or twice with a live IBV-serotype Massachusetts or strains H120 and Massachusetts vaccines were tested in the same manner on days 28, 35 and 42. The results revealed that experimental broilers which were vaccinated twice with serotype Massachusetts vaccine had higher Massachusetts VN titres than broilers which were vaccinated once. Both vaccinated groups had low 4/91 VN titers. Samples from two broiler farms had levels of Massachusetts and 4/91 VN titres as well as IBV ELISA titres higher than those in the experimental groups. Base on the serological observations, broilers from the two farms may have been infected with field IBV and it still remains uncertain whether IBV strain 4/91 is present in Thailand.

Keywords : Antibody titres, infectious bronchitis virus, broilers, Thailand

Department of Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

ธวัช เล็กดำรงศักดิ์ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ประจักษ์ พุ่มวิเศษ อัจฉรา ธวัชสิน

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่เนื้อ ในประเทศไทย

ไก่เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 30 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มทดลองที่ 1 ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ สเตรน H120 เมื่ออายุ 1 วัน และ สเตรนแมสซาชูเซตส์ เมื่ออายุ 10 วัน กลุ่มทดลองที่ 2 ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น สเตรนแมสซาชูเซตส์ เมื่ออายุ 10 วัน กลุ่มควบคุมไม่ได้รับวัคซีน ตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ (M41) ด้วยวิธี virus neutralization(VN) และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) เมื่อไก่อายุ 1 10 21 28 35 และ 42 วัน และตรวจระดับแอนติบอดีจากตัวอย่างเลือดไก่เนื้อจากฟาร์มที่ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ สเตรน H120 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ 1-2 ครั้ง จำนวน 4 ฟาร์ม แต่ละฟาร์ม เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ๆ ละ 10 ตัวอย่าง เมื่อไก่อายุ 28 35 และ 42 วัน ผลในไก่ทดลองพบว่าการให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ 2 ครั้ง สามารถกระตุ้นให้ไก่ที่มีแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่ไก่ สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ในระดับที่สูงกว่าการให้วัคซีนเพียงครั้งเดียว และสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ด้วยวิธี VN ได้ในระดับต่ำ ผลในไก่เนื้อจากฟาร์ม 2 แห่งตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ และสเตรน 4/91 ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี ELISA สูงกว่าไก่ทดลอง อาจแสดงถึงการได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนอกจากการได้รับวัคซีน และอาจมีการระบาดของเชื้อไวรัส สเตรน 4/91 ในประเทศไทย แต่ไม่สามารถสรุปได้จากการตรวจทางซีรัมวิทยา

คำสำคัญ : ระดับแอนติบอดี ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ไก่เนื้อ ประเทศไทย

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นโรคของระบบทางเดินหายใจ รังไข่ ท่อนำไข่ และไต ในไก่ ปัญหาที่สำคัญ คือ เชื้อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อมีหลายซีโรไทป์ แต่ละซีโรไทป์มีหลายสเตรน เช่น สเตรนแมสซาชูเซตส์ สเตรนฮอลแลนด์(H) และ สเตรน Ma5 อยู่ในซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ สเตรน 4/91 อยู่ในซีโรไทป์ 4/91 เชื้อไวรัสแต่ละสเตรนจะให้ cross immunity ต่อสเตรนอื่นได้ไม่ดีและไม่เหมือนกัน วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนที่ก่อโรคจะป้องกันโรคจากเชื้อไวรัสสเตรนนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งที่ควรทราบในการควบคุมและป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อนอกจากสเตรนของไวรัสที่มีการระบาดในพื้นที่ คือ ประสิทธิภาพของวัคซีนแต่ละชนิดในการป้องกันโรคหลอดลมอักเสบสเตรนต่างๆ

ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อมาเป็นเวลานาน(Chaiyasittiyuthaparn, 1957 cited in Chindavanig, 1962) และพบการระบาดทั่วประเทศ(นิยมศักดิ์และคณะ, 2526; ช้องมาศ และคณะ, 2536) และมีรายงานการตรวจพบซีรัมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 จากตัวอย่างที่เก็บจากสหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน กรีซ เม็กซิโก และประเทศไทย และรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติตรงกับเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 จากตัวอย่างที่เก็บจากสหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ และประเทศไทย(Cook et al., 1996) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการใช้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนดังกล่าวในประเทศไทย และยังไม่มีการรายงานระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสเตรนต่างๆ ในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นโปรแกรมต่างๆ ที่นิยมใช้ในประเทศไทย โดยวิธี virus neutralization(VN) ซึ่งมีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ ของไวรัส(De Wit, 2000)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่เนื้อที่ได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี virus neutraization(VN) ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกชนิดของวัคซีนและโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและป้องกันโรค และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 ในไก่เนื้อในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

1. การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่ทดลอง

ไก่เนื้อคละเพศ พันธุ์ Ross 208 อายุ 1 วัน จำนวน 30 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ให้อาหารและน้ำตลอดเวลา

กลุ่มทดลองที่ 1 ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรน H120 โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 1 วัน และให้วัคซีน หลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 10 วัน

กลุ่มทดลองที่ 2 ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อ เชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 10 วัน

กลุ่มทดลองที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ให้วัคซีน เจาะเลือดไก่กลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน เจาะเลือดไก่กลุ่มควบคุมเมื่ออายุ 1, 10 21, 28, 35 และ 42 วัน ทำการแยกซีรัมจากตัวอย่างเลือด เก็บที่อุณหภูมิลบ 20°ซ. เพื่อรอการตรวจระดับแอนติบอดีต่อไป

2. การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่เนื้อจากฟาร์ม

เจาะเลือดไก่เนื้อที่ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น จำนวน 4 ฟาร์ม แต่ละฟาร์ม เก็บตัวอย่าง 3 ครั้งๆ ละ10 ตัวอย่าง ที่อายุ 28 35 และ 42 วัน

ไก่เนื้อจากฟาร์มมีประวัติดังนี้ คือ ไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres จากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 และ 2 มีประวัติการได้รับวัคซีน คือ อายุ 7 วัน ให้วัคซีนรวมซึ่งประกอบด้วยวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B1 และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรน H120 โดยการหยอดตา อายุ 14 วัน ให้วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชนิดรุนแรง โดยการละลายน้ำ

ไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres จากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี มีประวัติการได้รับวัคซีน คือ อายุ 7 วัน ให้วัคซีนรวมซึ่งประกอบด้วยวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B1 และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา และให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายสเตรน LaSota อายุ 14 วัน ให้

วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชนิดรุนแรง โดยการละลายน้ำ

ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb จากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี มีประวัติการได้รับวัคซีน คือ อายุ 1 วัน ให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน Ulster 2C และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรน H120 โดยการพ่นเป็นละออง อายุ 10 วัน ให้วัคซีนรวมซึ่งประกอบด้วยวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B1 และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรน H120 โดยการหยอดตา และให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายสเตรน LaSota โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง อายุ 15 วัน ให้วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชนิดรุนแรง โดยการละลายน้ำ

3. ตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และ สเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN

นำซีรัมตัวอย่าง positive และ negative IBV serum ไป inactivate โดยการแช่ในอ่างน้ำ 56°ซ. เป็นเวลา 30 นาที

เจือจางซีรัม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ M199/F10 ที่มี FCS 5% ให้มีระดับการเจือจางในหลุมแรกเป็น 1 : 16 โดยใช้ซีรัม 12.5 ไมโครลิตรและอาหารเลี้ยงเซลล์ 187.5 ไมโครลิตร ในหลุมถัดไป เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ทำ two-fold dilution จนถึงหลุมสุดท้าย

