หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ เป็นโรคของระบบทางเดินหายใจ รังไข่ ท่อนำไข่ และไต ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งในด้านผลผลิตและการตาย ปัญหาที่สำคัญ คือ เชื้อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อมีหลายซีโรไทป์ แต่ละซีโรไทป์มีหลายสเตรน เชื้อไวรัสแต่ละสเตรนจะให้ cross immunity ต่อสเตรนอื่นได้ไม่ดีและไม่เหมือนกัน วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนที่ก่อโรคจะป้องกันโรคจากเชื้อไวรัสสเตรนนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งที่ควรทราบในการควบคุมและป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ นอกจากสเตรนของไวรัสที่มีการระบาดในพื้นที่ คือ ประสิทธิภาพของวัคซีนแต่ละชนิดในการป้องกันโรคหลอดลมอักเสบสเตรนต่างๆ การตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ไม่สามารถใช้ในการตรวจแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ของไวรัส แต่วิธี VN สามารถตรวจแอนติบอดีจำเพาะต่อซีโรไทป์ของไวรัสได้ จากรายงานการตรวจพบซีรัมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 และรายงานการแยกเชื้อไวรัสในปี ค.ศ.1996 (Cook *et al.*1996) แสดงว่าอาจมีการระบาดของเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 ในประเทศไทย แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการใช้วัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนดังกล่าวในประเทศไทย และยังไม่มีการรายงานระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสเตรนต่างๆ ในไก่เนื้อที่ทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นโปรแกรมต่างๆ ที่นิยมใช้ในประเทศไทย การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ในไก่เนื้อที่ทำวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี VN สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกชนิดของวัคซีนและโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและป้องกันโรค และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อไวรัสสเตรน 4/91 ในไก่เนื้อในประเทศไทย

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ หรือ Infectious bronchitis (IB) พบการระบาดครั้งแรกในรัฐนอร์ธ ดาโกต้า ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1930 โดย Schalk และ Hawn รายงานอาการทางคลินิคของโรค และการศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ (Schalk and Hawn,1931) และสามารถสรุปว่าเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุของโรคในปี ค.ศ. 1936 โดย Beach และ Schalm (Beach and

Schalm,1936) และสามารถเพาะเชื้อไวรัสได้เป็นครั้งแรกในไข่ไก่ฟักในปี ค.ศ. 1937 โดย Beaudette และ Hudson (Beaudette and Hudson,1937) ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อมาเป็นเวลานาน (Chaiyasittiyuthaparn,1957 cited in Chindavanig, 1962) และพบการระบาดทั่วประเทศ (นิยมศักดิ์และคณะ,2526 ; ช้องมาศและคณะ,2536)

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ infectious bronchitis virus (IBV) จัดอยู่ในแฟมิลี่ Coronaviridae สกุล Coronavirus (Cavanagh *et al.*,1994 ; Cook and Mockett,1995) มียีโนม (genome) เป็น RNA สายเดี่ยว ประกอบด้วย 27,500 นิวคลีโอไทด์ IBV เพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึม มีรูปร่างได้หลายแบบ (pheomorphism) แต่โดยปกติมีรูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120 นาโนเมตร มี spike รูปกระบองยาวประมาณ 20 นาโนเมตร ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มแคปซิด (envelope) (Davies and Macnaughton,1979) IBV มีโปรตีนจำเพาะอยู่ 3 ชนิด คือ โปรตีนเอส (spike(S)glycoprotein) โปรตีนเอ็ม (membrane(M)glycoprotein) และโปรตีนเอ็น (internal nucleocapsid(N)protein) โปรตีนเอสประกอบด้วย 2 ไกลโคโพลีเปปไทด์ (glycopolypeptide) คือ S1 และ S2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 520 และ 625 ตัวตามลำดับ (Cavanagh *et al.*,1994 ; Cook and Mockett,1995) S1 มีหน้าที่ในการจับเกาะเซลและรวมตัวกับผนังเซล เป็นตัวชักนำให้เกิดการสร้าง virus neutralizing antibody ในไก่ (Cavanagh *et al.*,1984 , 1986 , 1988 ; Mockett *et al.*,1984 ; Cavanagh and Davis,1986 ; Koch *et al.*,1990 ; Kant *et al.*,1992 ; Karaca *et al.*,1992 ; Parr and Collisson,1993 ; Cavanagh and Macnaughton,1995) เชื้อ IBV มีหลายซีโรไทป์ แต่ละซีโรไทป์มีหลายสเตรน การแยกซีโรไทป์ ใช้ปฏิกิริยาระหว่าง IBV และแอนติบอดีจำเพาะต่อซีโรไทป์เป็นพื้นฐาน คือ IBV 2 สเตรน (A และ B) จะจัดเป็นซีโรไทป์เดียวกันเมื่อ two way heterologous neutralization titre (antiserum A กับไวรัส B และ antiserum B กับไวรัส A) ต่างกันน้อยกว่า 20 เท่าเมื่อเทียบกับ homologous titre ทั้ง 2 ทาง (antiserum A กับไวรัส A และ antiserum B กับ ไวรัส B) และต่างซีโรไทป์กันเมื่อ heterologous neutralization titre ต่างกันมากกว่า 20 เท่าเมื่อเทียบกับ homologous titre (Hesselink,1991) พบว่า IBV มีความไวต่อน้ำยาฆ่าเชื้อธรรมดาทั่วไป ความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อ (infectivity) ถูกทำลายโดยคลอโรฟอร์ม (chloroform) 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 10 นาที หรือ โซเดียม ดีออกซีโคเลต (sodium deoxycholate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเวลา 18 ชั่วโมง (Otsuki *et al.*,1979) หรือ เบต้าโปรปิโอแลคโตน (betapropiolactone) 0.05 หรือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือ ฟอร์มาลิน (formalin) 0.1 เปอร์เซ็นต์ (King,1984) นอกจากนี้ยังพบว่า IBV มีความไวต่อความร้อน โดยไวรัสจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 นาที หรือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในเวลา 90 นาที (Otsuki *et al.*,1979)

