การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากเชื้อ *ฮีโมฟิลลัส พารากัลลินารุม*

นางสาวกฤดา ชูเกียรติศิริ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# EFFICACY OF AUTOGENOUS KILLED VACCINE OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*

Miss Kridda Chukiatsiri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Veterinary medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจาก เชื้อ *ฮีโมฟิลลัส พารากัลลินารุม* |
| โดย | นางสาวกฤดา ชูเกียรติศิริ |
| สาขาวิชา | อายุรศาสตร์สัตว์ปีก |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ |

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงศ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

N. Chansiripornchai ..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

T. Chalermchaikit .....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กฤดา ชูเกียรติศิริ : การศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจากเชื้อ*ฮีโมฟิลลัส พารากัลลินารุม*. (EFFICACY OF AUTOGENOUS KILLED VACCINE OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 59 หน้า.

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันและสื่อเจลที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *ฮีโมฟิลลัส พารากัลลินารุม* ในการกระตุ้นระดับแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันโรค โดยให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นความเข้มข้น $10^{10}$ cfu/mL แก่ไก่ไข่เพศผู้อายุ 5 สัปดาห์ ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร เข้าใต้หนังคอ จำนวน 2 ครั้งห่างกัน 3 สัปดาห์และให้เชื้อพิษทับภายหลังจากฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 4 สัปดาห์ ความเข้มข้น $10^{8}$ cfu/mL ตัวละ 400 μL โดยการหยอดจมูก โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวเดียวกันกับที่ผลิตวัคซีน เก็บตัวอย่างซีรัมตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี hemagglutination inhibition test พบว่าวัคซีนสื่อน้ำมันที่ผลิตขึ้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้เร็วกว่ากลุ่มอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อเจล ในการทดสอบความสามารถในการป้องกันโรคของวัคซีน โดยการป้ายเชื้อจากไซนัสใต้ตา ภายหลังจากให้เชื้อไปแล้ว 5 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองทั้งสื่อน้ำมันและสื่อเจลทุกตัวสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ โดยไม่พบไก่ตัวใดที่มีอาการหน้าบวม และพบน้ำมูกในช่องจมูก ประกอบกับการไม่พบเชื้อในไซนัสใต้ตาจากไก่ทั้งสองกลุ่ม ไม่ว่าไก่จะมีระดับแอนติบอดีสูงหรือต่ำก็ตาม ในขณะที่ไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ให้วัคซีนพบอาการหน้าบวมและมีน้ำมูกในช่องจมูก เมื่อตรวจหาเชื้อจากไซนัสใต้ตาสามารถพบเชื้อได้ทุกตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์ปีก.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4775584331 : MAJOR AVIAN MEDICINE

KEY WORD: Infectious coryza / *Haemophilus paragallinarum* / vaccine / chicken

KRIDDA CHUKIATSIRI : EFFICACY OF AUTOGENOUS KILLED VACCINE OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, Ph.D., THESIS COADVISOR : PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., 59 pp.

The efficacy of killed vaccine of *H. paragallinarum* with mineral oil adjuvant and aluminium hydroxide gel adjuvant had been tested on antibody titers and protective immune response. The vaccines at the concentration of $10^{10}$ cfu/mL were immunized to 5 weeks old male layers at 0.5 mL each by subcutaneously injection at neck for 2 times, 3 weeks interval. Each chicken was challenged with $10^{8}$ cfu/mL for 400 μL of homologous isolate of *H. paragallinarum* at 4 weeks after second vaccination by nasal route. Sera were collected and antibody titers were tested by hemagglutination inhibition test. The results revealed that the oil adjuvant vaccine provided the antibody significantly faster than the other groups ($p<0.05$). The average antibody titers of vaccinated group with oil adjuvant vaccine were higher than that of the vaccinated group with gel adjuvant vaccine. Protective ability of vaccines by infra-orbital sinus swab after 5 days post challenge was performed. The vaccines prepared by oil adjuvant and aluminium hydroxide gel adjuvant could protect all chicken after challenge. No chicken in both groups were found facial edema and serous nasal discharge. Moreover, no bacteria had been isolated from the infra-orbital sinuses of chicken in both groups either high or low antibody titers. In contrary to the positive control group, facial edema and serous nasal discharge had been found and bacteria could be isolated from all chickens in this group.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Medicine……..Student's signature.....K. chukiatsiri.....

Field of Avian Medicine……..Advisor's signature.....N. Chansiripornchai.....

Academic year 2006……Co-advisor's signature.....J. Sasipreeyajan.....

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสองท่าน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ซึ่งได้ให้ทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ สพ.ญ.วันทนีย์ เนรมิตมานสุข ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการทดลอง และความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ และขอขอบพระคุณ สัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ของสถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ Professor Dr.Patrick J Blackall ผู้ให้คำแนะนำช่วยแก้ปัญหา และให้ข้อมูลงานวิจัยที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และ Professor Dr.Katsumi Kume ที่ให้คำปรึกษาและวิธีการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน

ขอขอบพระคุณ รศ.อัจฉรา ธวัชสิน และ ผศ.น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อชี้แนะ ซึ่งทำให้งานวิจัยครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อ.น.สพ.ดร.ประสิทธิ์ ดำรงสุนทรชัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ช่วยกรุณาตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ และให้คำแนะนำในการตรวจ hemagglutination inhibition test ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2549 ที่ให้เงินอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และพนักงานเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ของหน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ หน่วยไวรัสวิทยา หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ หน่วยจุลพยาธิวิทยาและหน่วยชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัย และคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ยิ่ง

ขอขอบคุณ อ.น.สพ.ฉัตรชัย สารชัย, อ.น.สพ.ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และ สพ.ญ.สุวรักษ์ วรรณรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและงานทางห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ น.สพ.วิษณุ วรรณแสวง ที่เอื้อเฟื้อสารเคมีในการเตรียมวัคซีน

ขอกราบขอบพระคุณ คณบดีคณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งให้โอกาสให้ข้าพเจ้าได้รับทุนพัฒนาอาจารย์ จึงทำให้มีโอกาสได้ศึกษาต่อและทำงานวิจัยในครั้งนี้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย……ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……..ช
สารบัญตาราง……ฌ
สารบัญภาพ……...ญ
บทที่
1 บทนำ……..1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา……1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……...2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……3
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย……3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……...4
2.1 ประวัติและความสำคัญของโรคติดเชื้อ *H. paragallinarum*……..……4
2.2 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียและการก่อโรค……..5
2.3 การตรวจแยกเชื้อและการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ……6
2.4 วัคซีนป้องกันโรค……..7
3 วิธีดำเนินการวิจัย……9
3.1. การเตรียม *Haemophilus paragallinarum*……..…9
1.1 การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย……9
1.2 การเก็บแบคทีเรีย……10
1.3 การทดสอบ *Haemophilus paragallinarum*……10
1.4 การทดสอบแยกซีโรไทป์……12
3.2 การเตรียมวัคซีน……13
2.1 การเลือกแบคทีเรียเพื่อผลิตวัคซีน……....13
2.2 การผลิต monovalent vaccine จากสื่อวัคซีน 2 ชนิด……13
2.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน……..15
3.3 การให้วัคซีนในไก่ทดลอง……16
3.4 การให้เชื้อพิษทับแก่ไก่ (*Haemophilus paragallinarum* serotype A challenge)……16

บทที่ หน้า

3.5 การวัดผลการวิจัย……...17
5.1 การตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธีการ HI test…….……17
5.2 การศึกษาความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อภายหลังการให้วัคซีน…..20
3.6 การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ……20
3.7 แนวทางในการประเมินผลการทดลอง……..20
4 ผลการทดลอง……..……22
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่นำมาผลิตวัคซีนและการเตรียมวัคซีน……...22
4.2 การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน……...23
4.3 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* serotype A……..…25
4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย
ภายหลังการให้วัคซีน.....……..……28
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ
*H. paragallinarum* ……31
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……...32

รายการอ้างอิง……36
ภาคผนวก……..…41
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของ *H. paragallinarum* ที่นำมาศึกษา……..…….22
ตารางที่ 2 ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ……..….23
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน……..…24
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อที่เห็นด้วยตาเปล่า
ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย…….…...25
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบระดับ antibody titer ต่อ *H. paragallinarum* serotype A……...27
ตารางที่ 6 ผลการเพาะ *H. paragallinarum* จากไซนัสใต้ตาภายหลังการให้เชื้อ
ในวันที่ 5, 10 และ 15…….…...30
ตารางที่ 7 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *H. paragallinarum*……..53
ตารางที่ 8 ระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* และความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ
ภายหลังการให้เชื้อ……...56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กราฟแสดงค่า $\log_2$ HI titer ……..……29
รูปที่ 2 แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกในการเพาะ *H. paragallinarum* ภายหลังให้เชื้อ……..…29
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของลูกไก่ภายหลังจากฉีด *H. paragallinarum* ในไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน…..…49
รูปที่ 4 แสดงลักษณะการพบน้ำมูกสีขาวข้นในไซนัส จากการติด *H. paragallinarum*……..…..49
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของ satellite colonies ของ *H. paragallinarum*…….50
รูปที่ 6 แสดงการตรวจ HI antibody titer…….50
รูปที่ 7 แสดงการตรวจหา Hemagglutinin gene โดยใช้เทคนิค PCR……...51
รูปที่ 8 แสดงลักษณะของวัคซีน…….51
รูปที่ 9 แสดงลักษณะรอยโรคบริเวณที่ฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 1 สัปดาห์…….52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหวัดหน้าบวม หรือ infectious coryza เกิดจาก *Haemophilus paragallinarum* โดยตั้งแต่ปี 2005 แบคทีเรียชนิดนี้ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Avibacterium paragallinarum* (Blackall et al., 2005) แบคทีเรียชนิดนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ รูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ หรือค่อนข้างกลม กว้างประมาณ 0.4-0.8 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1-3 ไมโครเมตร เจริญได้ดีในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 5% และ ต้องการ V-factors (nicotinamide adenine dinucleotide) ในการเจริญเติบโต (Blackall, 1999)

โรคนี้เป็นโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่ และเป็นโรคที่มักพบในไก่อายุตั้งแต่ 5 สัปดาห์ขึ้นไป โดยไก่ที่มีอายุมากจะมีความไวรับต่อโรคมากกว่าไก่ที่มีอายุน้อย อาการของโรคที่พบคือ หน้าบวม อ้าปากหายใจ มีน้ำมูกและน้ำตาไหล เยื่อตาขาวอักเสบ มักพบได้ในไก่พ่อแม่พันธุ์และไก่ไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยสามารถพบได้บ่อยในไก่พื้นบ้าน (เกรียงศักดิ์, 2536) โรคนี้เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรวดเร็วและรุนแรง อัตราการติดเชื้อสูง แต่อัตราการตายต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยไก่จะชะงักการเจริญเติบโต และในฝูงไก่ที่ให้ไข่ พบอัตราการไข่จะลดลง (10-40%) (Terzolo et al., 1993) โรคนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้จากสภาวะความเครียดต่างๆ เช่น อากาศเปลี่ยน ฝนตก ความร้อน และความชื้นในบรรยากาศสูง

จากการศึกษาพบว่า ซีโรไทป์ ที่มีความสำคัญในการเกิดโรคได้แก่ ซีโรไทป์ A และ C (Jacobs et al., 1992) ตามการแบ่งซีโรไทป์ ของ Page scheme และไม่พบการป้องกันข้าม (cross protection) ระหว่างซีโรไทป์ที่นำมาทำวัคซีน ดังนั้นการผลิตวัคซีน จึงมักประกอบด้วยหลายซีโรไทป์ เช่น bivalent vaccine (ซีโรไทป์ A+C) หรือ trivalent vaccine (ซีโรไทป์ A+B+C) เนื่องจากความเชื่อที่ว่าซีโรไทป์ B สามารถก่อโรคได้ในบางพื้นที่ (Jacobs et al., 1992) โดยวัคซีนที่ใช้อยู่ในประเทศไทย จะเป็นวัคซีนของบริษัทที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมักใช้เชื้อที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐานจากต่างประเทศในการผลิตวัคซีน

นอกจากวิธีการแบ่งซีโรไทป์ของ Page scheme แล้ว วิธี Kume scheme นับว่าเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแบ่งซีโรไทป์ คือ จำแนกซีโรไทป์ A และ C ออกเป็น ซีโรไทป์ละ 4 ซีโรวาร์ และจากการศึกษาของ Sariano และคณะ (2004) พบว่า ภายใน 4 ซีโรวาร์ ของ ซีโรไทป์ A จะเกิดการป้องกันข้ามได้ดีกว่า 4 ซีโรวาร์ของซีโรไทป์ C ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่การทำวัคซีนไม่ได้ผล คืออาจเกิดเนื่องจากการขาดการป้องกันข้ามระหว่างเชื้อที่เป็น vaccine strain กับ field strain

สื่อวัคซีน (adjuvant) ที่ใช้ในการเตรียมวัคซีนมีความแตกต่างกันออกไป เช่น aluminium hydroxide gel, mineral oil หรือ saponin ซึ่งสื่อวัคซีนแต่ละชนิดจะมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน พบว่าการใช้ aluminium hydroxide gel adjuvant vaccine จะเหมาะสมในการฉีดวัคซีนครั้งแรก เนื่องจากสามารถให้แอนติบอดีได้สูงและเร็ว (Morein et al., 1996) และพบการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะที่ (local reaction) น้อยมาก เมื่อเทียบกับ oil adjuvant ซึ่งมักก่อให้เกิดการบวม (swelling) หรือก้อนเนื้องอกเล็กๆ (granuloma) ได้ (Reid and Blackall, 1986) oil adjuvant vaccine พบว่าเหมาะสำหรับการทำวัคซีนซ้ำ (boosting) ซึ่งจะปล่อยแอนติเจนช้าๆ และเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบ ซึ่งมีผลโดยตรงกับ antigen presenting macrophage ส่งผลให้ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นสามารถคงอยู่นานกว่า aluminium hydroxide gel adjuvant vaccine (Deguchi et al., 1998; Fukanoki et al., 2000; Morien et al., 1996) อย่างไรก็ตาม พบข้อขัดแย้งระหว่างสื่อวัคซีนชนิดน้ำมันและสื่อชนิดเจล ในประเด็นที่ว่าสื่อวัคซีนชนิดใดสามารถกระตุ้นแอนติบอดีและการป้องกันการติดเชื้อได้ดีกว่า Blackall (1980) และ Reid และ Blackall (1986) พบว่าวัคซีนสื่อเจลสามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้ดีกว่า นอกจากนี้ Reid และ Blackall (1987) ยังพบว่าวัคซีนสื่อเจลสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีกว่า ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Jacobs และคณะ (1992) ที่พบว่าวัคซีนสื่อ mineral oil สามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้สูงกว่าและป้องกันการติดเชื้อได้ดีกว่าด้วย

ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้อยู่เสมอ จากการเพาะแยกเชื้อจากไก่ป่วยที่สงสัย พบว่าสามารถแยก *H. paragallinarum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหวัดหน้าบวมได้ (วันทนีย์ และประภาส, 2528) โดยสามารถพบโรคนี้ได้ทั้งในไก่ไข่และไก่พื้นเมือง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อผลิตวัคซีนโดยใช้แบคทีเรียที่ก่อโรคในประเทศไทย มาทดลองเปรียบเทียบกับวัคซีนของบริษัทซึ่งเตรียมจากแบคทีเรียสายพันธุ์จากต่างประเทศ ว่าสามารถให้ผลในการป้องกันโรค เท่ากันหรือไม่ และศึกษาถึงผลของสื่อวัคซีนต่อแอนติบอดีของโรคว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

**1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ autogenous killed vaccine ต่อ *H. paragallinarum* ที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้า (commercial vaccine) โดยเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดี และความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคเมื่อไก่ได้รับเชื้อหลังจากทำวัคซีนแล้ว

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสื่อวัคซีน ระหว่าง mineral oil adjuvant และ aluminium hydroxide gel adjuvant ต่อการป้องกันโรค โดยเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดี และการคงอยู่ของระดับแอนติบอดี

**1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1 ทราบถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองซึ่งเตรียมจากแบคทีเรียที่พบระบาดในประเทศไทย เปรียบเทียบกับวัคซีนของบริษัทซึ่งเตรียมจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างประเทศ ว่าสามารถกระตุ้นแอนติบอดีและป้องกันโรคหวัดหน้าบวม สายพันธุ์ที่แยกได้จากการระบาดในท้องถิ่นได้ดีกว่ากันหรือไม่ เพื่อสามารถประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคหวัดหน้าบวมในประเทศไทย และเพื่อลดความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นจากโรคนี้

2 ทราบความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันโรค ระหว่างวัคซีนชนิดเดียวกัน ที่มีสื่อวัคซีนต่างกัน ว่าสื่อวัคซีนชนิดใด สามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้สูงหรือนานกว่า เพื่อวางแผนในการเลือกใช้วัคซีนที่มีความเหมาะสม

