

ประสิทธิภาพและโปรแกรมวัคซีนเชื้อเป็นลดดลุมอักเสบติดต่อสายพันธุ์คล้ายคิวเอร์กซ์ต่อการติด  
เชื้อไวรัสลดดลุมอักเสบติดต่อ



นายเอกสิงห์ สาเรือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFICACY AND VACCINATION PROGRAMS OF LIVE QX-LIKE,INFECTIOUS  
BRONCHITIS(IB)VACCINE AGAINST IB VIRUS INFECTION

Mr. Ekasingh Sarueng

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพและโปรแกรมวัคซีนเชื้อเป็นหลอดลมอักเสบ ติดต่อสายพันธุ์คล้ายคิวเริกซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสหลอดลม อักเสบติดต่อ
โดย	นายเอกสิงห์ สาเรือง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพร ชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรีชญจันทร์

---

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา รัชชสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรีชญจันทร์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สมศักดิ์ ภัคภิณโณ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม)

เอกสิทธิ์ สาเรือง : ประสิทธิภาพและโปรแกรมวัคซีนเชื้อเป็นหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์คล้ายคิวเอ็กซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ. (EFFICACY AND VACCINATION PROGRAMS OF LIVE QX-LIKE,INFECTIOUS BRONCHITIS(IB)VACCINE AGAINST IB VIRUS INFECTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
 หลัก: รศ. น.สพ. ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. น.สพ. ดร. จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์, 4 หน้า.

การทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เนื้อต่อไวรัสสายพันธุ์ THA80151 และ THA90151 ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยการทดลองที่ 1 แบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลองที่ 2 แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ 1 ให้วัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 วัน กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 ไม่ให้วัคซีนและได้รับเชื้อ IBV กลุ่มที่ 6 ไม่ให้วัคซีนและไม่ได้รับเชื้อ IBV การทดลองที่ 1 กลุ่มทดลองที่ 1 - 5 ได้รับเชื้อ IBV THA80151 ที่ความเข้มข้น 105.62 ELD50/0.1 มล. ที่ไก่อายุ 28 วัน และการทดลองที่ 2 กลุ่มทดลองที่ 1 - 5 ได้รับเชื้อ IBV THA90151 ที่ความเข้มข้น 105.78 ELD50/0.1 มล. ที่ไก่อายุ 28 วัน ประเมินผลการทดลองจาก เสียงกรน อัตราการตาย น้ำหนักตัว ciliostasis score ภายในท่อลม รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน และการแยกเชื้อไวรัส โปรแกรมวัคซีนถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ ทุกกลุ่มแสดงถึงการป้องกันความเสียหายภายหลังจากที่ให้เชื้อไวรัส วัคซีนสามารถลดความรุนแรงจากเสียงกรนระดับคะแนนการพัดโบกของซีเลียและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยากับกลุ่มที่ได้รับวัคซีน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน โปรแกรมวัคซีนที่ทดลองไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส THA80151 ได้ ยังคงสามารถแยกเชื้อได้จากบางอวัยวะที่ติดเชื้อ การให้วัคซีนซ้ำครั้งที่สอง ด้วยเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่แตกต่างจากครั้งแรกสามารถเพิ่มการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบ THA80151 และ THA90151

ภาควิชา อายุรศาสตร์

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์แพทย์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

# # 5375571031 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS EFFICACY VACCINE

EKASINGH SARUENG: EFFICACY AND VACCINATION PROGRAMS OF LIVE QX-LIKE, INFECTIOUS BRONCHITIS (IB) VACCINE AGAINST IB VIRUS INFECTION. ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, CO-ADVISOR: PROF. DR. JIROJ SASIPREEYANJAN, 4 pp.

To evaluate of efficacy of vaccination program of Infectious Bronchitis (IB) virus in broilers against THA80151 and THA90151 isolated in Thailand. The experimental groups were divided into 6 groups. Group 1 was administered by Poulvac IB QX like at 1 day old. Group 2 was administered by Poulvac IB QX like at 1 and 14 days old. Group 3 was administered by Nobilis IB H120 and Poulvac IB QX like at 1 and 14 days, respectively. Group 4 was administered by Nobilis IB H120 and Nobilis IB 4-91 at 1 and 14 days, respectively. Group 5 served as a positive control group. Group 6 served as a negative control group. First experiment (5 groups), all groups were challenged by IBV THA80151 at a concentration 105.62 ELD<sub>50</sub>/0.1 ml. at 28 day-old. Second experiment (6 groups), groups 1-5 were challenged by IBV THA90151 at a concentration 105.78 ELD<sub>50</sub>/0.1 ml. at 28 day-old. Group 6 served as a negative control group. The tracheal rales, mortality rate, body weight, ciliostasis, histopathological lesions, immunological responses and virus isolations were monitored. All groups demonstrated the protection to damage after challenged with live IB QX-like virus. The vaccines could decrease the tracheal rales, ciliary activity and histological lesion scores in the vaccinated groups compared to the positive control group. Anyhow, the vaccination programs could not prevent the infection because IB QX like virus was still be re-isolated from some infected organs. The booster vaccine with the heterologous strain could increase the cross protection of IBV THA80151 and THA90151

Department: Veterinary Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Veterinary Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาทั้ง 2 ท่าน รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทดลองและความอนุเคราะห์เชื้อไวรัส ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ น.สพ.ดร.ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และอาจารย์ น.สพ.ดร.วิษณุ วรรณแสง ที่ให้ความเอื้อเฟื้อให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ รศ. อัจฉรา ธวัชสิน และ รศ. น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ ที่ให้คำแนะนำและชี้แนะการดำเนินงานด้านการทำวิทยานิพนธ์ให้ดีและเหมาะสมขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทนุอดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 ที่สนับสนุนทุนงานวิจัยวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ คุณสรารุช มูลจันท์ นักวิทยาศาสตร์ และนางอารี พลศรี เจ้าหน้าที่เลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในการดำเนินงานทดลอง

ขอขอบคุณ บริษัท Betagro, Zoetis, MSD, BioChek และ Advance ที่ช่วยให้การสนับสนุนด้านวัสดุและอุปกรณ์การทดลอง

## สารบัญ

## หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ก
สารบัญตาราง .....	ค
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	2
1.4 กรอบแนวคิดวิจัย .....	3
บทที่ 2 .....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infectious bronchitis, IB) .....	4
2.2 คุณสมบัติของเชื้อ.....	4
2.3 การระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ .....	5
2.4 การก่อโรคและความเสียหายจากโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ.....	7
2.5 การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ .....	8
2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจากตัวอย่างในพื้นที่.....	9
2.7 วิธีการตรวจสอบไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ.....	10
2.8 การป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ .....	12
2.9 การประเมินผลจากประสิทธิภาพการใช่วัคซีนที่ตัวไก่ .....	12
2.10.....	17
การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อป้องกันการติดเชื้อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ .....	17
บทที่ 3 .....	20
วิธีดำเนินการวิจัย .....	20
3.1 เชื้อไวรัส.....	20
3.3. การออกแบบกลุ่มทดลอง .....	23

3.4. การสังเกตอาการทางคลินิก.....	23
3.5. การตรวจทางซีรัมวิทยา.....	23
3.6.การประเมิน ciliostasis score .....	24
3.7. การตรวจหาเชื้อไวรัส ด้วยวิธี Reverse transcripts PCR (RT- PCR).....	26
3.8.การตรวจทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อทอลม ปอด และไต .....	30
3.9. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเลี้ยงจากน้ำหนัก.....	31
3.10. การใช้สถิติในการวิเคราะห์.....	31
บทที่ 4.....	32
ผลการทดลอง.....	32
4.1.1. อาการทางคลินิก และน้ำหนักตัว .....	32
4.1.....	33
2. การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันโรค.....	33
4.1.3. การประเมิน Ciliostasis score .....	36
4.1.....	36
4. การให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของทอลม ปอด และไต.....	36
4.1.....	43
5.การตรวจเชื้อ IBV ที่เนื้อเยื่อทอลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก .....	43
4.2.1. อาการทางคลินิก และน้ำหนักตัว .....	45
4.2.....	46
2. การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันโรค.....	46
4.2.3. การประเมิน Ciliostasis score .....	49
4.2.....	51
4. การให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ทอลม ปอด และไต.....	51
4.2.....	53
5.การตรวจเชื้อ IBV ที่เนื้อเยื่อทอลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก .....	53
สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	55
รายการอ้างอิง.....	59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	70



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. แสดงการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ IBV THA90151.....	21
ตารางที่ 2. แสดงการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ IBV THA80151.....	22
ตารางที่ 3. การทดสอบความคุ้มโรคโดยการใช้วัคซีนสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และให้เชื้อพิษ IBV เมื่อไก่อายุ 28 วัน.....	24
ตารางที่ 4. การเติมส่วนประกอบต่างๆ เพื่อตรวจ RT-PCR ต่อ IBV THA80151.....	28
ตารางที่ 5. การเติมส่วนประกอบต่างๆ เพื่อตรวจ RT-PCR ต่อ IBV THA90151.....	29
ตารางที่ 6. การได้ยินเสียงกรน (tracheal rale) ภายหลังได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 5 วัน และน้ำหนัก ตัวไก่ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุไก่ 28 35 และ 42 วัน.....	32
ตารางที่ 7. ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ IBV THA80151 (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุ 7 14 28 35 และ 42 วัน .....	34
ตารางที่ 8. ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ciliostasis score เปอร์เซ็นต์การป้องกันโรคและคะแนน การป้องกันโรครายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 7 วัน.....	36
ตารางที่ 9. ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 3 5 7 และ 14 วัน.....	38
ตารางที่ 10. การตรวจเชื้อ IBV THA80151 ที่เนื้อเยื่อท่อลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก ภายหลังได้รับเชื้อ IBVTHA80151 นาน 4 5 และ 6 วัน.....	44
ตารางที่ 11. การได้ยินเสียงกรน (tracheal rale) ภายหลังได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 5 วันและน้ำหนัก ตัวไก่ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุไก่ 28 35 และ 42 วัน.....	46
ตารางที่ 12. ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ IBV THA90151 (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุ 7 14 28 35 และ 42 วัน .....	48
ตารางที่ 13. ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ciliostasis score เปอร์เซ็นต์การป้องกันโรค และคะแนน การป้องกันโรครายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 5 และ 7 วัน.....	50
ตารางที่ 14. ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 3 5 7 และ 14 วัน.....	52
ตารางที่ 15. การตรวจเชื้อ IBV THA90151 ที่ท่อลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก ภายหลังได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 4 5 และ 6 วัน.....	53
ตารางที่ 16. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลมและ immunohistochemistry ของลูกไก่ที่ติดเชื้อ หลอดลมอักเสบติดต่อกัน.....	68
ตารางที่ 17. ลักษณะทางพยาธิวิทยาของไตในลูกไก่ที่ติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกัน.....	69

## สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1. แสดงการการประเมีน ciliostasis score.....	15
รูปที่ 2. ท่อลมปกติ .....	39
รูปที่ 3. ท่อลมอักเสบแบบอ่อน.....	39
รูปที่ 4. ท่อลมอักเสบปานกลาง .....	40
รูปที่ 5. ท่อลมเสียหายอย่างรุนแรง.....	40
รูปที่ 6. ไตปกติ .....	41
รูปที่ 7. ไตอักเสบ .....	41
รูปที่ 8. ปอดปกติ.....	42
รูปที่ 9. ปอดอักเสบ.....	42
รูปที่ 10. แสดงภาพการตรวจ RT-PCR สำหรับเชื้อ IBV THA80151.....	45
รูปที่ 11. แสดงภาพการตรวจ RT –PCR โดยใช้อุณหภูมิของ annealing แตกต่างกันของเชื้อ IBV THA90151.....	54

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (Infectious bronchitis, IB) เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากไวรัสหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (Infectious bronchitis virus, IBV) ซึ่งมีผลกระทบต่อเซลล์ของระบบทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์ และไต (Cavanagh and Gelb, 2008) ความรุนแรงของการติดเชื้อโรค IBV ที่ระบบทางเดินหายใจ เพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อโรคอื่นร่วมด้วย เช่น *E. coli* *Mycoplasma gallisepticum* และ/หรือ *Mycoplasma synoviae* เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ถุงหุ้มหัวใจ และถุงลม ตามมา นอกจากนี้อาจพบการติดเชื้อ Avian Metapneumovirus ร่วมด้วย มักส่งผลต่ออัตราการผสมติดที่ลดลง (Villarreal et al., 2007) ไก่เนื้อที่ติดเชื้อพบผลกระทบในด้านอัตราการสูญเสีย อัตราการแลกเนื้อ และการคั้ตทิ้งซากที่โรงเชือด เนื่องจากปัญหาโรคของระบบทางเดินหายใจที่พบสูงขึ้น ส่วนไก่พันธุ์และไก่ไข่ การติดเชื้อไวรัสส่งผลกระทบต่ออัตราการสูญเสีย ผลผลิตไข่ลด และอัตราการฟักลดลง โรคหลอดลมอักเสบติดต่อก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกในประเทศไทยเป็นระยะๆ ถึงแม้ว่ามีการใช้วัคซีนเชื้อเป็นซึ่งเตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ H120 M41 Connecticut และ Ma5 และวัคซีนเชื้อตายสายพันธุ์ M41 เพื่อการป้องกันโรคเป็นระยะเวลาหลายปี อย่างไรก็ตาม ยังคงพบโรคหลอดลมติดต่อบริเวณในประเทศไทย (ชื่องาม และคณะ, 2536) การระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ มักพบปัญหาในช่วงระยะเวลาสั้นๆ โดยใน พ.ศ. 2552 มีรายงานการพบไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์แควเรียนต์ QX-like ในประเทศไทย โดยทำการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ตำแหน่ง S1 glycoprotein (Pohuang et al., 2009) ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกับสายพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ แต่เชื้อสายพันธุ์ใหม่มักพบอยู่ไม่นาน อาจเนื่องจากความไม่คงตัวของพันธุกรรม การตรวจไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ใน พ.ศ. 2552 สามารถจำแนกได้ 2 กลุ่ม คือ 1) TH1 เป็นสายพันธุ์ที่พบระบาดอยู่ในประเทศไทยมาเป็นเวลานาน 2) TH2 เป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (QX like virus) ที่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมคล้ายคลึงกับไวรัสสายพันธุ์ QX ที่มีการระบาดในประเทศจีน (Pohuang et al., 2009) โรคนี้เป็นโรคติดเชื้อไวรัสจึงไม่สามารถใช้ยารักษาได้

การรักษาทำได้โดยการให้ยาต้านจุลชีพ และวิตามิน เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน การจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม ความเข้มงวดในระบบการป้องกันโรค ไม่ให้เชื้อเข้าฟาร์ม ร่วมกับการใช้วัคซีนป้องกันโรค ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาด คือ วัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้เชื้ออ่อนกำลังลง (live attenuated vaccine) และวัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccine) ปัจจุบันวัคซีนที่มีใช้ในประเทศไทย เป็นวัคซีนที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ Massachusetts เช่น M41 H120 Ma5 และยังมีสายพันธุ์อื่น เช่น 4-91 และ Connecticut เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบ

ติดต่อกันแต่ละสายพันธุ์ให้ภูมิคุ้มกันข้ามระหว่างไวรัสสายพันธุ์อื่นไม่ดี และไม่เหมือนกัน การใช้วัคซีนเชื้อเป็นร่วมกันสองสายพันธุ์หรือมากกว่า ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันที่กว้างขวางขึ้น สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ดีขึ้น (Cook et al., 1999) การศึกษาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ nephropathogenic strain (B1648) พบว่าการใช้วัคซีน Ma5 อย่างเดียวมีประสิทธิภาพการป้องกันโรคที่ไม่ดี แต่เมื่อใช้วัคซีน 4-91 อย่างเดียวหรือร่วมกับ Ma5 สามารถป้องกันโรคได้ดี (Cook et al., 2001) ซึ่งการใช้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ควรเลือกใช้วัคซีนที่เตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของไวรัสที่พบการระบาด เพื่อให้ผลของการป้องกันโรคที่ดี ปัจจุบันมีวัคซีนป้องกันไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ QX-like ที่จดทะเบียนในต่างประเทศ จึงควรนำวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ QX-like มาทดสอบความสามารถของการป้องกันโรคของวัคซีน รวมทั้งการจัดโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคในประเทศไทย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

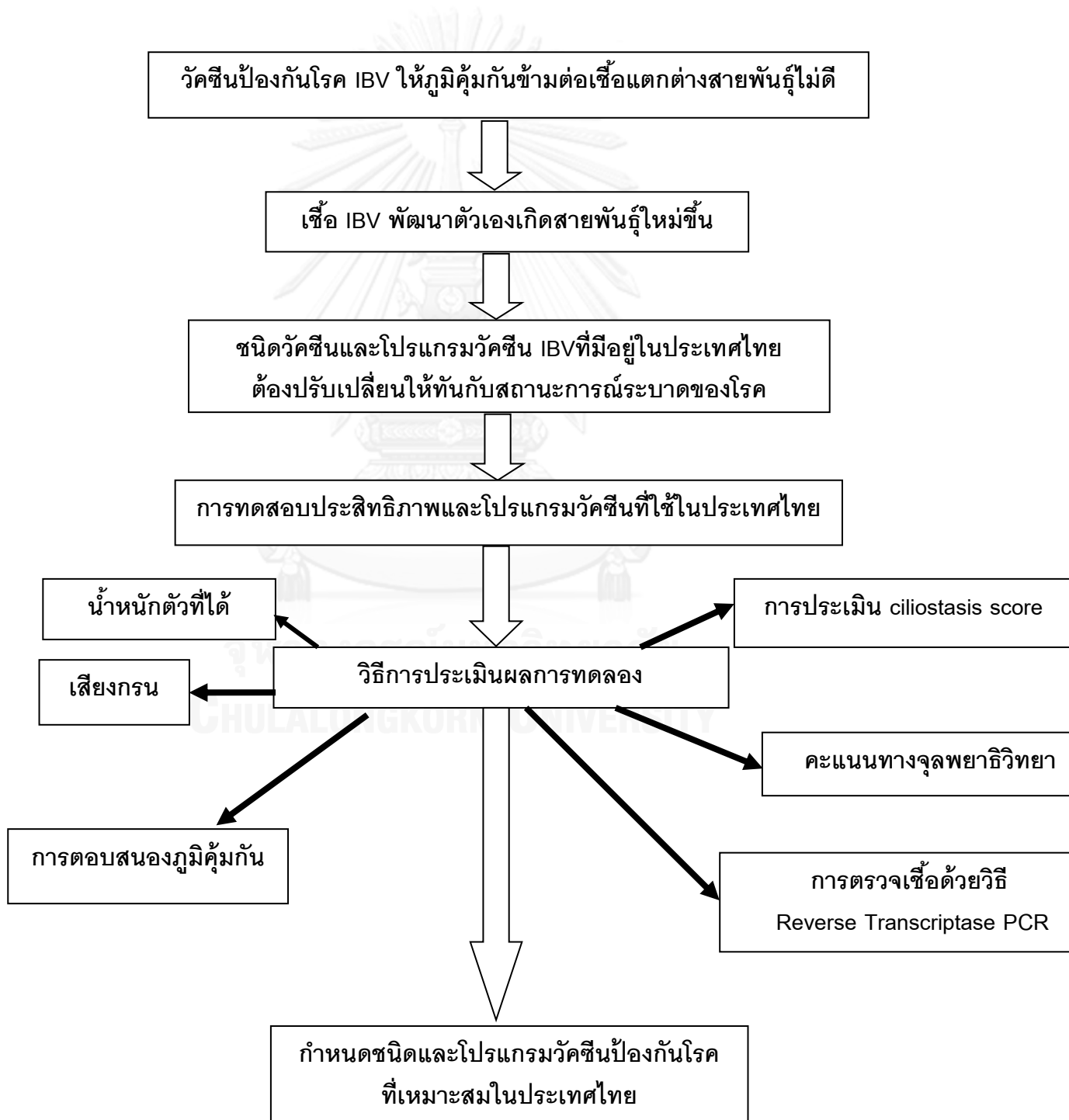
1.2.1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ QX-like ต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่พบในประเทศไทย

1.2.2. เพื่อเปรียบเทียบโปรแกรมต่างๆ ของวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อต่อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้ในประเทศไทย

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของวัคซีนและโปรแกรมวัคซีนที่เหมาะสม ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส IBV สายพันธุ์ IBV THA80151 และ IBV THA90151

## 1.4 กรอบแนวคิดวิจัย



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (Infectious bronchitis, IB)

โรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (IB) เป็นโรคไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคแบบเฉียบพลันและสามารถติดต่อได้อย่างกว้างขวางในไก่ การติดเชื้อก่อให้เกิดอาการของระบบทางเดินหายใจ ไตอักเสบ และการลดลงของผลผลิตไข่ (Britton et al., 2012)

#### 2.2 คุณสมบัติของเชื้อ

เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม โคโรนาไวรัส (coronaviridae) ซึ่งมีลำดับโปรตีนคล้ายคลึงกับโปรตีนของเชื้อหลอดลมอักเสบติดเชื้อในไก่ เชื้อไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลายชนิด โปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ โกลโคโปรตีน S1 (spike glycoprotein S1) ถือเป็นโปรตีนแอนติเจนที่สำคัญ ซึ่งใช้ในการแยกชนิดของเชื้อ โดยโปรตีนนี้ยังมีส่วนหน่วยย่อย (protein subunit) ที่ทำหน้าที่จับกับโปรตีนบนผิวโฮสต์เซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาหักล้างกันกับเชื้อโรคและป้องกันการติดเชื้อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ (neutralization) และปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) จากการศึกษาของโปรตีน S1 นี้ มีอัตราการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการตัดหรือการเพิ่มเข้าไปของ nucleotide ส่งผลให้เชื้อไวรัสเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้สามารถพบเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์ ที่มีความแตกต่างของการตอบสนองต่อซีรัม หรือมีความแตกต่างของการแสดงลักษณะแอนติเจน (antigenic variation, genotype) (Cavanagh, 2007; Britton et al., 2012) hemagglutinin esterase (HE) เป็นส่วนของปลายแหลมเล็กๆ ที่อยู่บน envelope membrane (M) glycoprotein และ Small membrane protein (E) เป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสซึ่งส่วนประกอบของอนุภาคไวรัสหลักจะเป็น M glycoprotein เป็นตัวเชื่อมต่อกับ Spike glycoprotein, E และ M ส่วน Small membrane protein (E) เป็นส่วนประกอบที่มีอยู่เล็กน้อย และมีความจำเป็นต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (Cavanagh, 2007) Internal nucleoprotein (N) เป็นส่วนที่จับกับ RNA และเป็นโครงสร้างพื้นฐานสำหรับ helical nucleocapsid อาจจะมีมีความสำคัญสำหรับการเหนี่ยวนำตอบสนองแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immunity) (Salf, 1993)