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นโรคเฉพาะของไก่ ไม่ทำให้เกิดโรคในคน เป็นได้กับไก่ทุกอายุ แต่จะมีความรุนแรงในลูกไก่และเป็นสาเหตุทำให้ลูกไก่ตาย การติดต่อของโรคเกิดโดยการติดเชื้อทางระบบหายใจ ส่วนการติดเชื้อผ่านไข่อาจมีโอกาสเกิดขึ้นได้ แต่ไม่ใช่การแพร่โรคที่สำคัญสำหรับโรคนี้ พาหะนำโรคไม่มีบทบาทในการแพร่โรค เป็นโรคที่เกิดแบบเฉียบพลัน (acute) มีการติดต่อของโรครวดเร็ว ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 18 – 36 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อไวรัสและทาง (route) ที่ไก่ได้รับเชื้อ โดยทั่วไปการติดเชื้อตามธรรมชาติมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 36 ชั่วโมงหรือมากกว่า (Cavanagh and Naqi,1997)

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นโรคของระบบทางเดินหายใจ รังไข่ ท่อนำไข่ และไต ในลูกไก่พบอาการของระบบทางเดินหายใจ คือ ไอ จาม หายใจแบบเสียงกรน มีน้ำมูก ตาแฉะ ไซนัสบวม ซึม นอนสุมกัน กินอาหารน้อยลง และ โตช้า ไก่ที่ติดเชื้อสเตรนที่มีผลต่อไต เช่น สเตรนออสเตรเลียนที (Australian-T) , เกรย์ (Gray) , โฮลต์ (Holte) (Albassam *et al.*,1986) , ฮอลแลนด์ 52 (H 52) (Macdonald and McMartin,1976) และเบลเยียน บี 1648 (Belgian B 1648) (Lambrechts *et al.*,1993 ; Pensaert and Lambrechts,1994) อาจพบอาการขนยุ่ง ถ่ายเป็นน้ำและกินน้ำเพิ่มขึ้น อาจทำให้รังไข่และท่อนำไข่ไม่เจริญเติบโต เป็นผลให้ไก่ไม่ไข่เมื่อถึงวัย ในไก่ไข่ทำให้ไข่ลดและคุณภาพของไข่เลวลง ลักษณะภายนอกของไข่ จะมีรูปร่างผิดปกติ เปลือกไข่บาง หรือหนาผิดปกติ มีแคลเซียมเกาะไม่สม่ำเสมอ ทำให้เปลือกไข่ไม่เรียบ ไข่ขาวเหลว ไม่เห็นความแตกต่างระหว่างไข่ขาวชั้นนอกและชั้นใน ไข่แดงแยกจากไข่ขาว ความรุนแรงอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับช่วงอายุของการไข่ (Eck,1983) และสเตรนของไวรัสที่ก่อโรค (Cook and Huggins, 1986) ในไก่พันธุ์นอกจากปัญหาไข่ลดและคุณภาพของไข่ ทั้งภายในและเปลือกไข่เลวลงแล้ว ยังมีปัญหาเรื่องจำนวนไข่มีเชื้อลดลง และจำนวนลูกไก่ที่ฟักได้ลดลง