**1.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย**

เก็บตัวอย่าง *H. paragallinarum* จากไก่ป่วยที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน แล้วนำมาแยกซี โรไทป์และทดสอบความสามารถในการก่อโรคและการกระตุ้นแอนติบอดี จากนั้นนำมาผลิตวัคซีนด้วยสื่อวัคซีน 2 ชนิดได้แก่ สื่อน้ำมัน (mineral oil) และสื่อเจล (aluminium hydroxide gel) เพื่อศึกษา

- ความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* โดยการวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี hemagglutination inhibition test

- ความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ เมื่อให้เชื้อพิษที่เป็นเชื้อตัวเดียวกับที่นำมาผลิตวัคซีน โดยการเพาะเชื้อจากไซนัสใต้ตาหลังจากให้เชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ประวัติและความสำคัญของโรคติดเชื้อ *H. paragallinarum*

โรคหวัดหน้าบวม หรือ infectious coryza เป็นโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ เกิดจากแบคทีเรียที่มีชื่อเดิมว่า *Haemophilus paragallinarum* แต่ปัจจุบันได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Avibacterium paragallinarum* (Blackall et al., 2005) การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้ได้เริ่มต้นเมื่อปี ค.ศ. 1930 โดยเชื้อนี้ได้รับการเรียกชื่อครั้งแรกว่า *Haemophilus gallinarum* เนื่องจากเชื้อนี้ต้องการทั้ง X-(hemin) และ V-(nicotinamide adenine dinucleotide : NAD) factor ในการเจริญเติบโต จนกระทั่งในปี 1962 Page และคณะ (Blackall, 1999) พบว่าเชื้อที่สามารถแยกได้จากไก่ป่วยด้วยโรคนี้ทุก isolate ต้องการเฉพาะ V-factor ในการเจริญเติบโต จึงเปลี่ยนชื่อเชื้อนี้เป็น *H. paragallinarum* (Blackall, 1999) ซึ่งการยืนยันว่าเชื้อนี้ไม่ต้องการ X-factor ในการเจริญ โดยดูความสามารถในการสังเคราะห์ porphyrin จาก δ-aminolevulinic acid (ALA) การทำ prophyrin test พบว่าเชื้อที่ไม่ต้องการ X-factor จะสามารถเปลี่ยน ALA ไปเป็น porphyrin ได้ (Muller and Hinz, 1978) ต่อมาในปี 1992 Mouahid และคณะ ได้ค้นพบ *H. paragallinarum* ที่ไม่ต้องการ V-factor ในการเจริญเติบโต จึงเรียกเชื้อกลุ่มนั้นเป็น NAD-independent ส่วนเชื้อที่ต้องการ V-factor ในการเจริญเติบโตจะเรียกเป็น NAD-dependent และในปี 2005 Blackall และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับ phenotype และ genotype ของ *H. paragallinarum* จึงเสนอเปลี่ยนชื่อเป็น *Avibacterium paragallinarum*

โรคหวัดหน้าบวมสามารถพบได้ทั้งไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยลักษณะอาการที่แสดงออก ได้แก่ มีน้ำมูก น้ำตาไหล หน้าบวม เบื่ออาหาร ท้องเสีย แกร็น อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ในฝูงไก่ที่กำลังให้ไข่จะมีอัตราการให้ไข่ลดลง (10-40%) การติดเชื้ออื่นๆ และความเครียดเป็นปัจจัยโน้มนำที่สำคัญในการเกิดโรค (Blackall, 1999) โรคนี้พบการระบาดได้ทั่วโลก อัตราการติดโรคสูง (ประมาณ 30-70%) แต่อัตราการตายต่ำ (2-6%) แต่หากมีการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย เช่น หลอดลมอักเสบติดต่อ การติดเชื้อมัยโคพลาสมา ก็อาจส่งผลให้อาการรุนแรงและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นได้ ไก่อายุมากมีความไวต่อโรคมากกว่าไก่อายุน้อย โดยมักพบโรคในไก่อายุมากกว่า 5 สัปดาห์ขึ้นไป และไก่ที่หายป่วยยังสามารถแพร่เชื้อได้เป็นระยะเวลามากกว่า 4 เดือน (เกรียงศักดิ์, 2536) การรักษา สามารถใช้ยาอิริโธรมัยซินและออกซีเตตราซัยคลินหรือยาในกลุ่มซัลโฟนามายด์ ในการลดความรุนแรงของโรคได้ แต่การรักษาที่ไม่ต่อเนื่องหรือยัง

มีตัวแพร่เชื้ออยู่ มักทำให้การควบคุมการระบาดของโรคไม่ได้ผล (Blackall et al., 1997) การป้องกันโรคโดยการทำวัคซีน เพื่อเพิ่มระดับแอนติบอดีของฝูงจึงค่อนข้างมีความสำคัญ

**2.2 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียและการก่อโรค**

*H. paragallinarum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เสตรนที่ก่อให้เกิดความรุนแรงอาจพบแคปซูล เชื้อมีลักษณะเป็นแท่งสั้นหรือกลมรี (coccobacilli) ซึ่งมีความยาว 1-3 ไมโครเมตร และกว้าง 0.4-0.8 ไมโครเมตร เจริญได้ในอาหารวุ้นผสมเลือดแกะที่มีการเติมสาร NAD ภายใต้สภาวะ anaerobe หรือมีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5-7% ซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น เชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 24-45 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายวัน ส่วนเชื้อที่มีอายุน้อยสามารถเก็บไว้ในโถเทียน แล้วจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 2 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยผ่านทางถุงไข่แดงในตัวอ่อนไก่ฟักที่อายุ 6-7 วัน พบตัวอ่อนตายภายใน 12-48 ชั่วโมง โดยพบเชื้อปริมาณมากอยู่ในไข่แดง ซึ่งสามารถนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส หรือเก็บรักษาโดยการดูดแห้ง (lyophilization) ส่วนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ *H. paragallinarum* ได้แก่ hemagglutinins (Yamaguchi et al., 1993), แคปซูล (Sawata et al., 1985), การสร้างสาร haemosin (Terry et al., 2003), โปรตีนที่หลั่งออกมา (Mena-Rojas et al., 2004) และ NAD-independent (Bragg, 2002; Taole et al., 2002)

โรคนี้สามารถติดต่อได้หลายทาง เช่น การสัมผัสกับสัตว์ป่วย การปนเปื้อนของเชื้อที่ขับออกมาพร้อมกับเสมหะ โดยปะปนแบคทีเรียในน้ำและอาหาร นับเป็นช่องทางสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แพร่ไปทั่วทั้งฝูงและโรงเรือนใกล้เคียง นอกจากนี้เชื้ออาจแพร่มากับวัสดุและอุปกรณ์ภายในฟาร์ม สิ่งรองนอนและยานพาหนะ แต่การติดเชื้อที่สำคัญที่สุด คือ การติดเชื้อจากไก่ติดเชื้อที่มีสุขภาพดีหรือไก่ติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งพบว่าเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ โรคหวัดหน้าบวมมักเกิดขึ้นในช่วงที่มีการเปลี่ยนอากาศ โดยเฉพาะจากอากาศร้อนเป็นอากาศชื้นมีฝนตก และมักเกิดร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวเนื่องกับการจัดการฟาร์ม เช่น การนำไก่สาวเข้ามาในฟาร์มที่มีโรคหวัดหน้าบวมอยู่ ฟาร์มที่มีการเลี้ยงไก่หลายอายุ พบการแพร่กระจายโรคในแต่ละกลุ่มอายุมักเกิดขึ้นภายใน 1-6 สัปดาห์ หลังจากเคลื่อนย้ายลูกไก่จากโรงเรือนกกไปยังโรงเรือนไก่รุ่น ที่อยู่ใกล้กันกับโรงเรือนไก่ไข่ที่ติดเชื้อ (Blackall et al., 1997)

โรคหวัดหน้าบวมไม่ใช่โรคที่ติดเชื้อผ่านไข่ ลักษณะการติดเชื้อของโรคหวัดหน้าบวมมีระยะฟักตัวสั้น โดยการพัฒนาอาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ (Reid and Blackall, 1984) ไก่ที่ไวต่อการติดเชื้อ เมื่อสัมผัสกับไก่ป่วยมักแสดงอาการของโรคภายใน 24-72 ชั่วโมง ในกรณีที่

ไม่มีการติดเชื้ออื่นแทรกซ้อน ระยะเวลาในการเกิดโรคหวัดหน้าบวมจะอยู่ภายใน 2-3 สัปดาห์ ไก่ที่ฟื้นจากกระบวนการติดเชื้อจะพบความต้านทานของระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อซ้ำได้ โดยความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำ มักเกิดขึ้นภายใน 2 สัปดาห์ ภายหลังการได้รับเชื้อโดยผ่านทางไซนัส (Sato and Shifrine, 1964) อาการที่เด่นชัดของการติดเชื้อหวัดหน้าบวมคือ การอักเสบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ได้แก่ จมูกและไซนัส ส่งผลให้พบสิ่งคัดหลั่งลักษณะเมือกใสหรือขุ่น หน้าบวม เยื่อตาอักเสบ น้ำตาไหลซึ่งอาจเป็นตาเดียวหรือสองตาก็ได้ หน้า หงอนและเหนียงบวม และพบไซนัสอักเสบเรื้อรัง

**2.3 การตรวจแยกเชื้อและการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ**

*H. paragallinarum* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างยาก ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยควรเป็นตัวอย่างที่ทำการเก็บจากไก่ป่วยจำนวนอย่างน้อย 2-3 ตัว ซึ่งอยู่ในระยะเฉียบพลันของการเกิดโรค คือ ระหว่าง 1-7 วันของการติดเชื้อ และควรทำการเก็บตัวอย่างบริเวณไซนัสใต้ตา โดยทำการฆ่าเชื้อผิวหนังภายนอก ก่อนตัดเข้าไปภายในไซนัสด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ไม้ป้ายพันสำลี (swab) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อสอดลึกลงไปในช่องไซนัส ซึ่งมักพบเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ในบริเวณนี้ ทำการป้ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นผสมเลือด (blood agar) แล้วทำการเขี่ยเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ขวางแนวของไม้พันสำลีที่ป้ายเชื้อ และบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในโถที่มีเทียนหรือ 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ *Staphylococcus epidermidis* (Page, 1962) *S. aureus* หรือ *S. hyicus* (Blackall and Reid, 1982) เป็นเชื้อที่นิยมใช้ในการคาด *H. paragallinarum* เพื่อให้ วี-แฟคเตอร์ ซึ่งเป็นปัจจัยการเจริญเติบโตของ *H. paragallinarum* พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ให้ผลเป็นลบเมื่อทำการทดสอบกับแคทตาเลส และมีการเจริญแบบ satellite colonies นอกจากนี้สามารถใช้วิธีพีซีอาร์ในการวินิจฉัย *H. paragallinarum* ได้ (Chen et al., 1996) วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วโดยสามารถรู้ผลได้ภายใน 6 ชั่วโมง ซึ่งเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ต้องใช้เวลาหลายวัน และมีการพัฒนาวิธีการทาง PCR โดยใช้ HPG-2PCR ซึ่งสามารถใช้ได้กับโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเมือกที่ได้จากจมูกของไก่ป่วย (Chen et al., 1996) พบว่าวิธี HPG-2PCR มีความสามารถในการวินิจฉัยโรคได้เช่นเดียวกับการเพาะเชื้อ แต่มีความรวดเร็วกว่า วิธี HPG-2PCR เป็นวิธีการทดสอบที่ดี โดยสามารถให้ผลทดสอบเป็นบวกกับไม้พันสำลีที่ป้ายเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 180 วัน (Chen et al., 1998)

นอกจาก *H. paragallinarum* แล้วยังมีแบคทีเรียในกลุ่มที่เป็น avian hemophilus ที่มีความคล้ายคลึงกับ *H. paragallinarum* แต่ไม่ก่อโรคในไก่ แต่อาจพบได้จากการเพาะแยกเชื้อจากไซนัสใต้ตา

และมีความต้องการ V-factor ในการเจริญเติบโต คือ *H. avium* (Reid and Blackall, 1984) ซึ่งสามารถแยกจาก *H. paragallinarum* โดยการทดสอบทางชีวเคมี การทำพีซีอาร์ และการให้เชื้อในไก่ทดลอง

*H. paragallinarum* สามารถจำแนก ซีโรไทป์ ได้ 2 แบบได้แก่ Page scheme และ Kume scheme โดย Page scheme แยกได้เป็น 3 ซีโรวาร์ คือ A, B และ C โดยใช้ปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (slide agglutination test) (Page, 1962) ส่วน Kume scheme จะใช้หลักการของ Hemagglutination inhibition (HI) test โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ เนื่องจากมี hemagglutinin บนผิวเซลล์ (Hobb et al., 2002) โดยปัจจุบันแบ่งเชื้อออกเป็น 7 ซีโรวาร์ อยู่ใน 3 ซีโรกรุ๊ป คือ I, II และ III (Kume et al., 1983) ต่อมา Blackall และคณะ (1990) ได้เปลี่ยนชื่อ Kume scheme ที่เป็น Kume ซีโรกรุ๊ป I, II และ III ให้คล้องกับ Page ซีโรวาร์ A, C และ B ตามลำดับ แล้วเรียก ซีโรวาร์ ที่อยู่ภายใน Kume ซีโรกรุ๊ป A เป็น ซีโรวาร์ A-1, A-2, A-3 และ A-4 Kume ซีโรกรุ๊ป B เป็น ซีโรวาร์ B-1 และ Kume ซีโรกรุ๊ป C เป็น C-1, C-2, C-3 และ C-4 ปัจจุบันวิธีการแยกซีโรไทป์จากตัวอย่างเชื้อ มักจะทำโดยวิธี Hemagglutination inhibition test โดยการใช้ monoclonal antibody ต่อซีโรไทป์นั้นๆ และนอกจากนั้นยังใช้ตรวจระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* ได้

**2.4 วัคซีนป้องกันโรค**

ซีโรไทป์ ที่มีความสำคัญในการเกิดโรคได้แก่ ซีโรไทป์ A และ C (Jacobs et al., 1992) และ การที่ไม่เกิดการป้องกันข้ามระหว่างซีโรไทป์ จึงได้มีการผลิตวัคซีนที่ประกอบด้วยหลายซีโรไทป์ เช่น bivalent vaccine (ซีโรไทป์ A+C) หรือ trivalent vaccine (ซีโรไทป์ A+B+C) เนื่องจากความเชื่อที่ว่าซีโรไทป์ B สามารถก่อโรคได้ในบางพื้นที่ (Jacobs et al., 1992) จากการศึกษาของ Soriano และคณะ (2004) พบว่า ซีโรวาร์ ทั้ง 9 ซีโรวาร์ ตามการแบ่งของ Kume scheme สามารถก่อโรคในไก่ได้ทุกซีโรวาร์ แต่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไป นอกจากนั้นเมื่อศึกษาความสามารถในการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ (cross protection) พบว่าภายในซีโรกรุ๊ปเดียวกัน ความสามารถในการป้องกันโรคข้ามซีโรวาร์ ก็มีความแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าภายใน ซีโรกรุ๊ป A จะมีความสามารถในการป้องกันข้าม ซีโรวาร์ ได้มากกว่า ซีโรกรุ๊ป C (ยกเว้น ซีโรวาร์ A-4 ที่มีความสามารถในการป้องกันข้าม ซีโรวาร์ กับ ซีโรวาร์ A-2 ได้น้อย) ซึ่งภายใน ซีโรกรุ๊ป C มีความสามารถในการป้องกันข้ามซีโรวาร์ได้น้อยมาก (Sariano et al., 2004) และแต่ละประเทศสามารถพบเชื้อได้ต่างกัน เช่น ซีโรวาร์ A-1 อาจพบในประเทศหนึ่ง แต่ไม่พบในอีกประเทศหนึ่ง นอกจากนั้นแล้ววัคซีนที่ผลิตขึ้นส่วนมากจะใช้แบคทีเรียที่มีต้นกำเนิดจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ทำให้การทำวัคซีนในบางประเทศจึงไม่ได้ผล

สื่อวัคซีน (adjuvant) ที่ใช้ในการเตรียมวัคซีนที่มีประสิทธิภาพมีหลายชนิด เช่น aluminium hydroxide gel, mineral oil หรือ saponin (Jacobs and van der Werf, 2000) ซึ่งสื่อวัคซีนแต่ละชนิดจะมี