เชื้อ Coronavirus สามารถรวมตัวกันได้ ถ้ามีการติดเชื้อพร้อมกัน 2 สายพันธุ์ภายในเซลล์เดียวกัน และสามารถผลิตไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมทั้ง 2 ชนิด (Mardani et al., 2010)

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดเชื้อ ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 15 นาที หรือที่ 45 °C นาน 90 นาที และไม่ควรเก็บรักษาเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ -20 °C แต่การเก็บรักษาไวรัสใน allantoinic fluid ที่อุณหภูมิ -30 °C สามารถเก็บได้นานหลายปี ส่วนการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ ทำได้โดยเก็บ

ในกลีเซอรอล 50% และนำส่งห้องปฏิบัติการได้โดยไม่ต้องแช่เย็น ความสามารถในการดำรงชีวิตของไวรัสภายนอกตัวสัตว์ ในฤดูใบไม้ผลิไวรัสอยู่ได้นาน 12 วัน และฤดูหนาวอยู่ได้นานถึง 56 วัน ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารฆ่าเชื้อทั่วไป (Cavanagh and Gelb, 2008)

การแพร่เชื้อของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว โดยมีระยะฟักตัว 18-36 ชั่วโมง ขึ้นกับจำนวนเชื้อ และช่องทางในการได้รับเชื้อ ไวรัสมีผลต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ไต และท่อนำไข่ โดยความรุนแรงและรอยโรคในแต่ละระบบขึ้นกับสายพันธุ์ของไวรัส ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันส่วนใหญ่ มักก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบทางเดินหายใจ กรณีการติดเชื้อตั้งแต่ใต้อายุุน้อย อาจเป็นสาเหตุให้เกิด false layer syndrome แต่ถ้ามมีการติดเชื้อในระหว่างช่วงให้ผลผลิตไข่ จะส่งผลกระทบต่อสีของเปลือกไข่ให้เปลี่ยนไป และผลผลิตไข่ลดลง จากการทดลองไวรัสสายพันธุ์ QX-like ก่อให้เกิดรอยโรคที่ไต และการขยายตัว (dilatation) ของท่อนำไข่ (Benyeda et al., 2010) เมื่อสัตว์ปีกติดเชื้อโดยการหายใจ จะสามารถแยกเชื้อจากอวัยวะต่างๆ เช่น ท่อลม ปอด ไต และต่อมเบอร์ดชา ได้ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้น จะยังคงพบเชื้อต่อไปอีก 7 วัน สำหรับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันไม่พบรายงานมีการติดเชื้อไวรัสผ่านไข่ (Cavanagh and Gelb, 2008)

การตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน โดยทั่วไปพบว่าไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันต่างสายพันธุ์ ไม่สามารถให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือความคุ้มโรคข้าม (no cross protection) (Ignjanovic and Sapats, 2000) โดยที่ความคุ้มโรคข้ามนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อไวรัสมีความแตกต่างของรูปแบบกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน S1 เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองเชื้อไวรัสที่แยกได้ส่วนใหญ่ พบว่าส่วนของโปรตีน S1 จะมีความเหมือนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 85% กับวัคซีนที่ใช้ (Gelb et al., 2005) อย่างไรก็ตาม การใช้วัคซีนสองครั้งจากเชื้อไวรัสคนละสายพันธุ์ มีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรม ส่งผลให้เพิ่มความคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่พบ การระบาดได้ โดยเรียกลักษณะนี้ว่า สายพันธุ์ป้องกัน (protectotype) โดยการใช้สายพันธุ์ป้องกันนี้จัดเป็นวิธีที่มีประโยชน์ และเหมาะสมต่อการพัฒนาเพื่อใช้เป็นกลยุทธ์ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน (Dhinakar Raj and Jones, 1996; Terregino et al., 2008; Mahgoub et al., 2010; De Wit et al., 2011; Cook et al., 2012; Lim et al., 2012)

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน สามารถจำแนกได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ QX (QX IBV) (Yudong et al., 1998) สายพันธุ์นี้พบรายงานครั้งแรกในประเทศจีน และระบาดไปทั่วยูเรเชีย (Gough et al., 2008; Monne et al., 2008) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ QX ที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบไต (QX-like nephropathogenic strain) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และการเพิ่มขึ้นของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในพื้นที่ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก (Worthington and Jones, 2006) จากการศึกษพบว่าเชื้อไวรัสชนิด QX ที่มีต้นกำเนิดที่ประเทศจีน สามารถรวมตัวกับไวรัสสายพันธุ์เกาหลี ได้ไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (สายพันธุ์ KM91) และคงความสามารถในการก่อความเสียหายต่อระบบไต เช่นเดียวกับสายพันธุ์จีน (Lim et al., 2012)

### 2.3 การระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

โรคนี้มีการรายงานเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี 1930 (Schalk and Hawn, 1931) โดยสายพันธุ์เริ่มต้น คือ สายพันธุ์ Massachusettes (Mass type) ในช่วงปี 1940 พบการระบาดของเชื้อสายพันธุ์ Mass ในยุโรปและเอเชีย จนถึงปัจจุบัน ยังคงพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ แต่เชื้อสายพันธุ์ใหม่มักพบอยู่ได้ไม่นาน อาจเนื่องจากความไม่คงตัวของพันธุกรรม (Sasipreeyajan et al., 2012) โรคนี้พบการระบาดได้ทั่วโลก ทั้งอัฟริกา เอเชีย ออสเตรเลีย ยุโรป และอเมริกาใต้

การระบาดของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทำให้ยากต่อการควบคุมโรค (Lim et al., 2012) โดยมักพบปัญหาในช่วงระยะแรกๆ ของการอุบัติของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ การสูญเสียผลผลิตไข่ อัตราไข่ อัตราการฟักลดลง และคุณภาพไข่ (Cavanagh and Gelb, 2008) การระบาดของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในต่างประเทศระหว่าง ค.ศ. 1980 ถึง ค.ศ. 1989 พบการระบาดที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ด้วยสายพันธุ์ Dutch variant (D1466 และ D274 strains) ต่อมาช่วงระหว่างต้นปี ค.ศ. 1990 ถึง ค.ศ.1999 ที่ประเทศอังกฤษพบการระบาดของ 793B (4-91; CR88) ในช่วงเปลี่ยนศตวรรษ พบการระบาดของ Italian strain (IT-02) กระทั่งถึงปัจจุบันพบการระบาดของ IB QX-like (Terregino et al., 2008) เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สายพันธุ์ QX พบรายงานการระบาดครั้งแรกที่ประเทศจีน ในเดือนกันยายน ค.ศ. 1996 (YuDong et al., 1998) พบรอยโรคการบวมที่กระเพาะแท้ (proventriculus) ในไก่ที่เลี้ยงในเมือง Qingdao ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีการกลายพันธุ์ (Benyeda et al., 2009) ปี ค.ศ. 1997 มีรายงานการตรวจพบเชื้อที่ประเทศโปแลนด์ ปี ค.ศ. 1999 พบที่ประเทศอังกฤษและฮังการี นอกจากนี้ยังพบการระบาดของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกลายพันธุ์ (IB variant) ในหลายประเทศ ปี ค.ศ. 1998 ถึง ค.ศ.2002 พบการระบาดที่ประเทศรัสเซีย โดยตรวจพบเชื้อไวรัส QX ที่ก่อให้เกิดปัญหาพยาธิสภาพที่ไต เมื่อตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม พบยีนมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับไวรัสที่พบในบริเวณตะวันออกไกล (QX-like) ไก่ชายแดนประเทศจีน ปี ค.ศ. 2000 และ 2001 ประเทศยุโรปมีรายงานการพบปัญหาพยาธิสภาพที่ไตจากการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ซึ่งมีลักษณะสายพันธุ์ QX ซึ่งก่อให้เกิดปัญหา false Layers ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้ที่ไตและรังไข่ (Terregino et al., 2008)

กลุ่มประเทศยุโรป มีรายงานการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ (Worthington et al., 2008) ทำให้เกิดการหมุนเวียนไปมาของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในประชากรไก่ในประเทศต่างๆ อยู่ตลอดเวลา (de Wit et al., 2011) หนึ่งในสายพันธุ์ที่มีความสำคัญ ได้แก่ สายพันธุ์ QX ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ QX นี้มีรายงานพบครั้งแรกในยุโรป ในปี 2003 จากการสร้างความเสียหายกับอุตสาหกรรมสัตว์ปีกในประเทศเนเธอร์แลนด์ และสามารถแยกเชื้อได้เป็นสายพันธุ์ D388 ในกลุ่ม QX โดยเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง

ในประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2496-2497 มีรายงานการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อครั้งแรก (Chindavanig, 1962) ต่อมา พ.ศ. 2526 มีรายงานการพบปัญหาโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในไก่เนื้ออายุ 14-28 วัน พบอัตราการตาย



สูง 1-15% (นิยมศักดิ์ และคณะ, 2526) ปี พ.ศ. 2536 ช้องมาศและคณะ (2536) รายงานการติดเชื้อที่แสดงออกทางระบบหายใจ และพบไตบวมใหญ่ จำนวน 21 ครั้งในขณะที่พบไตบวมใหญ่อย่างเดี่ยว 4 ครั้ง (ช้องมาศและคณะ, 2536) พ.ศ. 2552 พบรายงานการจำแนกไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นสายพันธุ์ TH1 เป็นสายพันธุ์ที่พบระบาดอยู่ในประเทศไทยส่วนของโปรตีน S1 มีความคล้ายกับสายพันธุ์ THA001 ที่เป็นสายพันธุ์พบเฉพาะในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 กลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ TH2 ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ที่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมส่วนของ 5'-terminus คล้ายคลึงกับไวรัสสายพันธุ์ QX (QX-like virus) กับส่วนของ 3'-terminus ที่แยกจากประเทศจีนสายพันธุ์ JX/99/01 กลุ่มที่ 3 เป็นสายพันธุ์เป็น Massachusetts type เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับวัคซิม (Pohuang et al., 2011) แม้ว่าโรคหลอดลมอักเสบติดต่อก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกในประเทศไทย และมีการใช้วัคซิมเชื่อเป็น ซึ่งเตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อการป้องกันโรคมาระยะเวลาหลายปี แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงพบโรคหลอดลมอักเสบติดต่อบริเวณในประเทศไทย

#### 2.4 การก่อโรคและความเสียหายจากโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

ไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกทั่วโลก (Lim et al., 2012) เดิมไวรัสชนิดนี้พบการติดเชื้อในไก่อายุน้อย อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันพบการติดเชื้อได้ทั้งในไก่อายุน้อย ไกรุ่น และไก่ไข่

เมื่อไก่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะเกาะติดเยื่อบุหลอดลม โพรงจุมูก และปอด ภายใน 3-4 ชั่วโมงหลังจากติดเชื้อไวรัส IBV สามารถเพิ่มจำนวนได้แล้วโดยเชื้อจะเข้าไปใน cytoplasm ของเซลล์โฮสต์แล้วแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเซลล์แตก เชื้อ IBV จะเข้าไปในกระแสเลือดสู่อวัยวะต่างๆ ภายใน 24-48 ชั่วโมงแล้วทำลายเยื่อบุเซลล์ของอวัยวะนั้นๆ พบว่าเชื้อมีการเพิ่มจำนวนมากสุดวันที่ 3 ของการติดเชื้อในโพรงจุมูกและหลอดลมและเชื้อยังคงอยู่ถึงวันที่ 2-5 วัน ภายหลังจากติดเชื้อเช่นเดียวกันกับในปอดและถุงลม (Cavanagh, 2007) ซึ่งปริมาณเชื้อจะลดลงขึ้นกับเวลาและสายพันธุ์ แต่สามารถพบเชื้อ IBV ได้ใน cecal tonsil ที่ 14 สัปดาห์ และในอุจจาระที่ 20 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อ (Cavanagh and Gelb, 2008) Mohammed และคณะ (2012) ทดลองให้เชื้อ IBV ที่แยกได้ประเทศมาเลเซียกับไก่เนื้อที่อายุ 30 วัน และตรวจเชื้อ โดย RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อจากตัวอย่างของหลอดลม ปอด ไต อวัยวะและ caecal tonsil โดยที่หลอดลมและปอดตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 1-13 วัน ไตตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 1-14 วัน ท่อน้ำไขกระดูกตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 3-13 วัน อวัยวะตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 1-11 วัน และ caecal tonsil ตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 1-20 วัน ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV

ไก่อายุน้อย พบความเสียหายในระบบทางเดินหายใจ การสูญเสียน้ำหนักตัว และอัตราการแลกเนื้อได้ ความรุนแรงของการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วม เช่น *E. coli* *Mycoplasma gallisepticum* และ/หรือ *Mycoplasma synoviae* เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ถุงหุ้มหัวใจ และถุงลม ตามมา นอกจากนี้ การติดเชื้อ Avian Metapneumovirus ร่วมด้วยมักส่งผลต่ออัตราการผสมติดที่ลดลง (Villarreal et al., 2007) ไก่เนื้อ

ที่ติดเชื้อจะพบผลกระทบในด้านอัตราการสูญเสีย อัตราการแลกเนื้อ และการคั้ตทิ้งซากที่โรงเชือด เนื่องจากปัญหาโรคของระบบทางเดินหายใจที่พบสูงขึ้น (Cavanagh and Gelb, 2008) อัตราการตายอาจสูงถึง 30 % ขึ้นกับสายพันธุ์ โดยช่วงอายุที่เสียหายมากที่สุดคืออายุ 5 – 6 สัปดาห์ (หรือไก่กระทงระยะสุดท้าย) ในการติดเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงอัตราการตายอาจต่ำกว่า 1% โดยพบการฟื้นตัวจากการติดเชื้อหรือการระบาศที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ในกรณีเกิดการกดภูมิคุ้มกันทำให้ความเสียหายในฝูงขยายวงกว้าง และพบอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น การทดลองติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 793/B (4-91) ในไก่ SPF อายุ 20 วัน พบอัตราการตาย 7.5% โดยพบการเกิดภาวะเลือดคั่งของเนื้อเยื่อต่อลมและปอด ไตบวมซีดรุนแรง (Villarreal et al., 2007)

ในไก่พันธุ์และไก่ไข่ การติดเชื้อไวรัสส่งผลกระทบต่อด้านอัตราการสูญเสีย โดยพบผลผลิตไข่ อัตราการฟัก และคุณภาพไข่ลดลง (Cavanagh and Gelb, 2008) หนึ่งในสายพันธุ์ที่มีความสำคัญได้แก่ สายพันธุ์ QX นอกจากจะพบอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ไตอักเสบ และผลผลิตไข่ลดลงแล้ว ยังพบการเกิด false layers syndrome (Benyeda et al., 2009; de Wit et al., 2011) จากการทดลองให้เชื้อ IBV D388 พบการเกิดถุงซีสทีนในท่อนำไข่ (cystic oviducts) ในไก่จำนวนมาก อัตราการตายจากสภาวะไตอักเสบ ระบบทางเดินหายใจล้มเหลว และภาวะไม่ทำงานของซิวเลียพัดในท่อนลม และการอักเสบของถุงลมปอด (air sacculitis) (de Wit et al., 2011) และอัตราการตายจากการติดเชื้อสายพันธุ์ที่เกิดความเสียหายต่อไตประมาณ 25 % ในฝูงไก่ที่มีความไว อัตราการลดของไข่อาจสูงถึง 10% แล้วแต่สภาวะทางภูมิคุ้มกันของฝูง รวมถึงการเกิดเปลือกไข่ผิดปกติและบาง มีสีซีดจาง เปราะแตกง่าย และกรณีเป็นไข่จากไก่ที่ให้ไข่ที่มีสี (pigmented eggs) พบไข่ขาวเหลวเป็นต้น อย่างไรก็ตาม ความเสียหายอาจเกิดถาวรในกรณีที่ไก่มีความไวต่อการติดเชื้อนี้

#### 2.4.1 รอยโรคทางพยาธิวิทยา

ไก่ที่ติดเชื้อ อาจพบของเหลวแบบใส (serous) หรือขุ่นเป็นเมือก (catarrhal) และเป็นหนองข้น (caseous) ในท่อนลม ช่องจุมูก และไขนัส ถุงลมพบลักษณะเป็นฟองคล้ายโฟม (foamy) ในระยะติดเชื้อเฉียบพลันของการติดเชื้อ จากนั้นจะกลายเป็นของเหลวขุ่นและเป็นหนองข้นเหลือง พบปอดและท่อนลมอักเสบ และพบรอยโรคของไต เช่น การเกิดไตบวมและซีด พบสารยูเรตีสขาวภายในท่อไต (tubules) และท่อปัสสาวะ (ureters) นอกจากนี้ยังเกิดภาวะไข่แดงตกค้างในช่องท้อง และภาวะไข่ลดจากการมีรอยโรคความเสียหายอย่างถาวรในท่อนำไข่ที่เกิดจากการติดเชื้อในไก่อายุน้อย โดยจะแสดงอาการเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ สองในสามของท่อนำไข่มักเกิดความเสียหายอย่างรุนแรง และอาจเกิดสภาวะท่อนำไข่เปิดไม่สมบูรณ์ และการไม่เจริญของไข่ (hypoglandular) นอกจากนี้ยังพบการลดลงของความยาวของท่อนำไข่รวมถึงการไม่เจริญหรือการฝ่อของรังไข่ (Cavanagh and Gelb, 2008)

#### 2.4.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ในการติดเชื้อระยะเริ่มแรก พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอด ไต และลำไส้ ในระยะท้ายของการติดเชื้อ พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของไตที่รุนแรง พบการเกิดสภาวะไต

อักเสบโดยการเกิด lymphoblastic nodules ในไต (Mahdavi et al., 2007) พบการบวมน้ำของเยื่อบุท่อลมบริเวณคอในไก่ที่ติดเชื้อ มีการสูญเสียซีเลีย เกิดภาวะเซลล์กลุมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อ พบการแทรกของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์และเฮเทอโรฟิลในบริเวณการติดเชื้อ ภายใน 18 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ การสร้างใหม่ของของเซลล์เยื่อจะพบได้ใน 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (hyperplasia) จากการกระตุ้นการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณการติดเชื้อ ใน lamina propria ในบริเวณ germinal center ภายหลังจากติดเชื้อ 7 วัน โดยอาจพบการบวมน้ำ และการลอกหลุด (desquamation) ของเซลล์เยื่อในถุงลมและการสะสมของของเหลวแบบมีไฟบริน (fibrinous exudate) ใน 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (Cavanagh and Gelb, 2008)

## 2.5 การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก

การตรวจหาไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก เพื่อประโยชน์ในการยืนยันการติดเชื้อไวรัสจากตัวอย่างในพื้นที่ และการแยกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับการก่อปัญหาทางคลินิก โดยการแยกประเภทของเชื้อนั้น เกี่ยวพันโดยตรงกับการเลือกสายพันธุ์ของวัคซีน การวางโปรแกรมวัคซีน เพื่อให้เกิดผลความคุ้มโรคที่เพียงพอต่อการติดเชื้อในฝูงไก่ (de Wit, 2000) โดยทั่วไปการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก สามารถวินิจฉัยได้โดยการตรวจหาส่วนของโปรตีนที่มีความจำเพาะของไวรัส หรือการตรวจหาแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยมีวิธีการจำนวนมากที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน ได้แก่ การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation, VI) วิธี immunofluorescence (IFA) วิธี immunoperoxidase (IPA) และวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

การยืนยันการติดเชื้อไวรัส สามารถทำได้ด้วยการตรวจสอบทางซีรัมวิทยา โดยดูการเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับภูมิคุ้มกัน (seroconversion) จากการเก็บตัวอย่างซีรัมสองครั้งเปรียบเทียบกัน (paired serum) หรือการตรวจสอบการปรากฏของโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) ที่มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อ ด้วยวิธีการตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) วิธี agar gel precipitation (AGPT) หรือวิธี enzyme linked immunosorbent (ELISA) ส่วนวิธี virus neutralization นั้น ไม่นิยมทำในงานตรวจสอบทั่วไป เนื่องจากมีราคาแพง และใช้ระยะเวลาการปฏิบัติมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยวิธีอื่น (de Wit, 2000) การเลือกใช้วิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม และการวิเคราะห์ผลการตรวจสอบการติดเชื้อในแต่ละพื้นที่ อาจพบความยากลำบากและอาจเกิดความสับสนได้ เนื่องจากการขาดระบบการเก็บข้อมูล และการขาดการประเมินประสิทธิภาพการตรวจสอบการติดเชื้อที่ดี

## 2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกจากตัวอย่างในพื้นที่

ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกจากตัวอย่างในพื้นที่ อาจมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการตรวจสอบ ดังนี้

1. ช่วงเวลาระหว่างการเริ่มติดเชื้อของสัตว์ปีกและการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากในระยะต้นของการติดเชื้อ ไวรัสจะเพิ่มจำนวนอย่างมากในระบบทางเดินหายใจ จากนั้นจะเกิดการแพร่กระจายของ

ไวรัสเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ไวรัสกระจายไปสู่อวัยวะต่างๆ ดังนั้นเมื่อเก็บตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆ ในระยะต่างๆของการติดเชื้อ และจากไวรัสสายพันธุ์ต่างกัน อาจทำให้เกิดความขัดแย้งของผลการตรวจสอบได้ โดยทั่วไป จะพบเชื้อเป็นจำนวนมากในทอลมที่ระยะ 3-5 วันแรกของการติดเชื้อ หลังจากนั้น ไวรัสในทอลมจะมีปริมาณลดลงอย่างมากภายใน 2 สัปดาห์ จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (de Wit, 2000) ในกรณีที่เก็บตัวอย่างจากไก่ที่มีการติดเชื้อในระยะเรื้อรัง ควรตรวจสอบและเลือกเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร เช่น ทอนซิลที่บริเวณไส้ตัน (caecal tonsil) และเก็บตัวอย่างเชื้อจากทวารรวม (cloacal swab) ซึ่งพบเชื้อได้สูงกว่าการเก็บตัวอย่างจากทอลม (Bhattacharjee et al., 1995; de Wit et al., 1998) ความซับซ้อนของการเลือกเก็บตัวอย่างจากการติดเชื้อระยะเรื้อรัง หรือจากสัตว์พาหะที่ยังคงมีการติดเชื้อ (persistent carrier) ขึ้นกับความสามารถในการแยกแยะฝูงที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังออกจากฝูงที่ได้รับวัคซีน จากการศึกษาพบว่าสัตว์ที่ติดเชื้อเป็นเวลานาน ยังคงความสามารถในการขับเชื้อซ้ำ (re-excretion) จนกว่าสัตว์นั้นจะมีอาการดีขึ้น (ระยะ 2-7 เดือน) (Alexander and Gough, 1977; Alexander and Gough, 1978; Chong and Apostolov, 1982) โดยสามารถพบการขับเชื้อในระยะหลังจากการให้ไข่ (on set of lay) หรือการใช้ยา cyclosporin เนื่องจากการเกิดการลดลงของ T-cell (Jones and Ambali, 1987) ซึ่งความสามารถการขับเชื้อซ้ำนี้ เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อหรือกลุ่มไก่ที่ได้รับวัคซีน (Cook, 1968)

2. ระดับภูมิคุ้มกันของไก่ในขณะที่เกิดการติดเชื้อ ระดับของ acquired immunity ในขณะที่เกิดการติดเชื้อส่งผลกระทบต่อระยะเวลา และปริมาณเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ (de Wit, 2000)

3. จำนวนตัวอย่างที่รวบรวมจากระยะต่างๆ ของการติดเชื้อและที่อายุต่างๆ เช่น การติดเชื้อเฉียบพลันในกลุ่มไก่ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ง่าย และพบในปริมาณมากกว่าการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ไก่ที่ได้รับวัคซีน หรือไก่พันธุ์ มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าและในปริมาณต่ำกว่า จึงต้องใช้จำนวนตัวอย่างมากขึ้นในการตรวจหาโรค (de Wit, 2000)

4. อวัยวะที่เลือกเก็บตัวอย่าง ตามระยะต่างๆ ของการติดเชื้อ เช่น กรณีติดเชื้อแบบเฉียบพลันเก็บตัวอย่างจากทางเดินหายใจ หรือ กรณีติดเชื้อแบบเรื้อรังเก็บตัวอย่างที่ ไต ทอนซิลของไส้ตัน และทวารรวม (de Wit, 2000)

5. คุณภาพของตัวอย่าง ตัวอย่างที่รวบรวมได้ ควรทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสเพื่อการคงอยู่ของไวรัส ขณะนำส่งห้องปฏิบัติการ โดยปกติตัวอย่างควรส่งถึงห้องปฏิบัติการภายใน 1 วัน กรณีที่ต้องเก็บรักษาตัวอย่างนานกว่า 1 วัน ควรเก็บตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส โดยเร็วที่สุด การเก็บตัวอย่างจากช่องทวารรวม ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากการปนเปื้อนแบบที่เรีย และเชื้อราและมีการเติมยาปฏิชีวนะ เช่น เพนิซิลลิน สเตตรปโตมัยซิน และแอมโฟเทอริซิน บี เพื่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา ในกรณีที่ไม่สามารถแช่แข็งตัวอย่างได้ ให้นำตัวอย่างใส่ลงใน 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ซึ่งสามารถเก็บรักษาไวรัสให้คงอยู่ได้หลายวันถึงแม้ว่าจะไม่มีตู้เย็นหรือช่องแช่แข็ง (de Wit, 2000)

6. สภาวะการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) คือ การติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นมาก่อน ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสกัมโบโรในไก่อายุน้อย ทำให้มีการตอบสนองต่อการทำวัคซีนลดลงอีกเสบติดต่อดลดลง และมีความไวต่อการติดเชื้อมากขึ้น นอกจากนี้สภาวะการกดภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้สามารถตรวจพบการติดเชื้อ IBV ได้ง่ายขึ้น (de Wit, 2000)

## 2.7 วิธีการตรวจสอบไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่

### 2.7.1 วิธีการแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) และการเพิ่มจำนวนไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่ เพื่อการตรวจสอบการติดเชื้อ (viral infectivity)

การแยกเชื้อไวรัส เป็นวิธีที่มีความจำเพาะในตรวจสอบการติดเชื้อ หรือเป็นการเพิ่มจำนวนไวรัส เพื่อการทดสอบในลำดับต่อไป การแยกเชื้อไวรัส ต้องใช้ระยะเวลาาน และอาจเกิดปัญหาผลบลวงกรณีไวรัสถูกทำลายก่อนการทดสอบ (inactivated) หรือในกรณีที่สัตว์เกิดการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย ในกรณีดังกล่าว ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่ อาจถูกมองข้ามและทำให้วิธีการตรวจสอบนี้ถูกตัดออกไปจากกระบวนการตรวจสอบโรค ในตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการสามารถใช้ซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ เพื่อยืนยันการเจริญของไวรัสได้ แต่วิธีการยืนยันนี้ จะไม่สามารถกระทำในตัวอย่างจากพื้นที่พบการระบาดได้ เนื่องจากอาจมีไวรัสที่สงสัยว่าติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 ชนิด การแยกเชื้อไวรัสมีหลายวิธี (Butler et al., 1972; de Wit, 2000) ได้แก่

2.7.1.1. การฉีดไข่ (egg inoculation) ทำโดยการฉีดเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อ chorioallantoic หรือช่อง allantoic ของไข่ฟักปลอดเชื้อ (embryonated SPF eggs)

2.7.1.2. การติดเชื้อเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด chicken kidney monolayer

2.7.1.3. การติดเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อท่อลม (tracheal tissue culture, TOC) หรือการเพาะเลี้ยงจากการล้างเก็บท่อลม (tracheal drained transplant) และการสังเกตการยับยั้งการโบกพัดของซิลเลีย (ciliostasis) (McMartin, 1993) หลังจากทำการบ่ม (incubation) เพื่อให้ไวรัสเจริญตามระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นสามารถตรวจวัดปริมาณไวรัสโดย

2.7.1.3.1. การตรวจสอบความเข้มข้นสุดท้ายของการไตเตรชัน (end point titration) จากเนื้อเยื่อท่อลม

2.7.1.3.2. การตรวจสอบจากการเกิด plaque (plaque formation assay) จากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสม

จากการทดสอบพบว่าตรวจสอบไวรัสโดยการใส่ไข่ฟักนั้นมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่มากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง เนื่องจากให้ผลชัดเจนจากการสังเกตมากกว่าวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งยังคงเป็นวิธีการที่สะดวกและเหมาะสม ส่วนวิธีการติดเชื้อโดยการให้ไวรัสเข้าสู่ท่อลมนั้นยังคงมีความเหมาะสม ในกรณีศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยา และการแสดงความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสในพื้นที่ (Butler et al., 1972)

2.7.2 การตรวจสอบแอนติเจนของเชื้อ

2.7.2.1 Agar gel precipitation เป็นวิธีการที่ง่าย ไม่แพง รวดเร็ว และใช้ อุปกรณ์น้อย โดยอาศัยการจับกันของแอนติบอดี และแอนติเจนที่จำเพาะของไวรัสในวุ้นตัวกลาง อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สามารถเกิดผลลบลวงจากการมีอัตราส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีไม่เหมาะสม (de Wit, 2000)

2.7.2.2 Immunofluorescence เป็นวิธีที่ต้องการอุปกรณ์ตรวจจับแสง ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นวิธีที่ไม่แพงและตรวจสอบได้รวดเร็ว โดยการตรวจจับแอนติเจนบนเซลล์เนื้อเยื่อ ชนิดต่างๆ ด้วยโพลีโคลนอลหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถใช้ในการแยกกลุ่มของไวรัสได้ (de Wit et al., 1995) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ผลการตรวจสอบวิธีนี้อาจมีความยุ่งยากจากการเกิดการจับกันของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ ซึ่งพบได้มากจากตัวอย่างภาคสนาม (Yagy and Ohta, 1990; De Wit et al., 1995) เนื่องจากมักพบปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการจับของโปรตีน เช่น แอมโมเนีย การติดเชื้อแบคทีเรียร่วมหรือการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย ขณะเก็บและเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นจึงควรมีการกำหนดและปรับเปลี่ยนขั้นตอน และวิธีการให้มีความเหมาะสมก่อนการทดสอบ วิธีนี้มีความไวโดยประมาณเทียบเท่ากับการทำการแยกเชื้อไวรัส (de Wit, 2000)

2.7.2.3 Immunoperoxidase ใช้หลักการเดียวกันกับ immunofluorescence แต่ใช้เปอร์ออกซิเดสเอนไซม์เป็นระบบการตรวจสอบ โดยการติดสีที่สามารถตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จึงไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์การตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้การจัดการอุปกรณ์ไม่ซับซ้อน แต่ต้องใช้แรงงานในการ

ปฏิบัติงาน

### 2.7.3. การตรวจสอบสารพันธุกรรม

การพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ตำแหน่งโปรตีน S1 (โดยทั่วไป) เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องการอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือไปฟัก วิธีนี้มีความไว และสามารถแยกชนิดของไวรัสได้เมื่อทำการลำดับสารพันธุกรรม (sequencing) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องการอุปกรณ์ที่มีความจำเพาะ และการวิเคราะห์ผลจากฐานข้อมูล ในกรณีที่ต้องการแยกแยะสายพันธุ์ของเชื้อ

วิธีการ RT-PCR เป็นการจำแนกและจัดกลุ่ม IBV ว่าเป็น genotype ใด และยังสามารศึกษความสัมพันธ์ของไวรัส IB ที่พบในอดีตและปัจจุบัน ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด จากการวิเคราะห์ S1 gene วิธีการนี้จะนำเชื้อที่แยกได้มาเทียบกับ IBV sequence ในฐานข้อมูล GenBank โดยวิธีการ BLAST ผ่านทาง National Center of Biotechnology Information (สหรัฐอเมริกา) ซึ่งอ้างอิงและเทียบข้อมูลจาก phylogenetic tree (Pohuang et al., 2009)

## 2.8 การป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันเป็นโรคติดเชื้อไวรัส จึงไม่มียาในการรักษา การรักษาจึงทำได้เช่นเดียวกับการรักษาโรคไวรัสชนิดอื่น คือ การรักษาตามอาการ โดยการให้ยาต้านจุลชีพป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน และวิตามินเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ การจัดการสภาพแวดล้อมให้มีความเหมาะสม และระบบการป้องกันโรคที่รัดกุมไม่ให้เชื้อไวรัสเข้าสู่ฟาร์มได้ ร่วมกับการใช้วัคซีนป้องกันโรค

การใช้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ควรเลือกใช้วัคซีนที่เตรียมจากไวรัสสายพันธุ์ที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของไวรัสที่พบการระบาด เพื่อให้ผลของการป้องกันโรคที่ดี วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันมีทั้งชนิดเชื้อเป็นที่เป็นเชื้อไวรัสอ่อนกำลัง (live attenuated vaccine) จากการติดเชื้อผ่านหลายครั้งในไขฟัก และวัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccine) วัคซีนทุกชนิดต้องได้รับการตรวจรับรอง ปัจจุบันวัคซีนที่นิยมใช้ คือ วัคซีนเชื้อเป็น ประเทศส่วนใหญ่ที่มีการใช้วัคซีน มักรับรองการใช้วัคซีนสายพันธุ์ Massachusetta (Mass) โดยบางประเทศมีการรับรองการใช้วัคซีนสายพันธุ์อื่น เช่น สายพันธุ์ Connecticut, Arkansas, Delaware 072 ในประเทศสหรัฐอเมริกาและสายพันธุ์ 4-91 ในประเทศอังกฤษ วัคซีนเชื้อเป็นอาจให้โดยการเสปร์ละอองหยาบให้ผสมน้ำกิน หรือการให้โดยการหยอดตา สำหรับวัคซีนเชื้อตาย ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายนั้นขึ้นกับระยะเวลาของการให้วัคซีนที่เหมาะสม ต้องทำการให้เป็นรายตัวเข้ากล้ามเนื้อหรือเข้าใต้ผิวหนัง (OIE, 2013)

ปัจจุบันวัคซีนที่มีใช้ในประเทศไทย เป็นวัคซีนที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ Massachusetta เช่น M41, H120 และ Ma5 นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ Connecticut และ 4-91 (ช้องมาศ และคณะ, 2536; Cook et al., 2012; Sasipreeyajan et al., 2012)

## 2.9 การประเมินผลจากประสิทธิภาพการใช้วัคซีนที่ตัวไก่

### 2.9.1. การประเมินอาการทางคลินิก

2.9.1.1 การให้คะแนนจากอาการที่แสดงออก ได้แก่ อาการอ้าปากหายใจ ไอ จาม ซึม และขนหยอง ทำการประเมินวันละ 2 ครั้ง 10 วันต่อเนื่องกัน

**การประเมินอาการทางคลินิก** (Mahgoub et al., 2008)

คะแนน 0 คือ สังเกตไม่พบอาการ

คะแนน 1 คือ มีน้ำตา (lacrimation) หัวสั้นเล็กน้อยและบริเวณใบหน้าเปื้อก

(slight head



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



shaking and watery faces)

คะแนน 2 คือ มีน้ำตา (lacrimation) มีสารคัดหลั่งที่จมูก (presence of nasal exudates) ซึม (depression) บริเวณใบหน้าเปียก (watery

faces)

คะแนน 3 คือ มีน้ำตา (lacrimation) สารคัดหลั่งที่จมูก (presence of nasal exudates) ซึม (depression) บริเวณใบหน้าเปียก ในระดับที่

มาก

(severe watery faces)

2.9.1.2. การสังเกตเสียงกรน (tracheal rale) (Sasipreeyajan et al., 2012)

2.9.2. การประเมินรอยโรคทางพยาธิวิทยา (Mahgoub et al., 2010)

2.9.2.1. ท่อลม

คะแนน 0 คือ ไม่มีรอยโรค

คะแนน 1 คือ มีสารเมือกเล็กน้อย (slight increase of mucin)

คะแนน 2 คือ มีสารเมือกปริมาณมาก (large increase of mucin)

คะแนน 3 คือ มีสารเมือกปริมาณมากและคั่งอยู่ภายใน (large increase

of

mucin and mucosal congestion)

2.9.2.2. ไต

คะแนน 0 คือ ไม่มีรอยโรค

คะแนน 1 คือ ไตบวม มองเห็นยูเรต ด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป

(swelling,

urate visible only under stereomicroscope)

คะแนน 2 คือ ไตบวมและมองเห็นยูเรตด้วยสายตา (swelling with

visible urate)

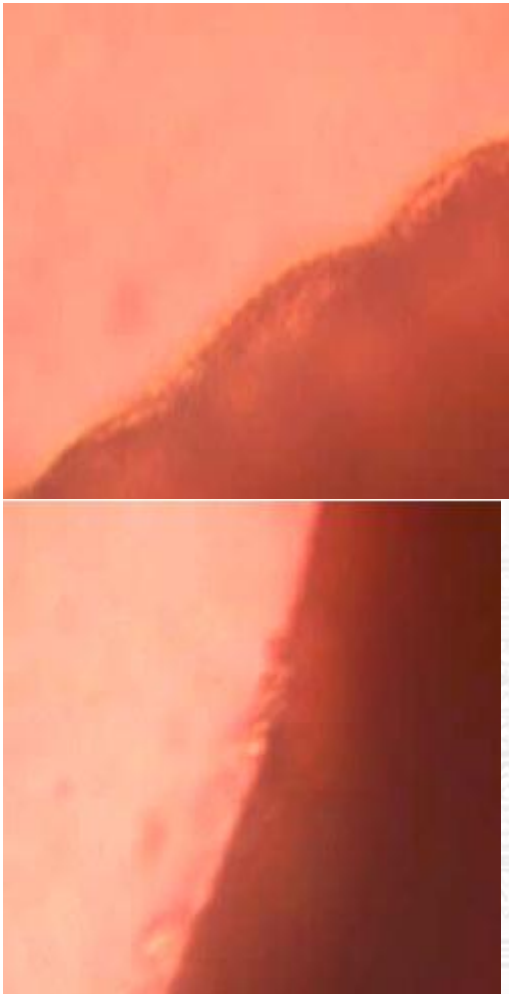
คะแนน 3 คือ ไตบวม พบยูเรตสะสมอยู่ในไตเป็นปริมาณมาก (swelling

with

large amount of urate deposit in kidney)

2.9.3. การทดสอบ Ciliostasis test (Cook et al., 1999)

การประเมินระดับความเสียหายของ ciliated epithelium ของท่อลมภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัส IBV การติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ในสัตว์ปีก เป็นสาเหตุทำให้การพัดโบกของซิเลียลดลงหรือหยุดชะงัก ซึ่งการสังเกตการพัดโบกของซิเลียในส่วนของวงท่อลมที่ตัดออกมาเป็นตัวที่ชี้วัดทางปริมาณถึงระดับความรุนแรงเสียหายจากการได้รับเชื้อ IBV ได้ (รูปที่ 1)



ซีเลียพัดโบก 100%

ซีเลียพัดโบก 0%

รูปที่ 1. แสดงการการประเมิน ciliostasis score

#### 2.9.4. การประเมินรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

##### 2.9.4.1 การประเมินรอยโรคในท่อลม (tracheal score) (Grgic et al., 2008)

คะแนน 1 คือ สังเกตไม่พบรอยโรค

คะแนน 2 คือ พบเยื่อบุเพิ่มการแบ่งตัวเล็กน้อย มีเม็ดเลือดขาวแทรกเข้ามา

บริเวณติดเชื้อ โดยพบว่าเซลล์ที่มีซีเลียเกิดการเปลี่ยนรูปร่างกลมขึ้นและแยกตัวออกจากพื้นผิวชั้นใต้เยื่อบุ พบเม็ดเลือดขาวแทรก

ตัวที่ขึ้น

lamina propria และอาจพบต่อมสร้างเมือกขยายขนาดผิดปกติรูปร่าง

	คะแนน 3 คือ พบการเกิดการแบ่งตัวเพิ่มของเยื่อบุปานกลาง มีเม็ดเลือด
ขาว	
	แทรกเข้ามาอย่างสมบูรณ์ เห็นได้ชัดเจน เกิดการสูญเสียของซีเลีย
ของ	และการเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเซลล์เยื่อ การลดลง
lamina	จำนวนของต่อมเมือกในถุงลมและเกิดการบวมน้ำชัดเจนของ
	propria
	คะแนน 4 คือ เกิดการแบ่งตัวเพิ่มของเยื่อบุอย่างรุนแรง มีเม็ดเลือดขาว
แทรกโดย	
	มีการหนาตัวของเยื่อและชั้นผิวของเยื่อ เซลล์จะกลายเป็น
เซลล์พื้นผิว	squamous สังเกตไม่พบต่อมเมือกทั่วบริเวณ
	2.9.4.2. การประเมินรอยโรคในท่อลมคอและไต (เชิดชัยและคณะ, 2542) การ
	ประเมินได้ดัดแปลงจาก Purcell et al., 1976 และ Rattanasethakul, 1979
	2.9.4.2.1. ท่อลม
	คะแนน 0 คือ ปกติ สังเกตไม่พบรอยโรค
	คะแนน 1 คือ ซีเลียหายไป มี epithelial hyperplasia บางส่วน และมี
submucosa	lymphoid infiltration เล็กน้อยใน lamina propria และ
	คะแนน 2 คือ ซีเลียหายไป มี epithelial hyperplasia ปานกลาง และมี
	lymphoid infiltration ปานกลางใน lamina propria และ
	submucosa
	คะแนน 3 คือ ซีเลียหายไป มี epithelial hyperplasia และมี
lymphoid	infiltration มากในชั้น lamina propria และ submucosa
	2.9. 4.2.2. ไต
	คะแนน 0 คือ ปกติ สังเกตไม่พบรอยโรค

คะแนน 1 คือ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวระหว่างเนื้อเยื่อ (lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue) เป็นบริเวณเล็กๆ 1-2 แห่ง

คะแนน 2 คือ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวระหว่างเนื้อเยื่อ (lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue) เป็นบริเวณเล็กๆ 3-4 แห่ง

คะแนน 3 คือ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวระหว่างเนื้อเยื่อ (lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue) เป็นบริเวณกว้าง

2.9.4.3 การประเมินรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมและไต (Chen et al., 1996)

2.9.4.3.1 การตรวจประเมินให้ระดับคะแนนที่ท่อลมให้คะแนน 4 ระดับคือ 0, 1,

2, 3 โดย

0 คือ ระดับปกติ (no change)

1 คือ ระดับอ่อน (mild)

2 คือ ระดับปานกลาง (moderate)

3 คือ ระดับรุนแรง (severe)

การให้คะแนนจากการตรวจประเมินความเสียหายลักษณะการเกิด epithelial deciliation, epithelial degeneration, mucous gland ลดลง, heterophil infiltration, epithelial hyperplasia, lymphoid infiltration ของท่อลม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9.4.3.2 การประเมินให้คะแนนที่ไตให้คะแนน 4 ระดับคือ 0, 1, 2, 3 โดย

0 คือ ระดับปกติ (no change)

1 คือ ระดับอ่อน (mild)

2 คือ ระดับปานกลาง (moderate)

3 คือ ระดับรุนแรง (severe)