รอยโรคในลูกไก่พบการอักเสบของทางเดินหายใจ พบน้ำมูก หนองใสหรือหนองแข็ง ในโพรงจมูก ไซนัส หลอดลม ถุงลมอาจขุ่นหรือมีหนองแข็งสีเหลือง อาจพบภาวะปอดอักเสบรอบหลอดลมขั้วปอดขนาดใหญ่ (Cavanagh and Naqi,1997) ไตบวม ซีด พบยูเรตหรือผลึกของกรดยูริค (Winterfield and Hitchner,1962 ; Cumming,1963) ในไก่ไข่และไก่พันธุ์อาจพบไข่แดงแตกในช่องท้อง ไก่มักติดเชื้อทั้งฝูง แต่อัตราการตายขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง คือ อายุของลูกไก่ แอนติบอดีที่ได้รับจากแม่ไก่ (maternal antibody) และจากวัคซีน สเตรนของไวรัส จำนวนไวรัส และทางที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายไก่ นอกจากนี้สภาพแวดล้อมรอบตัวไก่ก็มีผลต่ออัตราการตาย อัตราการตายอาจสูงถึง 25 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่าในไก่อายุน้อยกว่า 6 สัปดาห์ อัตราการตายจะต่ำในไก่ที่อายุมากกว่านั้น (Cavanagh and Naqi,1997) อัตราการตายในกรณีที่มีปัญหาเกี่ยวกับไต จะอยู่ในช่วง 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ต่อสัปดาห์ (Brown *et al.*,1987 ; Cowen *et al.*,1987)

การวินิจฉัยโรคนอกจากจะดูจากประวัติ อาการ อัตราการป่วย อัตราการตาย ระยะเวลาของการเป็นโรค ตลอดจนรอยโรคที่พบจากการผ่าซาก ซึ่งอาจคล้ายกับโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจอื่น เช่น โรคนิวคาสเซิล โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อ โรคหวัดหน้าบวม โรคติดเชื้อมัยโคพลาสมา (mycoplasmosis) ดังนั้นการวินิจฉัยโรค อาจใช้การแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส การตรวจหาแอนติเจนหรือการตรวจไวรัสโดยตรงจากหลอดลม หรือการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะที่ตอบสนองต่อการได้รับเชื้อ โดยการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีช่วงเริ่มแสดงอาการของโรค และ 2-3 สัปดาห์หลังจากไก่แสดงอาการของโรคแล้ว ระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่า (De Wit,2000)

การรักษาในกรณีที่ไก่เป็นโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ไม่มีการรักษาโดยเฉพาะ การจัดการ เช่น ให้ไก่อยู่ในที่อุณหภูมิพอเหมาะ อย่าให้ลมโกรก ลดความหนาแน่นของไก่ในเล้า มีน้ำและอาหารให้กินอย่างเพียงพอ อาจช่วยลดความสูญเสียจากโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ การให้สารปฏิชีวนะที่เหมาะสมจะช่วยลดความสูญเสียจากโรคแทรกซ้อนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

การป้องกันและควบคุมโรคอาศัยการจัดการฟาร์มที่ดีและการให้วัคซีน การจัดการฟาร์มที่ดี นอกจากการสุขาภิบาลที่ดีแล้ว ยังรวมถึงการเลี้ยงไก่อายุเดียวกันทั้งฟาร์ม แต่การเลี้ยงไก่ในประเทศไทย โดยเฉพาะไก่ไข่ มักมีการเลี้ยงไก่หลายอายุในเล้าเดียวกัน หรือ การเลี้ยงไก่หลายอายุในฟาร์มเดียวกัน ทำให้การป้องกันและควบคุมโรคยากขึ้น