ข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน พบว่าการใช้ aluminium hydroxide gel เป็นสื่อวัคซีนจะเหมาะสมในการฉีดวัคซีนครั้งแรก เนื่องจากสามารถให้แอนติบอดีได้สูงและเร็ว (Morein et al., 1996) และการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะที่ (local reaction) น้อยมาก เมื่อเทียบกับวัคซีนสื่อ mineral oil ซึ่งทำให้เกิดการบวมหรือก้อนเนื้องอกเล็กๆ (granuloma) ได้ (Reid and Blackall, 1987) วัคซีนสื่อ mineral oil พบว่าเหมาะสำหรับการทำวัคซีนซ้ำ (boosting) ซึ่งจะปล่อยแอนติเจนช้าๆ และเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบทำให้มีผลโดยตรงกับ antigen presenting macrophage ส่งผลให้ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นสามารถคงอยู่นานกว่าวัคซีนสื่อเจล (Deguchi et al., 1998; Fukanoki et al., 2000; Morien et al., 1996) ส่วนวิธีการทำให้แบคทีเรียหมดฤทธิ์ (inactivate) พบว่าวัคซีนที่ทำให้แบคทีเรียหมดฤทธิ์ด้วย thimerosal ให้ผลในการป้องกันโรคดีกว่าการใช้ formalin (Blackall and Reid, 1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

**ไก่ทดลอง**

ไก่ไข่เพศผู้ จำนวน 120 ตัว นำเข้ามาเลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน เมื่ออายุ 5 สัปดาห์ สุ่มแบ่งไก่ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว (sampling randomization) ให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่ (*ad libitum*) ระยะเวลาเลี้ยงไก่ 15 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในกรงตาข่ายยกพื้น พื้นที่การเลี้ยงคิดเป็น 10 ตัวต่อ 0.6 ตารางเมตร

**อาหาร**

อาหารไก่ไข่สำเร็จรูปของบริษัท ตามช่วงอายุของไก่

**วิธีดำเนินการวิจัย**

**3.1 การเตรียม *Haemophilus paragallinarum***

1.1 การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 เก็บตัวอย่างจากไก่ป่วยที่แสดงอาการหน้าบวม มีน้ำมูก น้ำตาไหล และเยื่อตาขาวอักเสบ โดยการใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ป้ายของเหลวจากไซนัสใต้ตา (infraorbital sinus) มา streak ลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ (blood agar) จนเต็ม plate จากนั้นขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* เป็นรูปสามเหลี่ยม เพื่อเป็นแหล่งของ V-factor ซึ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของ *H. paragallinarum*

1.1.2 นำอาหารวุ้นเลือดแกะ ที่ทำการเพาะเชื้อแล้วบ่มในโถเทียน (candle jar) ซึ่งมี carbon dioxide ประมาณ 3-5% จากนั้นนำทั้งโถเทียนไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.1.3 โคโลนีของ *H. paragallinarum* มีลักษณะใส นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เมื่ออยู่ไกลจาก *S. aureus* จนไม่พบเชื้อเลย ซึ่งเป็นลักษณะที่เรียกว่า satellite colonies (วันทนีย์ และ ประภาส, 2528) ทำการเลือก *H. paragallinarum* ที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวมา streak ลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะอีกครั้งและคาดทับด้วย *S. aureus* จากนั้นบ่มในโถเทียนและบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2 การเก็บแบคทีเรีย

1.2.1 นำ *H. paragallinarum* ที่ผ่านการลงอาหารวุ้นเลือดแกะ ครั้งที่ 2 ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว มาขีดลงบนอาหารวุ้นช็อกโกแลต (chocolate agar) ที่มีส่วนผสมของสาร β-NAD 0.001% ซึ่งเป็น V-factor ที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อ

1.2.2 นำอาหารวุ้นช็อกโกแลตไปบ่มในโถเทียนและในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นป้ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับเก็บเชื้อ Mist. Desiccans และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบเชื้อต่อไป

1.3 การทดสอบ *Haemophilus paragallinarum*

1.3.1 การทดสอบคุณสมบัติของ *Haemophilus paragallinarum*

| | |
|---|---|
| Colony hemolysis | - |
| Morphology | gram negative rod |
| Nitrate reduced | + |
| Indole | - |
| $CO_2$ requirement | + |
| X-factor requirement | - |
| V-factor requirement | + |
| Delta-ALA utilization | + |
| Catalase | - |

1.3.1.1 สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีที่เรียกว่า satellite colonies ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ Haemophilus ที่ต้องการ V-factor จาก *S. aureus* และลักษณะโดยรอบของโคโลนีที่ไม่เกิด hemolysis แล้วทำการย้อม Gram's stains เพื่อดูลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.1.2 นำแบคทีเรียที่ได้มาทำการทดสอบ catalase test โดย *H. paragallinarum* จะไม่เกิดปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide (catalase -) ส่วน *H. avium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคในไก่จะให้ผล catalase +

1.3.1.3 นำแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบ porphyrin test โดยเตรียม ALA (gamma-aminolevulinic acid hydrochloride) 0.5 มล. ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล. จากนั้นป้ายเชื้อจากอาหารวุ้นช็อกโกแลตใส่ลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งหากเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู แสดงว่าให้ผลบวกกับ porphyrin test ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ *H. paragallinarum* (โดย *H. paragallinarum* จะให้ผลบวกกับ porphyrin test )

1.3.2 ทดสอบแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ Oligonucleotide primers สำหรับ HPG-2 PCR (Chen et al., 1996) ดังนี้ N1 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3' , R1 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3' ซึ่งจะได้ product size ประมาณ 500 base pair

1.3.2.1 สกัดดีเอ็นเอโดยป้าย *H. paragallinarum* จากอาหารวุ้นช็อกโกแลตที่บ่มข้ามคืน ใส่ลงใน sterile PBS (pH 7.2) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นใส่ในเครื่อง AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet international, Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจต่อไป

1.3.2.2 PCR 1 reaction จะมีปริมาตร 25 µL ซึ่งประกอบด้วย PCR Master mix 10 µL (Eppendorf®, USA) N1 primer 2 µL, R1 primer 2 µL, DNA ตัวอย่าง 1 µL และ $H_2O$ 10 µL โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น negative control และ *Haemophilus paragallinarum* strain 221 เป็น positive control (ความเข้มข้นของ N1 และ R1 primer เท่ากับ 10 pmoles/µL)

1.3.2.3 นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้ cycle ดังนี้ (1) เริ่มต้นด้วย 98 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 วินาที (2) 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (3) 65 องศาเซลเซียส 1 นาที (4) 72 องศาเซลเซียส 2 นาที (5) ทำซ้ำในขั้นตอน 2 – 4 เป็นจำนวน 25 รอบ (6) สุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

1.3.2.4 นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี electrophoresis ใน 0.7% agarose gel โดย ใช้ TBE เป็น buffer (Chen et al., 1996) ทำการผสม PCR product 10 µL ผสมกับ

loading buffer (6x/μL) 2 μL แล้วหยอดหลุม และใช้ 100 base-pair ladder (Fermentas, Germany) 3.5 μL หยอดในหลุมแรก จากนั้นนำเข้าเครื่อง Electrophoresis (Power Pac™ Basic, BioRad, USA) โดยใช้ TBE เป็น buffer ที่กระแสไฟฟ้า 80 volt เป็นเวลา 30 นาที ทำการย้อมเจลด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น ส่องดูลักษณะของแถบ band ที่เกิดขึ้นโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.4 การทดสอบแยกซีโรไทป์

ทำการแยกซีโรไทป์ตาม Page scheme (Page, 1962) โดยจำแนกเชื้อออกเป็น 3 ซีโรไทป์ ได้แก่ A, B และ C โดยวิธีการ hemagglutination test และ hemagglutination inhibition test

1.4.1 Hemagglutination test : โดยใช้ทดสอบแยกซีโรไทป์อย่างคร่าวๆ โดยซีโรไทป์ A จะสามารถตกตะกอน fresh chicken Erythrocyte ได้ ในขณะที่ซีโรไทป์ C จะไม่ตกตะกอน fresh chicken Erythrocyte แต่สามารถจะตกตะกอน fixed chicken Erythrocyte ได้

1.4.1.1 ใส่ phosphate buffer saline (PBS; pH 7.2) + 0.1% bovine serum albumin (BSA) ลงใน microtiter plate 96 หลุม ปริมาตร 50 μL ต่อหลุม จากนั้นใส่ *H. paragallinarum* ลงในหลุมแรก 50 μL (วิธีการเตรียมเชื้อจะกล่าวถึงในหัวข้อการวัดผลการวิจัย) แล้วทำ 2-fold dilution ไปจนถึงหลุมสุดท้ายแล้วดูดทิ้ง 50 μL

1.4.1.2 เติม chicken Erythrocyte 1% หลุมละ 50 μL เขย่า plate แล้วตั้งทิ้งไว้ 45 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และดูผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

1.4.2 Hemagglutination inhibition test : โดยใช้ antiserum ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละซีโรไทป์ (The Kitasato Institute, Japan) เพื่อดูการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงต่อซีโรไทป์ที่จำเพาะนั้น

1.4.2.1 ใส่ PBS-BSA ปริมาตร 50 μL ตั้งแต่หลุมที่ 2-12 แล้วเติม antiserum ปริมาตร 50 μL ลงในหลุมที่ 1, 2 และ 12 ซึ่งหลุม 12 เป็น serum control จากนั้นทำ 2 fold-dilution serum ตั้งแต่หลุมที่ 2-11 แล้วดูดในหลุมสุดท้ายทิ้ง 50 μL

1.4.2.2 เติมแบคทีเรียที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 4 HA unit/50 μL ใส่ในหลุมที่ 1-11 เขย่า plate แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-45 นาที

1.4.2.3 เติม 1% fixed chicken Erythrocyte ทุกหลุม หลุมละ 50 μL เขย่า plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาทีแล้วดูผล

1.4.2.4 ทำการทดสอบ antiserum ของซีโรไทป์อื่นดังวิธีข้างต้น

**3.2 การเตรียมวัคซีน**

2.1 การเลือกแบคทีเรียเพื่อผลิตวัคซีน

2.1.1 ใช้เชื้อที่เก็บในอาหารเหลวสำหรับเก็บเชื้อ Mist. Desiccans มาฉีดในไข่ไก่ฟักอายุ 6-7 วัน บริเวณตำแหน่งของถุงไข่แดง ปริมาตร 0.1-0.2 มิลลิลิตร จากนั้นปิดทับรอยฉีดด้วยเทปใสแล้วนำเข้าบ่มในตู้ฟักไข่เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ไข่ฟักจะตาย จึงใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ดูดเก็บไข่แดงใส่ microcentrifuge tube และเพาะเชื้อลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ แล้วคาดทับด้วย *S. aureus* เพื่อตรวจดูการปนเปื้อน

2.1.2 นำเชื้อแต่ละ isolate ที่ผ่านการเพิ่มความรุนแรงในไข่ไก่ฟัก (Jacobs et al., 1992) มาผลิตเป็นวัคซีนโดยเพาะเชื้อลงใน CMI broth บ่มในตู้ shaking incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นด้วยการเพาะลงในอาหารวุ้นเลือดแกะ เมื่อไม่พบการปนเปื้อน จึงทำการ inactivate เชื้อด้วย 0.01% (v/v) thimerosal เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อลงอาหารวุ้นเลือดแกะ อีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อถูก inactivate ทั้งหมด และนำเชื้อนั้นมาปั่นด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนออก ซึ่งแบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ด้านล่างหลอด ปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) 3 รอบ สุดท้ายเจือจางด้วย PBS (pH 7.2) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ optical density เท่ากับ 0.47 ที่ wave length 550 nm ด้วย spectrophotometer ( Thermo Spectronic, Genesys 20 ) (ประมาณ 4.2 x $10^8$ CFU/mL) และเติม 2% aluminium hydroxide gel ซึ่งเป็นสื่อวัคซีนลงไป 25% (v/v) (วันทนีย์และคณะ, 2538)

2.1.3 นำวัคซีนแต่ละ isolate ที่ผลิตขึ้นมาฉีดในไก่ไข่เพศผู้อายุ 5 สัปดาห์ isolate ละ 2 ตัว โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังปริมาตร 1 มิลลิลิตร และภายหลังจากฉีดวัคซีน 4 สัปดาห์ทำการเก็บซีรัมตรวจหาระดับแอนติบอดี เพื่อดูความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดีของเชื้อ

2.1.4 เมื่อตรวจระดับแอนติบอดีแล้วจึงเลือก *H. paragallinarum* serotype A ที่เก็บตัวอย่างจากไก่ป่วยในท้องที่ ที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุดมาใช้ผลิตเป็นวัคซีน

2.2 การผลิต monovalent vaccine จากสื่อวัคซีน 2 ชนิด

2.2.1 สื่อวัคซีน aluminium hydroxide gel (วันทนีย์ และคณะ, 2538)

2.2.1.1 นำเชื้อที่เลือกมาเตรียมวัคซีน โดยเพิ่มความรุนแรงในไข่ไก่ฟัก แล้วเพิ่มจำนวนเชื้อใน CMI broth ใส่ตู้บ่ม shaking incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทดสอบการปนเปื้อนโดยเพาะเชื้อลงในอาหารวุ้นเลือดแกะ ที่คาดด้วย *S. aureus*

2.2.1.2 เมื่อไม่พบการปนเปื้อน ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้วิธี plate count โดยดูดเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี CMI broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อทำ ten fold dilution โดยเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น $10^{-1}$-$10^{-12}$ แล้วนำ dilution ดังกล่าวมา spread ลงบนอาหารวุ้นช็อกโกแลต บ่มในตู้บ่ม 5% $CO_2$ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผล (สุวณี และมาลัย, 2536 ) และปรับให้ได้ความเข้มของเชื้อประมาณ $10^{10}$ CFU/mL นำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาวัด optical density ที่ wave length 550 nm ได้เท่ากับ 1.1

2.2.1.3 inactivate เชื้อด้วย 0.01% (v/v) thimerosal เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พิสูจน์ว่าเชื้อถูก inactivate แล้วโดยการเพาะเชื้อในอาหารวุ้นเลือดแกะที่คาดด้วย *S. aureus* เมื่อไม่พบการปนเปื้อน จึงปั่นล้างด้วย PBS และเจือจางเชื้อใน PBS+0.01% thimerosal โดยวัด OD เท่ากับ 1.1 ที่ wave length 550 nm

2.2.1.4 เติม 2% aluminium hydroxide gel เป็นสื่อวัคซีนลงไปปริมาตร 25% (v/v) ผสมให้เข้ากันและเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลองต่อไป

2.2.2 สื่อวัคซีน mineral oil (Stone et al., 1978)

2.2.2.1 เตรียม emulsion vaccine ให้ส่วนผสมของ Aqueous phase ต่อ oil phase เท่ากับ 1 ต่อ 4 ส่วน โดยเตรียมส่วน oil phase ด้วย Mineral oil : Oil-phase emulsifier เท่ากับ 15:1 ส่วน และส่วน aqueous phase ด้วย kill bacteria : aqueous-phase emulsifier 3.872:0.128 ส่วน

2.2.2.2 ผสมแบคทีเรียที่เจือจางแล้วดังข้อ 2.2.1.3 ปริมาตร 19.36 มิลลิลิตร กับ Tween 80 (polysorbate 80) ปริมาตร 0.64 มิลลิลิตร ให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer จะได้ส่วนของ aqueous phase ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.2.2.3 ผสม mineral oil (Sigma-Aldrich Corp., USA) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร กับ span 80 (sorbitan monooleate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer จะได้ส่วนของ oil phase ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

2.2.2.4 ค่อยๆเทส่วนของ aqueous phase ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงใน oil phase แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer ต่อเป็นเวลา 5 นาที

2.2.2.5 นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งโดยการปั่นด้วยโถปั่นละเอียดของเครื่องปั่นน้ำผลไม้เป็นเวลา 2 นาที 5 ครั้ง (Sharp)

2.2.2.6 เก็บวัคซีนเชื้อตายในสื่อ mineral oil ที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน

2.3.1 การทดสอบความหนืดสัมพัทธ์ของวัคซีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Stone และคณะ (1978) โดยการดูดวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมขึ้นมาทดสอบความหนืดด้วยปิเปตพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร (Costar® Stripette, CORNING) และจับเวลาของการไหลในแนวดิ่งปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร โดยเริ่มจาก 0.5 จนถึง 0.9 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เป็นวินาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งวัคซีนที่ใช้ทดสอบความหนืดสัมพัทธ์ ได้แก่ วัคซีนเชื้อตายสื่อ aluminium hydroxide gel ทั้งที่เตรียมขึ้นเองและของบริษัท และวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil ที่เตรียมขึ้นเองและของบริษัท

2.3.2 การทดสอบความคงตัวของวัคซีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1991) โดยนำวัคซีนสื่อ mineral oil ทั้งที่เตรียมขึ้นและของบริษัทใส่หลอดแก้วปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส สังเกตผลทุกสัปดาห์ เพื่อศึกษาระยะเวลา (สัปดาห์) ที่วัคซีนสามารถรักษาสถานะอิมัลชันไว้ได้ จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นกันอย่างชัดเจนของส่วนที่เป็นน้ำออกจากวัคซีน