เจือจางไวรัสให้ได้ความเข้มข้น 100 $TCID_{50}$ / 50 ไมโครลิตร เติมไวรัสที่เจือจางแล้วลงในซีรัมที่เจือจางแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 60-90 นาที นำ serum-virus mixture 100 ไมโครลิตร ไปเติมลงใน microtiter plate ที่มี primary chick embryo kidney cell(pCEK) monolayer อายุ 2 วัน(รูปที่ 1) นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 3-4 วัน นำไวรัสที่เจือจางแล้วมาทำ ten-fold dilution ในหลอดทดลอง ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} เพื่อทำ back titration (control)

การอ่านผลระดับแอนติบอดีของซีรัม อ่านเป็นส่วนกลับของ dilution ของหลุมที่ซีรัมมีการเจือจางมากที่สุด โดยที่ไวรัสถูก neutralize คือ ไม่เกิด cytopathic effect(CPE-รูปที่ 2) ความเข้มข้นของไวรัสแสดงในรูป log_{10} $TCID_{50}$ / มล.(Reed and Muench, 1938) ไวรัสควรมีความเข้มข้น 100 $TCID_{50}$/50 ไมโครลิตร โดยมีเกณฑ์ความเข้มข้นที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงระหว่าง 30 ถึง 300 $TCID_{50}$/50 ไมโครลิตร negative IBV serum จะต้องมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 0 และ positive IBV serum จะต้องมีระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง±2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับแอนติบอดีมาตรฐานเฉลี่ยจากบริษัทอินเตอร์เวท ประเทศเนเธอร์แลนด์

ระดับแอนติบอดีของซีรัมตัวอย่างที่สามารถ neutralize ไวรัสที่ระดับการเจือจาง 1: 16(ระดับแอนติบอดี 4) หรือมากกว่า ให้ถือเป็นผลบวก

การตรวจระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี ELISA(Kirkegaard & Perry Lab, USA)

ผล

ในไก่ทดลอง ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ซึ่งตรวจด้วยวิธี VN รายงานในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยระดับแอนติบอดีของไก่เมื่ออายุ 1 วัน คือ 7.9±1.1 ลดลงเหลือ 3.8±2.1 และ 0.4±1.3 เมื่ออายุ 10 วัน และ 21 วัน ตามลำดับ ไก่กลุ่มทดลองที่ 1 เมื่ออายุ 28 35 และ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 3.6±2.5, 5.0±1.0 และ 5.8±1.2 ตามลำดับ ไก่กลุ่มทดลองที่ 2 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 3.0±2.1, 3.3±2.3 และ 4.1±2.5 ตามลำดับ ไก่กลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีตั้งแต่อายุ 28 วันจนสิ้นสุดการทดลอง

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ซึ่งตรวจด้วยวิธี VN ของไก่เมื่ออายุ 1 วัน คือ 5.2±2.1 และ ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีเมื่อไก่อายุ 10 วัน ไก่กลุ่มทดลองที่ 1 เมื่ออายุ 28 วัน ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดี และเมื่ออายุ 35 และ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 0.4±1.3 และ 1.7±2.2 ตามลำดับ ไก่กลุ่มทดลองที่ 2 เมื่ออายุ 28 และ 35 วัน ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดี และเมื่อ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 0.9±1.9 ไก่กลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีตั้งแต่อายุ 10 วันจนสิ้นสุดการทดลอง

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ซึ่งตรวจด้วยวิธี ELISA ของไก่เมื่ออายุ 1 วัน คือ 8004±6356 ลดลงเหลือ 199±307 เมื่ออายุ 10 วัน และตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีเมื่ออายุ 21 วัน ไก่กลุ่มทดลองที่ 1 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 294±353, 365±587 และ 857±764 ตามลำดับ ไก่กลุ่มทดลองที่ 2 เมื่ออายุ 28 35 และ 42 วัน ระดับแอนติบอดี คือ 89±154, 199±363 และ 783±1820 ตามลำดับ ไก่กลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีตั้งแต่อายุ 21 วัน จนสิ้นสุดการทดลอง(ตารางที่ 1)