การให้วัคซีนวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ในปัจจุบันมีทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและเชื้อตาย วัคซีนเชื้อเป็นที่มีใช้ในประเทศไทย คือ วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัส สเตรนแมสซาชูเซตส์ สเตรนคอนเนคติคัต สเตรนแมสซาชูเซตส์รวมกับคอนเนคติคัต สเตรนฮอลแลนด์ สเตรน Ma5 และสเตรน Armidale A3 ส่วนวัคซีนเชื้อตาย คือ วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัส สเตรนแมสซาชูเซตส์ และสเตรนฮอลแลนด์ วัคซีนเชื้อเป็นใช้ในไก่เนื้อ และใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกในไก่ไข่และไก่พันธุ์ ส่วนวัคซีนเชื้อตายใช้เฉพาะในไก่ไข่และไก่พันธุ์ เชื้อไวรัสที่ใช้ในวัคซีนเชื้อเป็นนิยมทำให้อ่อนกำลังลงโดยการผ่านเชื้อไวรัสเข้าไปในไข่ไก่ฟักหลายๆครั้ง (Klieve and Cumming,1988a) แต่ประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ร่างกายไก่สร้างภูมิคุ้มกันก็น้อยลงตามลำดับ สำหรับอายุที่ควรให้วัคซีน ในไก่เนื้อการให้วัคซีนครั้งแรกอาจให้ได้ในช่วงอายุสัปดาห์แรก (Davelaar and Kouwenhoven, 1977 ,1980 ; Andrade *et al.*,1983 ; Cook *et al.*,1991) และถ้าจำเป็นต้องให้วัคซีนครั้งที่สอง อาจให้เมื่ออายุไก่ 2-3 สัปดาห์ ในไก่ไข่และไก่พันธุ์ จะมีการให้วัคซีนอีก 2-3 ครั้งก่อนที่ไก่จะเริ่มไข่ และถ้าจำเป็นอาจให้วัคซีนทุกๆ 4 หรือ 6 หรือ 8 สัปดาห์ ขึ้นกับความเหมาะสมของแต่ละฟาร์ม โดยวิธีการให้วัคซีนเชื้อเป็น นิยมให้โดยการหยอดตาหรือจมูก เนื่องจากไก่ได้รับวัคซีนเท่ากันทุกตัว ภูมิคุ้มกันโรคที่ได้ค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่ไก่จะเครียดจากการจับ ส่วนการให้

วัคซีนเป็นกลุ่ม คือการพ่นเป็นละออง (spray หรือ aerosol) และการละลายน้ำดื่ม ก็เป็นที่นิยม เนื่องจากสะดวก ประหยัดเวลาและแรงงาน ไก่มีความเครียดน้อย พบว่าการให้วัคซีนโดยการพ่นเป็นละอองอาจทำให้เกิดอาการของระบบทางเดินหายใจ การให้วัคซีนโดยการละลายน้ำดื่ม มีโอกาสเกิดความผิดพลาดมากเนื่องจากวัคซีนไม่ทนต่อสภาพแวดล้อม และไก่ได้รับวัคซีนไม่เท่ากัน ทำให้ภูมิคุ้มโรคของฝูงไม่สม่ำเสมอ ส่วนวัคซีนเชื้อตายให้โดยการฉีด

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อมีความสำคัญในเชิงธุรกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ คือในไก่เนื้อทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารเลวลง เป็นสาเหตุของอาการของระบบทางเดินหายใจ ไต และอาจทำให้ลูกไก่ตาย ส่วนในไก่ไข่ทำให้เปอร์เซ็นต์ไข่ลดลงและคุณภาพไข่เลวลง ในไก่พันธุ์ทำให้จำนวนไข่มีเชื้อลดลง และจำนวนลูกไก่ที่ฟักได้ลดลง พบการระบาดของโรคในไก่ที่มีการให้วัคซีน ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งในด้านผลผลิตและการตาย การสูญเสียในด้านผลผลิตเป็นปัญหามากกว่าการสูญเสียจากการตาย สาเหตุของการระบาดนอกจากจะมาจากปัญหาด้านการจัดการแล้ว อาจมาจากปัญหาการให้วัคซีนแล้วไม่ได้ผล เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่ไก่ลดประสิทธิภาพวัคซีนในลูกไก่ (Klive and Cumming,1988a , 1988b) ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวเอง (mutation) ได้รวดเร็ว ทำให้เกิดสเตรนใหม่ได้ตลอดเวลา การที่ IBV มีหลายสเตรน ทำให้เกิดปัญหาในการตัดสินใจเลือกใช้วัคซีนที่ผลิตขึ้นจากเชื้อไวรัสสเตรนต่างๆในการป้องกันโรค เนื่องจากเชื้อไวรัสแต่ละสเตรนจะให้ cross immunity ต่อสเตรนอื่นได้ไม่ดี และไม่เหมือนกัน (Hofstad,1981) ถึงแม้ว่าไก่จะได้รับวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อไปแล้ว แต่ยังมีโอกาสป่วยด้วยเชื้อไวรัสสเตรนอื่นได้ (Johnson *et al.*,1972) แต่ถ้าใช้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนที่ก่อโรคจะป้องกันโรคจากเชื้อไวรัสสเตรนนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Picault *et al.*,1986 ; Gelb *et al.*, 1989 ; Cubillos *et al.*,1991 ; Parson *et al.*,1992 , Cavanagh *et al.*,1997) วัคซีนเชื้อเป็นที่นิยมใช้ในไก่เนื้อในประเทศไทย คือ วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนแมสซาชูเซตส์ สเตรนฮอลแลนด์ และสเตรนคอนเนคติคัต (เกรียงศักดิ์,2536 ; จิโรจ,2543) วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสเตรนแมสซาชูเซตส์มีคุณสมบัติให้ cross immunity ต่อเชื้อไวรัสสเตรนคอนเนคติคัตได้ดีพอสมควร (Winterfield,1968 ; Winterfield and Fadly,1975)