การให้คะแนนจากการตรวจประเมินความเสียหาย คือ epithelial degeneration, ductotubular dilation, lymphoid infiltration, epithelial regeneration, lymphoid nodules และ fibroblastic proliferation ที่ บริเวณไต

2.9.5. การตรวจแยกเชื้อด้วยวิธี reverse transcriptase PCR ที่ตำแหน่ง S1 protein

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการให้วัคซีนต้านป้องกันการติดเชื้อภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV (Canavagh et al., 1997; Gelb et al., 2005; Terregino et al., 2008; Sasipreeyajan et al., 2012)

## 2.10 การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อป้องกันการติดเชื้อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

Cook และคณะ (1999) พบว่า การให้วัคซีนเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ Massachusetts Ma5 แก่ลูกไก่อายุ 1 วัน ร่วมกับการให้วัคซีนต่างสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 4-91 ที่อายุ 2 สัปดาห์กับไก่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free chicken) ที่ได้รับเชื้อ IBV ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของโลก ในสัปดาห์ที่ 5 โดยประเมินผลของวัคซีนจากการทำงานผ่านการโบกพัดของซีเลียของเซลล์ท่อลม จากผลการทดลองพบว่าการใช้วัคซีนแบบต่างสายพันธุ์ (heterogous strain) ให้ประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีน ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ต่างๆ ได้ดีกว่าการใช้วัคซีนสายพันธุ์เดียว (homologous strain) ในการศึกษาของ Lim และคณะ (2012) ได้ทดลองในไก่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free) ใช้วัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์ K2 (สายพันธุ์สร้างความเสียหายต่อไต) เปรียบเทียบกับ IB H120 ที่ 3 สัปดาห์ ภายหลังให้วัคซีนให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์อุบัติใหม่ในประเทศเกาหลีสองกลุ่ม คือกลุ่มที่แยกพบสายพันธุ์ใหม่กับอีกกลุ่มที่เป็นสายพันธุ์ variant พบว่าวัคซีนเชื้อเป็น K2 สามารถป้องกันการติดเชื้อข้ามระหว่างสายพันธุ์ได้ดีกว่าวัคซีน IB H120

Gelb และคณะ (2005) พบว่าการใช้วัคซีน IBV เชื้อเป็นสายพันธุ์ Massachusetts (Mass), Arkansas (Ark) หรือ DE/072/92 ซึ่งโดยทั่วไปการเลือกวัคซีนเพื่อป้องกันโรค IBV ในพื้นที่จะเลือกวัคซีนที่ความคล้ายคลึงกันของ S1 โปรตีน (มากกว่าหรือเท่ากับ 90%) กับเชื้อ IBV ที่พบ ในการทดลองนี้กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันจากการใช้วัคซีน 2 สายพันธุ์ คือ Mass และ Ark ประเมินผลจากการตรวจเชื้อโดยวิธี RFLP แยกระหว่างสายพันธุ์ IBV ของวัคซีนและเชื้อที่ให้ พบว่าเกิดการป้องกันข้ามระหว่างสายพันธุ์ได้ดี โดยเฉลี่ย 83% (คิดจากจำนวนไก่ที่ตรวจพบเชื้อ IBV) จากการได้รับเชื้อ IBV variant 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยวัคซีนที่เลือกมา คือ Mass มีความคล้ายคลึงกับ S1 โปรตีนอยู่ในช่วง 62-69% และมีความคล้ายคลึงกับ Ark อยู่ในช่วง 68-83% กับเชื้อ IBV variant ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา

Terregino และคณะ (2008) พบว่าการให้วัคซีน IBV สายพันธุ์ Massachusettes (Ma5) และ 4-91 ที่อายุ 1 และ 14 วัน และที่ไก่อายุ 35 วัน ทำการให้เชื้อ IBV สายพันธุ์ QX ติดตามผลการทดลองจากอาการป่วยที่แสดงออก ระดับไตเตอร์ที่ตอบสนอง การตรวจหาเชื้อไวรัส และการตรวจ electron microscopy ที่ท่อลม ผลการทดลอง พบว่าโปรแกรมวัคซีนที่ใช้ อาจเป็นแนวทางที่สามารถลดความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการติดเชื้อ IBV สายพันธุ์ QX ได้

จากการศึกษาการให้วัคซีนสายพันธุ์ Ma5 และ 4-91 พบว่าการใช้วัคซีน Ma5 เพียงสายพันธุ์เดียวมีประสิทธิภาพการป้องกันโรคที่ไม่ดี แต่เมื่อใช้วัคซีน 4-91 สายพันธุ์เดียวหรือการใช้ร่วมกัน

สายพันธุ์ Ma5 สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ B1648 (สายพันธุ์สร้างความเสียหายต่อไต) ได้ (Cook et al., 2001)

ในประเทศจีน มีการศึกษาความคุ้มโรคของวัคซีนทางการค้า 8 ชนิดที่ต่างสายพันธุ์กัน คือ W93, D41, H94, HK, IBN, J9, JAAS, Jlin) ที่ขายในประเทศจีน และตรวจสอบการติดเชื้อโดยใช้เชื้อที่พบระบาดในพื้นที่เป็นสายพันธุ์ t/CH/LDT3/03 ซึ่งแยกได้จากนกเป็ดน้ำในประเทศจีน (Liu et al., 2006) และนำผลความคุ้มโรคมารวมไว้กับความต่างของสายพันธุ์ โดยดูจากความใกล้เคียงของลำดับสารพันธุกรรม และลำดับโปรตีน โดยนำเชื้อไวรัสในวัคซีนทุกชนิดเพิ่มจำนวนในไขฟัก อายุ 9 วัน และเก็บไวรัสในวันที่ 2 (ไขฟักอายุ 11 วัน) ทำการแยกเก็บเชื้อไวรัสตามวิธีของ Liu and Kong (2004) จากนั้นนำไปปรับให้ได้ไวรัสปริมาณ  $10^6$ - $10^8$  median embryo infective dose (EID<sub>50</sub>) ก่อนนำไปตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมและลำดับโปรตีน และนำไปตรวจสอบความคุ้มโรคและยืนยันการปรากฏของไวรัสพาร์ติเคิล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากน้ำในไขฟัก (allantoic fluid) โดยไวรัสวัคซีนที่ได้รับการปรับจำนวนแล้ว ทำการหยอดเข้าตาไก่ SPF อายุ 1 วัน (10 ตัวต่อกลุ่ม) โดยใช้วัคซีนสายพันธุ์ H120, IBN, J9, JAAS, Jlin และ CK/CH/LGD/031 และทำการเก็บ cloacal swab มาทดสอบการติดเชื้อที่อายุไก่ 26 วัน ด้วยปริมาณไวรัส  $10^{5.6}$  EID<sub>50</sub>/ตัว ทำการตรวจสอบอาการไก่ทุกวัน เป็นเวลา 30 วันต่อเนื่องกันนับ ตั้งแต่วันติดเชื้อ พบว่าวัคซีนที่มีขายอยู่ภายในประเทศให้ผลการป้องกันโรคต่อ IBV สายพันธุ์ t/CH/LDT3/03

การทดลองของ Geerlig และคณะ (Geerlig et al., 2011) ใช้วัคซีนเชื้อเป็น Poulvac IB QX (Pfizer) ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความปลอดภัยในไก่เนื้อและไก่พันธุ์ โดยกำหนดโปรแกรมการให้วัคซีนไก่เนื้อ ที่อายุ 1 วัน ไก่พันธุ์ที่อายุ 7 วัน โดยออกแบบการประเมินความปลอดภัย โดยการให้วัคซีนเกินขนาดเป็น  $10^5$  EID<sub>50</sub>/ตัว และเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มให้วัคซีนและไม่ให้วัคซีน การทดลองที่ 1 ในไก่เนื้อ ใช้ไก่ปลอดเชื้อ 60 ตัว (กลุ่มละ 30 ตัว ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม) ให้วัคซีนโดยการหยอดตา (0.2 มล.ต่อตัว) ที่อายุ 1 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงอาการทุกวัน และทำการชั่งน้ำหนักตัวทุกสัปดาห์ ทำการเมตตาฆาตไก่ทุกตัว ในวันที่ 42 และตรวจสอบรอยโรคมหภาค (gross lesion) การทดลองที่ 2 ในไก่พันธุ์ ใช้ไก่ทดลองจำนวน 50 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยเพิ่มกลุ่มไก่ที่มีภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนที่ได้รับจากพ่อแม่ ให้วัคซีนที่อายุ 1 วัน และบันทึกการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกันกับไก่เนื้อ แต่ทำการให้วัคซีนโดยการเสปร์รี่ (0.5 มล.ต่อตัว) และเพิ่มการตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจากเลือดในวันเริ่มการทดลอง เพื่อตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันจากพ่อแม่ โดยใช้ ELISA (FlockCheck Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit IDEXX) ในสัปดาห์ที่ 10 ทำการเมตตาฆาตไก่ทุกตัว และทำการตรวจสอบรอยโรค การประเมินผลโดยเน้นการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย โดยเฉพาะที่ท่อไข่ ผลการทดลองพบว่า ไม่พบอาการทางคลินิก ไม่พบรอยโรคมหภาคในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อจากไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน และไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักตัวของไก่ทั้งสองกลุ่ม คือ กลุ่มให้และกลุ่มไม่ให้วัคซีน ในการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน ทำการประเมินโดยการให้วัคซีนในปริมาณต่ำสุด ( $10^3$  และ  $10^{3.3}$  EID<sub>50</sub>/ตัว) ด้วยการใช้การหยอดตา (0.1 มล.ต่อตาทั้ง 2 ข้าง) ในไก่อายุ 1 วัน จากนั้นทำทดลองติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ D388 (QX-like virus) ที่อายุ 21 อายุ 42 หรือ อายุ 63 วัน

หลังจากการทดลองติดเชื้อ 5 วัน ไข่ทั้งหมดจะถูกทำให้ตาย และทำการประเมินผลให้ ciliostasis score ทั้งนี้ พบว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนให้ผลการป้องกันโรคดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน

Sasipreeyajan และคณะ (2012) รายงาน การทดลองที่มีการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มการทดลองคือกลุ่มที่ 1 ได้รับวัคซีน IBV QX-like ครั้งเดียวที่อายุ 7 วัน กลุ่มที่ 2 ได้รับวัคซีน IBV QX like ที่อายุ 1 วันและ 14 วัน กลุ่มที่ 3 ได้รับวัคซีน IBV QX like ที่อายุ 1 วัน และ ND B1+IBV Mass and Conn ที่อายุ 14 วัน กลุ่มที่ 4 ได้รับวัคซีน IBV H120 ที่อายุ 1 วัน และ ND B1+IBV Mass and Conn ที่อายุ 14 วัน กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก ที่อายุ 3 วันให้เชื้อ IBV Qx like ที่แยกได้ในประเทศไทย (IBV THA80151) ติดตามผลจากการประเมินน้ำหนักตัว อาการป่วย การตรวจแยกเชื้อและทางจุลพยาธิวิทยา ผลการทดลองพบว่าทุกโปรแกรมวัคซีนสามารถลดอัตราการป่วยจากการได้รับเชื้อ IBV QX like ได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ IBV และความเสียหายที่ต่อลมได้

## บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 เชื้อไวรัส

เลือกเชื้อ IBV จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ IBV THA80151 Accession number FJ156075 Genotype Thailand II และ IBV THA90151 Accession number EU925649 Genotype Thailand I จากหน่วยวิจัยอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Pohuang et al., 2009)

## 3.1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก และการคำนวณไวรัสไตเตอร์

3.1.1.1. ไข่ไก่ฟักอายุ 1 วัน จากฟาร์มไก่พันธุ์ไข่ จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.1.1.2. ฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส ภายในตู้ฟักขนาดเล็ก

(ขนาดบรรจุ 72 ฟอง)

3.1.1.3. เมื่อไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน ทำการส่องไข่ เพื่อเลือกไข่ไก่ฟักที่เอ็มบริโอมีชีวิต

3.1.1.4. การฉีดเชื้อไวรัส IB เข้าตรงฟองไข่ที่ตำแหน่ง allantoic cavity

3.1.1.5. เตรียมเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเจือจางไวรัส ด้วยสารละลาย

PBS

(isotonic PBS (0.01M) pH7.0-7.2) ในอัตราส่วน 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>,

1:10<sup>4</sup>

1:10<sup>5</sup> 1:10<sup>6</sup> และ 1:10<sup>7</sup>

3.1.1.6. ฆ่าเชื้อที่ตำแหน่งที่ฉีด ด้วยสารละลายเบตาดีน

3.1.1.7. เจาะทะลุเปลือกไข่ ด้วยเข็มเบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว ต้องระวัง อย่าให้เข็ม

ทะลุชั้น

allantoic cavity และทิ่มแทงลูกตัวเอ็มบริโอ

3.1.1.8. ดูดเชื้อไวรัสตามความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้คือ 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>,

1:10<sup>7</sup>

ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 ml. ตามลำดับ เริ่มจากความเข้มข้นน้อยไปยัง

ความ

เข้มข้นมาก

3.1.1.9. ฉีดเชื้อไวรัสปริมาตร 0.1 ml. ที่เจือจางไว้แต่ละความเข้มข้นต่อไข่ไก่ฟัก



จำนวน 6 ฟอง เข้าไปที่รูที่ใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเตรียมไว้ เริ่มจากความ  
เข้มข้นน้อย

ไปยังความเข้มข้นมาก

3.1.1.10. ใช้กาวน้ำปิดรูที่เจาะที่ฟองไข่ของแต่ละฟองที่ฉีดเชื้อเสร็จแล้ว

3.1.1.11. ไข่ถูกฉีดเชื้อเรียบร้อยแล้ว นำเข้าไปฟักในตู้ฟักตั้งอุณหภูมิ 37.5 องศา

เซลเซียส

เป็นเวลา 7 วัน

3.1.1.12. ติดตามการตายของเอ็มบริโอทุกวันโดยวิธีการส่องตรวจ ส่วนเอ็มบริโอ

ที่ตาย

ภายในวันแรกของการฟักจะไม่นำมาใช้คำนวณ เพราะการตายอาจเกิด

จาก

ปัญหาอื่นไม่ใช่เป็นผลกระทบจากการได้รับเชื้อไวรัส IBV

3.1.1.13. บันทึกผลการส่องไข่ นำข้อมูลมาใช้คำนวณหาปริมาณไวรัสไตเตอร์ ELD<sub>50</sub>

ตาม

วิธี Reed and Muench (1938) (ตามตารางที่ 1 และ 2)

#### ตารางที่ 1. แสดงการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ IBV THA90151

อัตราส่วน ไวรัส	จำนวน เอ็มบริโอที่ ตาย	จำนวน เอ็มบริโอที่มี ชีวิต	จำนวนเอ็มบริโอสะสม			% ตาย (A/(A+B))x100
			ตาย (A)	มีชีวิต (B)	A+B	
10 <sup>-3</sup>	6	0	19	0	19	100
10 <sup>-4</sup>	5	1	13	1	14	92.85
10 <sup>-5</sup>	3	3	8	4	12	66.67
10 <sup>-6</sup>	4	2	5	6	11	45.45
10 <sup>-7</sup>	1	5	1	11	12	8.33

คำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ที่ ELD<sub>50</sub> จาก

=  $\frac{(\% \text{เอ็มบริโอที่ตาย ในอัตราส่วนแรกที่มีมากกว่า } 50\%) - 50}{100}$

(%เอ็มบริโอที่ตายในอัตราส่วนแรกที่มีมากกว่า 50%) - (%เอ็มบริโอที่ตายในอัตราส่วนที่น้อยกว่า 50%)

$$= \text{Index} = (66.67-50)/(66.67-45.45) = 0.78$$

$$\text{ELD}_{50} = 10^{5.78} / 0.1 \text{ ml.}$$

ดังนั้นค่าไวรัสไตเตอร์ที่  $\text{ELD}_{50}$  เท่ากับ  $10^{5.78} / 0.1 \text{ ml}$

## ตารางที่ 2. แสดงการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ IBV THA80151

อัตราส่วน ไวรัส	จำนวน เอ็มบริโอที่ ตาย	จำนวน เอ็มบริโอที่มี ชีวิต	จำนวนเอ็มบริโอสะสม			% ตาย (A/(A+B))x100
			ตาย (A)	มีชีวิต (B)	A+B	
$10^{-3}$	5	1	19	1	20	95
$10^{-4}$	6	0	14	1	15	93.33
$10^{-5}$	4	2	8	3	11	72.72
$10^{-6}$	2	4	4	7	11	36.36
$10^{-7}$	2	4	2	11	13	15.38

$$\text{Index} = (72.72-50)/(72.72-36.36) = 0.62$$

$$\text{ELD}_{50} = 10^{5.62} / 0.1 \text{ ml.}$$

ดังนั้นค่าไวรัสไตเตอร์ที่  $\text{ELD}_{50}$  เท่ากับ  $10^{5.62} / 0.1 \text{ ml}$

### 3.1.2 การเก็บเชื้อไวรัส

3.1.2.1. การรวบรวม allantoic fluid ในไข่ฟัก กรณีที่เอ็มบริโอยังไม่ตายให้นำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

3.1.2.2. นำแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70% เช็ดฆ่าเชื้อบริเวณรอบเปลือกไข่ตรงตำแหน่งที่จะเปิดเก็บ ฆ่าเชื้อที่ forcep แล้วเจาะเปิดเปลือกไข่บริเวณด้านข้างของฟองไข่ (บริเวณ air egg shell) โดยรอบเปลือกไข่ เนื้อฟองอากาศของฟองไข่ ระวังอย่าให้เยื่อด้านล่าง air egg shell ฉีกขาด

3.1.2.3. ดูด allantoic fluid ที่มีเชื้อ IBV ด้วยกระบอกฉีดยา ขนาด 5 ml. เก็บ allantoic fluid ในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 400 xg เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นดูส่วนของเหลวไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ส่วนของตะกอนนำไปทิ้ง

**การทดลองที่ 1** ใช้เชื้อ IBV THA80151 (THA8) ปริมาณเชื้อ 5.62 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub>/0.1ml

**การทดลองที่ 2** ใช้เชื้อ IBV THA90151 (THA9) ปริมาณเชื้อ 5.78 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub>/0.1ml แต่ผลการทดลองใช้ไวรัสปริมาณ 100 µl ต่อไก่ 1 ตัว ให้โดยวิธีการหยอดตา เมื่อไก่อายุ 28 วัน

### 3.2. วัคซีน

วัคซีนที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการคุ้มโรคของเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ THA80151 และ THA90151 คือ Nobilis IB H120 (Intervet, Holland) Nobilis IB 4-91 (Intervet, Holland) และ Poulvac IB QX -like (Fort Dodge Animal Health, Weesp, Holland)

### 3.3. การออกแบบกลุ่มทดลอง

3.3.1. การทดลองที่ 1 ลูกไก่เนื้อเพศเมียอายุ 1 วันจำนวน 220 ตัว สุ่มแบ่งไก่เป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 40 ตัว แล้วสุ่มลูกไก่อายุ 1 วันจำนวน 20 ตัวของแต่ละกลุ่มมาเจาะเก็บตัวอย่างเลือดแล้วทำเมตตาฆาต ทำการสุ่มแบ่งลูกไก่ที่เหลือจำนวน 40 ตัวต่อกลุ่ม ให้วัคซีนชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการหยอดตา (ตารางที่ 3) เมื่อไก่อายุ 28 วัน ให้เชื้อ IBV THA80151 (THA8) ปริมาณเชื้อ 5.62 log<sub>10</sub> ELD<sub>50</sub>/0.1ml แก่ไก่ทุกตัวทุก

3.3.2 การทดลองที่ 2 ลูกไก่เนื้อเพศเมียอายุ 1 วันจำนวน 260 ตัว สุ่มแบ่งไก่เป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 40 ตัว แล้วสุ่มลูกไก่อายุ 1 วันจำนวน 20 ตัวของแต่ละกลุ่มมาเจาะเก็บตัวอย่างเลือดแล้วทำเมตตาฆาต ทำการสุ่มแบ่งลูกไก่ที่เหลือจำนวน 40 ตัวต่อกลุ่ม ให้วัคซีนชนิด

ต่างๆ ด้วยวิธีการหยอดตา (ตารางที่ 3) เมื่อไก่อายุ 28 วัน ให้เชื้อ IBV THA90151 (THA9) ปริมาณ เชื้อ  $5.78 \log_{10} \text{ELD}_{50}/0.1\text{ml}$  แก่ไก่ทุกตัวทุก ยกเว้นไก่กลุ่มควบคุมลบ(กลุ่มที่ 6) (ตารางที่ 3)

### 3.4. การสังเกตอาการทางคลินิก

สังเกตอาการเสี่ยงกรนทุกกลุ่มหลังจากได้เชื้อไวรัส IBV ที่ไปแล้ว 5 วัน และน้ำหนักตัวไก่ที่ อายุ 28 35 และ 42 วัน

### 3.5. การตรวจทางซีรัมวิทยา

สุ่มเจาะเลือดไก่ 20 ตัวต่อกลุ่ม โดยเจาะเลือดที่อายุ 1 วัน และทุกๆ สัปดาห์จนกระทั่งสิ้นสุด การทดลอง โดยตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (BioChek, Holland)

ตารางที่ 3. การทดสอบความคุ้มโรคโดยการใช้วัคซีนสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และให้เชื้อพิษ IBV เมื่อไก่ อายุ 28 วัน

กลุ่ม	อายุที่ให้วัคซีน		อายุที่ให้เชื้อ IBV
	1	14	
1	QX-like	-	+
2	QX-like	QX-like	+
3	H120	QX-like	+
4	H120	4-91	+
5	-	-	+
6	-	-	-