2.3.3 การทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ

ดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1997) โดยนำวัคซีนที่เตรียมขึ้นและวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้าด้วยสื่อทั้งสองชนิด มาฉีดใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอในไก่ไข่อายุ 4 สัปดาห์ กลุ่มละ 10 ตัว และตรวจรอยโรคบริเวณผิวหนัง ณ ตำแหน่งที่ฉีดวัคซีนภายหลังการให้วัคซีนเป็นเวลา 7 วัน แล้วประเมินผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ได้แก่ การเปลี่ยนสี การอักเสบ การบวมน้ำ การเกิดก้อน granuloma การมีปลอกแคปซูลหุ้มล้อมรอบ บริเวณที่ฉีดวัคซีนหรือพบวัคซีนกระจายทั่วไป

**3.3 การให้วัคซีนในไก่ทดลอง**

ไก่ไข่เพศผู้อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 120 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว

กลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมขึ้นเอง (monovalent serotype A) ด้วยสื่อวัคซีน mineral oil ที่มีปริมาณเชื้อ $10^{10}$ CFU/mL เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และฉีดซ้ำอีกครั้งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากฉีดครั้งแรก 3 สัปดาห์ (อายุ 8 สัปดาห์)

กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมขึ้นเอง (monovalent serotype A) ด้วยสื่อวัคซีน aluminium hydroxide gel ที่มีปริมาณเชื้อ $10^{10}$ CFU/mL เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และฉีดซ้ำอีกครั้งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากฉีดครั้งแรก 3 สัปดาห์ (อายุ 8 สัปดาห์)

กลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนเชื้อตายของบริษัท (trivalent) สื่อวัคซีน mineral oil เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และฉีดซ้ำอีกครั้งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากฉีดครั้งแรก 3 สัปดาห์ (อายุ 8 สัปดาห์)

กลุ่มที่ 4 ฉีดวัคซีนเชื้อตายของบริษัท (trivalent) สื่อวัคซีน aluminium hydroxide gel เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และฉีดซ้ำอีกครั้งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากฉีดครั้งแรก 3 สัปดาห์ (อายุ 8 สัปดาห์)

กลุ่มที่ 5 ไม่ฉีดวัคซีน (positive control)

กลุ่มที่ 6 ไม่ฉีดวัคซีน (negative control)

**3.4 การให้เชื้อพิษทับแก่ไก่ (*Haemophilus paragallinarum* serotype A challenge)**

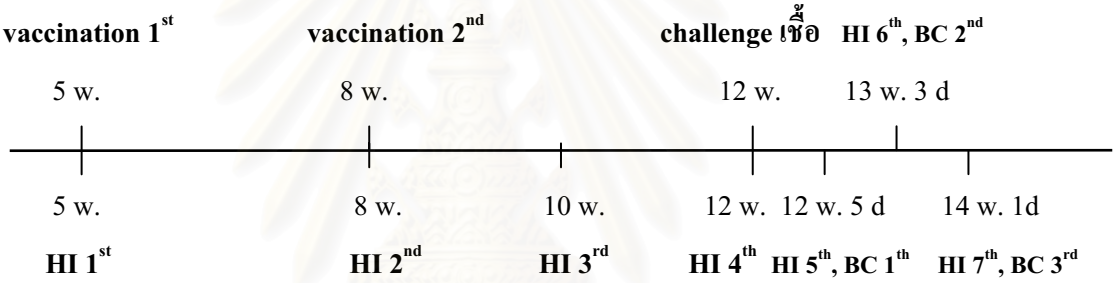
4.1 ทำการให้เชื้อพิษทับด้วย *H. paragallinarum* serotype A ที่ใช้เตรียมวัคซีน ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บตัวอย่างจากท้องที่ โดยทำการให้เชื้อหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 แล้ว 4 สัปดาห์ (อายุไก่ 12 สัปดาห์) การเตรียมเชื้อดัดแปลงจากวิธีของ Jacobs และคณะ (1992)

4.2 เตรียมเชื้อโดยการนำเชื้อจาก stock -70 องศาเซลเซียส มาฉีดเข้า egg yolk ของไข่ไก่ฟักอายุ 6-7 วัน ปิดรูด้วยเทปใส แล้วนำเข้าตู้ฟักไข่เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงซึ่งไข่ฟักจะตาย (Reid and Blackall, 1986) จากนั้นเก็บเชื้อใส่หลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ และเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้นเลือดแกะ ที่คาดด้วย *S. aureus* เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น

4.3 เพาะเชื้อจากไข่แดงที่ปลอดเชื้อลงใน CMI broth แล้วบ่มใน shaker incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเชื้อลงอาหารวุ้นเลือดแกะ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนอีกครั้ง และนำเชื้อใน broth ไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เท broth ส่วนใสทิ้ง แล้วนำส่วน pellet ของเชื้อที่อยู่ก้นหลอดมาเจือจางด้วย CMI broth ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $10^8$ CFU/mL โดยการวัดด้วย spectrophotometer (optical density เท่ากับ 0.47 ที่ wave length 550 นาโนเมตร) และการเจือจางเชื้อใน CMI broth

4.4 เมื่อได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการแล้ว ให้เชื้อในกลุ่มที่ 1-5 โดยวิธีการหยอดจมูกทั้ง 2 ข้าง ข้างละ 200 ไมโครลิตร ทุกตัว ส่วนกลุ่มที่ 6 ไม่ให้เชื้อเนื่องจากเป็นกลุ่ม negative control

**3.5 การวัดผลการวิจัย**




*** HI** = hemagglutination inhibition test **BC** = bacterial culture

5.1 การตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี HI test

5.1.1 เจาะเก็บเลือดด้วยวิธีปลอดเชื้อจากเส้นเลือดดำที่ปีกดังนี้

ก่อนฉีดวัคซีน (อายุไก่ 5 สัปดาห์) หลังฉีดวัคซีนเข็มแรก 3 สัปดาห์ (อายุไก่ 8 สัปดาห์) และ หลังฉีดวัคซีนเข็มที่สอง 2 สัปดาห์ (อายุไก่ 10 สัปดาห์) กลุ่มละ 10 ตัว

ก่อนให้เชื้อพิษทับ (อายุไก่ 12 สัปดาห์) ทุกตัว และ label หมายเลข เพื่อดูระดับแอนติบอดีของแต่ละตัวก่อนการให้เชื้อ

ภายหลังจากการให้เชื้อวันที่ 5 (อายุไก่ 12 สัปดาห์ 5 วัน), 10 (อายุไก่ 13 สัปดาห์ 3 วัน) กลุ่มละ 6 ตัว และ 15 (อายุไก่ 14 สัปดาห์ 1 วัน) ทุกตัวที่ยังเหลืออยู่

5.1.2 เตรียม antigen จาก *Haemophilus paragallinarum* serotype A

5.1.2.1 โดยใช้ *H. paragallinarum* strain 221 (serotype A) ซึ่งเป็น reference strain (ได้รับจากสถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำมาฉีดไข่ไก่ฟักอายุ 6-7 วัน และเพาะเชื้อลงใน CMI broth ใส่ตู้บ่ม shaker incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเชื้อเพื่อดูการปนเปื้อนในอาหารวุ้นเลือดแกะ

5.1.2.2 เมื่อไม่พบการปนเปื้อนจึงนำเชื้อไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม PBS ที่มี 0.01% (v/v) thimerosal ดูดด้วยปิเปตขึ้นลงเพื่อให้เชื้อกระจายใน PBS แล้ว centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

5.1.2.3 ล้างเชื้อด้วย PBS ที่มี 0.01% (v/v) thimerosal ซ้ำอีก 3 ครั้ง สุดท้ายเจือจางเชื้อใน PBS ที่มี 0.01% (v/v) thimerosal ให้ optical density เท่ากับ 1.6 ที่ wave length 650 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Soriano et al., 2001)

5.1.2.4 เก็บใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 วันก่อนใช้ตรวจ serum เพื่อให้เชื้อถูก inactivate หมด (จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อจะถูก inactivate หมดโดยใช้เวลาไม่เกิน 4 วัน)

5.1.3 เตรียม antigen จาก *Haemophilus paragallinarum* serotype C

5.1.3.1 โดยใช้ *H. paragallinarum* strain Modesto (serotype C) ซึ่งเป็น reference strain (ได้รับจากสถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำมาฉีดไข่ไก่ฟักอายุ 6-7 วัน และเพาะเชื้อลงใน CMI broth ใส่ shaker incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเชื้อเพื่อดูการปนเปื้อนในอาหารวุ้นเลือดแกะ

5.1.3.2 เมื่อไม่พบการปนเปื้อนจึงนำเชื้อไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม PBS (pH 7.2) ปิเปตขึ้นลงเพื่อให้เชื้อกระจายใน PBS แล้ว centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง เติม KSCN-Saline solution (0.5 M KSCN + 0.425 M NaCl ; pH 6.3) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ optical density 1.6 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร แล้ว stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทใส่ centrifuge tube 15 มิลลิลิตร นำไป

sonicate เป็นเวลา 4 นาที 40 วินาที ( Program : pulse on 40 off 10, Ampl 40% ) 2 ครั้ง (Vibra cell™, Sonics )

5.1.3.3 ล้างเชื้อด้วย PBS ที่มี 0.01% (v/v) thimerosal ซ้ำอีก 3 ครั้ง สุดท้ายเจือจางเชื้อใน PBS ที่มี 0.01% (v/v) thimerosal ให้ optical density เท่ากับ 1.6 ที่ wave length 650 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บใส่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

5.1.4 การเตรียมซีรัมเพื่อใช้ตรวจระดับแอนติบอดี

5.1.4.1 ปั่นแยกซีรัมที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสมซีรัมกับ 10% fixed chicken Erythrocyte ในอัตราส่วน 1:5 (ซีรัม 200 µL ผสมกับ 10% fixed chicken Erythrocyte 800 µL) เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำออกมาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

5.1.4.2 ปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร และเก็บใส่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจ HI test โดยเป็นซีรัมที่มีความเข้มข้น 1:5

5.1.5 การตรวจ HI test

5.1.5.1 นำ antigen reference ของซีโรไทป์ A ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.2 มาตรวจ hemagglutination test โดยใช้ microtiter plate 96 หลุม ดังวิธีการข้างต้น เพื่อเจือจาง antigen ให้ได้เท่ากับ 4 HA unit ต่อ 50 µL ด้วย PBS + 0.1% BSA

5.1.5.2 เติม PBS + 0.1% BSA ลงในหลุมที่ 2 ถึง 12 ของทุกแถว ปริมาตร 50 µL จากนั้นเติมซีรัมที่ผ่านการกำจัด non-specific hemagglutinin ด้วย 10% fixed chicken Erythrocyte แล้ว เติมในหลุมที่ 1, 2 และ 12 ของแถว หลุมละ 50 µL แล้วทำ two-fold dilution ตั้งแต่หลุมที่ 2 ไปจนถึงหลุมที่ 10 แล้วดูดหลุมสุดท้ายออกทิ้ง 50 µL โดยหลุมที่ 11 เป็น antigen control และ หลุมที่ 12 เป็น serum control

5.1.5.3 เติม antigen ความเข้มข้น 4 HA unit/ 50 µL ในหลุมที่ 1 – 11 ของทุกแถว หลุมละ 50 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 30 – 45 นาที จากนั้นเติม 1% fixed chicken Erythrocyte ทุกหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 30 นาทีจึงอ่านผล

5.2 การศึกษาความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อภายหลังการให้วัคซีน

5.2.1 เมตตาฆาตในวันที่ 5, 10 และ 15 ภายหลังจากให้เชื้อ ในวันที่ 5 และ 10 กลุ่มละ 6 ตัว ทุกกลุ่ม ส่วนในวันที่ 15 ทำทุกตัวที่เหลืออยู่ ทุกกลุ่ม เจาะเก็บเลือดก่อนการทำเมตตาฆาต

5.2.2 ตัดส่วนปากบนของไก่ให้ชิดเบ้าตา ด้วยวิธี aseptic technique แล้วใช้ cotton swab สะอาด ป้ายของเหลวในบริเวณไซนัสใต้ตา ซึ่งจะอยู่ด้านล่างใต้โพรงจมูก ทั้งด้านซ้ายและขวา ป้ายลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ แล้วคาดด้วย *S. aureus* บ่มในโถเทียน แล้วใส่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

5.2.3 บันทึกผลการเพาะเชื้อ เมื่อพบการเจริญของ *H. paragallinarum* ให้ทำการยืนยันโดยเลือกเชื้อที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวมาป้ายลงอาหารวุ้นเลือดแกะ และคาดด้วย *S. aureus* อีกครั้ง เพื่อดูการเจริญของเชื้อแบบ satellite colonies หากพบการเจริญของเชื้อจึงบันทึกผลว่าไม่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ

**3.6 การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ**

การวิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้โปรแกรม SPSS for windows version 12.0

6.1 ระดับแอนติบอดี: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

6.2 ผลการตรวจเพาะเชื้อ *H. paragallinarum*: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

6.3 ระยะเวลาการไหลของวัคซีน: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**3.7 แนวทางในการประเมินผลการทดลอง**

การประเมินผลการทดลองว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างเชื้อในท้องที่ใช้ได้ดีและมีประสิทธิภาพ ประเมินได้จาก

7.1 ผลของวัคซีนสามารถกระตุ้นแอนติบอดีของไก่ได้ในระดับที่เท่ากัน หรือสูงกว่าวัคซีนทางการค้าที่เลือกมาเปรียบเทียบ

7.2 จำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการพบ *H. paragallinarum* ในไซนัสใต้ตาในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นจะต้องมีจำนวนน้อยกว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทางการค้า

7.3 จำนวนไก่ที่แสดงอาการของโรคภายหลังจากให้เชื้อแล้วในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองจะต้องมีจำนวนน้อยกว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทางการค้า และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน

7.4 วัคซีนที่ให้จะต้องมีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อย มีความหนืดต่ำ และมีความคงตัวสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่นำมาผลิตวัคซีนและการเตรียมวัคซีน

จากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็น *Haemophilus paragallinarum* ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากตัวอย่างไก่ป่วยที่แสดงอาการหน้าบวมที่อยู่ในพื้นที่แตกต่างกัน และตัวอย่างจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ โดยจัดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

การสังเกตลักษณะของการเจริญเติบโตของโคโลนีพบว่าทุกตัวอย่างมีการเจริญแบบ satellite growth คือมีการเจริญของแบคทีเรียรอบๆ *Staphylococcus aureus* และโคโลนีจะเล็กลงเรื่อยๆเมื่ออยู่ไกลจาก *S. aureus* และลักษณะสำคัญคือมีลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก ใส นูน ขอบเรียบและไม่เกิด hemolysis จากนั้นนำแบคทีเรียมาทำการย้อมแกรมและทดสอบ catalase, urease, porphyrin test และ indole test พบว่าตัวอย่างที่เป็น *H. paragallinarum* มีจำนวน 4 ตัวอย่าง นำแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวอย่าง มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) พบว่าทุก isolate ให้ผลบวกและทำการฉีดไข่ไก่ฟักอายุ 11 วันเข้าทางถุงไข่แดงเปรียบเทียบกับแบคทีเรียเสตรน 221 ซึ่งเป็นเสตรนอ้างอิง พบว่าตัวอ่อนของไก่ที่ฉีดด้วยเสตรนอ้างอิง พบการตายของตัวอ่อน โดยพบจุดเลือดออกทั่วตัว ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกันกับการฉีดแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวอย่าง เข้าไข่ไก่ฟัก

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของ *H. paragallinarum* ที่นำมาศึกษา

| Number | แหล่งที่มา | จังหวัด |
|---|---|---|
| A12 | ไก่ป่วย | กรุงเทพ |
| CU17 | หน่วยชันสูตร | กรุงเทพ |
| CM2 | ไก่ป่วย | เชียงใหม่ |
| IR1 | ไก่ป่วย | ชัยภูมิ |

นำแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง มาเตรียมเป็นแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตวัคซีนและตรวจแยกซีโรไทป์ โดยใช้ antiserum A และ C (The kitasato Institute) เมื่อนำมาทดสอบการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง พบแบคทีเรีย 1 ตัวอย่างไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน และอีก 3 ตัวอย่างเป็น *H. paragallinarum* serotype A จึงเตรียมวัคซีนจาก 3 ตัวอย่างนั้นฉีดในไก่ทดลอง หลังทำวัคซีน 4

สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือดตรวจระดับแอนติบอดีต่อ serotype A พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่ป่วยจากฟาร์มไก่ไข่จังหวัดชัยภูมิมีระดับแอนติบอดีสูงที่สุดคือ 1:80 จึงนำไป challenge ในไก่ทดลอง พบว่าสามารถก่อให้เกิดอาการป่วยได้ภายใน 3 วันและสามารถเพาะแยกเชื้อกลับมาจากไซนัสใต้ตาได้ จึงพิจารณาเลือกเชื้อตัวอย่างนี้มาผลิตวัคซีน