ในปี ค.ศ.1991 พบการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่ต่างไปจากปกติในไก่พันธุ์ไก่เนื้อในประเทศอังกฤษ พบอัตราการตายเพิ่มขึ้น ไก่ป่วยแสดงอาการหงอนมีสีคล้ำ นอนหมอบ หายใจหอบ กล้ามเนื้อสั่น ไข่ลด รอยโรคจากการผ่าซากพบรอยโรคของกล้ามเนื้ออก (myopathy) คือ กล้ามเนื้อมีสีซีด บวม อาจพบการมีเลือดออกที่พังผืด (fascia haemorrhage) และ gelatinous oedema บนผิวหน้าของกล้ามเนื้อ หลอดลมเป็นสีแดง พบการคั่งเลือด (congestion) ของอวัยวะทั่วร่างกาย โดยเฉพาะใน intramural vessel ของรังไข่ ในไก่เนื้อ พบอาการของระบบ

ทางเดินหายใจอย่างรุนแรง ถ่ายเหลวและอัตราการตายสูงขึ้น ในช่วงอายุประมาณ 6 สัปดาห์ พบว่าการระบาดนี้เกี่ยวข้องกับไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรนใหม่ซึ่งแยกได้ คือ สเตรน 4/91 (Parson *et al.*,1992) หรือ 793B (Gough *et al.*,1992) การศึกษาในขั้นต้นเกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันโรคพบว่าวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนฮอลแลนด์120 (H120) ไม่ได้ผลในการป้องกันโรค สำหรับประเทศไทยพบรายงานซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสสเตรน 4/91 และรายงานการแยกเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติตรงกับสเตรน 4/91 ในปี ค.ศ. 1996 แต่รายงานไม่ได้ระบุถึงผู้เก็บหรือผู้ส่งตัวอย่าง (Cook *et al.*1996)

วิธี VIRUS NEUTRALIZATION และวิธี ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

วิธีการทางซีรัมวิทยาที่ใช้ในการตรวจระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อ IBV ในซีรัมมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ วิธี Agar gel precipitation test (AGP) , ELISA , Hemagglutination inhibition test (HI) และ VN วิธี AGP เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีความไว (sensitivity) ต่ำ (Bracewell and Alexander,1996) วิธี ELISA เป็นวิธีที่ง่าย ราคาไม่แพงและมีความไวสูง (Mockett and Darbyshine,1981 ; Bracewell and Alexander,1996) สามารถใช้ในการวินิจฉัยแยกการติดเชื้อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อออกจากโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจอื่น และสามารถใช้วัดประสิทธิภาพของวัคซีนในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ IBV ทั้ง AGP และ ELISA ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นโดยสเตรนของไวรัสต่างซีโรไทป์กันได้ วิธีที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นโดยสเตรนของไวรัสต่างซีโรไทป์กัน คือ วิธี HI และ VN วิธี HI มีความจำเพาะ (specificity) ต่อซีโรไทป์ต่ำกว่าวิธี VN (King and Hopkins,1983 ; Gelb and Killian 1987 ; De Wit *et al.*,1997) วิธี VN เป็น วิธีมาตรฐานในการวัดแอนติบอดีจำเพาะต่อซีโรไทป์ของ IBV (De Wit ,2000)