หมายเหตุ การทดลองที่ 1 ให้เชื้อ IBV THA80151 ไม่มีกลุ่มทดลองที่ 6

การทดลองที่ 2 ให้เชื้อ IBV THA90151 มีทั้งหมด 6 กลุ่มทดลอง

### 3.6. การประเมิน ciliostasis score

ทำการประเมินระดับความเสียหายของ ciliated epithelium ของท่อลมภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV การติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในสัตว์ปีก เป็นสาเหตุทำให้การพับของซีเลียลดลงหรือหยุดชะงัก ซึ่งการสังเกตการณ์พับโบกของซีเลียในส่วนของวงท่อลมที่ตัดออกนี้ สามารถชี้วัดถึงระดับความรุนแรง หรือความเสียหายจากการได้รับเชื้อ IBV ได้ โดยห้องปฏิบัติการที่ใช้ทดสอบต้องมีสภาพแวดล้อมที่สะอาด การทดสอบทำการสุ่มไก่ 5 ตัวต่อกลุ่ม โดย การทดลองที่ 1 ทำการประเมินภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV นาน 7 วัน การทดลองที่ 2 ทำการประเมินภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV นาน 5 และ 7 วัน

#### 3.6.1 อุปกรณ์

- 3.6.1.1. Petri dishes 90 mm
- 3.6.1.2. Sterile instruments – scissors and forceps
- 3.6.1.3. Scalpel blades (nr. 22)
- 3.6.1.4. Microscope fitted with 10X eyepiece and 10X objective lens
- 3.6.1.5. Sterile universal containers – 30 ml capacity
- 3.6.1.6. 24-Well-plate

#### 3.6.2 สารเคมี

3.6.2.1. Minimum Essential Medium Eagle/Eagle's Balance Salts (MEM/EBSS) (HyClone<sup>R</sup>, Thermo SCIENTIFIC, Utah, USA)

3.6.2.2. 70% alcohol

#### 3.6.3 วิธีการทดสอบ

3.6.3.1. อดอาหาร 2 ชั่วโมงก่อนเมตตามาตไก่เพื่อไม่ให้อาหารเข้าไปภายในท่อลม จะทำให้การอ่านยากมากขึ้น

3.6.3.2. เมตตามาตไก่ด้วยวิธีการดิงคอกไก่ให้กระดูกคอต้นคอท่อนที่ 1 ให้หลุด

3.6.3.3. ใช้กรรไกรและ forceps เลาะผิวหนังบริเวณคอเปิดเข้าไปหาท่อลม

3.6.3.4. เลาะดึ่งท่อลมออกมาตั้งแต่ส่วน epiglottis ยาวลงไปไกลที่สุดเท่าที่ทำได้ ( ใช้ forceps จับตรง epiglottis เพื่อลดปัญหาความเสียหายตรงส่วนของท่อลมให้น้อยที่สุด พยายาม แยกเนื้อเยื่อและไขมันออกให้มากที่สุด วางท่อลมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM/EBSS

3.6.3.5. นำท่อลมที่ตัดออกมาแช่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS เขย่าหลอดให้มั่นใจว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าไปภายในท่อลม ด้วย vortex นำท่อลมวางลงใน Petri dish ทำการขจัดเศษไขมัน เนื้อเยื่อ และเยื่อเมือกบริเวณท่อลม อีกครั้ง

3.6.3.6. ใช้ใบมีด scalpel blade ตัดแบ่งท่อลมออกเป็น 10 ชิ้น (แต่ละชิ้นมีขนาดใหญ่ไม่เกิน 2 mm.) โดยแบ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ใต้ epiglottis 3 ชิ้น ตำแหน่งส่วนกลางท่อลม 4 ชิ้น และตำแหน่งท่อลมส่วนปลาย 3 ชิ้น

3.6.3.7. นำชิ้นท่อลมที่ได้ใส่ใน 24-well-plate จำนวน 1 ชิ้นต่อ 1 หลุมที่มี MEM/EBSS

3.6.3.8. นำตัวอย่างที่เตรียมได้รับมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ low power inverted microscopy กำลังขยายต่ำสุด (10X eyepiece และ 10X objective lens) เพื่อดูการทำงานของ ซิเลีย และให้คะแนนดังนี้

คะแนน 0 คือ ซิเลียพัดโบกตามปกติ

คะแนน 1 คือ ซิเลียพัดโบกเพียง 75 %

คะแนน 2 คือ ซิเลียพัดโบกเพียง 50 %

คะแนน 3 คือ ซิเลียพัดโบกเพียง 25 %

คะแนน 4 คือ ซิเลียไม่พัดโบก

คะแนนรวมสูงสุดต่อไก่หนึ่งตัวจะเท่ากับ 40 ถ้าพบว่าไก่มีคะแนนน้อยกว่า 20 คะแนน แสดงว่าไก่อัตว์นั้นสามารถป้องกันการให้เชื้อพิษหัดได้ หลังจากนั้นนำคะแนนที่ได้จากไก่แต่ละตัวในกลุ่มมา คำนวณหา Protection score (Cook et al., 1999)

การคำนวณ Protection score :

$$\times 100 \left[ \frac{1 - \text{mean ciliostasis score for vaccinated/challenge}}{\quad} \right]$$

Mean cilliositosis score for corresponding challenge control

การคำนวณ เปอร์เซนต์ Protection :

$$\frac{\text{จำนวนไก่(ตัว)ที่มีค่า cilliositosis score น้อยกว่า 20 ของแต่ละกลุ่ม}}{\text{จำนวนไก่ที่ตรวจทั้งหมดต่อกลุ่ม(5 ตัว)}} \times 100$$

**3.7. การตรวจหาเชื้อไวรัส ด้วยวิธี Reverse transcripts PCR (RT- PCR) ของเนื้อเยื่อท่อนม ปอด ไต และลำไส้** โดยการตรวจผ่าซากไก่จำนวน 3 ตัวต่อกลุ่ม ที่อายุ 4 5 และ 6 วัน เก็บตัวอย่างจากไต ท่อนม ปอด ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV (Terregino et al., 2008; Sasipreeyajan et al., 2012)

#### 3.7.1 วิธีการตรวจ RT-PCR ต่อเชื้อ IBV THA80151

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ IBV ด้วยวิธีการตรวจ RT- PCR กับ specific primer ต่อ S1 gene ต่อเชื้อ IBV THA80151 โดยวิธี one-step RT-PCR ใช้ชุด Primer F1547-TAA TGA AAC TGG TTC TCA GCC และ R1691-GCG GTA CTA TTT GCT TAA TAA (Sasipreeyajan et al., 2012)

##### 3.7.1.1. เตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจด้วยวิธี RT-PCR

3.7.1.1.1. นำตัวอย่างมาบดในครก (mortar และ pestle) เติมทราย และ สารละลาย PBS เล็กน้อย

3.7.1.1.2. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge 400 x g นาน 3 นาที

3.7.1.1.3. ตูดส่วนใสออกจากหลอดทดลอง และนำส่วนใสที่ได้ไปใช้สกัด แยก RNA

3.7.1.1.4. สกัด RNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัด HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Real Biotech Corporation, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้คือ

##### 3.7.1.2. ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก (Lysis)

3.7.1.2.1. นำตัวอย่างปริมาณ 200 µl ใส่ลงในหลอด microcentrifuge กรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณน้อยกว่า 200 µl ให้ปรับปริมาณโดยใช้ PBS

3.7.1.2.2. เติมสาร VB Lysis Buffer ปริมาณ 400 µl ลงในตัวอย่าง และ ผสมโดยใช้ vortex

3.7.1.2.3. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที

##### 3.7.1.3. ขั้นตอน Nucleic acid Binding

- 3.7.1.3.1. นำ VB column ใส่ลงใน collection tube ขนาด 2 ml
- 3.7.1.3.2. ดูดสารละลาย Lysate mixture ที่ได้ใส่ VB column และปั่นที่ความเร็วรอบ 21,900 x g เป็นระยะเวลา 1 นาที
- 3.7.1.3.3. เทของเหลวทิ้ง และวาง VB column ลงใน collection tube เหมือนเดิม
- 3.7.1.4. ขั้นตอนการล้าง
- 3.7.1.4.1. เติม W1 Buffer 400 µl ลงใน VB column และปั่นที่ความเร็วรอบ 21,900 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที
- 3.7.1.4.2. เทของเหลวทิ้ง และวาง VB column ลงใน collection tube เหมือนเดิม
- 3.7.1.4.3. เติม wash buffer 600 µl ลงใน VB column และปั่นที่ความเร็วรอบ 21,900 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที
- 3.7.1.4.4. เทของเหลวทิ้ง และวาง VB column ลงใน collection tube เหมือนเดิม
- 3.7.1.4.5. ปั่นแห้งที่ความเร็วรอบ 21,900 x g เป็นระยะเวลา 3 นาที
- 3.7.1.5. ขั้นตอน Nucleic acid Elution
- 3.7.1.5.1. วาง VB column ในหลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 ml
- 3.7.1.5.2. เติม RNase-free water ลงตรงบริเวณกึ่งกลางของ column
- 3.7.1.5.3. วางทิ้งไว้ 3 นาทีจนกระทั่งมีการดูดซับน้ำจนหมด
- 3.7.1.5.4. ปั่นที่ความเร็วรอบ 21,900 x g เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อดึงสารพันธุกรรมที่บริสุทธิ์ออกมา
- 3.7.1.6. ขั้นตอนการตรวจ RT-PCR
- 3.7.1.6.1. การเติมสารเพื่อตรวจ RT-PCR กับ THA80151 (ตารางที่ 4)
- 3.7.1.6.2. ดูดส่วนผสมแบ่งลงในหลอด PCR ปริมาณหลอดละ 23 µl แล้วเติม RNA template (จากตัวอย่างที่สกัด) ปริมาณหลอดละ 2 µl รวมเป็นปริมาณ 25 µl

ตารางที่ 4. การเติมส่วนประกอบต่างๆ เพื่อตรวจ RT-PCR ต่อเชื้อ IBV THA80151

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	1Rx	2Rx	3Rx	5Rx	10Rx
DEPC-Treat Water	-	7.5	15	22.5	37.5	75



Access Quick 2X	1X	12.5	25	37.5	62.5	125
Primer F1547 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M	1.25	2.5	3.75	6.25	12.5
Primer R1691(10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M	1.25	2.5	3.75	6.25	12.5
AMV Reverse Trans.5U/ $\mu$ l	2.5U	0.5	1	1.5	2.5	5

### 3.7.1.6.3. นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR จากนั้นตั้งสภาวะเครื่องดังนี้

Reverse transcription	48 $^{\circ}$ C	45 นาที	
Pre-denature	94 $^{\circ}$ C	5 นาที	
Denaturation	94 $^{\circ}$ C	30 วินาที	} 35 รอบ
Annealing	56 $^{\circ}$ C	30 วินาที	
Extension	72 $^{\circ}$ C	30 วินาที	
Final Extension	72 $^{\circ}$ C	10 นาที	

### 3.7.1.7. ขั้นตอน gel electrophoresis

#### 3.7.1.7.1. ขั้นตอนการเตรียม agarose gel

3.7.1.7.1.1. เตรียม TBE จากความเข้มข้น 5X เป็น 0.5X

3.7.1.7.1.2. เตรียม agarose gel ให้เป็น 1.2% โดยคำนวณปริมาณ gel แล้วนำไปละลายกับ TBE ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปอุ่นให้ gel ละลายจนใส

3.7.1.7.1.3. รอจน gel เย็นขึ้นแล้วเทใส่บล็อก

3.7.1.7.2. ผสม loading dye ปริมาณ 5  $\mu$ l กับตัวอย่างปริมาณ 10  $\mu$ l หยอดใส่หลุม gel จากนั้นต่อกับเครื่อง gel electrophoresis (100 volt, 500 mA, 40 นาที)

3.7.1.7.3. นำ gel ย้อมสี Ethidium bromide เป็นระยะเวลา 20 นาที

3.7.1.7.4. นำ PCR product ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.2% agarose gel ที่ 100 volt 45 นาที นำเข้าเครื่อง UV transilluminator เพื่ออ่านผล โดยที่ตัวอย่าง

3.7.1.7.5 ผลที่ได้ เชื้อ IBV THA80151 จะให้ผลบวกที่ 200 base pair, IB H120 จะให้ผลบวกที่ 900 base pair และ IBV strain L1148 จากวัคซีนจะไม่ให้ผลบวกกับ primer ที่ใช้

### 3.7.2. วิธีการตรวจ RT-PCR ต่อเชื้อ IBV THA90151

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ IBV ด้วยวิธีการตรวจ RT-PCR กับ specific primer ต่อ S1 gene ต่อเชื้อ IBV THA90151 โดยวิธี one-step RT-PCR โดยใช้ชุด Primer THA09/1F 5'ATG CAG GCT CTT CAT CTG GG -3' Primer THA09/1R 5'GCT GTT GAA GCA TGC CAG TT -3' ชุดทดสอบ : AccessQuick™ RT-PCR system วิธีการสกัดและเตรียม RNA template เหมือนกับ THA80151 จะแตกต่างตรงขั้นตอนการตรวจ RT-PCR ดังนี้คือ

#### 3.7.2.1. ขั้นตอนการตรวจ RT-PCR

3.7.2.1.1. การเติมสารเพื่อตรวจ RT-PCR สำหรับ THA90151\_ (ตารางที่ 5)

3.7.2.1.2. คูส่วนผสมแบ่งลงในหลอด PCR ปริมาณหลอดละ 23 µl แล้วเติม RNA template (จากตัวอย่างที่สกัด) ปริมาณหลอดละ 2 µl รวมเป็นปริมาณ 25 µl

ตารางที่ 5. การเติมส่วนประกอบต่างๆ เพื่อตรวจ RT-PCR ต่อเชื้อ IBV THA90151

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	1Rx	2Rx	3Rx	5Rx	10Rx
	สุดท้าย					
DEPC-Treat Water	-	7.5	15	22.5	37.5	75
Access Quick 2X	1X	12.5	25	37.5	62.5	125
Primer F (10µM)	0.5 µM	1.25	2.5	3.75	6.25	12.5
Primer R (10µM)	0.5 µM	1.25	2.5	3.75	6.25	12.5
AMV Reverse Trans.5U/µl	2.5U	0.5	1	1.5	2.5	5

### 3.7.2.1.3. นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR จากนั้นตั้งสถานะเครื่องดังนี้

Reverse transcription step	48 °C	45 min	
Pre-denaturation step	94 °C	5 min	
Denaturation step	94 °C	30 sec	} 35 รอบ
Annealing step Gradient	58 °C	30 sec	
Extension step	72 °C	30 sec	
Final Extension step	72 °C	10 min	
Hold temperature	4 °C		

### 3.7.2.2. วิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis ขั้นตอนการทำเหมือนกับ IBV

THA80151

## 3.8. การตรวจทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อทอลม ปอด และไต

สุ่มไก่ จำนวน 3 ตัวต่อกลุ่ม ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อพิษทาบที่ 3 5 7 และ 14 วัน นำไก่แต่ละกลุ่มการทดลองมาทำเมตตาฆาต จากนั้นผ่าซากนำทอลม และไตมาแช่เก็บใน formalin 10% นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน ตัดและย้อมด้วย haematoxylin และ eosin (HE) แล้วนำมาตรวจความเสียหายของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจประเมินให้ระดับคะแนน 0-3 คือ 0 คือ ปกติ (no change), 1 คือ ระดับอ่อน (mild), 2 คือ ระดับปานกลาง (moderate), 3 คือ ระดับรุนแรง (severe) การตรวจ และประเมินผล อ้างอิงตาม Chen และคณะ (1996) โดยการตรวจสอบประเมินความเสียหายจากความเสียหายของเซลล์บุผิว (epithelial deciliation) การเสื่อมของเซลล์บุผิว (epithelial degeneration) การลดลงของต่อมสร้างเมือก (decrease of mucous gland) การแทรกของเซลล์เฮเทอโรฟิลล์ (heterophil infiltration) การเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิว (epithelial

hyperplasia) การแทรกของเซลล์น้ำเหลือง และการบวมน้ำ (lymphoid infiltration and edema) epithelial deciliation, epithelial degeneration, decrease of mucous gland, heterophil infiltration, epithelial hyperplasia, lymphoid infiltration and edema ส่วนไตให้สังเกตการเสื่อมของเซลล์บุผิว (epithelial degeneration) การขยายท่อไต (ductotubular dilation) การแทรกของเซลล์น้ำเหลือง (lymphoid infiltration) การซ่อมแซมเซลล์บุผิว (epithelial regeneration) และการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์ (fibroblastic proliferation) โดยใช้วิธีการประเมินของ Chen และคณะ ( 1996 )ในส่วนของปอดประเมินให้คะแนนจากการแทรกของเซลล์น้ำเหลือง และเฮเทอโรฟิลล์ lymphoid infiltration และ heterophil infiltration ใช้วิธีการประเมินจาก Randall and Reece (1996)

### 3.9. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเลี้ยงจากน้ำหนัก

ทำการชั่งน้ำหนักตัวไก่ ณ วันที่ 28 35 และ 42 วัน

### 3.10. การใช้สถิติในการวิเคราะห์

ใช้ ANOVA และ Duncan's multiple test เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มทดลองตามคอลัมน์เดียวกันของการตอบสนองของระดับภูมิคุ้มกัน และน้ำหนักตัว และใช้ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney test เพื่อวิเคราะห์เสียงกรน ciliostasis score คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และการตรวจพบเชื้อที่อวัยวะที่ระดับความเชื่อมั่น  $p < 0.05$  ของแต่ละกลุ่มทดลองตามคอลัมน์เดียวกัน

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการทดลองที่ 1 โดยการให้เชื้อ IBV THA80151

##### 4.1.1. อาการทางคลินิก และน้ำหนักตัว

ภายหลังจากที่ให้เชื้อ IBV THA80151 ติดตามอาการทางคลินิก และการป่วย-ตาย พบว่าไม่พบอัตราการตายที่แตกต่างกันตลอดการทดลอง โดยไม่พบไก่แสดงอาการป่วยที่ชัดเจน แต่ได้ยินเสียงกรน กลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มมีเสียงกรนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ยกเว้นกลุ่ม 3 ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 ด้านน้ำหนักตัวที่อายุ 28, 35 และ 42 วัน ในกลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนทุกกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อโดยน้ำหนักไก่ที่ 7 และ 14 วัน ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อพบว่ากลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ไม่ให้วัคซีน ภายหลังจากที่ให้เชื้อ IBV THA80131 (ตามตารางที่ 6)

ตารางที่ 6. การได้ยินเสียงกรน (tracheal rale) ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 5 วัน และน้ำหนักตัวไก่ (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุไก่ 28 35 และ 42 วัน

กลุ่ม	จำนวนไก่ที่พบเสียงกรน จากท่อลม (จำนวนไก่ 30 ตัวต่อกลุ่ม)	น้ำหนักไก่ (กรัมต่อตัว) ที่อายุ 28 35 42 วัน		
		28 วัน (n = 35)	35 วัน (n = 20)	42 วัน (n = 15)
1	1 <sup>a</sup>	1504.29 $\pm$ 81.61	1936.00 $\pm$ 78.50	2380.67 $\pm$ 138.85
2	2 <sup>a</sup>	1535.71 $\pm$ 82.76	1945.00 $\pm$ 111.76	2394.67 $\pm$ 146.67
3	4 <sup>a,b</sup>	1510.00 $\pm$ 60.97	1921.50 $\pm$ 241.03	2334.67 $\pm$ 188.52
4	2 <sup>a</sup>	1508.86 $\pm$ 67.12	1936.50 $\pm$ 100.17	2363.33 $\pm$ 189.50
5	9 <sup>b</sup>	1503.46 $\pm$ 73.67	1874.00 $\pm$ 117.98	2295.33 $\pm$ 185.85

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

n หมายถึงจำนวนไก่ที่ซึ่หน้าหน้ากตัว

#### 4.1.2. การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันโรค

ลูกไก่อายุ 1 วัน พบระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV ที่ได้รับมาจากแม่ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $4871 \pm 1801$  และลดลงที่อายุ 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ระดับภูมิคุ้มกันในกลุ่มทดลองที่ได้รับวัคซีน พบมีระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV เริ่มสูงขึ้นที่อายุไก่ 28 วัน ที่ไก่อายุ 28 วัน ไก่กลุ่มที่ 4 ได้รับวัคซีน Nobilis IB H120 ที่อายุ 1 วันและ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 14 วัน พบระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับทุกกลุ่มการทดลอง ที่ไก่อายุ 35 วัน กลุ่มที่ 3 ได้รับวัคซีน Nobilis IB H120 ที่อายุ 1 วัน และ Poulvac IB QX like ที่อายุ 14 วัน พบมีระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับทุกกลุ่มการทดลอง ที่ไก่อายุ 42 วัน ไก่กลุ่มทดลองที่ 2 3 และ 4 มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV สูงกว่ากลุ่ม 1 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตามตารางที่ 7 )

ตารางที่ 7. ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ IBV THA80151 (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุ 7 14 28 35 และ 42 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของระดับภูมิคุ้มกัน ± ค่าเบี่ยงเบน					
	7 วัน (n = 15)	14 วัน (n = 15)	21 วัน (n = 15)	28 วัน (n = 15)	35 วัน (n = 15)	42 วัน (n = 10)
1	901.60±158.41	240.00±159.56 <sup>a</sup>	37.33±63.31 <sup>a</sup>	83.27±94.53 <sup>a</sup>	2754.20±1785.88 <sup>a</sup>	2269.90±1023.21 <sup>a</sup>
2	656.73±378.83	134.67±132.97 <sup>a</sup>	97.80±193.98 <sup>a</sup>	420.53±614.37 <sup>a</sup>	4170.33±2654.94 <sup>b</sup>	4501.00±2235.75 <sup>b</sup>
3	916.07±441.76	237.40±174.83 <sup>a</sup>	200.93±186.63 <sup>a</sup>	1089.13±71-.75 <sup>b</sup>	7643.33±2427.30 <sup>c</sup>	6432.70±2986.75 <sup>b</sup>
4	622.13±283.50	186.93±106.19 <sup>a</sup>	205.87±227.61 <sup>a</sup>	2509.53±1192.07 <sup>c</sup>	3387.47±1435.37 <sup>a,b</sup>	4431.30±322.76 <sup>b</sup>
5	890.93±717.94	501.47±607.87 <sup>b</sup>	692.93±865.49 <sup>b</sup>	546.27±784.80 <sup>a,b</sup>	3963.85±677.17 <sup>a</sup>	1022.50±337.12 <sup>a</sup>