**4.2 การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน**

1.1 ผลการทดสอบความหนืดของวัคซีน

จากการทดลองโดยการจับเวลาการไหลของวัคซีนที่ผลิตขึ้นและ วัคซีนทางการค้า พบว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยใช้สื่อ mineral oil มีระยะเวลาการไหลของวัคซีนมากกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อเจล วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil และสื่อเจล มีระยะเวลาในการไหลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ (MEAN ± SE)

| ชนิดวัคซีน | เวลา (วินาที) | | | MEAN ± SE |
|---|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | |
| วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil | 2.37 | 2.27 | 2.30 | $2.313 \pm 0.029^{a}$ |
| วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil | 0.67 | 0.69 | 0.61 | $0.667 \pm 0.015^{b}$ |
| วัคซีนที่ผลิตขึ้น สื่อเจล | 0.69 | 0.64 | 0.67 | $0.657 \pm 0.024^{b}$ |
| วัคซีนทางการค้า สื่อเจล | 0.65 | 0.60 | 0.68 | $0.643 \pm 0.023^{b}$ |
| Mineral oil | 1.60 | 1.63 | 1.53 | $1.587 \pm 0.029^{c}$ |
| Aluminium hydroxide gel | 0.71 | 0.76 | 0.64 | $0.703 \pm 0.035^{b}$ |

* สภาวะการทดสอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

$^{a-c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน

หลังการเตรียมวัคซีน พบว่าวัคซีนผสมเข้ากันได้ดีเป็นเนื้อเดียวกัน และการประเมินความคงตัวของวัคซีน โดยการวางขวดบรรจุวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน แล้วสังเกตการแยกชั้นของส่วนน้ำและน้ำมัน พบว่าวัคซีนสื่อ mineral oil จะมีความคงตัวที่ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียสเท่าๆกัน และวัคซีนสื่อ mineral oil ที่ผลิตขึ้นเองมีความคงตัวของวัคซีนใกล้เคียงกับวัคซีนสื่อ mineral oil เพื่อการค้า (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน

| ชนิดของวัคซีน | ระยะเวลาคงตัวของวัคซีน (สัปดาห์) | | |
|---|---|---|---|
| | 4 °C | 25 °C | 37 °C |
| วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ |
| วัคซีนทางการค้าสื่อmineral oil | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ | อย่างน้อย 16 สัปดาห์ |

1.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ทำการตรวจผลของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดวัคซีนทุกกลุ่ม โดยทำการตรวจสอบที่ 1, 3 และ 5 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน โดยสังเกตรอยโรคบริเวณที่ฉีด ซึ่งพบลักษณะการเปลี่ยนสีของผิวหนัง การเกิดการบวมของชั้นใต้ผิวหนัง และการเกิดก้อน granuloma พบว่าวัคซีนสื่อเจลทั้งที่ผลิตขึ้นเองและทางการค้าไม่พบว่าก่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อเลย ในขณะที่วัคซีนสื่อ mineral oil ที่ผลิตขึ้นเองเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนสื่อ mineral oil เพื่อการค้า พบว่าในสัปดาห์แรกที่ได้รับวัคซีน พบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ 90% และ 100% ตามลำดับ สัปดาห์ที่ 3 หลังทำวัคซีน พบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อลดลงเหลือ 40% เท่ากัน และในสัปดาห์ที่ 5 ไม่พบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อเลย โดยรอยโรคที่พบส่วนใหญ่จะเป็นการเกิดก้อน granuloma บริเวณที่ฉีดและจะมีขนาดเล็กลงเมื่อเวลาผ่านไป (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อที่เห็นด้วยตาเปล่าภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตาย

| ชนิดของวัคซีนเชื้อตาย | การพบรอยโรคภายหลังการให้วัคซีนที่สัปดาห์ต่างๆ (ไก่ที่พบ/ไก่ที่ตรวจทั้งหมด) | | |
|---|---|---|---|
| | 1 สัปดาห์ | 3 สัปดาห์ | 5 สัปดาห์ |
| วัคซีนที่ผลิตขึ้น สื่อ mineral oil | 9/10 | 4/10 | 0/10 |
| วัคซีนทางการค้า สื่อ mineral oil | 10/10 | 4/10 | 0/10 |
| วัคซีนที่ผลิตขึ้น สื่อเจล | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| วัคซีนทางการค้า สื่อเจล | 0/10 | 0/10 | 0/10 |

* ประเมินผลบวกจากลักษณะการเปลี่ยนสีของผิวหนัง การเกิดการบวมของชั้นใต้ผิวหนัง และการเกิดก้อน granuloma

**4.3 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* serotype A**

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีพบว่าไก่บางตัวในแต่ละกลุ่ม มีระดับแอนติบอดีต่ำมากโดยมีระดับ HI titer ต่ำกว่า 5 ถึงแม้จะฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 ไปแล้ว 4 สัปดาห์ก็ตาม (แสดงข้อมูลรายตัวในภาคผนวกตารางที่ 7) ในสัปดาห์ที่ 3 หลังให้วัคซีนเข็มแรก ไก่กลุ่มที่ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นชนิดสื่อ mineral oil มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $23.5 \pm 4.72$ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าสื่อเจลที่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยเท่ากับ $3.0 \pm 1.53$ และกลุ่มที่เหลือยังไม่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น หลังจากให้วัคซีนเข็มที่ 2 ไปแล้ว 2 สัปดาห์ ทำการตรวจระดับแอนติบอดีซ้ำ พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของกลุ่มที่ให้วัคซีนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกกลุ่ม ($p<0.05$) โดยเฉพาะกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าสื่อเจล พบว่ามีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ $182 \pm 77.54$ ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่มพบว่าระดับแอนติบอดียังคงระดับ <5.0 ไปจนจบการทดลอง

สัปดาห์ที่ 4 หลังได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของทุกกลุ่มลดลง โดยกลุ่มที่มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงที่สุดคือกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil ซึ่งมีค่า $86.58 \pm 26.17$ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทางการค้าชนิดสื่อเจล ที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุดเมื่อสัปดาห์ที่ 2 หลัง

ได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 พบว่ามีระดับแอนติบอดีลดลงเหลือ 61 ± 16.99 ส่วนวัคซีนที่เตรียมขึ้นเองทั้งชนิดสื่อ mineral oil และสื่อเจล พบว่ามีระดับแอนติบอดีต่ำกว่าวัคซีนทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 28.5 ± 5.67 และ 23.5 ± 15.75 ตามลำดับ

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีก่อนให้วัคซีนจนถึงให้ *H. paragallinarum* พบว่าระดับแอนติบอดีของกลุ่มที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มมีระดับแอนติบอดีสูงสุดภายหลังจากให้วัคซีนเข็มที่ 2 แล้ว 2 สัปดาห์ และระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงสุดพบในกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าสื่อเจล ส่วนกลุ่มที่ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อทั้งสองชนิดพบว่ามีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบระดับ antibody titer ต่อ *Haemophilus paragallinarum* serotype A (HI antibody titer) แสดงค่าเป็น mean±S.E.

| กลุ่มที่ | อายุของไก่ทดลอง (สัปดาห์) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5w. ($1^{st}$ vaccination) | 8 w. ($2^{nd}$ vaccination) | 10 w. | 12 w. (challenge) | 12 w. 5 d. (5 DPI) | 13 w. 3 d. (10 DPI) | 14 w. 1 d. (15 DPI) |
| 1 | <5 ± 0.0 | 23.5 ± 4.72[a] | 82 ± 18.73[a,b] | 28.5 ± 5.67[a,c] | 25.83 ± 6.64 | 30 ± 10.95[a] | 33.75 ± 7.78[a,c] |
| 2 | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[b] | 34 ± 15.72[a] | 23.5 ± 15.75[a,c] | 15 ± 5.48 | 17.5 ± 5.12[a] | 35.71 ± 12.12[a,c] |
| 3 | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[b] | 115.5 ± 65.99[a,b] | 86.58 ± 26.17[b] | 44.17 ± 24.17 | 106.67 ± 24.59[b] | 277.14 ± 171.74[a,c] |
| 4 | <5 ± 0.0 | 3.0 ± 1.53[b] | 182 ± 77.54[b] | 61 ± 16.99[b,c] | 48.33 ± 23.44 | 373.33 ± 53.33[c] | 731.43 ± 151.62[b] |
| 5 | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[b] | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0[a] |
| 6 | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[b] | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0 | <5 ± 0.0[a] | <5 ± 0.0[a] |
| n | 5 | 10 | 10 | 19[D]/20 | 6 | 6 | 7[E] /8 |

A) ค่าของ HI titer ที่เป็นค่า <5 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะคิดเป็น 0

B) [a-d] ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

C)DPI = day post infection D) ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 ตาย 1 ตัวจากการจิกตีกัน E)ไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 และ 4 ตายกลุ่มละ 1 ตัวจากการจิกตีกัน

* หมายเหตุ : กลุ่มที่ 1 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 2 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อเจล กลุ่มที่ 3 วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 4 วัคซีนทางการค้าสื่อเจล กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้เชื้อ กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อภายหลังจากให้วัคซีน**

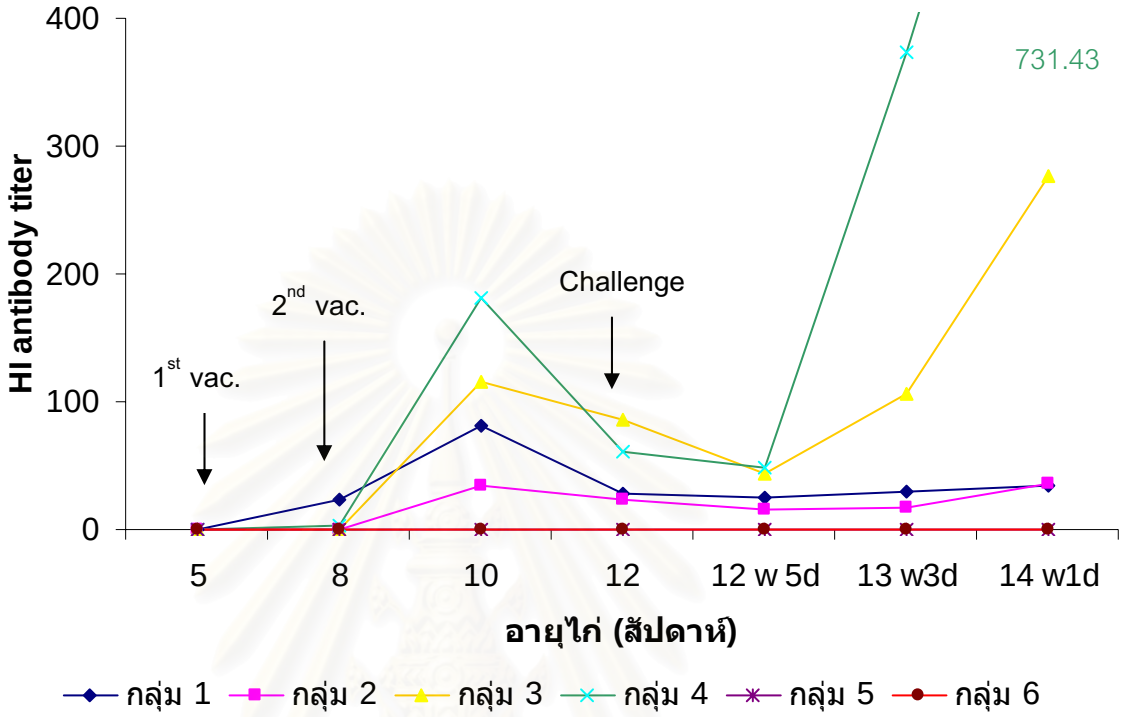
ภายหลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 แล้ว 4 สัปดาห์ ทำการให้เชื้อโดยการหยอดจมูกในกลุ่มที่ 1-5 ด้วยเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีนเพื่อฉีดในกลุ่มที่ 1 และ 2 และเก็บตัวอย่างเชื้อจากไซนัสใต้ตาในวันที่ 5, 10 และ 15 หลังให้เชื้อ พบว่าในวันที่ 3 หลังการให้เชื้อ ไก่กลุ่มที่ 5 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนแต่ได้รับเชื้อเริ่มแสดงอาการหน้าบวม มีน้ำมูกสีขาวข้น เป็นจำนวน 8 ตัวจาก 20 ตัว และพบว่าไก่ที่แสดงอาการหน้าบวมกลับมาเป็นปกติในวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ ส่วนกลุ่มที่ให้วัคซีนทุกกลุ่มและกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้เชื้อไม่พบว่ามีไก่ตัวใดแสดงอาการหน้าบวม แต่ไก่ในกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil 4 ตัวจาก 6 ตัวและวัคซีนทางการค้าสื่อเจล 1 ตัวจาก 6 ตัวมีน้ำมูกสีขาวข้น (ตารางที่ 5)

ผลการเพาะเชื้อจากไก่ในกลุ่มที่ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นเองโดยใช้สื่อทั้งสองชนิด พบว่าไก่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 100% และไม่พบว่าไก่ตัวใดแสดงอาการมีน้ำมูกสีขาวข้นในทางเดินหายใจ ส่วนไก่กลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil พบว่าในวันที่ 5 หลังให้เชื้อ สามารถแยกเชื้อในไซนัสใต้ตาได้ถึง 5 ตัวจาก 6 ตัว หรือ 83.33% และมี 4 ตัวที่พบน้ำมูกสีขาวข้นในช่องจมูก ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าชนิดสื่อเจลพบเชื้อในวันที่ 5 หลังให้เชื้อเพียง 2 ตัวจาก 6 ตัว หรือ 33.33% และพบน้ำมูกสีขาวข้นในช่องจมูกเพียง 1 ตัวเท่านั้น กลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อ พบว่าทุกตัวมีน้ำมูกสีขาวข้นในช่องจมูกและผลการเพาะเชื้อพบว่าทุกตัวสามารถพบเชื้อได้คิดเป็น 100% (ตารางที่ 5)

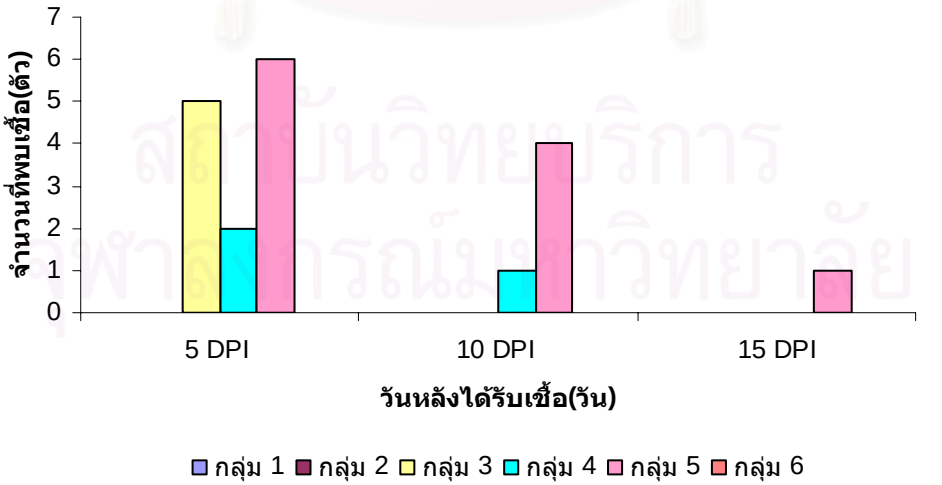
เมื่อทำการเพาะเชื้อซ้ำในวันที่ 10 หลังไก่ได้รับเชื้อ พบว่าไก่ที่แสดงอาการหน้าบวมหายเป็นปกติแล้ว ในกลุ่มควบคุมที่ให้เชื้อบางตัวยังพบน้ำมูกสีขาวข้นในช่องจมูก และสามารถพบเชื้อคิดเป็น 66.67% (4 ตัวจาก 6 ตัว) ส่วนกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าพบว่ามีเพียงกลุ่มที่ให้วัคซีนชนิดสื่อเจลที่ยังพบเชื้อคิดเป็น 16.67% (1 ตัวจาก 6 ตัว)

ผลการเพาะเชื้อในวันที่ 15 หลังให้เชื้อพบว่าไก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อเพียง 1 ตัวจาก 8 ตัว หรือ 12.5% ในขณะที่กลุ่มอื่นๆไม่พบเชื้อเลย และตลอดระยะเวลาการทดลองไม่พบว่าไก่ทดลองตายจาก *H. paragallinarum* ซึ่งสาเหตุการตายที่พบในไก่ทดลองกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 มาจากการจิกตีกัน (กลุ่มละ 1 ตัว)

รูปที่ 1 แสดงค่า HI titer (mean)




รูปที่ 2 แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกในการเพาะ H. *paragallinarum* ภายหลังให้เชื้อ




* หมายเหตุ : กลุ่มที่ 1 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 2 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อเจล กลุ่มที่ 3 วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil
กลุ่มที่ 4 วัคซีนทางการค้าสื่อเจล กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้เชื้อ กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ

ตารางที่ 6 ผลการเพาะ *H. paragallinarum* จากไซนัสใต้ตาภายหลังการให้เชื้อในวันที่ 5, 10 และ 15

| กลุ่มที่ | จำนวนไก่ที่พบ/ จำนวนไก่ทั้งหมดที่ตรวจ | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Clinical sign (3 DPI) | 5 DPI | | | 10 DPI | | | 15 DPI | | |
| | | Mucus in sinuses | Haemophili in sinuses | Protection rate (%) | Mucus in sinuses | Haemophili in sinuses | Protection rate (%) | Mucus in sinuses | Haemophili in sinuses | Protection rate (%) |
| 1 | 0/20 | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/8 | 0/8 | 100% |
| 2 | 0/20 | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/7 | 0/7 | 100% |
| 3 | 0/19 | 4/6 | 5/6 | 16.67% | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/7 | 0/7 | 100% |
| 4 | 0/20 | 1/6 | 2/6 | 66.67% | 0/6 | 1/6 | 83.33% | 0/7 | 0/7 | 100% |
| 5 | 8/20 | 6/6 | 6/6 | 0% | 3/6 | 4/6 | 33.33% | 0/8 | 1/8 | 87.5% |
| 6 | 0/20 | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/6 | 0/6 | 100% | 0/8 | 0/8 | 100% |

A) DPI = day post infection

B) ไก่ทดลองกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ตายกลุ่มละ 1 ตัวจากการจิกตีกัน

C) หมายเหตุ : กลุ่มที่ 1 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 2 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อเจล กลุ่มที่ 3 วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 4 วัคซีนทางการค้าสื่อเจล กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้เชื้อ กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ *H. paragallinarum***

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ โดยทำหมายเลขไก่ทุกตัวของทุกกลุ่ม เพื่อดูระดับแอนติบอดีก่อนการให้เชื้อและการตรวจพบเชื้อในวันที่ 5 หลังให้เชื้อ ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่เตรียมขึ้นด้วยสื่อ mineral oil และสื่อเจล โดยใช้เชื้อเดียวกับที่ challenge พบว่าไก่บางตัวมีระดับแอนติบอดีสูง ในขณะที่บางตัวมีระดับแอนติบอดีต่ำกว่า 5 แต่ไก่ทั้งสองกลุ่มสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 100% ในขณะที่ไก่ที่ได้รับวัคซีนทางการค้าบางตัวสามารถตรวจพบเชื้อในไซนัสใต้ตา ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ พบว่าไก่ที่มีระดับแอนติบอดีสูงจะมีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อได้มากกว่าไก่ที่มีระดับแอนติบอดีต่ำ (แสดงข้อมูลในภาคผนวกตารางที่ 8)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

*Haemophilus paragallinarum* serotype A ที่นำมาใช้ผลิตวัคซีนเชื้อตายในการทดลองครั้งนี้ เป็นเชื้อที่เก็บตัวอย่างมาจากไก่ไข่ในฟาร์มไก่ไข่แห่งหนึ่งในจังหวัดชัยภูมิ ซึ่งประสบปัญหาการระบาดของโรคหวัดหน้าบวม ทั้งที่มีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้ตามโปรแกรมแล้ว โดยผลการระบาดทำให้ฟาร์มไก่ไข่ประสบปัญหาไข่ลด ในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ทำการคัดเลือกไก่ไข่ที่แสดงอาการหน้าบวม เยื่อตาขาวอักเสบ มีน้ำมูกสีขาวข้น มาทำการเพาะแยกเชื้อ แล้วนำเชื้อที่ได้มายืนยันว่าเป็น *Haemophilus paragallinarum* โดยการทำ biochemical test และ PCR จากนั้นทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นแอนติบอดี และความสามารถในการก่อโรค โดยฉีดไข่ไก่ฟักเพื่อสังเกตลักษณะการตายของตัวอ่อน การให้เชื้อพิษทับ โดยการหยอดจมูกเพื่อสังเกตการเกิดโรคในไก่ทดลอง และการนำเชื้อไปผลิตเป็นวัคซีนแล้วฉีดไก่ไข่ทดลองเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี หลังจากผ่านขั้นตอนทุกอย่างแล้วพบว่าเชื้อนี้สามารถกระตุ้นแอนติบอดี และยังสามารถก่อโรคในไก่ทดลองได้

การศึกษาคุณสมบัติของวัคซีนที่เตรียมขึ้น พบว่าวัคซีนสื่อ mineral oil ที่เตรียมขึ้นมีความหนืดมากกว่าวัคซีนสื่อ mineral oil เพื่อการค้าและวัคซีนสื่อเจลทั้งสองแบบอยู่ประมาณ 3.5 เท่า แต่ในทางปฏิบัติกลับไม่พบความแตกต่าง เนื่องจากเมื่อทำการวัดระยะเวลาในการฉีดวัคซีนในไก่แต่ละกลุ่มพบว่ามีความใกล้เคียงกัน และจากการศึกษาความคงตัวของวัคซีนสื่อ mineral oil ที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนสื่อ mineral oil เพื่อการค้า พบว่าที่อุณหภูมิเดียวกัน วัคซีนสื่อ mineral oil ทั้งสองชนิดมีความคงตัวของวัคซีนใกล้เคียงกัน โดยไม่พบการแยกชั้นของน้ำและน้ำมันตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา พบการตกตะกอนของแอนติเจนในวัคซีนสื่อ mineral oil ที่ผลิตขึ้น แต่เมื่อเขย่าวัคซีนสามารถกลับเข้ามาเป็นเนื้อเดียวกันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสูตรการเตรียมวัคซีนทางการค้าและวิธีการในการผลิตวัคซีนด้วยอุปกรณ์ที่ดีกว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นเอง โดยการผลิตวัคซีนในเชิงอุตสาหกรรมจะอาศัยความดันในการผลักอิมัลชันให้ผ่านรูเล็กๆที่กำหนดขนาดของอิมัลชันให้สม่ำเสมอและละเอียดขึ้น อิมัลชันจึงมีความหนืดน้อยและมีการแขวนลอยของแอนติเจนมากกว่า

การเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองของเนื้อเยื่อจากการฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนัง พบว่าวัคซีนสื่อ mineral oil ทั้งที่เตรียมขึ้นเองและวัคซีนทางการค้ามีผลต่อเนื้อเยื่อมากกว่าวัคซีนสื่อเจล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับที่เตรียมวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil จาก *H. paragallinarum* เปรียบเทียบกับสื่อเจลและพบการเกิดการบวมของชั้นใต้ผิวหนังและการเกิดก้อน granuloma ในบริเวณที่ฉีด (Blackall et al., 1991; Deguchi et al., 1998; Fukanoshi et al., 2000; Reid and Blackall,

1986) โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อต่อวัคซีนเมื่อฉีดวัคซีนสื่อ mineral oil ไปแล้ว 1 สัปดาห์ ไก่บางตัว พบปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อคงอยู่ไปจนถึง 3 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีน ในขณะที่สื่อเจลไม่พบปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังฉีดวัคซีน ลักษณะปฏิกิริยาที่ตรวจพบในไก่ที่ฉีดวัคซีนด้วยสื่อ mineral oil คือ พบการบวมของชั้นใต้ผิวหนัง การเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด และการเกิดก้อน granuloma ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร ซึ่งปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นนี้ไม่รุนแรงมากนัก และไม่พบความแตกต่างของการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อระหว่างวัคซีนทางการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น จากการศึกษาของ Deguchi และคณะ (1998) ซึ่งเตรียมวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil จาก *H. paragallinarum* แล้วเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อเมื่อฉีดวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil เข้ากล้ามเนื้อและใต้ผิวหนัง พบว่าการฉีดเข้าใต้ผิวหนังจะมีความรุนแรงของการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อยกว่าการฉีดเข้ากล้าม และพบว่าการฉีดวัคซีนชนิดนี้เข้าใต้ผิวหนัง สามารถกระตุ้นให้เกิดระดับแอนติบอดีที่สูงกว่าการฉีดเข้ากล้ามอีกด้วย

ความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดีของวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตขึ้นเอง พบว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อ mineral oil สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีได้เร็วกว่าวัคซีนสื่อเจล โดยพบระดับแอนติบอดีที่ 3 สัปดาห์หลังฉีดวัคซีนเข็มแรก ในขณะที่วัคซีนสื่อเจลตรวจไม่พบแอนติบอดี ซึ่งแตกต่างจากวัคซีนทางการค้า โดยพบว่าวัคซีนทางการค้าสื่อเจล สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่ำๆ ที่ 3 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีนเข็มแรก ในขณะที่วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil ตรวจไม่พบแอนติบอดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Morein และคณะ (1996) คือการใช้ aluminium hydroxide gel เป็นสื่อวัคซีน สามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้เร็วกว่า oil จากการศึกษาระดับแอนติบอดีระหว่างวัคซีนเชื้อตายทั้งสื่อเจลและสื่อ mineral oil พบว่าไก่ทุกกลุ่มสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากให้วัคซีนเข็ม 2 และพบว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นมีระดับแอติบอดีเฉลี่ยต่ำกว่าวัคซีนที่ผลิตทางการค้า ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากสูตรการเตรียมวัคซีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างวัคซีนที่เตรียมขึ้นและวัคซีนทางการค้า นอกจากนี้วัคซีนที่ผลิตขึ้นเองอาจจะใช้วิธีการเตรียมที่ยังไม่ดีเทียบเท่ากับวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้า ทำให้แบคทีเรียและสื่อวัคซีนไม่ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถอธิบายผลข้างต้นที่ว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อ mineral oil สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้เร็วกว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อเจล เนื่องจากการจับกันของแอนติเจนและสื่อ mineral oil ยังไม่ดีนัก ทำให้มีการปล่อยแอนติเจนเร็วจึงพบระดับแอนติบอดีที่เร็วกว่า

ความสัมพันธ์ระหว่างการปล่อยแอนติเจนและสื่อของวัคซีน อธิบายได้จากการศึกษาของ Fukanoki และคณะ (2000) ว่าวัคซีนที่ปล่อยแอนติเจนช้าจะให้แอนติบอดีสูงและนานกว่า และการลดสัดส่วนของ aqueous phase ในสูตรจะสามารถลดอัตราการปล่อยแอนติเจนของวัคซีนและเพิ่มระดับแอนติบอดีให้สูงขึ้นได้ ดังนั้นสูตรในการเตรียมวัคซีนจึงมีความสำคัญต่อระดับแอนติบอดีที่

เกิดขึ้น ซึ่งสามารถอธิบายผลการทดลองที่ว่า ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อ mineral oil จะมีระดับเฉลี่ยสูงกว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นด้วยสื่อเจล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fukanoki และคณะ (2000) และ Jacobs และคณะ (1992) ในขณะที่วัคซีนทางการค้ากลับให้ผลตรงข้ามกัน คือสอดคล้องกับงานวิจัยของ Blackall (1980) และ Reid และ Blackall (1986) ว่าวัคซีนทางการค้าชนิดสื่อเจล พบระดับแอนติบอดีเฉลี่ยสูงกว่าวัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil แต่ทั้งนี้ทุกงานวิจัยก็ให้ผลตรงกันว่าวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีที่ยาวนานกว่าวัคซีนเชื้อตายชนิดสื่อเจล

การให้เชื้อ *H. paragallinarum* serotype A ที่เป็น homologous กับเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีนเชื้อตายในการวิจัยนี้ พบว่ากลุ่มที่ให้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อ mineral oil และสื่อเจลสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ 100% แม้กระทั่งไก่ตัวที่มีระดับแอนติบอดีต่ำมาก โดยไก่ทั้งหมดไม่พบว่ามีตัวใดแสดงอาการป่วยและไม่สามารถแยกเชื้อบริเวณไซนัสใต้ตา ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเชื้อได้บ่อย (Soriano et al., 2004) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้าด้วยสื่อทั้งสองชนิดและกลุ่มควบคุมที่ให้เชื้อ ที่สามารถพบเชื้อจากไซนัสใต้ตาได้และบางตัวยังพบอาการป่วย ซึ่งสรุปได้ว่าแม้เป็นเชื้อที่มีซีโรไทป์เดียวกันแต่ความสามารถต่อการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ยังมีจำกัด เนื่องจากเชื้อมีหลาย serovar (แบ่งตาม Kume scheme) ทำให้การพบเชื้อในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกัน โดยที่บาง serovar อาจพบในประเทศหนึ่งแต่ไม่พบในอีกประเทศหนึ่ง (Soriano et al., 2004; Terzolo et al., 1992) และการที่ความสามารถในการป้องกันโรคข้าม serovar มีความแตกต่างกัน (Soriano et al., 2004) จึงมีความจำเป็นที่วัคซีนที่ใช้ในท้องถิ่นนั้นควรผลิตจากเชื้อที่พบในท้องถิ่น (วันทนีย์ และคณะ 2538; Bragg, 2002; Bragg, 2005; Mouahid et al., 1991)

ในกลุ่มที่ให้วัคซีนทางการค้า พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสื่อเจลมีความสามารถในการป้องกันโรคได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายสื่อ mineral oil ซึ่งแยกพบเชื้อได้มากกว่า โดยวัคซีนสื่อ mineral oil มีความสามารถในการป้องกันโรค 16.67% ในขณะที่วัคซีนสื่อเจลสามารถป้องกันได้ถึง 66.67% จากการศึกษาของ Reid และ Blackall (1987) พบว่าวัคซีนสื่อเจลจะให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนสื่อ mineral oil ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Coetzee และคณะ (1982) และ Jacobs และคณะ(1992) ว่าวัคซีนสื่อ mineral oil มีความสามารถในการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนสื่อเจล เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าวัคซีนทางการค้าสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้วัคซีน จึงมีความเป็นไปได้ว่า วัคซีนทางการค้ามีความสามารถในการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ได้บางส่วน และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีกับการตรวจพบเชื้อในไซนัสใต้ตาจากไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทางการค้าในวันที่ 5 หลังให้เชื้อพบว่า ไก่

ที่มีระดับแอนติบอดีสูงจะสามารถป้องกันการเกิดโรคได้มากกว่าไก่ที่มีระดับแอนติบอดีต่ำ (วันทนีย์ และคณะ 2538; Soriano et al., 2004)

สรุปการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อที่แยกได้ในท้องถิ่น สามารถให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีกว่าการใช้วัคซีนทางการค้าซึ่งเตรียมจากเชื้อที่มีการระบาดในต่างประเทศ และวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อ mineral oil มีความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดีได้สูงกว่าและคงอยู่นานกว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยสื่อเจล โดยความสามารถนี้ขึ้นอยู่กับสูตรและวิธีการเตรียมวัคซีนที่แตกต่างกับวัคซีนทางการค้า

**ข้อเสนอแนะ**

ในการศึกษาครั้งหน้าควรทำการเก็บตัวอย่างให้มากขึ้น และแยก serovar ประกอบกับการทำ DNA sequence เพื่อดูความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบระบาดภายในประเทศ และศึกษาความสามารถในการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ของเชื้อที่พบระบาดภายในประเทศด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง

## ภาษาไทย


เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. โรคติดเชื้อในไก่. กรุงเทพมหานคร: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันทนีย์ เนรมิตมานสุข และประภาส เนรมิตมานสุข. 2528. เชื้อฮีโมฟีลัสพารากาลลินารัม ที่พบจากโรคหวัดติดต่อในไก่. สัตวแพทยสาร 36(2): 133-140.

วันทนีย์ เนรมิตมานสุข ประภาส เนรมิตมานสุข ทิพา ตันติเจริญยศ และลัดดา ตรงวงศา. 2538. การศึกษาวัคซีนโรคหวัดติดต่อในไก่ที่ผลิตจากสายพันธุ์ท้องถิ่น. สัตวแพทยสาร 46(4): 53-60.

สุวณีย์ สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ศิริยอด.


## ภาษาอังกฤษ


Blackall, P.J., and Reid, G.G. 1982. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium.* Vet Microbiol. 7: 359-367.

Blackall, P.J., and Reid, G.G. 1987. Further efficacy studies on inactivated, aluminium-hydroxide-absorbed vaccines against infectious coryza. Avian Dis. 31(3): 527-532.

Blackall, P.J., Eaves, L.E., and Aus, G. 1990. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. Avian Dis. 34(3): 643-645.

Blackall, P.J., Eaves, L.E., and Rogers, D.G. 1990. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin Scheme. Journal of Clin Micro. 28(6): 1185-1187.

Blackall, P.J., Eaves, L.E., Rogers, D.G., and Firth, G. 1992. An evaluation of inactivated infectious coryza vaccines containing a double-emulsion adjuvant system. Avian Dis. 36: 632-636.

Blackall, P.J., Matsumoto, M., and Yamamoto, R. 1997. Infectious coryza. In B.W. Calnek (ed.), Diseases of poultry, pp. 179-190. USA: Iowa state press.

Blackall, P.J., and Yamamoto, R. 1998. Infectious coryza. In D.E. Swayne (ed.), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, pp. 29-34. USA: American association of avian pathologists, Inc.