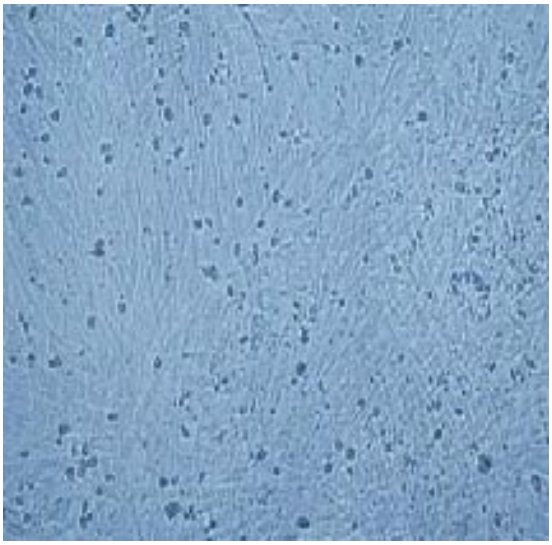
ในไก่เนื้อจากฟาร์ม ระดับแอนติบอดี ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ซึ่งตรวจด้วยวิธี VN ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 3.0±2.1, 3.1±2.8 และ 4.1±2.3 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 2 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 0.9±1.9, 2.3±2.5 และ 3.2±2.3 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 3.0±2.7, 3.8±2.2 และ 5.9±0.7 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 3.1±2.2, 2.7±2.3 และ 6.3±1.2 ตามลำดับ

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ซึ่งตรวจด้วยวิธี VN ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 เมื่ออายุ 28 35 และ 42 วัน คือ 0.8±1.7, 1.4±2.3 และ 1.4±2.3 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 2 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 0.4±1.3, 0.5±1.6 และ 0.5±1.6 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 1.0±2.1, 1.8±2.3 และ 5.1±0.9 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 1.4±2.3, 1.3±2.1 และ 5.6±1.0 ตามลำดับ

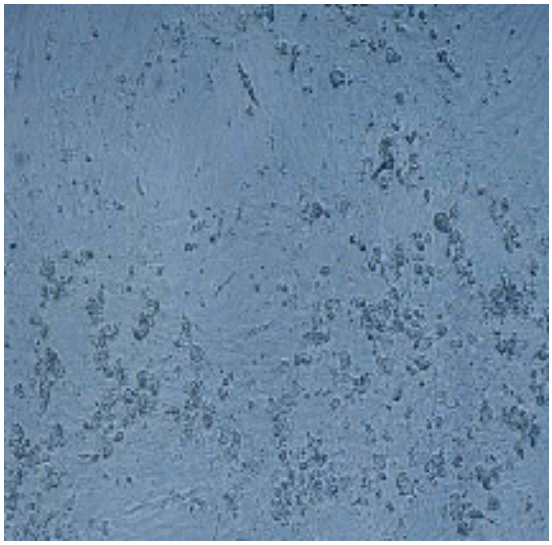
ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ซึ่งตรวจด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 542±679, 1327±2004 และ 993±1218 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์ม ที่ 2 เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 314±823, 676±1169 และ 840±1141 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 2638±5785, 2182±3601 และ 5644±3467 ตามลำดับ ของไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี เมื่ออายุ 28, 35 และ 42 วัน คือ 1082±1397, 828±1072 และ 11717±4656 ตามลำดับ(ตารางที่ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่อายุ 1 วัน ลูกไก่ทดลองมีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN ลดลงตามลำดับ ส่วนระดับแอนติบอดีต่อไวรัส หลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ด้วยวิธี VN ที่อายุ 1 วัน เท่ากับ 5.2±2.1 และตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีที่อายุ 10 วัน เนื่องจากไก่พันธุ์-สายพันธุ์ไก่เนื้อได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น และเชื้อตายหลายครั้ง(ไม่ได้รับวัคซีน



รูปที่ 1 pCEK monolayer ปกติ



รูปที่ 2 pCEK เกิด CPE

ตารางที่ 1 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ และ 4/91 ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA(mean ± SD) ในไก่ทดลอง

กลุ่มทดลองที่/อายุไก่		**ระดับแอนติบอดี วิธี VN**		**วิธี ELISA**
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	**สเตรน 4/91**	
กลุ่มทดลองที่ 1	28 วัน	3.6 ± 2.5	0.0 ± 0.0	294 ± 353
	35 วัน	5.0 ± 1.0	0.4 ± 1.3	365 ± 587
	42 วัน	5.8 ± 1.2	1.7 ± 2.2	857 ± 764
กลุ่มทดลองที่ 2	28 วัน	3.0 ± 2.1	0.0 ± 0.0	89 ± 154
	35 วัน	3.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0	199 ± 363
	42 วัน	4.1 ± 2.5	0.9 ± 1.9	783 ± 1820
กลุ่มควบคุม	1 วัน	7.9 ± 1.1	5.2 ± 2.1	8004 ± 6356
	10 วัน	3.8 ± 2.1	0.0 ± 0.0	199 ± 307
	21 วัน	0.4 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	28 วัน	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	35 วัน	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	42 วัน	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0 ± 0

ตารางที่ 2 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ และ 4/91 ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA ในไก่เนื้อจากฟาร์ม(mean ± SD)

จังหวัด/อายุไก่		ระดับแอนติบอดี วิธี VN		วิธี ELISA
		สเตรนแมสซาชูเซตส์	สเตรน 4/91	
อุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1	28 วัน	3.0 ± 2.1	0.8 ± 1.7	542 ± 679
	35 วัน	3.1 ± 2.8	1.4 ± 2.3	1327 ± 2004
	42 วัน	4.1 ± 2.3	1.4 ± 2.3	993 ± 1218
อุบลราชธานี ฟาร์มที่ 2	28 วัน	0.9 ± 1.9	0.4 ± 1.3	314 ± 823
	35 วัน	2.3 ± 2.5	0.5 ± 1.6	676 ± 1169
	42 วัน	3.2 ± 2.3	0.5 ± 1.6	840 ± 1141
ชลบุรี	28 วัน	3.0 ± 2.7	1.0 ± 2.1	2638 ± 5785
	35 วัน	3.8 ± 2.2	1.8 ± 2.3	2182 ± 3601
	42 วัน	5.9 ± 0.7	5.1 ± 0.9	5644 ± 3467
ลพบุรี	28 วัน	3.1 ± 2.2	1.4 ± 2.3	1082 ± 1397
	35 วัน	2.7 ± 2.3	1.3 ± 2.1	828 ± 1072
	42 วัน	6.3 ± 1.2	5.6 ± 1.0	11717 ± 4656

สเตรน 4/91) และแม่ไก่อาจได้รับเชื้อ IBV นอก จากการได้รับวัคซีน ซึ่งการได้รับเชื้อ IBV หลายครั้ง โดยเฉพาะต่างซีโรไทป์จะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ IBV บางซีโรไทป์ที่ไก่ไม่เคยได้รับมาก่อน(Gelb and Killian, 1987; Karaca and Naqi, 1993; De Wit et al., 1997) จึงตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสหลอด ลมอักเสบติดต่อ สเตรน 4/91 สำหรับระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบ ติดต่อ ซึ่งตรวจด้วยวิธี ELISA ที่อายุ 1 วัน เท่ากับ 8004±6356 และลดลงเหลือ 199±307 เมื่ออายุ 10 วันและตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีที่อายุ 21 วัน

การตอบสนองต่อการได้รับวัคซีนในไก่ทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เนื้อที่มีแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่ไก่ โดยระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA ในกลุ่มทดลองที่ 1 เพิ่มขึ้นจาก 0±0 ที่อายุ 21 วัน เป็น 294±353, 365±587 และ 857±764 ที่อายุ 28, 35 และ 42 วันตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 เพิ่มขึ้นจาก 0±0 ที่อายุ 21 วัน เป็น 89±154, 199±363 และ 783±1820 ที่อายุ 28, 35 และ 42 วัน ตามลำดับ และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN ในกลุ่มทดลองที่ 1 เพิ่มขึ้นจาก 0.4±1.3 ที่อายุ 21 วัน เป็น 3.6±2.5, 5.0±1.0 และ 5.8±1.2 ที่อายุ 28, 35 และ 42 วัน ตามลำดับ ในกลุ่มทดลองที่ 2 เพิ่มขึ้นจาก 0.4±1.3 ที่อายุ 21 วัน เป็น 3.0±2.1, 3.3±2.3 และ 4.1±2.5 ที่อายุ 28, 35 และ 42 วัน ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ

Andrade et al.(1983) และ De Wit et al.(1997) ที่รายงานว่าการให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น สเตรน H120 ที่อายุ 1 วัน โดยการหยอดตาและพ่นเป็นละออง ในไก่เนื้อที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ที่ได้รับจากแม่ไก่ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์เมื่อไก่อายุ 28 วัน การที่ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN ในกลุ่มทดลองที่ 1 สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 2 ในไก่ทุกอายุ อธิบายได้ว่าการได้รับวัคซีน ซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ 2 ครั้ง จะเกิดการตอบ สนองทางด้านอิมมูนวิทยา ที่เกิดขึ้นซ้ำเมื่อสัตว์ได้รับแอนติเจนที่เคยได้รับซ้ำอีก เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด memory B-lymphocyte ซึ่งมีความจำทางอิมมูนวิทยาจะรับรู้แอนติเจนดังกล่าว ทำให้มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาเพิ่มสูงขึ้นไปอีก(anamnestic response) (Winterfield et al., 1976; Halvorson et al., 1991) และที่อายุ 35 วัน สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สเตรน 4/91 ด้วยวิธี VN ในไก่กลุ่มทดลองที่ 1 คือ 0.4±1.3 และสูงขึ้นเป็น 1.7±2.2 ที่อายุ 42 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Gelb and Killian(1987) และ Karaca and Naqi(1993) ที่รายงานว่าไก่ที่ได้รับ IBV ซีโรไทป์เดียวกันซ้ำ จะเกิด cross-reactions กับ IBV ซีโรไทป์อื่นในระดับต่ำ เนื่องจากเมื่อไก่ได้รับเชื้อ IBV ซีโรไทป์หนึ่ง ไก่จะสร้างแอนติบอดีต่อส่วนต่างๆของไวรัส ทั้งส่วนที่จำเพาะต่อซีโรไทป์และส่วนร่วมของไวรัส และเชื้อ IBV ซีโรไทป์ แมสซาชูเซตส์ซึ่งใช้เป็นวัคซีน มีลำดับกรดอะมิโนใน S1 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody คล้าย กันมาก(Cavanagh et al., 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าไม่สามารถวัดระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ด้วยวิธี VN ในไก่กลุ่มทดลองที่ 2 ที่อายุ 35 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Cook et al.(1999) ไม่สามารถวัดระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ สเตรน 4/91 ด้วยวิธี HI ที่อายุ 35 วัน ในไก่ที่ได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็น สเตรน Ma 5 โดยวิธีการ หยอดจมูกที่อายุ 1 วัน แต่ตรวจพบแอนติบอดีเมื่อไก่อายุ 42 วัน คือ 0.9±1.9 เนื่องจากวิธี VN จะมีความจำเพาะสูงมาก ในไก่ที่ได้รับเชื้อ IBV เพียงครั้งเดียว (Marquardt et al., 1981; Gelb and Kilian, 1987; Karaca and Naqi, 1993) De Wit et al.(1997) รายงานว่าวิธี VN ต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ มีความจำเพาะ 100% เมื่อใช้ cut-off value ของระดับแอนติบอดีเท่ากับ 5 ในไก่ที่ได้รับเชื้อ IBV สเตรนแมสซาชูเซตส์ครั้งเดียว และความจำเพาะจะลดต่ำลงในไก่ที่เคยได้รับวัคซีน H120 ก่อนการได้รับเชื้อ IBV สเตรนอื่นๆ ตามมา กล่าวคือความจำเพาะของวิธี VN ต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ เมื่อใช้ cut-off value ของระดับแอนติบอดี 5, 6, 7 และ 8 จะมีค่าเป็น 17, 38, 60 และ 81% ตามลำดับ