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

n หมายถึง จำนวนไก่ที่เก็บตัวอย่างเลือด

#### 4.1.3. การประเมิน Ciliostasis score

การติดตามประเมินผล โดยการทำ ciliostasis test ภายหลังจากที่ให้เชื้อ IBV THA80151 แล้ว 7 วัน (ไก่อายุ 35 วัน) ผลการทดสอบพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับวัคซีนมีค่าเฉลี่ยของ ciliostasis score ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งหมายถึงไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้ง 4 กลุ่มสามารถลดผลกระทบจากการติดเชื้อ IBV THA80151 ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน กลุ่มทดลองที่ 1 และ 3 มีค่า ciliostasis score สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กลุ่มทดลองที่ 4 ที่ได้รับวัคซีน Nobilis IB H120 ที่อายุ 1 วันกับ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 14 วันพบว่าค่า ciliostasis score ต่ำที่สุดและค่า protection score สูงที่สุด ทุกกลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนมีความสามารถป้องกันโรคได้ (% protection) 100% ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนมีความสามารถป้องกันโรคได้ 20% (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ciliostasis score เปอร์เซนต์การป้องกันโรค และคะแนนการป้องกันโรคภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย ciliostasis score (n = 5)	% การป้องกัน	คะแนนการป้องกัน
1	7.80 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>	100	91.45
2	3.20 $\pm$ 3.11 <sup>a,b</sup>	100	89.47
3	7.60 $\pm$ 4.45 <sup>a</sup>	100	75.00
4	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	100	100
5	30.4 $\pm$ 10.48 <sup>c</sup>	20	0.00

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

n หมายถึง จำนวนไก่ที่สุ่มเก็บตัวอย่าง

#### 4.1.4. การให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต

ผลการทดลองภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA 80151 ที่ 3, 7 และ 14 วัน พบว่าคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เนื้อเยื่อท่อลม ปอด และไต ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละกลุ่มทั้งกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม พบว่าที่ 14 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV ค่าคะแนนทางจุลพยาธิวิทยาจะลดต่ำลง แสดงว่าร่างกายสัตว์มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคได้ดี และกลุ่ม 4 มีค่าคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาต่ำที่สุด ที่ 5 วันภายหลังจากที่ได้รับเชื้อโรค IBV



คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของทอลม ของกลุ่ม 1 และ 2 จะมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 3 และ 4 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไต ที่ 7 วันภายหลังจากที่ได้รับเชื้อโรค IBV ทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน และที่อายุ 14 วันภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 กลุ่มที่ 1 มีค่าคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตต่ำที่สุด (ตารางที่ 9)



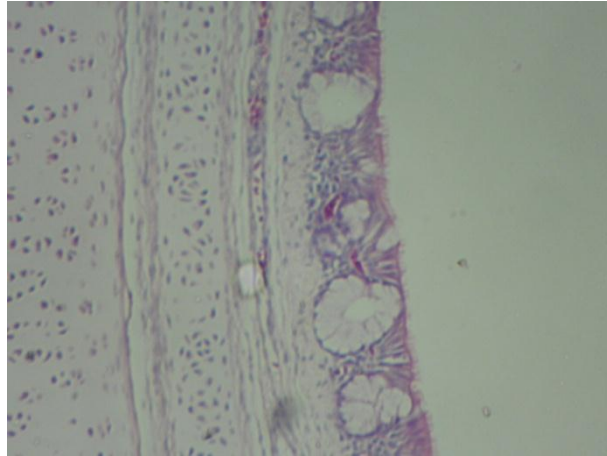
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 9. ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 3 5 7 และ 14 วัน

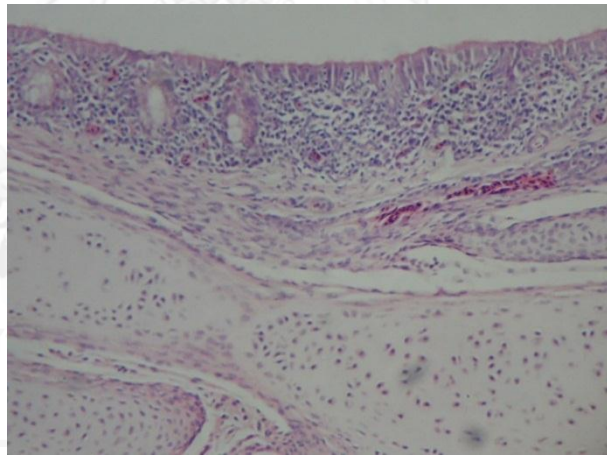
กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยคะแนนทางจุลพยาธิวิทยา (n = 3)											
	3 วันภายหลังได้รับเชื้อ			5 วันภายหลังได้รับเชื้อ			7 วันภายหลังได้รับเชื้อ			14 วันภายหลังได้รับเชื้อ		
	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต
1	1.7±0.93	1.0±1.0	0.04±0.08	2.2±0.08	0.7±0.76	0.13±0.25	1.8±0.22	0.2±0.29	0.33±0.36	1.1±0.73	0.2±0.29	0.00±0.0
2	2.0±0.57	0.0±0.0	0.00±0.0	2.1±0.08	0.3±0.58	0.13±0.14	1.5±0.08	0.0±0.0	0.46±0.30	1.0±0.22	0.0±0.0	0.42±0.0
3	1.2±0.84	0.5±0.5	0.08±0.16	1.6±0.62	0.3±0.29	0.04±0.08	1.7±0.16	0.5±0.87	0.58±0.29	0.9±0.25	0.7±1.15	0.54±0.16
4	1.0±0.68	0.0±0.0	0.04±0.08	0.9±0.71	0.0±0.25	0.13±0.25	0.8±0.30	0.5±0.16	0.13±0.16	0.2±0.22	0.0±0.0	0.29±0.36
5	2.0±0.46	0.0±0.0	0.08±0.08	1.7±0.38	0.2±0.14	0.13±0.14	1.4±0.30	0.3±0.58	0.63±0.0	1.5±0.33	0.3±0.29	0.58±0.16

n หมายถึงจำนวนไก่ที่ตรวจต่อกลุ่มต่อครั้ง

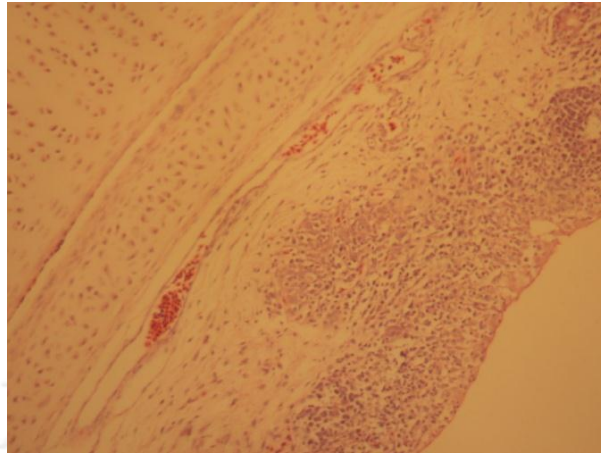
ผลการแสดงการตรวจประเมินรอยโรคของอวัยวะท่อลม ไต และปอดทางจุลพยาธิวิทยา



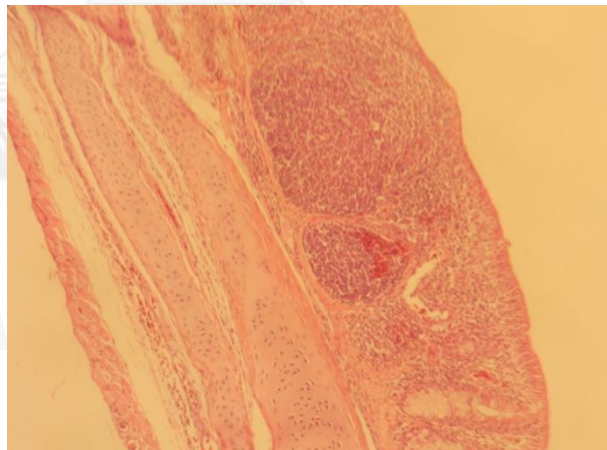
รูปที่ 2. ท่อลมปกติ ภายในท่อลมประกอบด้วยด้วยเซลล์เยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium โดยมีต่อมหลังเมือกจำนวนมาก คະแนนเท่ากับ 0 (กำลังขยาย 200 เท่า)



รูปที่ 3. ท่อลมอักเสบแบบอ่อน เกิดความเสียหาย และการเสื่อมของซิเลียบนเซลล์เยื่อบุผิว เริ่มมีเซลล์ลิมโฟไซต์แทรกในชั้น lamina propria ต่อมสร้างเมือกมีรูปร่างผิดปกติ และยืดยาว คະแนนเท่ากับ 1 (กำลังขยาย 200 เท่า)

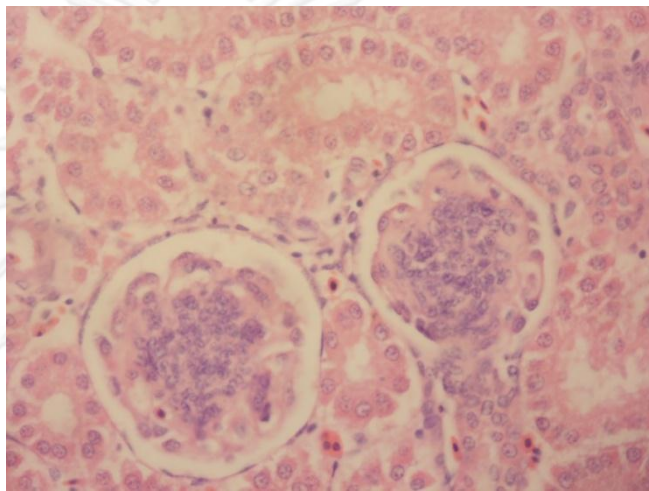


รูปที่ 4. ท่อลมอักเสบปานกลาง เกิดความเสียหาย และการเสื่อมของซิเลียบนเซลล์เยื่อบุผิว มี เซลล์ลิมโฟไซต์แทรกเข้ามาในชั้น lamina propria และมีการบวมน้ำ ค่ะแนน เท่ากับ 2 (กำลังขยาย 200 เท่า)

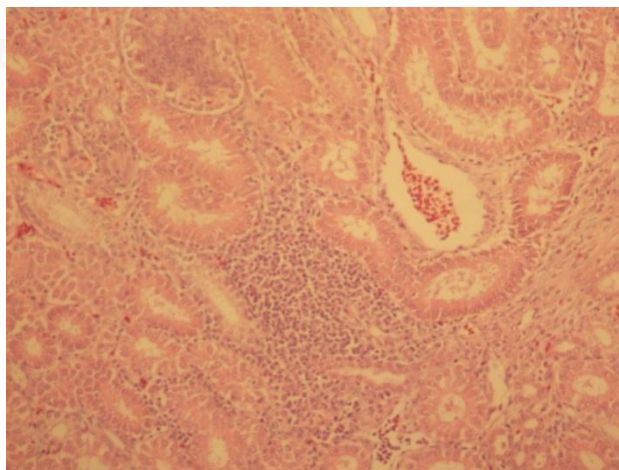


รูปที่ 5. ท่อลมเสียหายอย่างรุนแรง มีการเสียหายของซิเลียบนเซลล์เยื่อบุผิวอย่างรุนแรง การ แทรกของเซลล์น้ำเหลืองจำนวนมาก ร่วมกับการจับกลุ่มของเซลล์น้ำเหลือง และจำนวนต่อมสร้าง เมือกน้อยลง ค่ะแนน เท่ากับ 3 (กำลังขยาย 200 เท่า)

การประเมินรอยโรคไต

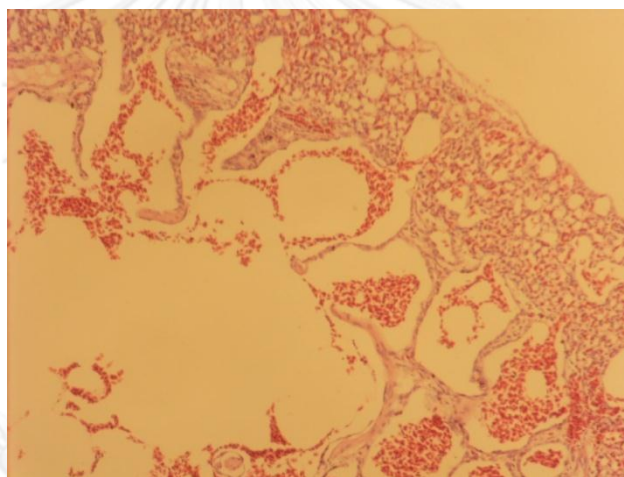


รูปที่ 6. ไตปกติ      คະแนน เท่ากับ 0 (กำลังขยาย 200 เท่า)

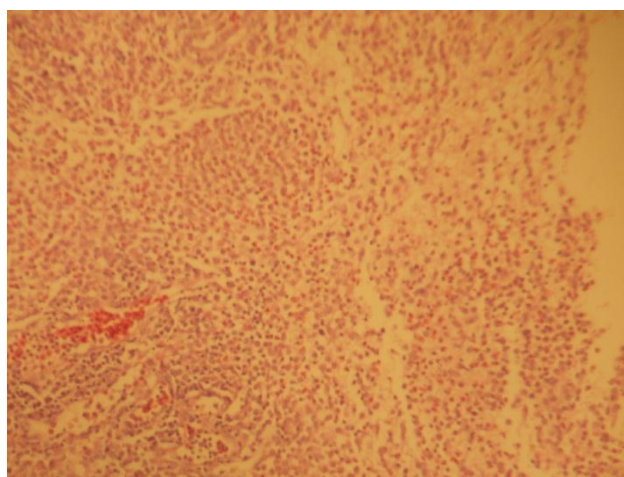


รูปที่ 7. ไตอักเสบ มีการแทรกของเซลล์น้ำเหลือง และท่อไตขยาย คະแนน เท่ากับ 1 (กำลังขยาย 200 เท่า)

การประเมินรอยโรคที่ปอด



รูปที่ 8. ปอดปกติ ส่วนของ parabronchial lobules มีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมและมีขอบเขต ถูกแบ่งแยกจาก lobules อื่นๆโดย fibrous septa normal lung คະแนน เท่ากับ 0 (กำลังขยาย 200 เท่า)



รูปที่ 9. ปอดอักเสบ พบการแทรกของเซลล์เฮเทอโรฟิลล์ และพบเห็น proteinaceous fluid pneumonia. (กำลังขยาย 200 เท่า)

#### 4.1.5. การตรวจเชื้อ IBV ที่เนื้อเยื่อท่อนม ปอด ไต และลำไส้เล็ก

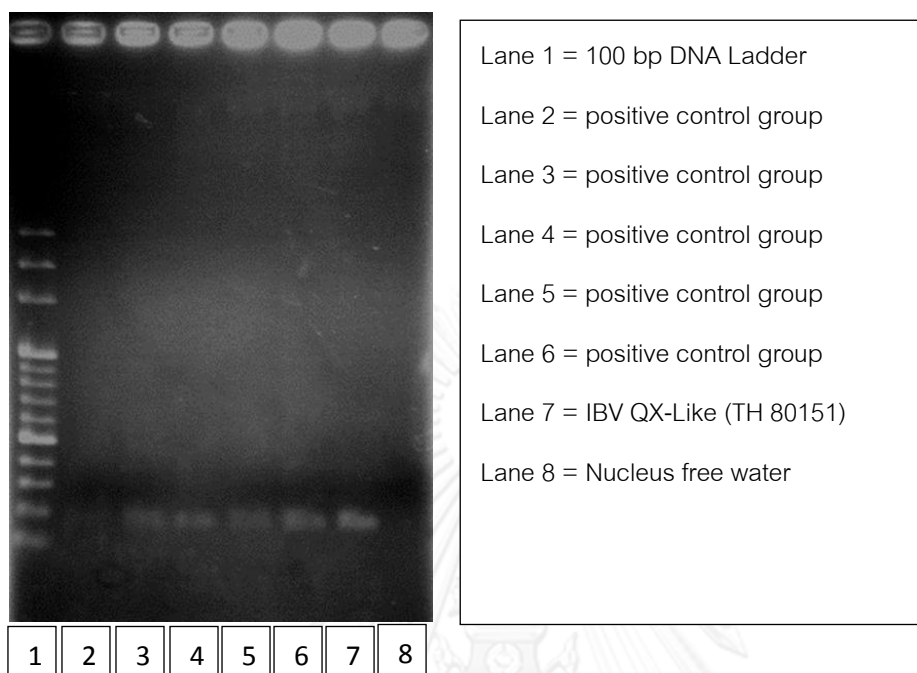
จากการใช้ RT-PCR ตรวจหาเชื้อ IBV THA80151 ที่ท่อนม ปอด ไต และลำไส้ ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 4, 5 และ 6 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการพบเชื้อ IBV THA80151 ระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับวัคซีน และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนของแต่ละอวัยวะ ท่อนมเป็นอวัยวะที่ตรวจพบเชื้อ IBV THA80151 มากที่สุด โดยที่วันที่ 5 หลังจากได้รับเชื้อ IBV สามารถตรวจพบเชื้อ IBV THA80151 ที่ลำไส้ ที่ 6 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV ตรวจพบเฉพาะที่ท่อนม และปอด (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10. การตรวจเชื้อ IBV THA80151 ที่เนื้อเยื่อต่อลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA80151 นาน 4 5 และ 6 วัน

กลุ่ม	การตรวจพบเชื้อ IBV โดยวิธี RT-PCR ( n=3 )											
	4 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ				5 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ				6 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ			
	หลอดลม	ปอด	ไต	ลำไส้	หลอดลม	ปอด	ไต	ลำไส้	หลอดลม	ปอด	ไต	ลำไส้
1	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
2	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
5	3/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3

n หมายถึงจำนวนไก่ที่ตรวจต่อกลุ่มต่อครั้ง





รูปที่ 10. แสดงภาพการตรวจ RT-PCR สำหรับเชื้อ IBV THA80151

## 4.2 ผลการทดลองที่ 2 โดยการให้เชื้อ THA90151

### 4.2.1. อาการทางคลินิก และน้ำหนักตัว

ผลจากการติดตามอาการทางคลินิกจากเสียงกรน พบว่ากลุ่มทดลองที่ให้วัคซีน และกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน แต่ให้เชื้อ IBV THA90151 ที่ไก่อายุ 28 วัน ทำการติดตามเสียงกรน ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไป 5 วันพบว่ากลุ่ม 1 ถึง 4 ที่ให้วัคซีน และกลุ่ม 6 เป็นกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ให้วัคซีนและไม่ให้เชื้อ IBV THA90151 ไม่พบเสียงกรน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่ม 5 เป็นกลุ่มควบคุมบวกที่ไม่ได้รับวัคซีนแต่ให้เชื้อ IBV THA90151 พบมีเสียงกรน 4 ใน 30 ตัว และในระหว่างการทดลอง พบไก่อกลุ่ม 5 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกที่ไม่ให้วัคซีนแต่ให้เชื้อ IBV ตายจำนวน 8 ตัวที่อายุ 31 วันเนื่องจากอาการร้อนและไก่ขาดน้ำกิน ระหว่างการทดลองไม่พบไก่อป่วยตายจากปัญหาการติดเชื้อ IBV หรือแบคทีเรียแทรกซ้อน ที่ไก่อายุ 28 และ 42 วันด้านน้ำหนักตัวไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุม ที่อายุไก่อ 35 วัน กลุ่มทดลองที่ 3 มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 5 และ 6 โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11. การได้ยินเสียงกรน (tracheal rale) ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 5 วันและ น้ำหนักตัวไก่ (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุไก่ 28 35 และ 42 วัน

กลุ่ม	จำนวนไก่ที่พบเสียงกรน (จำนวนไก่ 30 ตัวต่อกลุ่ม)	น้ำหนักไก่ (กรัมต่อตัว) ที่อายุ 28 35 42 วัน		
		28 วัน (n = 35)	35 วัน (n = 20)	42 วัน (n = 15)
1	0 <sup>a</sup>	1421.25 $\pm$ 99.77	1853.85 $\pm$ 119.10 <sup>a</sup>	2116.50 $\pm$ 218.23
2	0 <sup>a</sup>	1419.25 $\pm$ 74.74	1843.08 $\pm$ 113.55 <sup>a</sup>	2151.05 $\pm$ 250.09
3	0 <sup>a</sup>	1426.75 $\pm$ 83.46	1909.20 $\pm$ 133.32 <sup>a,b</sup>	2216.66 $\pm$ 236.22
4	0 <sup>a</sup>	1439.75 $\pm$ 92.58	1865.60 $\pm$ 143.24 <sup>a,b</sup>	2138.95 $\pm$ 257.27
5	4 <sup>b</sup>	1400.50 $\pm$ 61.81	1811.05 $\pm$ 80.48 <sup>a,c</sup>	2137.50 $\pm$ 84.87
6	0 <sup>a</sup>	1403.75 $\pm$ 50.77	1806.54 $\pm$ 41.08 <sup>a,c</sup>	2029.00 $\pm$ 134.24

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.2. การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันโรค

ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อ IBV ด้วย BioChek test kit พบว่าลูกไก่อายุ 1 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3409 และลดลงเรื่อยๆ โดยที่อายุ 7 วันกลุ่มทดลองที่ 1 มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ 2, 4 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และลดลงจนต่ำสุดที่อายุลูกไก่ 14 วัน กลุ่มทดลอง 2 3 และ 4 และกลุ่มควบคุมที่ 5 และ 6 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันเริ่มเพิ่มสูงขึ้นที่อายุ 21 วัน ส่วนกลุ่มที่ 1 ลดลงต่ำสุดที่อายุไก่ 21 วัน เริ่มสูงขึ้นที่อายุ 28 วัน โดยที่อายุไก่ 14 และ 21 วัน ไม่พบความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันทั้งระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองให้วัคซีน เมื่อไก่อายุ 28 วัน พบการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันโรคจากการให้วัคซีนแต่ละโปรแกรมของกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กรณีจัดลำดับค่าการตอบสนองระดับภูมิคุ้มกันพบว่าที่กลุ่มทดลองที่ 4 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 1 และ 14 วัน มีการตอบสนองระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) รองลงมาเป็นกลุ่มทดลองที่ 3 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน และลำดับถัดไปเป็นกลุ่มทดลองที่ 1 ให้วัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 วัน และกลุ่มที่ 2 ให้วัคซีน

Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ ที่อายุ 28 วันให้เชื้อ IBV THA90151 พบว่าที่ไก่อายุ 35 วันแต่ละกลุ่มการทดลองจะมีการตอบสนองทางด้านระดับภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยกลุ่มทดลองที่ 4 พบการตอบสนองด้านระดับภูมิคุ้มกันต่ำกว่ากลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กลุ่มทดลองที่ 3 มีการตอบสนองด้านระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 4 และ 5 ที่อายุไก่ 42 วัน พบว่าไก่แต่ละกลุ่มมีการตอบสนองทางด้านระดับภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยกลุ่มทดลองที่ 3 มีการตอบสนองทางด้านระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 1, 2, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตามตารางที่ 12)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 12. ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ IBV THA90151 (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่อายุ 7 14 28 35 และ 42 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของระดับภูมิคุ้มกัน ± ส่วนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	7 วัน (n=15)	14 วัน (n=15)	21 วัน (n=15)	28 วัน (n=15)	35 วัน (n=15)	42 วัน (n=10)
1	832.47±471.50 <sup>a</sup>	53.33±81.87	1.00±.00	1278.53±1244.37 <sup>a</sup>	2899.53±1376.02 <sup>a,b</sup>	1199.00±491.31 <sup>a</sup>
2	351.87±360.78 <sup>b</sup>	1.00±.00	20.67±76.17	1146.80±1051.35 <sup>a,b</sup>	2838.53±1893.78 <sup>a,b</sup>	1959.60±974.91 <sup>a</sup>
3	614.00±426.27 <sup>a,b</sup>	49.67±147.93	106.40±360.18	1933.60±1898.03 <sup>a</sup>	3930.47±1840.96 <sup>a</sup>	3161.50±1909.08 <sup>c</sup>
4	375.60±401.847 <sup>b</sup>	3.13±8.26	153.00±186.51	3192.53±1804.8 <sup>d</sup>	1427.33±931.194 <sup>c</sup>	1533.60±879.12 <sup>a</sup>
5	601.47±244.10 <sup>a,b</sup>	1.80±3.10	10.27±15.57	343.27±373.86 <sup>b,c</sup>	2143.47±2366.51 <sup>b,c</sup>	1880.10±1147.38 <sup>a</sup>
6	547.61±400.56 <sup>b</sup>	29.27±109.48	49.00±96.03	16.60±20.72 <sup>c</sup>	1.00±.00 <sup>d</sup>	60.30±41.21 <sup>b</sup>

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวหมายถึงในคอลัมน์เดียวกันถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

n หมายถึง จำนวนไก่ที่เก็บตัวอย่างเลือด

#### 4.2.3. การประเมิน Ciliostasis score

ภายหลังจากที่ให้เชื้อ THA90151 ไปแล้ว 5 วัน (ไก่อายุ 33 วัน) และ 7 วัน (ไก่อายุ 35 วัน) สุ่มเลือกไก่ 5 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง นำทอลมตัดแบ่งเป็น 10 ส่วนต่อ 1 ทอลม ผลที่ได้คือที่ไก่อายุ 33 วัน พบว่ากลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนมีคะแนน ciliostasis score ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มให้การป้องกันโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน โดยกลุ่มทดลองที่ 2 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มทดลองที่ 1, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่ไก่อายุ 35 วัน พบว่ากลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนมีคะแนน ciliostasis score ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มให้การป้องกันโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน และเมื่อพิจารณาค่า ciliostasis score ระหว่างไก่อายุ 33 และ 35 วันพบว่าที่อายุ 35 วันจะมีค่า ciliostasis score น้อยกว่าที่ไก่อายุ 33 วัน ด้านเปอร์เซ็นต์การป้องกันโรค (% protection) ที่ไก่อายุ 33 วัน กลุ่มทดลองที่ 4 มีค่าเท่ากับ 80% ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 100% ส่วนที่ไก่อายุ 35 วันทุกกลุ่มการทดลองที่ให้วัคซีนมี ค่า % protection เท่ากับ 100% ด้านคะแนนการป้องกันพบว่าที่ไก่อายุ 35 วันให้คะแนนการป้องกันที่มากกว่าที่ไก่อายุ 33 วัน พบว่าที่ไก่อายุ 33 วันกลุ่มที่ 2 มีคะแนนการป้องกันมากที่สุด และที่ไก่อายุ 35 วันพบว่ากลุ่มที่ 1 มีคะแนนการป้องกันมากที่สุด (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13. ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ciliostasis score เปอร์เซนต์การป้องกันโรค ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 5 และ 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยคะแนนการพัดโบก ของซีเลีย ( n=5 )		เปอร์เซนต์การป้องกัน		คะแนนการป้องกัน	
	อายุไก่ 33 วัน	อายุไก่ 35 วัน	อายุไก่ 33 วัน	อายุไก่ 35 วัน	อายุไก่ 33 วัน	อายุไก่ 35 วัน
1	12.6 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	100	100	58.82	82.29
2	6.8 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	3.8 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>	100	100	77.78	80.21
3	11 $\pm$ 3.0 <sup>b,c</sup>	3.6 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	100	100	64.05	81.25
4	15 $\pm$ 5.39 <sup>a,c</sup>	4.4 $\pm$ 3.78 <sup>a</sup>	80	100	50.98	77.08
5	30.6 $\pm$ 4.16 <sup>d</sup>	19.2 $\pm$ 9.18 <sup>b</sup>	0	80	0	0
6	0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	100	100	100	100

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

n หมายถึงจำนวนไก่ที่ตรวจประเมินต่อกลุ่มต่อครั้ง

#### 4.2.4. การให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลม ปอด และไต

ภายหลังจากที่ให้เชื้อ IBV THA90151 มีการสุ่มไก่ 3 ตัวต่อกลุ่ม ทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมผ่าซากไก่ นำท่อลม ปอด และไต ตรวจทางด้านจุลพยาธิวิทยา และประเมินให้คะแนนความเสียหายทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าที่ 3 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA90151 กลุ่มทดลองที่ 1 มีคะแนนต่ำกว่ากลุ่มทดลองที่ 5 กลุ่มทดลองที่ 2 และ 3 มีคะแนนสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 4 กลุ่มทดลองที่ 4 มีค่าคะแนนต่ำกว่ากลุ่มทดลองที่ 5 และทุกกลุ่มการทดลองที่ 1 2 3 4 และ 5 มีคะแนนสูงกว่ากลุ่มที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนที่ปอด และไต ไม่พบความแตกต่างของคะแนนในระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV THA90151 ไปแล้ว 5 7 และ 14 วัน ที่ท่อลม ปอด และไต ไม่พบมีความแตกต่างของคะแนนในระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV THA90151 นาน 3 5 7 และ 14 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยคะแนนทางจุลพยาธิวิทยา ( n=3 )											
	3 วันภายหลังได้รับเชื้อ			5 วันภายหลังได้รับเชื้อ			7 วันภายหลังได้รับเชื้อ			14 วันภายหลังได้รับเชื้อ		
	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต	หลอดลม	ปอด	ไต
1	0.86±0.38 <sup>a,b</sup>	0.33±0.0	0.33±0.22	1.29±0.43	0.67±0.29	0.52±0.22	1.43±0.52	0.0±0.0	0.62±0.22	0.76±0.95	0.0±0.0	0.29±0.25
2	1.24±0.22 <sup>a,c</sup>	0.48±0.29	0.48±0.08	1.43±0.29	0.33±0.58	0.48±0.08	1.33±0.50	0.33±0.58	0.86±0.25	0.81±0.22	0.5±0.5	0.43±0.14
3	1.38±0.30 <sup>a,c</sup>	0.62±0.58	0.62±0.30	1.33±0.16	0.0±0.0	0.24±0.22	1.38±0.30	0.17±0.29	0.71±0.38	1.29±0.43	0.17±0.29	0.67±0.44
4	0.62±0.08 <sup>b</sup>	0.14±0.29	0.14±0.14	1.38±0.08	0.0±0.0	0.29±0.38	0.52±0.30	0.17±0.29	0.76±0.33	0.57±0.74	0.0±0.0	0.62±0.30
5	1.57±0.14 <sup>c</sup>	0.33±0.58	0.33±0.36	1.57±0.62	0.33±0.58	0.57±0.0	1.81±0.30	0.0±0.0	0.86±0.00	1.33±0.16	0.33±0.58	0.67±0.16
6	0.00±0.0 <sup>d</sup>	0.10±0.58	0.10±0.16	0.00±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.62±0.41	0.0±0.0	0.19±0.08	0.14±0.14	0.0±0.0	0.24±0.22

ความแตกต่างของตัวอักษรภาษาอังกฤษแต่ละตัวในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



n หมายถึงจำนวนไม้ที่ตรวจต่อกลุ่มต่อครั้ง



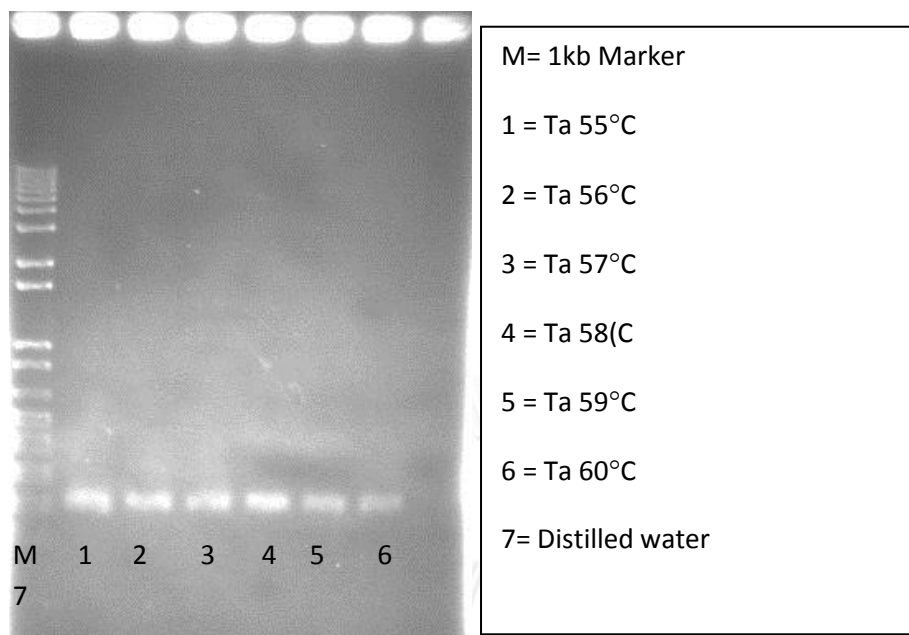
#### 4.2.5. การตรวจเชื้อ IBV ที่เนื้อเยื่อทอลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก

ภายหลังจากที่ให้เชื้อ IBV THA90151 4 5 และ 6 วัน สุ่มเลือกไก่มาผ่าซากเก็บตัวอย่างทอลม ปอด ไต และลำไส้ นำไปตรวจด้วยวิธี RT-PCR พบว่าทุกกลุ่มทดลอง ทุกอวัยวะ และช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ให้ผลการตรวจเป็นลบต่อเชื้อ IBV THA90151 (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15. การตรวจเชื้อ IBV THA90151 ที่ทอลม ปอด ไต และลำไส้เล็ก ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBVTHA90151 นาน 4 5 และ 6 วัน

กลุ่ม	การตรวจพบเชื้อ IBV โดยวิธี RT-PCR ( n = 3 )											
	4 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ				5 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ				6 วันภายหลังจากได้รับเชื้อ			
	ทอลม	ปอด	ไต	ลำไส้	ทอลม	ปอด	ไต	ลำไส้	ทอลม	ปอด	ไต	ลำไส้
1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

n หมายถึงจำนวนไก่ที่ตรวจต่อกลุ่มต่อครั้ง



รูปที่ 11. แสดงภาพจากการตรวจ RT – PCR โดยใช้อุณหภูมิของ annealing แตกต่างกันของ IBV THA9015

## บทที่ 5

### สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ ศึกษาโปรแกรมวัคซีนและการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส IBV แบบไหนที่สามารถป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากปัจจุบันยังพบรายงานการเกิดโรคการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในประเทศไทยได้อย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าจะมีการนำวัคซีนมาใช้เพื่อป้องกันโรคก็ตาม นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เป็นระยะ จากการทดลองนี้มีการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนจากอาการป่วยที่ไก่แสดงออกมา เสี่ยงกรนหายใจ น้ำหนักตัวไก่ คะแนนทางจุลพยาธิวิทยา คะแนนการตัดใบกของซีเลีย การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน และการตรวจแยกหาเชื้อ IBV

ด้านอาการป่วย พบว่าการทดลองที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 และ IBV THA90151 ไม่พบการแสดงออกของอาการป่วย เช่น ซึม มีน้ำตา ตาอักเสบบวม หรือมีน้ำมูกทั้งจากกลุ่มที่ให้วัคซีนกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้วัคซีนและได้รับเชื้อ IBV แต่พบความแตกต่างกันของเสียงกรน (tracheal rale) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส 5 วัน ในการทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA 80151 เปรียบเทียบระหว่างการใช้วัคซีนแบบ homologous strain กับการใช้วัคซีนแบบ heterologous strain กับเชื้อไวรัส IBV ผลลัพธ์ที่ได้ สามารถสรุปได้ว่าการใช้วัคซีนสายพันธุ์เดียวกันกับเชื้อ IBV กับการใช้วัคซีนที่ต่างสายพันธุ์ระหว่างครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 ของการให้ (heterologous strain) สามารถป้องกันและลดอาการแสดงออกของเชื้อ IBV ที่มีสายพันธุ์ไม่เหมือนกันกับวัคซีนได้ ส่วนการทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA90151 พบว่าการให้วัคซีนแบบ heterologous strain ให้ผลช่วยลดความเสียหายจากการติดเชื้อ IBV ได้ (Cook et al., 1999) การให้วัคซีนเชื้อเป็นแบบทำให้อ่อนกำลังลงไปกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่และแบบฟิงเซลล์ (local and cell-mediated immunity) (Bijlenga et al., 2004) ที่เยื่อของผนังท่อลม (tracheal mucosa) ป้องกันความเสียหายจากการเข้าไปติดเชื้อของไวรัส IBV THA80151 และ THA90151 ในการเลี้ยงไก่แบบเชิงอุตสาหกรรมการใช้วัคซีนแบบ heterologous strain ผลลัพธ์ที่ได้อาจไม่เหมือนกับการทดลอง ความเสียหายด้านอาการที่ไก่แสดงออกอาจเกิดขึ้นได้มากกว่า เนื่องจากความหนาแน่นของการเลี้ยงไก่มากกว่าร่วมกับการจัดการสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ด้านน้ำหนักตัวไก่ ที่อายุ 28 35 และ 42 วัน การทดลองที่ 1 ให้เชื้อ IBV THA80151 ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองที่ให้วัคซีนกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้วัคซีน อาจเนื่องจากภายหลังไก่ได้รับเชื้อโรค รูปแบบการเลี้ยงในห้องทดลองสภาพการเลี้ยงไม่หนาแน่น และสภาพแวดล้อมของห้องทดลองดีกว่าการเลี้ยงแบบเชิงอุตสาหกรรม จึงไม่

เห็นผลกระทบต่อน้ำหนัก ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Cavanagh and Gelb (2008) พบว่าผลกระทบต่อทั้งทางด้านอัตราการสูญเสียที่สูงขึ้น น้ำหนักตัวลดลงและประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนสูง

ด้านการประเมิน ciliostasis score ที่เยื่อบุผิวท่อลม สามารถแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของการป้องกันโรคจากการลดความเสียหายซีเลียของเยื่อบุท่อลมได้อย่างชัดเจน โดยสังเกตจากการพัดโบกของ ซีเลีย ผลลัพธ์ที่ได้บ่งชี้ว่าการใช้วัคซีนแบบ heterologous strain เพื่อป้องกันโรค IBV THA80151 โดยเฉพาะการให้วัคซีน Nobilis IB H 120 ที่อายุ 1 วันและ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 14 วันให้ผลการป้องกันโรค (%protection) ได้ 100% ได้เช่นเดียวกับการใช้วัคซีน Poulvac IB Qx like ที่มีสายพันธุ์เดียวกัน (homologous strain) กับเชื้อ IBV THA80151 ที่ไก่ได้รับ ส่วนการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรค IBV THA90151 ผลลัพธ์ที่ออกมาบ่งบอกว่าโปรแกรมวัคซีนแบบ heterologous strain สามารถให้การป้องกันการติดเชื้อ IBV THA90151 ได้ รวมถึงจากผลการทดลองพบว่าวัคซีน Poulvac IB QX like มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ IBV THA90151 ได้เช่นกัน การเตรียมตัวอย่างท่อลมมักพบปัญหาเมื่อภายในท่อลม ซึ่งสามารถแก้ปัญหาโดยใช้ Hanks balance salt solution มาล้างก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Mahgoub et al., 2010) การป้องกันข้ามระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ IBV อาศัยหลักการให้วัคซีนหลอดลมอีกสายพันธุ์กันระหว่างครั้งที่ 1 และ 2 ส่งผลให้ไก่สามารถมีความต้านทานโรคติดเชื้อ IBV ที่มีสายพันธุ์ไม่เหมือนกับวัคซีนได้ ซึ่งเรียกว่า protectotype (Cook et al., 1999; Terregino et al., 2008; Mahgoub et al., 2010; de Wit et al., 2011; Lim et al., 2012)

ด้านการให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอด และไต จากการให้เชื้อ IBV THA80151 และ THA90151 ไม่พบความแตกต่างกันของคะแนนที่ได้ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน สำหรับเชื้อ IBV THA90151 ในกลุ่มทดลองที่ 1 และ 4 พบว่าภายหลังจากรับเชื้อ IBV THA90151 แล้ว 3 วัน คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาต่ำกว่ากลุ่ม 5 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีน แต่ให้เชื้อ IBV (กลุ่มควบคุมบวก) โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยที่ทั้งเชื้อ IBV THA80151 และ THA 90151 ก่อให้เกิดความเสียหายต่อท่อลมมากกว่าที่ปอด และไต และพบว่าภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV ไปแล้วที่ 14 วัน กลุ่มทดลอง 1 ถึง 4 ที่ให้วัคซีนและกลุ่มควบคุม 5 กลุ่ม ที่ไม่ได้ให้วัคซีนแต่ได้รับเชื้อ IBV พบว่าระดับคะแนนที่ได้ลดต่ำกว่าช่วงระยะแรกที่ได้รับเชื้อ โดยเฉพาะที่ภายหลังได้รับเชื้อ IBV ไปแล้ว 14 วัน กลุ่มทดลองที่ 4 ที่ให้วัคซีน Nobilis IB H 120 ที่อายุ 1 วันและ Nobilis IB 4-91 มีคะแนนที่ต่ำที่สุด แสดงถึงการกลับคืนสู่สภาพของร่างกายสัตว์อาจเป็นสาเหตุที่จากการที่ร่างกายสัตว์สร้างภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะที่และแบบพั้งเซลล์มาจัดการติดเชื้อออกไป (Cavanagh, 2003) การให้วัคซีนสามารถลดการติดเชื้อและอาการที่แสดงออกภายหลังจากที่มีการติดเชื้อ IBV ซึ่ง อาจเนื่องจาก cytotoxic T-cell อาศัยการทำงานร่วมกันของ major histocompatibility complex และ CD8+ CD4- ต่อการป้องกันการติดเชื้อ

เชื้อโรคภายหลังจากที่ให้วัคซีน ลดการติดเชื้อระยะแรกๆและอาการป่วยที่แสดงออก (Seo et al., 1997) ส่งผลให้คะแนนทางด้านจุลพยาธิวิทยาที่อายุ 14 วันลดต่ำลง

ด้านการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรค กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ IBV THA80151 และกลุ่มทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA90151 พบว่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากการให้วัคซีนที่อายุไก่ 28 วัน ที่กลุ่มการทดลองที่ 4 ที่ให้วัคซีน Nobilis IB H120 ที่อายุ 1 วันและ Nobilis IB4-91 ที่อายุ 14 วัน พบว่ามีค่าระดับภูมิคุ้มกันที่สูงที่สุด กลุ่มการทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA80151 พบว่ามีผลการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันลงที่อายุ 7, 14 และ 21 วัน และมีค่าระดับภูมิคุ้มกันที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 5) ซึ่งอาจเนื่องมาจากเกิดการหักล้างกันระหว่างภูมิคุ้มกันต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่กับภูมิคุ้มกันที่มีการสร้างขึ้นใหม่จากการให้วัคซีนกับตัวไก่

(Cavanagh and Gelb, 2008) ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับเชื้อ THA90151 เมื่อติดตามระดับภูมิคุ้มกันจากค่าตัวเลขที่ได้จากการการตรวจพบว่ากลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้ให้วัคซีนและไม่ได้รับเชื้อ IBV พบระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่จะต่ำสุดที่ไก่อายุ 35 วัน แต่จากการรายงานผลการตรวจพบว่าทุกตัวอย่างเลือดที่ตรวจค่าเป็นลบที่ไก่อายุ 21 วัน แต่จากข้อมูลของ Hamal et al. (2006) ค่าระดับภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่พบว่าต่ำสุดที่อายุ 14 วัน Mockett และคณะ (1987) ได้ทำงานทดลองพบว่าค่าครึ่งชีวิต (half life) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค IBV ที่ถ่ายทอดจากแม่ไปยังลูกเท่ากับ 4.5 วัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทำให้เกิดความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากระดับตั้งต้นของภูมิคุ้มกันจากแม่มายังลูกไก่ และวิธีการตรวจที่มีความแตกต่างกัน จากทั้งสองการทดลองที่มีการให้เชื้อ IBV THA80151 กับ IBV THA90151 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันที่อายุไก่ 28 วันที่ได้จากการให้วัคซีนอาจไม่มีความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของการป้องกันโรคที่เกิดขึ้น