Blackall, P.J. 1999. Infectious coryza: Overview of the disease and new diagnostic options. Clin Micro Reviews. 12(4): 627-632.

Blackall, P.J., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L.L., and Bisgaard, M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum, [Haemophilus] paragallinarum, Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 353-362.

Bragg, R.R. 2002. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: A further indication of the need for the production of vaccine against infectious coryza containing local isolates of *H. paragallinarum*. Onderstepoort J Vet Res. 69(2): 129-32.

Bragg, R.R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*: part 2: naturally occurring NAD-independent filed isolates. Onderstepoort J Vet Res. 69: 171-175.

Chen, X., Miflin, J.K., Zhang, P., and Blackall, P.J. 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 40: 398-407.

Deguchi, K., Honda, T., Matsuo, K., Fujikawa, H., Iwamoto, T., and Sakanoue, Y. 1998. Influence of inoculation site of combined oil-adjuvanted vaccine on the antibody response in chickens. J Vet Med Sci. 60(7): 831-835.

Eaves, L.E., Rogers, D.G., and Blackall, P.J. 1989. Comparison of Hemagglutinin and Agglutinin Schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. Journal of Clin Micro. 27(7): 1510-1513.

Fukanoki, S., Matsumoto, K., Mori, H., and Takeda, R. 2000. Relation between antigen release and immune response of oil adjuvanted vaccines in chickens. J Vet Med Sci. 62(6): 571-574.

Hobb, R.I., Tseng, H.J., Downes, J.E., Terry, T.D., Blackall, P.J., Takagi, M., and Jennings, M.P. 2002. Molecular analysis of haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology 148: 2171-2179.

Jacobs, A.A.C., Cuenen, W., and Strom, P.K. 1992. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet Micro. 32: 43-49.

Jacobs, A.A.C., and Van Der Werf, J. 2000. Efficacy of a commercial available coryza vaccine against challenge with recent South African NAD-independent isolates of *Haemophilus paragallinarum.* J S Afr Vet Assoc. 71: 109-110.

Kume, K., Sawata, A., Nakai, T., and Matsumoto, M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a Hemagglutinin system. Clinical Micro. 17(6): 958-964.

Mena-Rojas, E., Cruz, C.C., Vaca, S.P., Garcia, G.O., Perez-Marquez, V.M., Perez-Mendez, A., Ibarra-Caballero, J., Garza, M., Zenteno, E., and Negrete-Abascal, E. 2004. Antigenic secreted protein from *Haemophilus paragallinarum*: a 110-kDa putative RTX protein. FEMS Microbiol Lett. 232: 83-87.

Morein, B., Eriksson, M.V., Sjolander, A., and Bengtsson, K.L. 1996. Novel adjuvants and vaccine delivery systems. Vet Immunology And Immunopat. 54: 373-384.

Mouahid, M., Bouzoubaa, K., and Zouagui, Z., 1991. Preparation and use of an autogenous bacterin against infectious coryza inchickens. Vet Res Commun. 15(6): 413-419.

Mouahid, M., Bisgaard, M., Morley, A.J. Mutters, R., and Mannheim, W. 1992. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum.* Vet Micro. 31: 363-368.

Muller, H.E., and Hinz, K.H. 1978. Occurrence and some properties of neuraminidases in *Haemophilus avium* and *Haemophilus paragallinarum*. Vet Micro. 2: 303-312.

Reid, G.G., and Blackall, P.J. 1984. Pathogenicity of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium* in chickens. Vet Micro. 9: 77-82.

Reid, G.G., and Blackall, P.J. 1987. Comparison of Adjuvants for an Inactivated infectious coryza vaccine. Avian Dis. 31(1): 59-63.

Page, L.A. 1962. Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res. 23: 85-95.

Sato, S., and Shifrine, M. 1964. Serologic response of chickens to experimental infection with *Haemophilus gallinarum*, and their immunity to challenge. Poult Sci. 43: 1199-1204.

Sawata, A., Nakai. T., Kume, K.,Yoshikawa, H., and Yoshikawa, T. 1985. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated vafiants of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res. 46: 1185-1191.

Soriano, V.E.., Blackall, P.J., Dabo, S.M., Tellez, G., Garcia-Delgodo, G.A., and Fernandez, R.P. 2001. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume Hemagglutinatinin Scheme. Avian Dis. 45: 680-683.

Soriano, V.E., Longinos, G.M., Fernandez, R.P., Velasquez, Q.E., Ciprian, C.A., Salazar Garcia, F., and Blackall, P.J. 2004. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 48(4): 886-9.

Soriano, V.E., Garduno, M.L., Tellez, G. Rosas, P.F., Suarez-Guemes, F., and Blackall, P.J. 2004. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinatinin scheme. Avian Pathol. 33(5): 506-11.

Stone, H.D., Brugh, M., Hopkins, S.R., Yoder, H.W., and Beard, C.W. 1978. Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. Avian Dis. 22: 666-674.

Stone, H.D. 1991. The preparation and efficacy of manually emulsified Newcastle disease oil emulsion vaccines. Avian Dis. 35: 8-16.

Stone, H.D. 1997. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal, vegetable and synthetic oils. Avian Dis. 41: 591-597.

Takagi, M., Hirayama, N., Makie, H., and ohta, S. 1991. Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. Vet Microbio. 27: 327-338.

Taole, M., Albertyn, J., Heerden, E.V., and Bragg, R.R.2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum:* part 3: experimentally produced NAD-independent isolate. Onderstepoort J Vet Res. 69: 189-196.

Terzolo, H.R., Paolicchi, F.A., Sandoval, V.E., Blackall, P.J., Yamaguchi, T., and Iritani, Y. 1993. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis. 37(3): 310-314.

Terry, T.D., Zalucki, Y.M., Walsh, S.L. Blackall, P.J., and Jennings, M.P. 2003. Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum.* Microbiology 149: 3177-3184.

Yamaguchi, T., Iritani, Y., and Hayashi, Y. 1988. Serological response of chickens either vaccinated or artificially infected with *Haemophilus paragallinarum.* Avian Dis. 32(2): 308-12.

Yamaguchi, T., Kobayashi, M., Masaki, S., and Iritani, Y. 1993. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis. 37: 970-976.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาคผนวก ก**

**PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.2** ปริมาตร 1 ลิตร

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 8 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 1.44 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.25 | กรัม |
| Distilled water add to | 1,000 | มิลลิลิตร |

นำสารละลายเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**PBS-BSA (Phosphate Buffered Saline-Bovine Serum Albumin)** ปริมาตร 1 ลิตร

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2HPO_4$-$2H_2O$ | 0.45 | กรัม |
| $NaH_2PO_4$-$12H_2O$ | 2.53 | กรัม |
| NaCl | 8 | กรัม |
| Bovine serum albumin | 1 | กรัม |
| $NaN_3$ | 4 | กรัม |
| Distilled water add to | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับ pH เป็น 6.9-7.1 แล้วนำไปกรองด้วยหัวกรอง millipore 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส

*ควรใช้ให้หมดภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียมแล้ว

**Mist. Desiccans**

| | | |
|---|---|---|
| A. horse serum | 300 | มิลลิลิตร |

(sterile โดยกรองด้วยหัวกรอง millipore 0.45 ไมครอน)

| | | |
|---|---|---|
| B. glucose | 30 | กรัม |
| Soy peptone | 1.3 | กรัม |
| Distilled water add to | 100 | มิลลิลิตร |

(sterile โดยอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที)

ผสม A และ B เข้าด้วยกันก่อนใช้โดยผสมอัตราส่วนของ A : B เท่ากับ 30 : 10

| **Alsever's solution** | | ปริมาตร 1 ลิตร |
|---|---|---|
| Dextrose | 20.5 | กรัม |
| Sodium citrate | 8 | กรัม |
| Citric acid | 0.55 | กรัม |
| NaCl | 4.2 | กรัม |
| Distilled water add to | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

| **Blood agar** | ปริมาตร 500 มิลลิลิตร | |
|---|---|---|
| Blood agar base (OXOID®, England) | 40 | กรัม |
| Distilled water add to | 500 | มิลลิลิตร |
| Sheep blood | 25 | มิลลิลิตร |

ละลาย blood agar base ลงในน้ำกลั่น ต้มจนสารละลายใส แล้วนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบตามเวลา วางทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทเลือดแกะลงผสม แกว่งให้เข้ากัน จึงเทใส่ petri dish

| **Chocolate agar (contain 0.001% β-NAD)** | ปริมาตร 500 มิลลิลิตร | |
|---|---|---|
| TSA (tryptic soya agar; OXOID®, England) | 40 | กรัม |
| Distilled water add to | 500 | มิลลิลิตร |
| Sheep blood | 25 | มิลลิลิตร |
| 0.1% β-NAD | 5 | มิลลิลิตร |

ละลาย TSA ในน้ำกลั่น ต้มจนสารละลายใส แล้วนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบตามเวลา วางทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 65 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทเลือดแกะลงผสม แกว่งให้เข้ากัน ต้มต่อใน water bath อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วแกว่งทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 30 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิลดเหลือ 45 องศาเซลเซียส จึงเท 0.1% β-NAD ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ petri dish

| ***วิธีเตรียม 0.1% β-NAD (Merck) | ปริมาตร 100 มิลลิลิตร | |
|---|---|---|
| β-NAD(Nicotinamide adenine dinucleotide free acid) | 100 | มิลลิกรัม |

| | | |
|---|---|---|
| Distilled water add to | 100 | มิลลิลิตร |

ละลาย β-NAD ในน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยหัวกรอง millipore 0.45 ไมครอน ใส่หลอดทดลองที่มีฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บใส่ตู้ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

**CMI broth (chicken meat infusion broth)** ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.chicken meat infusion[A] | 90% | 450 | มิลลิลิตร |
| 2. Vitamin assay casamino acid (difco,USA) | 0.5% | 2.5 | กรัม |
| 3. Bacto-soytone (difco,USA) | 0.5% | 2.5 | กรัม |
| 4. NaCl | 0.5% | 2.5 | กรัม |
| 5. chicken serum[B] | 5% | 25 | มิลลิลิตร |
| 6. Fresh yeast extract[C] | 5% | 25 | มิลลิลิตร |
| 7. β-NAD[D] 10 | มิลลิกรัมต่อ media 100 | | มิลลิลิตร |

ผสมส่วนผสมข้อ 1-4 เข้าด้วยกัน แล้วปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 10% NaOH แล้วนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบตามเวลา วางทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนผสมข้อ5-7 ผสมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

[A] chicken meat infusion

ใช้เนื้อไก่ส่วนอกไม่ติดมันสับละเอียดน้ำหนัก 1 กิโลกรัมต่อน้ำกลั่น 2 ลิตร ปั่นในเครื่องปั่นจนละเอียด แล้วใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำไปต้มในหม้อไฟปานกลางประมาณ 45 นาที คนเรื่อยๆจนน้ำใส แล้วกรองด้วยผ้าขาวเพื่อแยกเนื้อไก่ออก นำน้ำส่วนใสไปกรองในกระดาษกรอง whatman (no.1) 2 รอบ แล้วกรองด้วยหัวกรอง millipore ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใส่ขวดฝาเกลียวที่สะอาด แล้วใส่ตู้ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

[B] Chicken serum

เจาะเก็บเลือดไก่ ปั่นเก็บซีรั่ม แล้วนำไปกรองด้วยหัวกรอง millipore ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใส่หลอดแก้วฝาเกลียว จากนั้นนำซีรั่มไป inactivate โดยต้มทั้งหลอดใน water bath อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเก็บในตู้ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

[C] Fresh yeast extract

ใช้ยีสต์ทำขนมปังน้ำหนัก 500 กรัม นำไปปั่นในเครื่องปั่นจนละเอียด แล้วผสมน้ำกลั่น 1.5 ลิตร ต้มใน water bath 100 องศาเซลเซียส 30 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที 10นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษ whatman (no. 1) แล้วกรองด้วยหัวกรอง millipore ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใส่หลอดฝาเกลียวเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

[D] β-NAD

ละลาย β-NAD 100 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยหัวกรอง millipore ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

| **Fresh chicken Erythrocyte 10%** | ปริมาตร 100 มิลลิลิตร | |
|---|---|---|
| Alsever's solution | 30 | มิลลิลิตร |
| PBS | 500 | มิลลิลิตร |
| Chicken blood | 30 | มิลลิลิตร |

เจาะเลือดไก่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร(ห้ามให้เลือดแข็งตัว)ผสมกับ Alsever's solution 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,800 รอบ 7 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วน buffy coat และส่วนใสออก เติม PBS แล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 1,800 รอบ 7 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ รอบสุดท้ายปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบ 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS ให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 10% ตอนใช้ dilute ด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 1% fresh Erythrocyte

| **Fixed chicken Erythrocyte 10%** | ปริมาตร 100 มิลลิลิตร | |
|---|---|---|
| Alsever's solution | 30 | มิลลิลิตร |
| PBS | 500 | มิลลิลิตร |
| Chicken blood | 30 | มิลลิลิตร |
| Glutaraldehyde | 4 | มิลลิลิตร |
| 1% thimerosal | 1 | มิลลิลิตร |

เจาะเลือดไก่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร(ห้ามให้เลือดแข็งตัว)ผสมกับ Alsever's solution 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,800 รอบ 7 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วน buffy coat และส่วนใสออก เติม PBS แล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 1,800 รอบ 7 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ รอบสุดท้ายปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบ 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS ให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 10% แล้วผสมกับ 4% glutaraldehyde แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (glutaraldehyde 4 มิลลิลิตร+PBS 96 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 นำไป sterrier ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,000 รอบ 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS ปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบ 10 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ เทส่วนใสทิ้ง

แล้วเติม PBS ให้ความเข้มข้นเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 10% แล้วเติม 1% thimerosal ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ thimerosal เท่ากับ 0.01% ก่อนใช้จึงทำการ dilute เม็ดเลือดแดงให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1%



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาคผนวก ข**

**Porphyrin test** : ใช้ในการทดสอบความต้องการ X-factor

หลักการ: เชื้อที่ไม่ต้องการ x-factor จะสามารถเปลี่ยน ALA ซึ่งเป็น porphyrin precursor ไปเป็น porphyrin ( เป็น intermediate ของ haemin biosynthetic pathway)

A. 2 mM delta-aminolevulinic acid hydrochloride (ALA) (Sigma)

B. 0.8 mM $MgSO_4$

C. 0.1 M phosphate buffer pH 6.9

D. Kovac's reagent 1-2 หยด

ผสมข้อ A-C เข้าด้วยกัน แล้วดูดมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube แล้วกวาดเชื้อที่เตรียมไว้ใน chocolate agar ใส่ลงไป จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หยด Kovac's reagent ลงไป 1-2 หยด ดูการเปลี่ยนสี (หากเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามี porphyrin เกิดขึ้น คือไม่ต้องการ x-factor)

**Indole test**

A. 0.1% L-tryptophan

B. 0.05M phosphate buffer pH 6.8

C. Kovac's reagent 1-2 หยด

ผสม A กับ B เข้าด้วยกัน แล้วกวาดเชื้อที่เตรียมไว้ใน chocolate agar ใส่ลงไป จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent ลงไป 1-2 หยด ดูการเปลี่ยนสี หากเกิดวงแหวนสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

**Urease test**

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.1 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.1 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| 0.2% phenol red | 0.5 | มิลลิลิตร |

(เตรียมโดยละลาย phenol red crystal 0.2 กรัม ใน 1 N NaOH และ distilled water 92 มิลลิลิตร)

| | | |
|---|---|---|
| Distilled water add to | 100 | มิลลิลิตร |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้ 5 N NaOH แล้วนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบตามเวลา นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงแล้วเติม 20% urea solution (กรองด้วยหัวกรอง millipore ขนาด 0.45 ไมครอน

เมื่อจะใช้จึงกวาดเชื้อที่เตรียมไว้ใน chocolate agar ใส่ลงไป จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หากเกิดสีแดงแสดงว่าผลเป็นบวก

**Catalase test**

กระดาษกรอง

3% $H_2O_2$

ป้ายเชื้อจาก chocolate agar ลงไปบนกระดาษกรอง แล้วหยด 3% $H_2O_2$ ลงไป 1 หยด หากเกิดฟองอากาศขึ้นมาแสดงว่าผลเป็นบวก

**Gram's stain**

| | |
|---|---|
| Glass slide | Distilled water |
| Gentian violet | Gram Iodine |
| Decolorized alcohol | Safranin |

เผา slide ทั้งสองด้านแล้วหยดน้ำกลั่นลงไป 1 หยด ใช้ sterile loop แตะเชื้อมา 1 colony เกลี่ยไปมาบน slide แล้วผึ่งรอให้เชื้อแห้งจึงทำการเผา slide อีกรอบ นำไปย้อม gram's stain โดยจุ่มใน gentian violet 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วจุ่มใน gram iodine 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างด้วย decolorized alcohol 15 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น สุดท้ายจุ่มใน safranin 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่ง slide ให้แห้ง จึงส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