วิธี VN

วิธี VN มีพื้นฐาน คือ ไวรัสเป็นจุลชีพที่จำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวนในเซลของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น การเพิ่มจำนวนของไวรัสจะเป็นผลให้โฮสต์ (host) เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็นได้ การเปลี่ยนแปลงนี้จะแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัสแต่ละชนิด และชนิดของโฮสต์ที่ไวรัสนั้นเพิ่มจำนวน สำหรับ IBV โฮสต์ที่ใช้ประกอบด้วยไข่ฟัก tracheal organ culture (TOC) (Darbyshine,1978) primary chick embryo kidney cell (pCEK) (Chomiak *et al.*,1958 ;

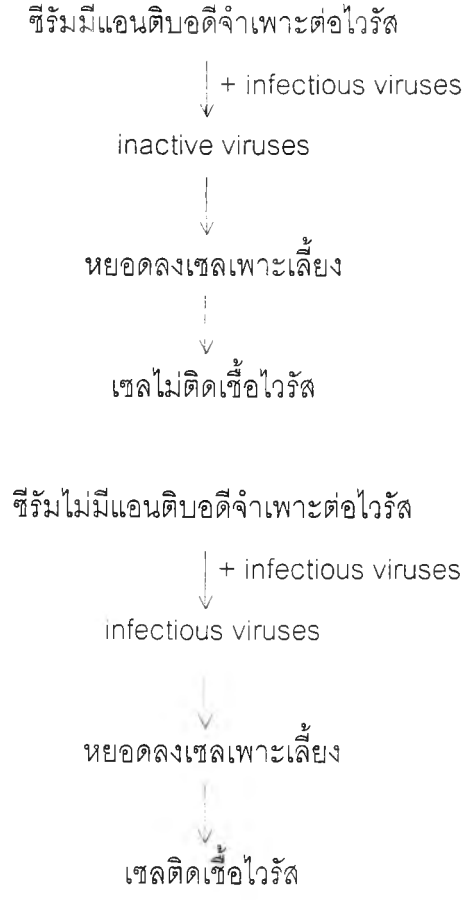
Gillette,1973) หรือ chick kidney cell (CK) การเปลี่ยนแปลงที่พบในโฮสต์ที่เป็นไข่ไก่ฟัก ได้แก่ การม้วนตัวเป็นก้อนกลม แคระแกร็น และ/หรือทำให้ตัวอ่อนตาย รอยโรคของตัวอ่อนพบยูเรตใน mesonephros การเปลี่ยนแปลงที่พบในโฮสต์ที่เป็น TOC ได้แก่ ciliostasis การเปลี่ยนแปลงที่พบในโฮสต์ที่เป็น pCEK ได้แก่ cytopathic effect (CPE) แบบ round CPE และ syncytial CPE (Gillette,1973 ; Wadey and Faragher,1981) และ การเปลี่ยนแปลงที่พบในโฮสต์ที่เป็น CK ได้แก่ syncytial CPE (Alexander and Collins,1975) ซึ่งคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological function) เหล่านี้ของไวรัสจะสามารถถูกยับยั้งได้โดยแอนติบอดีจำเพาะ ซึ่งจะไปทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ (neutralized) ก่อนที่จะเข้าสู่เซลของโฮสต์ การใช้ pCEK มีข้อดี คือ ประหยัดเนื้อที่ และค่าใช้จ่ายต่ำกว่าไข่ฟักและ TOC มีความไวสูงเมื่อเทียบกับไข่ฟัก (El Zein *et al.*,1972)

หลักการคือ VN เป็นการทดสอบใดๆ ก็ตามที่แอนติบอดีจำเพาะ ไปยับยั้งคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัสทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ และไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโฮสต์ได้ VN เป็นการทดสอบที่มีประโยชน์หลายประการ เช่น ใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัส และการพิสูจน์เชื้อไวรัส นอกจากนี้ VN ยังเป็นการทดสอบทางซีรัมวิทยาที่ได้รับความเชื่อถือมากที่สุด และยังนิยมถือเป็นมาตรฐาน สำหรับเปรียบเทียบความจำเพาะและความไวกับวิธีการทดสอบทางซีรัมวิทยาอื่นๆ เนื่องจากระดับแอนติบอดีจำเพาะ ที่วัดได้จากการทดสอบนี้ คือ ระดับ neutralizing antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิดที่ทำหน้าที่ยับยั้งคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัสโดยเฉพาะ ไม่รวมแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ไม่มีผลในการป้องกันโฮสต์จากการติดเชื้อ ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบนี้จะแสดงค่าความต้านทานโรคของสัตว์ ต่อไวรัสชนิดนั้นๆ โดยตรง

VN มี 2 วิธี คือ วิธี Constant serum-vary virus dilutions หรือ วิธีอัลฟ่า (α) ใช้ซีรัมปริมาณคงที่ผสมกับเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ วิธีนี้ใช้ได้ทั้งในการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีจำเพาะ โดยใช้ไวรัสที่ทราบชนิดเป็นตัวทดสอบ และการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ทราบชนิดเป็นตัวทดสอบ และ วิธี Constant virus-vary serum dilutions หรือ วิธีเบต้า (β) ใช้เชื้อไวรัสในปริมาณคงที่ผสมกับซีรัมที่ความเข้มข้นต่างๆ วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาและวัดระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสชนิดที่ใช้ทดสอบ (ราตรี,2533) วิธีเบต้าเป็นที่นิยมมากกว่า เพราะมีความไวและความเที่ยงตรงสูงกว่าวิธีอัลฟ่า (Cunningham,1973)

ปฏิกิริยา virus neutralization test ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

<u>แผนภูมิที่ 1</u> ปฏิกิริยา virus neutralization test



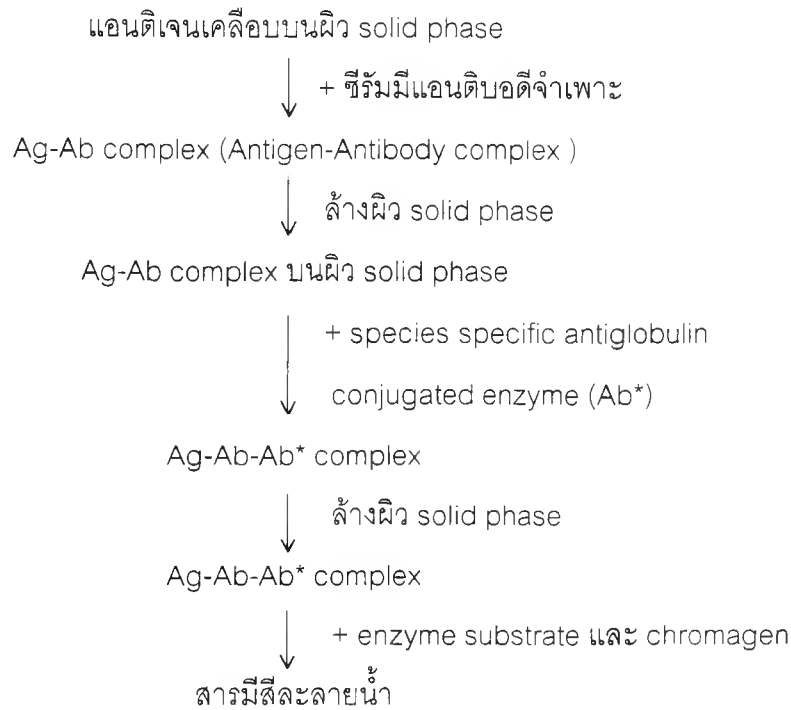
วิธี ELISA

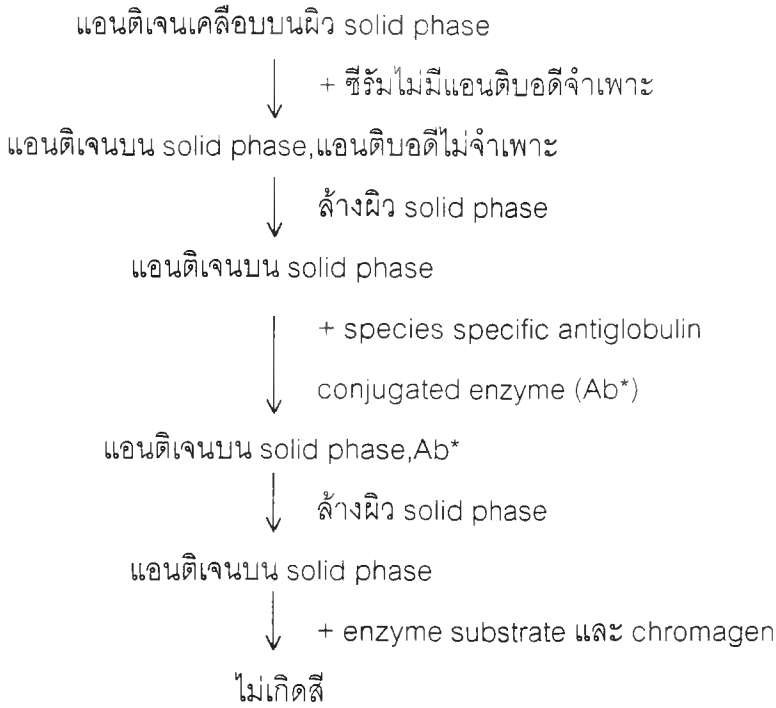
วิธี ELISA เป็น immunoenzymatic method ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่รวมคุณสมบัติทางอิมมูนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเข้ากับคุณสมบัติของเอนไซม์ ในการย่อยตัวถูกย่อย (substrate) ที่เหมาะสมกัน โดยมีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาหรือวัดระดับแอนติเจน ซึ่งจัดเป็นการตรวจโรคโดยตรง (direct examination) และเพื่อตรวจหาหรือวัดระดับแอนติบอดี ซึ่งจัดเป็นการพิเคราะห์โรคจากปฏิกิริยาของซีรัม (serodiagnosis)

หลักการ คือ เป็นวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาหรือวัดระดับ แอนติเจนหรือแอนติบอดี ในตัวอย่างส่งตรวจซึ่งอยู่ในรูปของเหลว โดยการจับตัวกับแอนติบอดีจำเพาะหรือแอนติเจนจำเพาะที่เคลือบอยู่บนผิว solid phase แล้วจึงใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ conjugate กับเอนไซม์ ไปจับตัวอีกชั้นหนึ่ง การแสดงผลการทดสอบจะขึ้นอยู่กับความเข้มของสีที่เกิดจากการย่อยตัวถูกย่อยที่เหมาะสมกันของเอนไซม์นั้น วิธีที่ใช้ในการตรวจหาหรือวัดปริมาณแอนติบอดีมีอยู่หลายวิธี เช่น indirect method , competitive method , blocking method แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือวิธี

indirect ซึ่งมีหลักการคือ เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจนของไวรัส แล้วใส่ซีรัมทดสอบลงไปถ้าซีรัมมีแอนติบอดีจำเพาะจะเกาะกับแอนติเจน และส่วนที่เหลือจะถูกล้างออกไป ตรวจดู antigen-antibody complex โดยเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งปิดสลากด้วยเอนไซม์ (species specific antiglobulin conjugated enzyme) ลงไป จากนั้นล้าง แล้วเติมตัวถูกย่อยสำหรับเอนไซม์ เมื่อตัวถูกย่อย ถูกย่อยจะเกิดสารมีสีซึ่งละลายน้ำได้ขึ้นมา อ่านความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ถ้ามีสีเข้มมากแสดงว่ามีแอนติบอดีจำเพาะในปริมาณมาก (ราตรี,2533) มีรายงานแสดงว่า indirect ELISA ไม่สามารถตรวจแยกแอนติบอดีจำเพาะต่อซีโรไทป์ได้ (Garcia and Bankoski,1981 ; Marquardt *et al.*,1981 ; Zellen and Thorsen,1987 ; Perrota *et al.*,1988 ; Karaca *et al.*,1990 ; Karaca and Naqi,1993 ; De wit *et al.*,1997) ปัจจุบันมีหลายบริษัทผลิตชุดตรวจสอบแอนติบอดีสำเร็จรูปต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี ELISA เช่น บริษัท Kirkegaard & Perry Laboratory, Inc. (KPL), แมรี่แลนด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัท IDEXX, เมนน์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ชุดตรวจสอบแอนติบอดีสำเร็จรูปเหล่านี้ สามารถตรวจแอนติบอดีจำเพาะต่อ IBV แต่ไม่สามารถแยกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซีโรไทป์
ปฏิกิริยา indirect ELISA ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

<u>แผนภูมิที่ 2</u> ปฏิกิริยา indirect ELISA




แอนติเจนเคลือบบนผิว solid phase
+ ซีรัมไม่มีแอนติบอดีจำเพาะ
แอนติเจนบน solid phase,แอนติบอดีไม่จำเพาะ
ล้างผิว solid phase
แอนติเจนบน solid phase
+ species specific antiglobulin
conjugated enzyme (Ab*)
แอนติเจนบน solid phase,Ab*
ล้างผิว solid phase
แอนติเจนบน solid phase
+ enzyme substrate และ chromagen
ไม่เกิดสี