ด้านการตรวจหาเชื้อไวรัส IBV ที่ตำแหน่ง โปรตีน S1 โดยวิธี reverse transcriptase PCR จากการทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA80151 พบว่าต่อลมเป็นอวัยวะที่สามารถแยกพบเชื้อได้มากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับ Sasipreeyajan et al., (2012) ส่วนกลุ่มทดลองที่ให้เชื้อ IBV THA90151 ตรวจไม่พบเชื้อจากทุกตัวอย่างอาจจะเนื่องมาจากเชื้อ IBV เป็น RNA virus ซึ่งจะเสื่อมสภาพได้ง่ายและเร็วถ้าการเก็บรักษาตัวอย่างในสภาพที่ไม่เหมาะสมหรือมีการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลานานเกินไปส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ การตรวจหาระยะเวลาของการติดเชื้อหมุนเวียนระหว่างตัวไก่ ภายในฝูงอาจจะมี ความแตกต่างกันเนื่องจากสภาพการเลี้ยงไก่บนพื้นกับในกรงและความหนาแน่นของฝูงไก่ (de Wit, 2000) สภาพการเลี้ยงไก่บนพื้นและ/หรือสภาพการเลี้ยงไก่ที่หนาแน่นส่งผลให้เชื้อมีการติดเชื้อหมุนเวียนติดเชื้ระหว่างตัวไก่ได้มากที่สุดส่งผลให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อในฝูงได้เป็นระยะเวลานานเมื่อเทียบกับการเลี้ยงไก่บนกรงและ/หรือสภาพการเลี้ยงไก่ที่ไม่หนาแน่นซึ่งในการทดลองนี้ การเลี้ยงไก่จะเลี้ยงบนกรงและสภาพการเลี้ยงไม่หนาแน่นอาจจะส่งผลกระทบต่อให้การติดเชื้อ IBV ที่

หมูนเวียนระหว่างตัวไก่อ้น้อยส่งผลกระทบต่อให้การจำนวนตัวอย่างทีตรวจเชื้อไวรัส IBV ของ ที่อายุไก่อ 4 , 5 และ 6 วันหลังได้รับเชื้อได้น้อยลง

บทสรุปจากการทดลองพบว่าวัคซีนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อเข้าไปสู่ตัวไก่อได้ เนื่องจากยังแยกพบเชื้อที่อวัยวะทอลม ปอดและไต แต่วัคซีนช่วยลดอาการป่วยที่แสดงออกเช่น เสียงกรนภายในทอลม เป็นต้น และความเสียหายทีเกิดขึ้นทางจุลพยาธิวิทยา เช่น การประเมิน ciliostasis score คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ทอลม ปอดและไต เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทีให้วัคซีนป้องกันโรค IBV กับกลุ่มควบคุมทีไม่ได้ให้วัคซีน การประเมินผลประสิทธิภาพการใช้วัคซีนป้องกันโรคทอลมอีกสติดติดต่อโดยการสังเกตอาการป่วยจากเสียงกรนและการประเมิน ciliostasis score เป็นวิธีการทีเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ การให้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอีกสติดติดต่อซ้ำอีกครั้งด้วยสายพันธุ์ทีแตกต่างจากครั้งแรกช่วยให้เกิดการป้องกันโรคข้ามระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อโรคหลอดลมอีกสติดติดต่อได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## รายการอ้างอิง

- เชิดชัย รัตนเศรษฐกุล กัลยา เจือจันทร์ วราภรณ์ ศกลพงศ์ และกิ่งกาญจน์ สารระชู. 2542. การก่อโรคไตอักเสบในไก่ที่เกิดจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ. สัญชัย จตุรสิทธา (บรรณาธิการ), รายงานการประชุมวิชาการสาขาสัตวบาล/สัตวศาสตร์/สัตวแพทย์ วันที่ 8-10 ธันวาคม พ.ศ. 2542. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 243-252.
- ซ้องมาศ อันตรเสน บุญเลิศ อ่าวเจริญ นิมิตร เชื้อเงิน สมพงศ์ สหพงศ์และรุ่งทิวา กงกะนันท์. 2536. โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในเขตภาคใต้. เวชสารโรงพยาบาลสัตว์: 47-54.
- นิยมศักดิ์ อุปทุม วิมลพร จิระวัฒน์พงษ์ วิมล จิระธนะวัฒน์ รื่นฤดี บุญยะโหดระ สมใจ ศรีหาคิม บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ นิमित สิริริกุล และพรทิพย์ ศิริวรรณ. 2526. โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กระทางซึ่งพบวิการที่ไต. เวชสารสัตวแพทย์. 13: 36-43.
- Alexander DJ and Gough RE. 1977. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. Res Vet Sci. 23: 344-347.
- Alexander DJ and Gough RE. 1978. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. Res Vet Sci. 24: 228-233.
- Benyeda Z, Mató T, Süveges T, Szabó E, Kardi V, Abonyi-Tóth Z, Rusvai M and Palya V. 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. Avian Pathol. 38: 449-456.
- Benyeda Z, Szeredi L, Mato T, Suveges T, Balka G, Abonyi-Toth Z, Rusvai M and Palya V. 2010 Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotype of infectious bronchitis virus infection in chickens. J Comp Path. 143: 276-283.
- Bhattacharjee PS, Carter SD, Savage CE and Jones RC. 1995. Re-excretion of infectious bronchitis virus in chickens induced by cyclosporin. Avian Pathol. 24: 435-441.
- Bijlenga G, Cook JKA, Gelb J and de Wit JJ. 2004. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. Avian Pathol. 33: 550-557.
- Bochkov YA, Batchenko GV, Scherbakova LO, Borisov AV and Drygin VV. 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. Avian Pathol. 35: 379-393.
- Britton P, Armesto M, Cavanagh D and Keep S. 2012. Modification of the avian coronavirus infectious bronchitis virus for vaccine development. Bioeng Bugs. 3: 114-119.



- Butler M, Ellaway WJ and Hall T. 1972. Comparative studies on the infectivity of avian respiratory viruses for eggs, cell cultures and tracheal explants. *J Comp Pathol.* 82: 327-332.
- Cavanagh D. 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32: 567-582.
- Cavanagh D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* 38: 281-297.
- Cavanagh D and Gelb J. 2008. Infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> ed. Y. M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne (eds.). Iowa State University Press. Blackwell Publishing Professional.: 117-135.
- Chen BY, Host S, Nunoya T and Itakura C. 1996. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol.* 25: 269-283.
- Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 12: 1-7.
- Chong KT and Apostolov K. 1982. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by Infectious bronchitis virus. *J Comp Pathol.* 92: 199-211.
- Cook JKA. 1968. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Res Vet Sci.* 9: 506-514.
- Cook JKA, Chesher J, Baxendale W, Greenwood N, Huggins MB and Orbell SJ. 2001. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 30: 423-426.
- Cook JKA, Jackwood M and Jones RC. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239-250.
- Cook JKA, Orbell SJ, Woods MA and Huggins MB. 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.
- De Wit JJ. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29: 71-93.
- De Wit JJ, Cook JKA and Van der Heijden HMJ. 2011. Infectious bronchitis virus variants: A review of the history, current situation and control measure. *Avian Pathol.* 40: 223-235.
- De Wit JJ, de Jong MC, Pijpers A and Verheijden JH. 1998. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. *Avian Pathol.* 27: 464-471.

- De Wit JJ, Koch G, Kant A and Van Roozelaar DJ. 1995. Detection by immunofluorescent assay of serotype-specific and group-specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems. *Avian Pathol.* 24: 465-474.
- De Wit JJ, Nieuwenhuisen-van Wilgen J, Hoogkamer A, van de Sande H, Zuidam GJ and Fabri TH. 2011. Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. *Avian Pathol.* 40: 463-471.
- Dhinakar RG and Jones RC. 1996. Prototypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an in vitro challenge model. *Vet Microbiol.* 53: 239-252.
- Geerligs HJ, Boelm GJ, Meinders CA, Stuurman BG, Symons J, Tarres-Call J, Bru T, Vila R, Mombarg M, Karaca K, Wijmenga W and Kumar M. 2011. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol.* 40: 93-102.
- Gelb Jr J, Weisman Y, Ladman BS and Meir R. 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* 34: 194-203.
- Gough RE, Cox WJ, de B Welchman D, Worthington KJ and Jones RC. 2008. Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Vet Rec.* 19: 162: 99-100.
- Grgic H, Hunter DB, Hunton P and Nagy E. 2000. Pathogenicity of infectious bronchitis virus isolates from Ontario chickens. *Can J Vet Res.* 72: 403-410.
- Hamal KR, Burgess SC, Pevzner LY and Erf GF. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poul Sci.* 85: 1364-1372.
- Ignjatovic J and Sapats S. 2000. Review: Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech.* 19: 493-508.
- Jones RC and Ambali AG. 1987. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet Rec.* 120: 617-618.
- Lee HJ, Youn HN, Kwon JS, Lee YJ, Kim JH, Lee JB, Park SY, Choi IS and Song CS. 2010. Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus

- vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. *Vaccine*. 28: 2887-2894.
- Lim TH, Kim MS, Jang JH, Lee DH, Park JK, Youn HN, Lee JB, Park SY, Choi IS and Song CS. 2012. Live attenuated nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine provides broad cross protection against new variant strains. *Poult Sci*. 91: 89-94.
- Liu S and Kong X. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol*. 33: 321-327.
- Liu S, Chen J, Han Z, Zhang Q, Shao Y, Kong X and Tong G. 2006. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. *Avian Pathol*. 35: 394-399.
- Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Liu Q, Han Z, Zhang Q, Kong X and Tong G. 2009. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. *The Vet J*. 179: 130-136.
- Mahdavi S, Tavasoly A, Pourbakhsh SA and Momayez R. 2007. Experimental histopathologic study of lesions induced by serotype 793/B(4-91) infectious bronchitis virus. *Archives of Razi Institute*. 62: 15-22.
- Mahgoub KM, Bassiouni AA, Manal AA and Rabie AN. 2010. The prevalence of infectious bronchitis (IB) outbreaks in some chicken farms. III, Cross Protection of vaccinated chickens versus field IB virus. *J. Am. Sci*. 6: 94-108.
- Mardani K, Noormohammadi MH, Ignjatovic J and Browning GF. 2010. Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*. 155: 1581-1586.
- McMartin DA. 1993. In: McFerran J.B and McNulty MS, eds. *Virus infections of birds*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 4: 249-275.
- Mockett APA, Cook JKA and Huggins MB. 1987. Maternally-derived antibody to infectious Bronchitis virus: its detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian Pathol*. 16: 407-416.
- Mohammed MH, Hair-Bejo M, Zahid AA, Alazawy A, Ahad EAA, Mauda EAA and Hasoon F. 2012. Pathogenesis of infectious bronchitis virus in infected broiler chickens. *Bas J Vet Res*. 11: 180-188.
- Monne I, Cattoli G, Jones R, Worthington K and Wijnenga W. 2008. QX genotypes of infectious bronchitis virus circulating in Europe. *Vet Rec*. 15; 163: 606-607.

- OIE. 2013. In: Avian infectious bronchitis. OIE Terrestrial manual 2013. World assembly of delegates of the OIE: 1-15.
- Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A and Sasipreeyajan J. 2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *J Vet Sci.* 10: 219-223.
- Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A and Sasipreeyajan J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: identification of natural recombination in the field isolates. *Virus Genes.* 43: 254-260.
- Purcell DA, Tham VL and Surman PG. 1976. The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic "T" strain of virus. *Aust Vet J.* 52: 85-91.
- Randall CJ and Reece RL. 1996. Color atlas of avian histopathology. Published by London: Mosby-Wolfe: 145-169.
- Ratanasethakul C. 1979. Studies on some factor affecting the pathogenesis and immune response of Australian infectious bronchitisviruses. Ph.D.Thesis.University of New England. Aminide.N.S.W., Australia.
- Reed LR and Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497
- Saif LJ. 1993. Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol.* 37: 285-297.
- Sasipreeyajan J, Pohuang T and Srikobkul N. 2012. Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. *Thai J Vet Med.* 42: 73-79.
- Schalk AF and Hawn MC. 1931. An apparently new respiratory disease of chicks. *J Am Vet Med Assoc.* 78: 413-422.
- Seo SH and Collosson EW. 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *J.Virol.* 71: 5173-5177.
- Smith HW, Cook JK and Parsell ZE. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol.* 66: 777-786.
- Terregino C, Toffan A, Beato MS, Nardi RD, Vescellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M and Capua I. 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4-91 Serotype. *Avian Pathol.* 37: 487-493.

- Villarreal LY, Brandão PE, Chacón JL, Assayag MS, Maiorka PC, Raffi P, Saidenberg AB, Jones RC and Ferreira AJ. 2007. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. *Avian Dis.* 51: 900-904.
- Worthington KJ and Jones RC. 2006. New genotype of infectious bronchitis virus in chickens in Scotland. *Vet Rec.* 159: 291-292.
- Worthington KJ, Currie RJ and Jones RC. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* 37: 247-257.
- Yagyu K and Ohta S. 1990. Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. *Avian Dis.* 34: 246-252.
- YuDong W, YongLin W, ZiChun Z, GenChe F, YiHai J, Xiang EL, Jiang D and ShuShuang W. 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine.* 15: 1-3.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

Chen และ คณะ (1996) ได้ทดลองให้ไก่ได้รับเชื้อ IBV สายพันธุ์ M87 กับลูกไก่ specific pathogen free ที่อายุ 2 วันและศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดของทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลมและไตดังนี้คือ

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ 2 วัน พบการบวมและ vacuolar degeneration กับความเสียหายของ ซีเลีย ที่ mucosal epithelium cell บางส่วน พบสภาพ degenerative และ necrotic epithelial cell ลอกหลุดจากส่วนของ basement membrane บางครั้งจะพบ heterophils ภายในพื้นผิวท่อลม ส่วนของ epithelial cells ของ alveolar mucous glands และ goblet cells มีจำนวนที่ลดลง หรือไม่พบส่วนของ cytoplasmic mucous granules ที่ชั้น lamina propria พบการคั่ง การบวมน้ำ และบางครั้งพบการเข้ามาแทรกของ heterophils

ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV 4 ถึง 6 วัน พบที่ mucosal epitheliums รวมถึงชั้น basal cells พบการหนาตัวผิดปกติและมีการแทรกเข้ามาของ heterophils, lymphocytes และ macrophages (ปริมาณเล็กน้อย) ที่ชั้น lamina propria ไม่พบส่วนของ goblet cells และ alveolar mucous glands ใน epithelial cells ซึ่งจะมีการหนาตัวผิดปกติ

ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV 8 วัน พบ multilayered cuboidal และ columnar epithelial cells ในบางส่วนของ mucosal epithelial lining และ ciliated epithelial cells และ goblet cells ซึ่งจะถูกพบเห็นไม่บ่อยครั้ง ส่วนของ alveolar mucous gland epithelial และ cell สร้างใหม่ที่ deepest mucosal layer กับการแทรกเข้ามาของ lymphocytes, plasma cells และ heterophils จำนวนเล็กน้อยใน lamina propria

ภายหลังจากได้รับเชื้อ IBV 10 ถึง 20 วัน พบว่าที่ mucosal epithelium มีการเปลี่ยนแปลงเกือบจะกลับเข้าสู่สภาพปกติ

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของไต

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV 4 วัน รอยโรคที่พบแรกเริ่มถูกพบใน collecting ducts, collecting tubules และ distal convoluted tubules เริ่มขยายตัวและบางครั้งพบการบวม vacuolation และ desquamation ของ epithelial cell ในขณะที่ proximal convoluted tubules และ henle's loops ปกติ พบการคั่ง การบวมน้ำ และการแทรกตัวของ heterophils จำนวนเล็กน้อย ซึ่งพบเห็นเป็นบางโอกาสภายใน tubules และ ducts

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV 6 ถึง 8 วัน ในส่วนของ collecting ducts , collecting tubules, distal convoluted tubules และ henle's loops ที่มีการขยายตัวพบเกิด vacuolar degeneration, necrosis และ desquamation ของ epithelial cells การเกิด ducto-tubular degeneration และ necrosis สามารถตรวจพบเห็นได้ใน single epithelial cell หรือ ตามส่วนของ tubular epithelial ทั้งหมด ภายในท่อที่มีการขยายตัวของ collecting ducts, collecting tubules และ distal collecting tubules พบเห็น debris ของ desquamated epithelial cells, heterophils, macrophages และ globular crystals เป็นบางโอกาส ในกรณีที่รุนแรงที่ ureteral lumina พบ desquamated epithelial cells ร่วมกับ inflammatory cell ส่วนของ proximal convoluted tubules มีผลกระทบรุนแรงเล็กน้อยพบการหายไปของ brush border ในบางส่วนของ epithelial cells ที่บวมแสดงให้เห็น granular degeneration หรือ single-cell necrosis พบการบวมน้ำที่ interstitial บริเวณใกล้เคียงกับส่วนของ degenerated tubules และ ducts ในบางบริเวณ ส่วนของ interstitium พบ heterophils, lymphocytes จำนวนมากและ macrophages จำนวนเล็กน้อย การเปลี่ยนแปลงที่เห็นจะพบได้ทั้งจากลูกไก่ที่ถูกฆ่าและที่ตายเอง

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV 10 ถึง 13 วัน ส่วนของ cellular debris ถูกขจัดออกจาก luminal tubules และ ducts พบการเกิด degenerated และ squamated epithelial cell เล็กน้อยในบางส่วนของ collecting ducts, collecting tubules และ distal convoluted tubules ซึ่งบางครั้งพบการขยายตัวของ lumina พบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยคือเห็นการเสื่อมของ epithelial cell เล็กน้อย และมีการแทรกตัวของ lymphocytes และ macrophages ที่ proximal convoluted tubules เป็นบางโอกาส บางส่วนของ tubules และ ducts พบการหนาตัว ที่ชั้นผิว epithelium พบ multifocal infiltration ของ lymphocytes และ plasma cells และ fibroblastic proliferation (เล็กน้อย) ใน interstitium

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ IBV 16 ถึง 20 วันพบการก่อตัวของ lymphocytes และ plasma cells เป็น lymphoid nodules ใน interstitium lymphocytes และ macrophages ถูกแทรกตัวเข้าไปในบาง tubules และ ducts จำนวนเล็กน้อย ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ tubules และ ducts ส่วนมากจะกลับคืนมาดีขึ้น ส่วนของ distal convoluted tubules, collecting tubules และ collecting ducts พบการขยายตัวเล็กน้อยซึ่งจะหาได้ยาก ส่วนของ proximal convoluted tubules ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ



ตารางที่ 16 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม และ immunohistochemistry ของลูกไก่ที่ติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

รอยโรคที่ท่อลม	จำนวนวันภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ							
	2	4	6	8	10	13	16	20
Epithelial declination	++ <sup>a</sup>	+++	++	+	+	+	-	-
Epithelial degeneration	++	+++	+	+	+	-	+	-
Decrease of mucus cells	++	+++	++	+	-	-	-	-
Heterophil infiltration	++	++	+	+	-	-	-	-
Epithelial hyperplasia	-	++	+++	+	-	-	-	-
Lymphoid hyperplasia	-	+	++	++	+	-	+	-
IBV antigen in epithelium	+ <sup>a</sup>	+++	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยของดัชนีความรุนแรงจากลูกไก่ 3 ตัว: - คือ ปกติ; + คือระดับอ่อน; ++ คือระดับปานกลาง; +++ คือระดับรุนแรง

<sup>b</sup> ค่าเฉลี่ยจำนวนของ f antigen-positive epithelial cells ต่อ  $3.15 \text{ mm}^2$  ของพื้นที่เนื้อเยื่อท่อลมจากลูกไก่ 3 ตัว: -, ไม่พบ antigen; + พบจำนวน 1 ถึง 4; ++ พบจำนวน 5 ถึง 10; +++ มากกว่า 10

ตารางที่ 17. ลักษณะทางพยาธิวิทยาของไตในลูกไก่ที่ติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อ

รอยโรคที่ไต	จำนวนวันภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ							
	2	4	6	8	10	13	16	20
Epithelial degeneration	<sup>a</sup> -	+	+++	+++	++	++	<sup>b</sup> +	+
Ducto-tubular dilation	-	+	+++	++	+	+	+	+
Heterophil infiltration	-	+	++	+	-	-	-	-
Lymphoid infiltration	-	-	+	++	+++	+++	+++	++
Epithelial regeneration	-	-	-	+	++	++	+	-
Epithelial hyperplasia	-	-	-	++	+	+	-	-
Lymphoid nodules	-	-	-	-	-	-	+	++
Fibroblastic proliferation	-	-	-	+	+	+	+	+

ค่าเฉลี่ยของดัชนีความรุนแรงจากลูกไก่ 3 ตัว: - คือ ปกติ; + คือระดับอ่อน; ++ คือระดับปานกลาง; +++ คือระดับรุนแรง (Chen et al., 1996)

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเอกสิงห์ สาเรือง เกิดเมื่อวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จปริญญาตรี วุฒิการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2536 และปริญญาโท CEO MBA จากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทยปี พ.ศ. 2551 ด้านการทำงานปี พ.ศ. 2536 เริ่มทำงานที่บริษัท สหฟาร์ม จำกัด ในตำแหน่งสัตวแพทย์วิชาการ ในปี พ.ศ. 2547 ทำงานที่บริษัท JohnsonDiversey (Thailand) ในตำแหน่ง Veterinarian: Process food ในปี พ.ศ. 2549 จนถึงปัจจุบันทำงานที่บริษัท บี.ฟู้ด โปรดักส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด (เครือเบทาโกร) ในตำแหน่งผู้จัดการฝ่ายประกันคุณภาพและสุขภาพสัตว์ รับผิดชอบงานด้านการประกันคุณภาพและสุขภาพสัตว์ของฟาร์มไก่พันธุ์ โรงฟักและฟาร์มไก่เนื้อ ได้รับทุนสนับสนุนด้านการศึกษาจากบริษัท บี.ฟู้ด โปรดักส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด (เครือเบทาโกร) มาศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ในปีการศึกษา 2553-2556



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**