การตอบสนองต่อการได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นในไก่เนื้อจากฟาร์ม พบว่าไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 และ 2 มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี VN และ ELISA ใกล้เคียงกับไก่กลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งให้วัคซีนซีโรไทป์ แมสซาชูเซตส์ 1 ครั้งเช่นเดียวกัน เนื่องจากวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อที่ใช้เป็นสเตรน H120 ซึ่งอยู่ในซีโรไทป์เดียวกับสเตรนแมสซาชูเซตส์ และมีความเกี่ยวพันกันทางแอนติเจน (Darbyshine et al., 1979) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในไก่เนื้อที่มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ได้รับจากแม่ไก่ และสามารถวัดระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี VN เมื่อไก่อายุ 28 วัน (Andrade et al., 1983; De Wit et al., 1997) และจากระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ซึ่งตรวจด้วยวิธี VN เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งไม่เคยได้รับเชื้อ IBV สเตรน

4/91 แสดงว่าไก่ไม่เคยได้รับเชื้อ IBV สเตรน 4/91

ไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ 1 ครั้งเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะเมื่ออายุ 42 วัน คือ 5.9±0.7 และ 5644±3467 ตามลำดับ และพบว่าระดับแอนติบอดีด้วยวิธี VN เมื่ออายุ 42 วัน คือ 5.1±0.9 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มทดลอง อาจ แสดงถึงการได้รับเชื้อ IBV นอกจากการได้รับวัคซีน แต่ไม่อาจสรุปว่าเป็นการติดเชื้อ IBV สเตรนใด เนื่องจาก cross-reactions ที่พบในไก่ที่ได้รับเชื้อ IBV หลายครั้ง โดยเฉพาะเมื่อมีการได้รับเชื้อมากกว่า 1 ซีโรไทป์ cross-reactions ที่เกิดจะมากกว่าการได้รับ IBV ซีโรไทป์เดียวกันซ้ำ(Gelb and Killian, 1987; De Wit et al., 1997) เมื่อ cross-reactions อยู่ในระดับสูง โดยเฉพาะไก่อายุมากซึ่งเคยได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อและอาจมีการติดเชื้อต่างซีโรไทป์ การแปลผลทางซีรัมวิทยาอาจเป็นไปได้ยาก(Gough et al., 1992; De Wit, 2000) และไม่อาจสรุปว่าเป็นการติดเชื้อ IBV สเตรน 4/91 เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Cook et al.(1999) ซึ่งรายงานว่าไก่ที่ได้รับเชื้อ IBV สเตรน Ma 5 และ 4/91 พบว่ามีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 ด้วยวิธี HI สูงกว่าสเตรน แมสซาชูเซตส์ แต่จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN สูงกว่าสเตรน 4/91 ซึ่งวิธี HI สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นโดยสเตรนของไวรัสต่างซีโรไทป์กัน แต่มีความจำเพาะต่ำกว่าวิธี VN (King and Hopkins, 1983; Gelb and Killian, 1987; De Wit et al., 1997) และจากการศึกษาของ De Wit et al.(1997) ที่รายงานว่าวิธี VN มีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ของไวรัสชนิดนี้ลดลงในไก่ที่เคยได้รับวัคซีน H120 จึงไม่สามารถ สรุปว่ามีการติดเชื้อสเตรน 4/91 ในไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี

ไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดลพบุรี มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบ ติดต่อสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบ ติดต่อ ด้วยวิธี ELISA เมื่ออายุ 42 วัน คือ 6.3±1.2 และ 11717±4656 ตามลำดับ สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ 2 ครั้งเช่นเดียวกัน และพบว่าระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี VN เมื่ออายุ 42 วัน คือ 5.6±1.0 ซึ่งสูงกว่าไก่ทดลอง อาจแสดงถึงการได้รับเชื้อ IBV นอกจากการได้รับวัคซีน แต่ไม่อาจสรุปว่าเป็นการติดเชื้อ IBV สเตรนใดเช่นเดียวกับไก่เนื้อจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล อ.สพ.ญ.ประวีณา กิติคุณ คุณสุมิตรา วัฒโนดร ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการตรวจ VN บริษัทอินเตอร์เวท(ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนทุนและเชื้อไวรัส และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ช้องมาศ อันตรเสน บุญเลิศ อ่าวเจริญ นิมิตร เชื้อเงิน สมพงศ์ สหพงศ์ และรุ่งทิวา กงกะนันทน์. 1994 (2536). โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ในเขตภาคใต้. เวชชสารโรงพยาบาลสัตว์ 4: 47-54.

นิยมศักดิ์ อุปทุม วิมลพร จิระวัฒนพงษ์ วิมล จิระธนะวัฒน์ รื่นฤดี บุณยะโหตระ สมใจ ศรีหาคิม บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ นิมิต ลีสิริกุล และพรทิพย์ ศิริวรรณ์. 1984(2526). โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กระทงซึ่งพบวิการที่ไต. เวชชสารสัตวแพทย์ 13: 36-43.

Andrade, L.F., Villegas, P. and Fletcher, O.J. 1983. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. Avian Dis. 27: 178-187.

Cavanagh, D., Davis, P.J. and Mockett, A.P.A. 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11: 141-150.

Chayasittiyuthaparn, P. 1957. Unknown infectious agent isolated from chickens in Thailand similar to infectious bronchitis. The 9th Pacific Science Congress, Bangkok, Thailand. Cited in Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. J. Thai Vet. Med. Assoc. 12: 1-7.

Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A. and Huggins, M.B. 1996. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). Vet. Rec. 138: 178-180.

Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A. and Huggins, M.B. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathol. 28: 477-485.

Darbyshire, J.H., Rowell, J.G., Cook, J.K.A. and Peters, R.W. 1979. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheal organ cultures. Arch. Virol. 61: 227-238.

De Wit, J.J. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29: 71-93.

De Wit, J.J., Mekkes, D.R., Kouwenhoven, B. and Verheijden, J.H.M. 1997. Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. Avian Pathol. 26: 105-118.

Gelb, J.Jr. and Killian, S.L. 1987. Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. Avian Dis. 31: 513-522.

Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J. and Pearson, D. 1992. A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Vet. Rec. 130: 493-494.

Halvorson, D.A., Shaw, D., Sivanandan, V., Barbour, E.K., Maheshkumar, S., Newman, J.A. and Newman, L. 1991. Serological response in broiler chicks to different commercial Newcastle disease and infectious bronchitis vaccines. Avian Dis. 35: 978-981.

Karaca, K. and Naqi S. 1993. A monoclonal antibody blocking ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. Vet. Microbtol. 34: 249-257.

King, D.J. and Hopkins, S.R. 1983. Evaluation of the hemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. Avian Dis. 27: 100-112.

Marquardt, W.W., Snyder, D.B. and Schlotthober, B.A. 1981. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 25: 713-722.

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

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