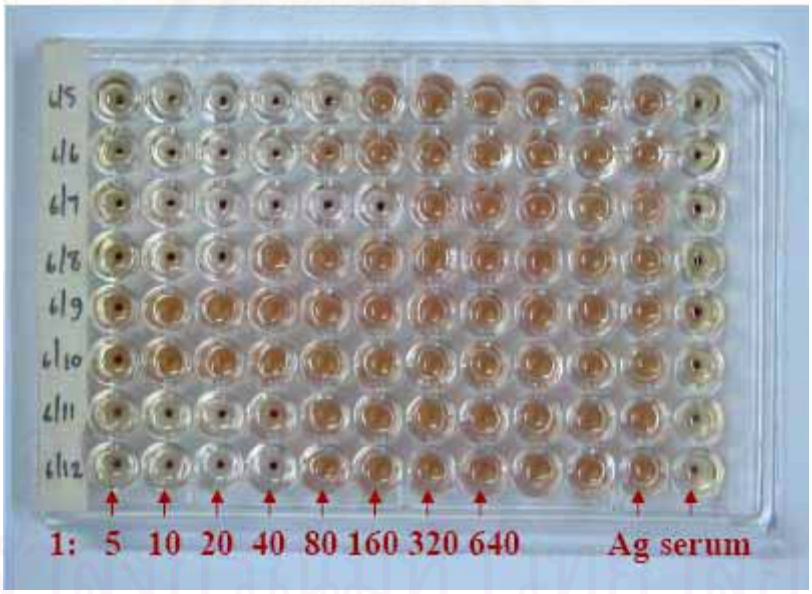
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพซ้ายเป็นลูกไก่ปกติ ส่วนภาพขวาเป็นลูกไก่ที่ได้รับเชื้อโดยพบลักษณะจุดเลือดออกทั่วตัว

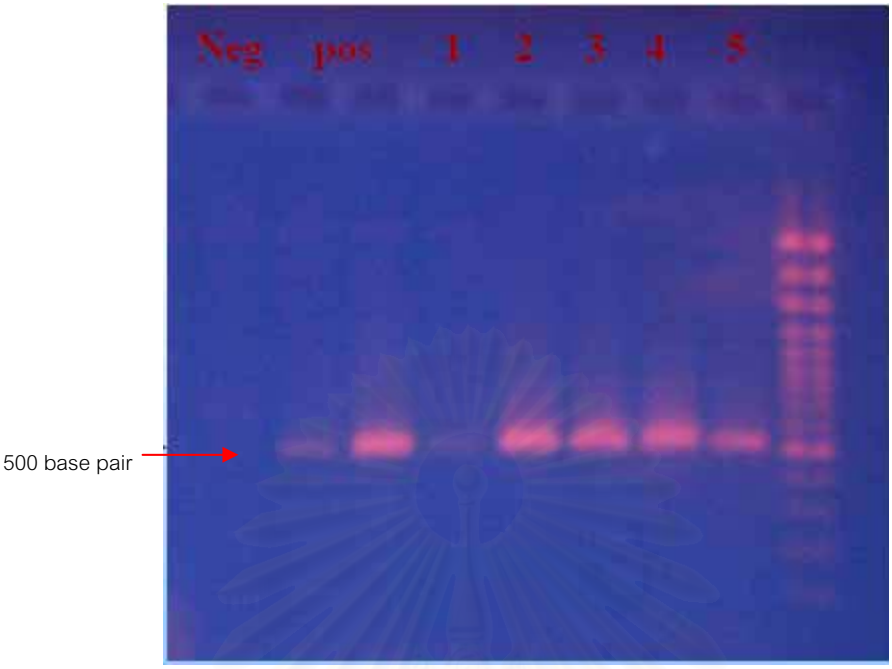
**รูปที่ 3 แสดงลักษณะของลูกไก่ภายหลังจากฉีด *H. paragallinarum* ในไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน**

**รูปที่ 4 แสดงลักษณะการพบน้ำมูกสีขาวข้นในไซนัส จากการติด *H. paragallinarum***

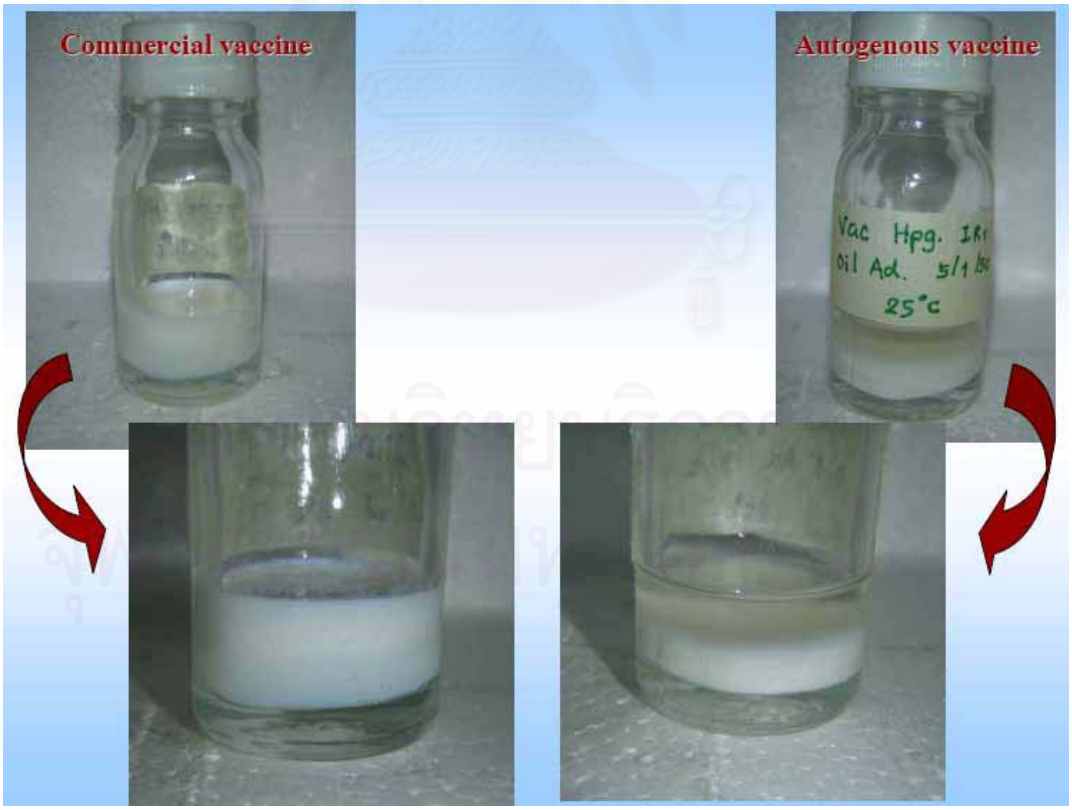
**รูปที่ 5 แสดงลักษณะของ satellite colonies ของ *H. paragallinarum***




**รูปที่ 6 แสดงการตรวจ HI antibody titer**




**รูปที่ 7 แสดงการตรวจหา Hemagglutinin gene โดยใช้เทคนิค PCR**




**รูปที่ 8 แสดงลักษณะของวัคซีนที่ผลิตขึ้นซึ่งมีการตกตะกอนของแอนติเจน(ขวา) ในขณะที่วัคซีนทางการค้าไม่พบการตกตะกอนของแอนติเจน(ซ้าย) แต่ทั้งสองชนิดไม่พบการแยกชั้นของน้ำและน้ำมัน**

**รูปที่ 9 แสดงลักษณะรอยโรคบริเวณที่ฉีดวัคซีน หลังฉีดวัคซีน 1 สัปดาห์ โดยวัคซีนสื่อ mineral oil จะพบรอยโรคบริเวณที่ฉีด ในขณะที่วัคซีนสื่อ aluminium hydroxide gel ไม่พบรอยโรคใดๆ**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 7 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *H. paragallinarum***

| สัปดาห์ที่ | กลุ่มที่ 1 | กลุ่มที่ 2 | กลุ่มที่ 3 | กลุ่มที่ 4 | กลุ่มที่ 5 | กลุ่มที่ 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 w | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 8 w | 40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 0.00 | 0.00 | 10 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 5 | 0.00 | 0.00 | 10 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 | 0.00 | 10 | 0.00 | 0.00 |
| 10 w | 20 | 20 | 0.00 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 160 | 10 | 80 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 20 | 10 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 160 | 160 | 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 10 | 0.00 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 20 | 0.00 | 20 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 0.00 | 80 | 160 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 20 | 320 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 80 | 20 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 160 | 0.00 | 640 | 80 | 0.00 | 0.00 |

หมายเหตุ : กลุ่มที่ 1 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 2 วัคซีนที่ผลิตขึ้นสื่อเจล กลุ่มที่ 3 วัคซีนทางการค้าสื่อ mineral oil กลุ่มที่ 4 วัคซีนทางการค้าสื่อเจล กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้เชื้อ กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 7 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *H. paragallinarum* (ต่อ)**

| สัปดาห์ที่ | กลุ่มที่ 1 | กลุ่มที่ 2 | กลุ่มที่ 3 | กลุ่มที่ 4 | กลุ่มที่ 5 | กลุ่มที่ 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 w | 5 | 10 | 20 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 0.00 | 80 | 20 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 40 | 80 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 5 | 10 | 160 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 5 | 40 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 20 | 20 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 | 320 | 160 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 0.00 | 5 | 20 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 5 | 40 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 20 | 0.00 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 0.00 | 320 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 5 | 5 | 20 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 320 | 10 | 10 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 10 | 160 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 5 | 320 | 80 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 0.00 | 20 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 10 | 160 | 20 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 0.00 | 20 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | 5 | 0.00 | 20 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 10 | | 40 | 0.00 | 0.00 |
| 12 w 5 d | 40 | 5 | 40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 40 | 5 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 5 | 20 | 40 | 10 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 10 | 0.00 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 10 | 20 | 40 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 5 | 160 | 160 | 0.00 | 0.00 |

**ตารางที่ 7 ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *H. paragallinarum* (ต่อ)**

| สัปดาห์ที่ | กลุ่มที่ 1 | กลุ่มที่ 2 | กลุ่มที่ 3 | กลุ่มที่ 4 | กลุ่มที่ 5 | กลุ่มที่ 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 w 3 d | 80 | 10 | 160 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 5 | 40 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 10 | 160 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 20 | 40 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 40 | 160 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 20 | 80 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| 14 w 1 d | 20 | 40 | 320 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 80 | 40 | 1280 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 20 | 40 | 1280 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 10 | 160 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 10 | 10 | 1280 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 20 | 80 | 80 | 640 | 0.00 | 0.00 |
| | 40 | 10 | 20 | 320 | 0.00 | 0.00 |
| | 80 | | | | 0.00 | 0.00 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* และความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ ภายหลังให้เชื้อ

| No. | Group 1 | | | | | | | Group 2 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | |
| | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. |
| 1 | 1:5 | | | | | 1:20 | - | 1:10 | 1:5 | - | | | | |
| 2 | 1:40 | 1:40 | - | | | | | <1:5 | | | 1:10 | - | | |
| 3 | 1:80 | | | 1:80 | - | | | 1:40 | | | | | 1:40 | - |
| 4 | 1:80 | | | 1:40 | - | | | 1:5 | | | | | 1:80 | - |
| 5 | 1:10 | | | | | 1:20 | - | 1:5 | | | 1:5 | - | | |
| 6 | 1:20 | | | | | 1:40 | - | 1:20 | 1:40 | - | | | | |
| 7 | 1:10 | | | | | 1:40 | - | <1:5 | | | | | 1:20 | - |
| 8 | 1:20 | | | 1:10 | - | | | <1:5 | | | 1:10 | - | | |
| 9 | <1:5 | | | | | 1:10 | - | 1:5 | | | | | 1:10 | - |
| 10 | 1:40 | 1:20 | - | | | | | 1:20 | | | 1:20 | - | | |
| 11 | 1:20 | | | 1:20 | - | | | <1:5 | | | | | 1:10 | - |
| 12 | 1:5 | 1:5 | - | | | | | 1:5 | | | 1:40 | - | | |
| 13 | 1:10 | | | 1:10 | - | | | 1:320 | | | | | 1:80 | - |
| 14 | 1:20 | | | | | 1:20 | - | 1:10 | | | 1:20 | - | | |
| 15 | 1:40 | 1:40 | - | | | | | 1:5 | 1:20 | - | | | | |
| 16 | 1:20 | | | | | 1:40 | - | <1:5 | | | | | 1:10 | - |
| 17 | 1:40 | 1:40 | - | | | | | 1:10 | 1:10 | - | | | | |
| 18 | 1:10 | 1:10 | - | | | | | <1:5 | 1:10 | - | | | | |
| 19 | 1:80 | | | | | 1:80 | - | 1:5 | 1:5 | - | | | | |
| 20 | 1:20 | | | 1:20 | - | | | 1:10 | | | | | | |

start = ระดับแอนติบอดีก่อน challenge เชื้อ *H. paragallinarum*

protect = ความสามารถในการกำจัดเชื้อโดยการเพาะเชื้อจากแอ่งไต่ตา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* และความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ ภายหลังให้เชื้อ(ต่อ)

| No. | Group 3 | | | | | | | Group 4 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | |
| | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. |
| 1 | 1:20 | 1:40 | + | | | | | 1:40 | | | 1:320 | - | | |
| 2 | 1:80 | | | 1:160 | - | | | 1:20 | | | | | 1:640 | - |
| 3 | 1:80 | | | | | 1:320 | - | <1:5 | | | 1:320 | - | | |
| 4 | 1:10 | 1:5 | + | | | | | 1:160 | | | | | 1:1280 | - |
| 5 | 1:40 | 1:40 | + | | | | | 1:80 | | | 1:320 | - | | |
| 6 | 1:20 | 1:20 | + | | | | | 1:40 | | | 1:320 | - | | |
| 7 | 1:320 | | | 1:160 | - | | | 1:160 | | | | | 1:1280 | - |
| 8 | 1:5 | <1:5 | + | | | | | 1:20 | | | | | 1:640 | - |
| 9 | 1:40 | | | 1:40 | - | | | 1:5 | <1:5 | + | | | | |
| 10 | <1:5 | | | | | 1:40 | - | 1:5 | | | | | 1:320 | - |
| 11 | 1:320 | 1:160 | - | | | | | 1:40 | | | | | 1:640 | - |
| 12 | 1:20 | | | | | 1:40 | - | 1:40 | 1:40 | - | | | | |
| 13 | 1:10 | | | 1:40 | - | | | 1:10 | 1:10 | + | | | | |
| 14 | 1:160 | | | 1:160 | - | | | 1:80 | 1:40 | - | | | | |
| 15 | 1:320 | | | | | 1:160 | - | 1:80 | 1:40 | - | | | | |
| 16 | 1:20 | | | 1:80 | - | | | 1:320 | 1:160 | - | | | | |
| 17 | 1:160 | | | | | 1:1280 | - | 1:20 | | | 1:640 | + | | |
| 18 | 1:20 | | | | | 1:80 | - | 1:40 | | | | | 1:320 | - |
| 19 | <1:5 | | | | | 1:20 | - | 1:20 | | | 1:320 | - | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | |

start = ระดับแอนติบอดีก่อน challenge เชื้อ *H. paragallinarum*

protect = ความสามารถในการกำจัดเชื้อโดยการเพาะเชื้อจากแอ่งไต้คา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ระดับแอนติบอดีต่อ *H. paragallinarum* และความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ ภายหลังให้เชื้อ(ต่อ)

| No. | Group 5 | | | | | | | Group 6 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | | start | 5DPI | | 10DPI | | 15DPI | |
| | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. | | titer | protect. | titer | protect. | titer | protect. |
| 1 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 2 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 3 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 4 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 5 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 6 | <1:5 | <1:5 | + | | | | | <1:5 | <1:5 | - | | | | |
| 7 | <1:5 | | | <1:5 | - | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 8 | <1:5 | | | <1:5 | + | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 9 | <1:5 | | | <1:5 | + | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 10 | <1:5 | | | <1:5 | + | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 11 | <1:5 | | | <1:5 | - | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 12 | <1:5 | | | <1:5 | + | | | <1:5 | | | <1:5 | - | | |
| 13 | <1:5 | | | | | <1:5 | + | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 14 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 15 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 16 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 17 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 18 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 19 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |
| 20 | <1:5 | | | | | <1:5 | - | <1:5 | | | | | <1:5 | - |

start = ระดับแอนติบอดีก่อน challenge เชื้อ *H. paragallinarum*

protect = ความสามารถในการกำจัดเชื้อโดยการเพาะเชื้อจากแอ่งใต้ตา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกฤดา ชูเกียรติศิริ เกิดเมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2523 ที่จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2546 จากนั้นเข้าทำงานตำแหน่งนักวิจัยโครงการ ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2547 และเข้ารับศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ระดับปริญญาโท-เอกของคณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2547-2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย