

ความสัมพันธ์ระหว่างภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์และสารน้ำ ต่อประสิทธิภาพของวัคซีนภูมิ
คอมเพล็กซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันในไก่เนื้อ

นายวิสุทธิ ระวีเวช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

RELATIONSHIP BETWEEN CELL MEDIATED AND HUMORAL IMMUNITY ON THE
EFFICACY OF IMMUNE COMPLEX VACCINE AGAINST INFECTIOUS
BURSAL DISEASE VIRUS IN BROILERS

Mr. Visut Rawiwet

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

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเกอร์และสารน้ำต่อประสิทธิภาพ
ของวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสโรคเบาหวานอักเสบติดต่อกัน
ในไก่เนื้อ

โดย นาย วิสุทธิ ระวิเวช

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์แพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรีชญจันทร์

วิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

วิทยานิพนธ์ร่วม

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

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

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

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

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

วิสุทธิ์ ระวิเวช : ความสัมพันธ์ระหว่างภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์และสารน้ำต่อประสิทธิภาพของ
 วัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อในไก่เนื้อ (RELATIONSHIP
 BETWEEN CELL MEDIATED AND HUMORAL IMMUNITY ON THE EFFICACY OF
 IMMUNE COMPLEX VACCINE AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN
 BROILERS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์, อ. ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, 70 หน้า

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ในการป้องกันโรค
 เบอร์ซาอักเสบติดต่อในไก่เนื้อ เมื่อได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ทั้งในด้านของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำและ
 ภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน การทดลองแรกเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ
 วัคซีนและการแสดงออกของวัคซีนต่อระดับแอนติบอดี การตรวจพบไวรัสในวัคซีนที่อวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ
 การทดลองที่สองศึกษาการ แสดงออกของไวรัสวัคซีนต่อภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ โดยศึกษาปริมาณทีลิมโฟไซต์
 เซลล์ชนิด helper T cell ($CD4^+CD3^+/Total\ CD3^+$) ที่เพิ่มขึ้นจากการได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ พบว่า
 ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์มีแนวโน้มค่าคะแนนรอยโรคและการพบการบวมน้ำที่ต่อมเบอร์ซา
 และ น้ำหนักตัวไก่ดีกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนเล็กน้อย แต่ไม่พบความ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 การตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีน สามารถตรวจพบได้ทั้งในต่อมเบอร์ซา ม้ามและไตมัด ตั้งแต่ไก่อายุ 7 และ
 14 วันหลังจากได้รับวัคซีน ภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในลูกไก่ต่ำกว่า 500 ในวันที่ 14 และหมดลงในวันที่ 21
 โดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีไตเตอร์ ณ วันที่ให้เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 (วันที่ 21 หรือ วันที่ 28)
 ในไก่ที่ได้รับวัคซีนชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์ แม้ว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีการตอบสนองทางแอนติบอดี แต่ไก่ที่
 ได้รับวัคซีนสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของไวรัสไอบีดี สายพันธุ์ w2512 ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากวัคซีน ณ
 วันที่ 7 หลังจากให้วัคซีน ในส่วนของการตอบสนองของปริมาณอัตราส่วนทีลิมโฟไซต์เซลล์ชนิด helper T
 cell ในกระแสเลือดของไก่ที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง
 สถิติแสดงให้เห็นว่าวัคซีนไม่มีผลต่อการตอบสนองของ ปริมาณลิมโฟไซต์เซลล์ชนิด helper T cell

ภาควิชาอายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชาอายุรศาสตร์ สัตวแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา2555..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

5275568131 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEY WORDS: broiler chickens/immune complex vaccine/infectious bursal disease virus/ vaccine efficacy/cell mediated and humoral immunity.

VISUT RAWIWET : RELATIONSHIP BETWEEN CELL MEDIATED AND HUMORAL IMMUNITY ON THE EFFICACY OF IMMUNE COMPLEX VACCINE AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN BROILERS : ADVISOR : PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, Ph.D., 70 pp.

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of immune complex vaccine on the prevention of infectious bursal disease virus infection in commercial broiler chickens which has been infected with the vvIBDV (IBD-CU-1) in the aspect of vaccine's response both on the humoral immunity and cell mediated immunity (CMI). The study was divided into two parts. The first experiment, we aimed to study the efficacy of vaccines and its response by antibody titer, viral vaccine distribution and replication in lymphoid organs. The second experiment, we aimed to study the response of CMI in the term of helper T lymphocyte and total T lymphocyte ratios (CD4 + CD3 + / Total CD3 +) after vaccinated with immune complex vaccine. The immune complex vaccinated chickens tended to have lower lesion scores and gelatinous on bursa and higher body weight than those of unvaccinated group but did not significantly differ. The vaccine virus could be detected in bursa, spleen and thymus after 7 to 14 days post vaccination. At fourteen days old, the maternal antibody titers of chickens were less than 500 and could not be detected at 21 days old. No antibody was detected at the date of challenge (21 and 28 days old). Even no antibody response was found in the immune complex vaccinated chickens but all vaccinated chickens could be detected the replication of IBDV, w2512 strain at 7 days post vaccination. The ratio of the helper T cell and total T lymphocyte cell in vaccinated chickens and unvaccinated did not differ significantly. These studies showed that the vaccine had no effect on the number of helper T lymphocyte cell in blood circulation.

Department Veterinary Medicine Student's Signature.....
 Field of Veterinary Medicine Advisor's Signature.....
 Academic Year 2012 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก อาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสองท่าน ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์ และรองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิวัตร จันท์ศิริพรชัย ซึ่งได้ให้ทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณ รศ.อัฉรา ธวัชสิน และ รศ.น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิณูญ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อชี้แนะ ซึ่งทำให้งานวิจัยครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 ที่ให้เงินอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 16 (3/2554) ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2553

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และพนักงานเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยทุกด้าน

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนการศึกษา

ขอขอบคุณนิสิต ระดับปริญญาโทบัณฑิต และ ปริญญาตรีบัณฑิตของภาควิชาอายุรศาสตร์ แขนงวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องตรวจนับเม็ดเลือด หรือ Flow Cytometer สำหรับงานวิจัยใน ส่วนการศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) และภาควิชารังสีวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในงานบริการใช้เครื่องตรวจนับเม็ดเลือด หรือ Flow Cytometer สำหรับงานวิจัย

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
คำอธิบายลักษณะและคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โรคกัมโบโร หรือ โรคต่อมเบอริซซาลอักเสบติดต่อ (Infectious bursal disease ; IBD)...	4
2.1.1 ประวัติและความสำคัญ.....	4
2.1.2 สาเหตุการเกิดโรค.....	5
2.1.2.1 การจัดจำแนก (classification).....	5
2.1.2.2 การศึกษารูปร่าง (morphology).....	6
2.1.2.3 องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition).....	6
2.1.3 การติดต่อ (transmission) ตัวนำโรค (carriers) และพาหะนำโรค (vectors).....	7
2.1.4 ระยะเวลาฟักตัวและอาการทางคลินิก (incubation period and clinical signs)	7
2.1.5 อัตราการป่วยและอัตราการตาย (morbidity rate and mortality rate).....	7
2.1.6 รอยโรค (pathology).....	8
2.1.6.1 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (gross lesions).....	8
2.1.6.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (microscopic lesions).....	8
2.1.7 พยาธิกำเนิด (pathogenesis of the infectious process).....	10

2.1.8 การวินิจฉัยโรค (diagnosis).....	11
2.1.8.1 การแยกเชื้อและระบุเชื้อ (isolation and identification).....	11
2.1.8.2 การตรวจทางซีรั่มวิทยา (serology).....	12
2.1.9 การป้องกันโรค.....	12
2.1.9.1 ด้านการจัดการ.....	12
2.1.9.2 การให้วัคซีนป้องกันโรค.....	12
2.1.9.2.1 วัคซีนชนิดรุนแรงปานกลาง (intermediate).....	13
2.1.9.2.2 วัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccine).....	13
2.1.9.2.3 วัคซีนชนิดแรง (intermediate plus or hot vaccine).....	13
2.1.9.2.4 ผลเสียของการให้วัคซีนชนิดแรง.....	13
2.1.9.3 การเลือกชนิดของวัคซีน.....	14
2.2 การตรวจแยกเชื้อและการจำแนกเชื้อ ด้วยวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	14
2.3 วัคซีนป้องกันโรคชนิด อิมมูนคอมเพล็กซ์.....	15
2.3.1 โครงสร้างของวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์.....	15
2.3.2 กลไกการทำงานของวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์.....	15
2.3.3 การตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์.....	16
2.3.4 ประสิทธิภาพของวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์.....	17
2.4 การตอบสนองของวัคซีนในด้านภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ และ ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ.....	17
2.5 การศึกษา ภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์เม็ดเลือด (flow cytometry).....	20
2.5.1 การใช้ flow cytometry ในงานเม็ดเลือดขาว.....	20

บทที่ 3 การทดลองที่ 1

3.1 สัตว์ทดลอง.....	21
3.2 วิธีการทดลอง.....	21
3.3 วิธีทางห้องปฏิบัติการ.....	23
3.3.1 การเตรียมซีรั่ม การเก็บรักษาซีรั่ม และการวิเคราะห์หาค่า Ab titer ต่อโรคเบอ์ซาอ์กเสบติดต่อดโดยวิธี ELISA.....	23
3.3.2 ตรวจสอบสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อ.....	23
3.3.3 การแยกชนิดสารพันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธี RFLP	

(Restriction Fragment Length Polymorphism).....	24
3.3.4 การประเมินรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอริชชา (gross lesion and histopathological lesion score).....	25
3.3.5 การคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชชาต่อน้ำหนักตัวไก่.....	25
3.4 การเตรียมเชื้อไวรัส เบอริชชากักเสบติดต่อกัน สำหรับเชื้อพิษ.....	25
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	26
3.6 ผลการทดลอง.....	26
3.6.1 อัตราการตาย (mortality rate).....	26
3.6.2 แอนติบอดีไทเตอร์ต่อไวรัสไอบีดี (antibody titers against IBDV).....	26
3.6.3 ค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชชาต่อน้ำหนักตัวไก่ (Bursa to body weight ratio).....	26
3.6.4 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอริชชา (gross and histopathological lesion scores of bursa)	28
3.6.5 การตรวจพบเชื้อไวรัส vvIBDV-CU1 โดยวิธี RT-PCR.....	30
3.6.6 น้ำหนักตัวไก่และอัตราการแลกเนื้อ (body weight and feed conversion ratio; FCR).....	32
3.7 วิจัยณ์และสรุปผล.....	34
บทที่ 4 การทดลองที่ 2	
4.1 สัตว์ทดลอง.....	36
4.2 วัคซีนในการทดลอง.....	36
4.3 การเตรียมเชื้อไวรัส เบอริชชากักเสบติดต่อกัน สำหรับเชื้อพิษ.....	36
4.4 วิธีการทดลอง.....	36
4.5 วิธีทางห้องปฏิบัติการ.....	38
4.5.1 ตรวจหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อและการแยกชนิดสาร พันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธี RFLP.....	38
4.5.2 การคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชชาต่อน้ำหนักตัวไก่ (Bursa to body weight ratio).....	38
4.5.3 การตรวจทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์โดยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (flow cytometer).....	38

4.5.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด (blood collection).....	39
4.5.3.2 การแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte isolation).....	39
4.5.3.3 การย้อมเซลล์มีชีวิตด้วยสีย้อม trypan blue (test of cell viability).....	40
4.5.3.4 การนับเม็ดเลือดด้วย Hemocytometer และการคำนวณหา ความเข้มข้น.....	40
4.5.3.5 วิธีการย้อมสีเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย สารแอนติบอดีจำเพาะติดสี เรืองแสง (Dual staining CD4 R-PE and CD3 FITC).....	41
4.5.3.6 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (flow cytometer)....	41
4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	41
4.7 ผลการทดลอง.....	42
4.7.1 ตรวจสอบสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อของต่อมเบอริชชาและ การแยกชนิดสารพันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ (RFLP).....	42
4.7.2 ค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชชาต่อน้ำหนักตัวไก่ (Bursa to body weight ratio).....	43
4.7.3 ผลการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์โดยวิธี flow cytometry.....	44
4.7.4 ผลของน้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม.....	45
4.8 วิจัยณ์และสรุปผล.....	46
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 บทสรุป.....	48
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	48
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	69

สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
1	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไ้ระหว่างกลุ่มที่ไ้รับ วัคซีน อิมมูโนคอมเพล็กส์ และไ้ไ้รับวัคซีนรายสัปดาห์.....	27
2	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไ้ในแต่ละกลุ่มเมื่อ ไ้รับ การป้อนเชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน.....	27
3	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไ้ในแต่ละกลุ่มเมื่อ ไ้รับ การป้อนเชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน.....	28
4	คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวนไ้ที่พบวุ้นที่ต่อมเบอริซาเมื่อ ไ้รับการป้อนเชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน.....	29
5	คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวนไ้ที่พบวุ้นที่ต่อมเบอริซาเมื่อ ไ้รับการป้อนเชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน.....	30
6	การตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไ้ปีดีสลายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนอิม มูโนคอมเพล็กส์ ใน ต่อมเบอริซา ม้าม และไ้มีส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่างระหว่างไ้กลุ่มที่ไ้รับวัคซีนและไ้ไ้รับวัคซีน.....	31
7	การตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไ้ปีดีสลายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนอิม มูโนคอมเพล็กส์ และเชื้อไวรัสไ้ปีดีสลายพันธุ์รุนแรงชนิด wIBDV-CU1 ใน ต่อมเบอริซา ม้าม และไ้มีส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง เมื่อป้อนเชื้อ ไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน.....	31
8	การตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไ้ปีดีสลายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนอิม มูโนคอมเพล็กส์ และเชื้อไวรัสไ้ปีดีสลายพันธุ์รุนแรงชนิด wIBDV-CU1 ใน ต่อมเบอริซา ม้าม และไ้มีส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง เมื่อป้อนเชื้อ ไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน.....	32
9	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและอัตราการแลกเนื้อของไ้แต่ละกลุ่มเมื่อ ไ้รับเชื้อ ไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน.....	33
10	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและอัตราการแลกเนื้อของไ้แต่ละกลุ่มเมื่อ ไ้รับเชื้อ ไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน.....	33
11	การแบ่งกลุ่มการทดลองที่สอ.....	38

	หน้า
12	ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัส IBDV..... 42
13	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่..... 43
14	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ต่อทีลิมโฟไซต์ เซลล์..... 44
15	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวไก่..... 45
16	น้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBD-CU1 ในวันที่ 21 ของอายุไก่..... 57
17	น้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อ ได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBD-CU1 ในวันที่ 28 ของอายุไก่..... 58
18	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ วัคซีน อิมมูโนคอมเพล็กซ์ และไม่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์รายตัว..... 59
19	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไกรายตัว ในแต่ละกลุ่ม การ ทดลอง เมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBD-CU1 ในวันที่ 21 ของอายุไก่..... 60
20	อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไกรายตัว ในแต่ละกลุ่ม การ ทดลอง เมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBD-CU1 ในวันที่ 28 ของอายุไก่..... 61
21	คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวเมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน..... 62
22	คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวเมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน..... 63
23	น้ำหนักตัวไกรายตัวในวันเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง..... 66
24	อัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไกรายตัว..... 67
25	ผลการนับเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดไหลไซโตมิเตอร์จากเลือดไก่ ในแต่ละอายุ..... 67

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ความเสียหายของพอลลิเคิลในต่อมเบอริซาเมื่อได้รับเชื้อไวรัสไอบีดี.....	9
2	จุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Mbo</i> I (ซ้าย) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bst</i> NI (ขวา)	14
3	แสดงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจจากเชื้อไวรัสไอบีดี.....	19
4	แผนการดำเนินงานการทดลองที่ 1.....	22
5	แผนการดำเนินงานการทดลองที่ 2.....	37
6	การแยกชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte).....	39
7	เครื่อง hemocytometer และตำแหน่งในการนับเซลล์ลิมโฟไซต์.....	40
8	แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดี.....	64
9	แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดีเมื่อถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ <i>Mbo</i> I โดยวิธี RFLP.....	64
10	แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดีเมื่อถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ <i>Bst</i> NI โดยวิธี RFLP.....	65

คำอธิบายลักษณะและคำย่อ

µl	= microliter
BSA	= bovine serum albumin
bp	= base pair
CD4	= cluster of difference 4
CD8	= cluster of difference 8
CD3	= cluster of difference 3
DPI	= days post inoculation
ELD ₅₀	= 50% chicken embryo lethal dose
ELISA	= enzyme-linked immuno sorbent assay
FCR	= feed conversion ratio
FITC	= fluorescein isothiocyanate
IBDV	= infectious bursa disease virus
PCR	= polymerase chain reaction
PBS	= phosphate buffer saline
RT-PCR	= reverse transcriptase polymerase chain reaction
RFLP	= restriction fragment length polymorphism
R-PE	= R-phycoerythrin
Th cell	= T helper cell lymphocyte
wIBDV	= very virulent infectious bursal disease virus
VP2	= viral protein 2

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคกัมโบโรหรือโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อกัน (infectious bursal disease; IBD) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากเอวิบีร์นาไวรัส (avibirnavirus) ซึ่งพบครั้งแรกโดย Cosgrove ในปี 1962 ที่เมืองกัมโบโร มลรัฐเดลาแวร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ไวรัสโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อกัน มีต่อมเบอร์ซา (bursa of Fabricius) เป็นอวัยวะเป้าหมาย (Lukert and Saif, 2003) โรคนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจใน 2 ด้าน คือ 1) การติดเชื้อในไก่อายุ 3 สัปดาห์ หรือมากกว่า ไวรัสบางสเตรนอาจเป็นสาเหตุให้มีอัตราการตายสูงถึง 20% และ 2) การติดเชื้อในไก่อายุน้อยกว่า 3 สัปดาห์ จะพบภาวะการกดภูมิคุ้มกัน โดยอาการผิดปกติหลังจากรับเชื้อมีความสัมพันธ์กับภาวะการกดภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัส เช่น ผิวหนังอักเสบแบบมีเนื้อตาย (gangrenous dermatitis) พบภาวะตับอักเสบแบบมีอินคลูชันบอดี (inclusion body hepatitis) ภาวะเลือดจาง (anemia syndrome) การติดเชื้อ อี. โคไล (*E. coli* infections) และการได้รับวัคซีนไม่ได้ผล ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรครุนแรงในลูกไก่ โรคนี้เป็นโรคที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก โดยพบโรคได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ มักพบอาการทางคลินิกระหว่างอายุ 3-6 สัปดาห์ (Chansiripornchai and Sasipreeyajan, 2005; Sasipreeyajan et al., 2007)

เชื้อไวรัสมีผลทำลายต่อมเบอร์ซา ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อระบบภูมิคุ้มกันของไก่ เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดทั่วโลก แม้ว่าเชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อกัน เป็นไวรัสที่มีอวัยวะเป้าหมายที่ บี ลิมโฟไซต์ ในต่อมเบอร์ซา (Kaufers and Weiss, 1980) ซึ่งส่งผลกระทบต่อ บี เซลล์ และ อิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ในกระแสเลือด จากหลักฐานการถูกทำลายของ บี เซลล์ ในต่อมเบอร์ซา (Ivanyi and Morris, 1976; Giambone et al., 1977; Hirai et al., 1981; Rodenberg et al., 1994) นอกจากนี้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในอวัยวะน้ำเหลืองอื่นๆ ได้ เช่น ม้าม ต่อมไทมัส ต่อมทอนซิลที่ไ้ต้น (Ivanyi and Morris, 1976; Hirai et al., 1981; Rodenberg et al., 1994) เชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันจึงเป็นสาเหตุให้เกิดสภาวะกดภูมิคุ้มกันในไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งส่วนของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำและชนิดฟั้งเซลล์ โดยพบว่าผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์น้อยกว่าระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Giambone et al., 1977; Confer et al., 1981; Sharma et al., 1989) ในการป้องกันโรคทำได้ด้วยการใช้วัคซีนซึ่งวัคซีนที่นิยมใช้มี 2 ชนิดคือ ชนิดเชื้อเป็นและ

ชนิดเชื้อตาย วัคซีนชนิดเชื้อเป็นสามารถจำแนกได้ 3 ระดับตามความรุนแรงของวัคซีนคือ ชนิดรุนแรงน้อย (mild vaccine) ชนิดรุนแรงปานกลาง (intermediate) และชนิดรุนแรงมาก (intermediate-plus หรือ hot vaccine) วัคซีนชนิดรุนแรงมากสามารถป้องกันไก่อตายจากโรคระบาดได้ดีและสามารถใช้ได้แม้ขณะลูกไก่ยังมีระดับแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่เหลืออยู่ แต่ขณะเดียวกันวัคซีนชนิดรุนแรงมากนี้อาจทำให้ไก่ป่วยหรือตายได้ นอกจากนี้วัคซีนยังมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อและมีผลกดภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้ไก่มีการตอบสนองต่อวัคซีนอื่นๆ ได้ไม่ดี วัคซีนชนิดรุนแรงแต่ละชนิดมีความรุนแรงไม่เท่ากัน วัคซีนชนิดรุนแรงมากจะมีผลเสียต่อไก่มาก โดยเฉพาะในไก่ไข่ซึ่งมีความไวรับต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ วัคซีนประเภทนี้ไม่ควรให้เมื่อไก่อายุน้อยกว่า 7 วัน การให้วัคซีนประเภทนี้ในลูกไก่อายุน้อยและมีระดับของแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ต่ำจะเกิดผลเสียต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะต่อมเบอริชจะถูกทำลายและอาจถูกทำลายอย่างถาวรได้ ซึ่งระดับของต่อมเบอริชที่ถูกทำลายจะพบแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของวัคซีนที่ใช้ ชนิดของไก่ อายุที่ได้รับวัคซีนและระดับแอนติบอดีในลูกไก่ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาการใช้วัคซีนชนิดชนิดรุนแรง เพื่อให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่านไก่ที่มีระดับภูมิคุ้มกันจากแม่สูงๆ ได้ดีจึงมีการใช้วัคซีนในรูปของวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ (immune complex vaccine) โดยเชื้อไวรัสจากวัคซีนจะไม่ถูกหักล้าง (neutralize) จากระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ (maternal antibody) และสามารถให้ได้ในไข่ไก่ฟักอายุ 18 วันในช่วงที่ย้ายจากตู้ฟักไปสู่ตู้เกิดซึ่งสะดวกในการจัดการ หรือการให้วัคซีนในลูกไก่อายุ 1 วันที่ขึ้นได้ผิวหนังบริเวณคอซึ่งเป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติในประเทศไทย เนื่องจากเทคโนโลยีการได้รับวัคซีนผ่านไข่ฟักยังไม่ได้รับความนิยมแพร่หลายเนื่องเพราะราคาและต้นทุนของเครื่องมือ ในประเทศไทยนิยมให้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่อายุ 1 วันที่บริเวณใต้ผิวหนังคอ โดยมีรายงานการแพร่กระจายของไวรัสวัคซีนในไก่มีความแตกต่างกันเมื่อให้โดยวิธีที่ต่างกัน (Sharma et al., 1989; Jeurissen et al., 1998; Ivan et al., 2001; 2005) ดังนั้นผลของภูมิคุ้มกันที่ได้จากการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไข่ฟักจึงอาจแตกต่างจากการได้รับวัคซีนในไก่อายุ 1 วันทางใต้ผิวหนังคอ ซึ่งเป็นที่นิยมปฏิบัติในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาหาประสิทธิภาพของวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ และศึกษาการแสดงออกของวัคซีนในด้านการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสจากวัคซีน การกระจายของเชื้อไวรัสจากวัคซีนและ การตอบสนองของวัคซีนในด้านภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์และสารน้ำ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนโรคเบอริชซาล์กเสบติดต่อชนิดภูมิคุ้มกันคอมเพล็กซ์ เมื่อได้รับเชื้อ ไวรัสชนิดรุนแรง ไอบีดี-ซียู 1 (vIBDV-CU1) ที่อายุ 21 หรือ 28 วัน
2. ศึกษาผลการตอบสนองของวัคซีน ต่อภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ และภูมิคุ้มกันชนิด สารน้ำ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคเบอริชซาล์กเสบติดต่อ โดยการใช้วัคซีนชนิดภูมิคุ้มกันคอมเพล็กซ์

1.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย

ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเบอริชซาล์กเสบติดต่อ หากไก่ได้รับเชื้อไวรัสที่อายุ 21 หรือ 28 วันและการแสดงออกของเชื้อไวรัสในวัคซีนในด้านของระยะเวลา การเพิ่มจำนวน การคงอยู่ และการแพร่กระจายของไวรัสไปสู่อวัยวะน้ำเหลือง เมื่อไก่ได้รับวัคซีนภูมิคุ้มกันคอมเพล็กซ์โดย การฉีดวัคซีนใต้ผิวหนังคอเมื่อไก่อายุ 1 วัน

บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคกัมโบโร หรือ โรคเบอร์ซาลอักเสบติดต่อกัน (Infectious bursal disease ; IBD)

2.1.1 ประวัติและความสำคัญ

โรคกัมโบโร หรือ infectious bursal disease (IBD) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ซึ่งก่อโรครุนแรงในลูกไก่ โดยติดเชื้อเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายที่ต่อมเบอร์ซาล (bursa of Fabricius) โรคนี้ถูกพบครั้งแรกโดย Cosgrove ในปี 1962 ที่เมืองกัมโบโร มลรัฐเดลาแวร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา และให้ชื่อว่า avian nephrosis เพราะพบความเสียหายที่ไตอย่างรุนแรงในไก่ที่ตาย ต่อมาในภายหลังมีการเรียกชื่อโรคว่า Gumboro disease ตามชื่อของเมืองที่พบโรคครั้งแรก หรือโรค infectious bursal disease หรือ IBD ตามลักษณะของการเกิดโรคในไก่ โรคนี้พบการติดเชื้อได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ ไก่ติดเชื้อมักแสดงอาการทางคลินิกระหว่างอายุ 3-6 สัปดาห์ เชื้อไวรัสมีผลทำลายต่อมเบอร์ซาล ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อระบบภูมิคุ้มกันของไก่ โรคนี้พบแพร่ระบาดทั่วโลก และพบความสำคัญทางเศรษฐกิจ 2 ทาง คือ 1 ไวรัสบางสเตรนอาจเป็นสาเหตุให้อัตราการตายสูงถึง 20% ในไก่อายุ 3 สัปดาห์ หรือมากกว่า และ 2 ภาวะการกดภูมิคุ้มกันของไก่ในช่วงอายุน้อยซึ่งมีความสำคัญมาก อาการผิดปกติหลังจากรับเชื้อมีความสัมพันธ์กับภาวะการกดภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัส เช่น ผิวหนังอักเสบแบบมีเนื้อตาย (gangrenous dermatitis) พบภาวะตับอักเสบแบบมีอินคลูชันบอดี (inclusion body hepatitis) ภาวะเลือดจาง (anemia syndrome) การติดเชื้อ อี.โคไล (*E. coli* infections) และการทำวัคซีนที่ไม่ได้ผล การป้องกันการติดเชื้อในลูกไก่มักอาศัยภูมิคุ้มกันจากแม่ซึ่งส่งผ่านไข่ออกแบบมีประสิทธิภาพ เชื้อไวรัสนี้ไม่ก่อโรคในคนและไม่มี ความสำคัญทางด้านสาธารณสุข

การศึกษาในระยะแรกถึงสาเหตุของโรค IBD (avian nephrosis) เกิดความสับสนกับการติดเชื้อ infectious bronchitis virus ในไก่ โดย Winterfield และ Hitchner (1962) แยกไวรัสที่ได้จากตัวอย่างไก่ที่ป่วยด้วยโรค avian nephrosis จากฟาร์มและให้ชื่อสาเหตุของโรคนั้นว่า gray virus ต่อมา Cosgrove (1962) เชื่อว่า gray virus คือสาเหตุของโรคเนื่องจากมีความเหมือนกันระหว่างรอยโรคที่ไตที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย gray virus และโรคที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้น หลังจากนั้นได้มี

การศึกษาต่อมาพบว่าไก่ที่มีภูมิคุ้มกันต่อ gray virus ยังคงสามารถติดเชื้อ IBD agent และพัฒนาให้เกิดความผิดปกติที่ต่อมเบอริซาได้ ซึ่งเป็นรอยโรคที่จำเพาะ การศึกษาของ Winterfield และคณะ (1962) สามารถแยกเชื้อได้สำเร็จโดยการใช้ไข่ฟักและสรุปว่าเป็น infectious bursal agent ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค IBD ส่วน gray virus ถูกระบุว่า เป็น infectious bronchitis virus ด้วย ต่อมา Hitchner (1970) ได้เสนอให้เปลี่ยนคำเรียกชื่อโรคที่เป็นสาเหตุให้เกิดรอยโรคที่ต่อมเบอริซาเป็น infectious bursal disease ในปี 1972 Allan และคณะ รายงานว่า IBD virus (IBDV) สามารถติดต่อไก่อายุอ่อน ส่งผลให้เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกัน และการควบคุมการติดต่อของโรคต้องอาศัยภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดผ่านไข่จากแม่ รายงานในขณะนั้นพบว่าเชื้อนี้มีทั้งหมด 2 ซีโรไทป์โดยซีโรไทป์ที่พบก่อโรคในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่คือ ซีโรไทป์ 1 จากการรายงานของ Rosenberger และ Cloud (1985) ได้รายงานพบว่ามีการระบาดของโรคในแถบประเทศอเมริกาเหนือในลูกไก่ในปี 1984 ซึ่งมีภูมิคุ้มกันจากแม่ชนิด standard strain โดยพบว่าเชื้อที่ระบาดนี้เกิดจาก variant strain ของเชื้อ IBDV serotype 1 ซึ่งพบในรัฐเดลาแวร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย สเตรนนี้สามารถระบาดได้แม้มี maternal immunity ต่อเชื้อ standard strain ต่อมา Chettle และคณะ (1989) ได้รายงานการพบเชื้อ IBDV subtype ใหม่ซึ่งระบาดในช่วงปลายปี 1987 คือ very virulent strains (vvIBDV) ถูกแยกได้ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งไก่ที่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ (maternal immunity) ต่อไวรัสชนิด standard strain สามารถป้องกันการเกิดโรคจาก very virulent strain ได้ โดย ในปัจจุบันพบสเตรนนี้มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปสู่แอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ รวมถึงประเทศไทย (Vandenberg et al., 2000)

2.1.2 สาเหตุการเกิดโรค

2.1.2.1 การจัดจำแนก (classification)

ไวรัสโรคเบอริซาอักเสบติดต่อ (Infectious bursal disease virus, IBDV) จัดอยู่ในแฟมิลี Birnaviridae ซึ่งมี 3 genera ประกอบด้วย 1. Aquabirnavirus ซึ่งติดเชื้อบริเวณตับอ่อนของปลา สัตว์ในกลุ่ม mollus และพวก crustaceans 2. Avibirnavirus สายพันธุ์นี้ก่อโรคติดเชื้อที่ต่อมเบอริซา สัตว์ที่พบได้แก่ สัตว์ปีก และกลุ่มสุดท้าย 3. Entomobirnavirus เรียกไวรัสก่อโรคในกลุ่มนี้ว่า Drosophila X virus ซึ่งก่อโรคในแมลง ไวรัสในตระกูลนี้ทั้งหมดเป็น RNA สายคู่ (dsRNA)

2.1.2.2 การศึกษารูปร่าง (morphology)

ไวรัสนี้มีโครงสร้างแบบ nonenveloped เป็น RNA สายคู่ (dsRNA) มีรูปร่างของ capsid เป็น icosahedral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55-65 nm

2.1.2.3 องค์ประกอบทางเคมี (chemical composition)

dsRNA ของไวรัส IBDV ประกอบด้วยสารพันธุกรรม 2 ส่วน คือ A และ B ซึ่งแสดงให้เห็นด้วยการใช้ polyacrylamide gel electrophoresis โดยมีรายงานว่าสารพันธุกรรมทั้ง 2 ส่วนนั้นทำหน้าที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน 5 ชนิดประกอบด้วย VP1, VP2, VP3, VP4 และ VP5 มีน้ำหนักโมเลกุลตามลำดับดังนี้ 90, 41, 32, 28 และ 21 kD นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีโปรตีน VPX ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แต่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของโปรตีนแต่ละชนิด (Mundt et al., 1995)

Jackwood และคณะ (1984) วิเคราะห์ความแตกต่างของโครงสร้างโปรตีน พบว่า VP2 (51%) และ VP3 (40%) เป็นโปรตีนหลักของ IBDV ใน ซีโรไทป์ 1 ขณะที่ VP1 (3%) และ VP4 (6%) เป็นโปรตีนส่วนน้อยโดย VP1 คือ viral RNA polymerase และ VP4 คือ viral protease ส่วนหน้าที่ของ VP5 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงาน (regulatory function) ของการเข้าและออกจากเซลล์ของไวรัส ชิ้นส่วนของ genome B จะถอดรหัสเป็น VP1 ซึ่งเป็นส่วนน้อย (2.9 kb) ส่วนชิ้นส่วน genome A ซึ่งเป็นชิ้นส่วนใหญ่ (3.2 kb) จะถอดรหัสเป็น viral protein ที่เหลือทั้งหมด

การหักล้าง (neutralize) เอพิโทป (epitope) เกิดที่ VP2 โดยแอนติบอดีต่อเอพิโทปเหล่านี้ถือเป็นภูมิคุ้มกันประเภทรับมาที่ช่วยปกป้องไก่จากโรค จากการศึกษาในระยะแรกพบว่า VP3 เป็นตัวกำหนดซีโรไทป์ ต่อมาพบว่า VP2 เป็นโปรตีนที่แสดงความเป็นแอนติเจนสำคัญต่อการหักล้างกับแอนติบอดีต่อไวรัส (neutralize antigenic site) (Becht et al., 1988) เพื่อการป้องกันโรคและนอกจากนี้ ส่วนของ VP2 ยังเป็นส่วนที่มีการแปรผันของสารพันธุกรรมค่อนข้างสูงหรือ เรียกว่า hypervariable region of VP2 ซึ่งเป็นประโยชน์ในการแยกความแตกต่างในการศึกษาสเตรนของเชื้อ (Bayliss et al., 1990)

2.1.3 การติดต่อ (transmission) ตัวนำโรค (carriers) และพาหะนำโรค (vectors)

โรคเบอร์ซาลักเสบติดต่อ เป็นโรคที่ติดต่อตามแนวราบ (horizontal transmission) ได้เป็นอย่างดี และเชื้อไวรัสทนต่อสภาพแวดล้อมในโรงเรือน ไก่ติดเชื้อจากเชื้อที่คงอยู่ในโรงเรือนได้ถึง 54 ถึง 122 วัน (Benton et al., 1967) ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่าเชื้อไวรัสไอบีดีติดเชื้อมีชีวิตใหม่ เนื่องจากเชื้อไวรัสทนต่อความร้อนและสารฆ่าเชื้อทำให้เชื้อไวรัสสามารถคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดี ในระหว่างที่มีการระบาดของหนอนไส้เดือน (mealworm ; *Alphitobius diaperinus*) ที่เก็บจากเล้า 8 สัปดาห์หลังการระบาด สามารถทำให้ไก่ที่มีความไวรับป่วยได้โดยการกิน (Snedeker et al., 1967) นอกจากนี้ Howie and Thorsen (1981) ได้ศึกษาหาเชื้อ IBDV จากยุง (*Aedes vexans*) ที่เก็บได้ในพื้นที่ที่ไก่ป่วยใน southern Ontario แต่สิ่งที่แยกได้นั้นไม่ก่อโรคในไก่ จึงยังไม่มีหลักฐานมากพอในการสรุปว่า ยุง เป็นพาหะหรือตัวเก็บกักโรคของเชื้อไวรัส

2.1.4 ระยะเวลาฟักตัว และอาการทางคลินิก (incubation period and clinical signs)

ระยะฟักตัวของเชื้อสั้นมาก อาการของโรคถูกพบได้ใน 2-3 วันหลังจากสัมผัสเชื้อ อาการแรกที่พบได้จากฝูงที่ติดเชื้อ พบว่าไก่ขนยุ่ง ถ่ายเหลวเป็นสีขาว ซึม สิ้น นอนคว่ำ และตาย ไก่จะมีภาวะขาดน้ำและระยะท้ายของโรคไก่จะมีอุณหภูมิร่างกายต่ำลง

2.1.5 อัตราการป่วยและอัตราการตาย (morbidity rate and mortality rate)

อัตราการป่วยและตาย ในฝูงที่ไวต่อโรคจะพบการตายเฉียบพลัน มีอัตราการป่วยสูงถึง 100 % อัตราการตายอาจสูงถึง 20-30% ปกติการตายจะเริ่มวันที่ 3 หลังจากติดเชื้อ และเพิ่มขึ้นที่ 5-7 วันโดย ในปลายปี 1987 พบสเตรนของ IBDV ชนิดรุนแรง ก่อปัญหาในยุโรป โดยเชื้อที่แยกได้สามารถก่อให้เกิดอัตราการตาย 90-100% ในไก่พันธุ์ Leghorn ที่ไวต่อโรคที่อายุ 4 สัปดาห์ (Chettle et al., 1989) การระบาดของโรคครั้งแรกของฟาร์ม ปกติจะเป็นแบบเฉียบพลันส่วน การระบาดในครั้งต่อมาจะพบความรุนแรงลดลง การติดเชื้อมากไม่ส่งสัญญาณใดๆให้ทราบ โดยเฉพาะในไก่ที่อายุน้อยกว่า 3 สัปดาห์เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันจากแม่

2.1.6 รอยโรค (pathology)

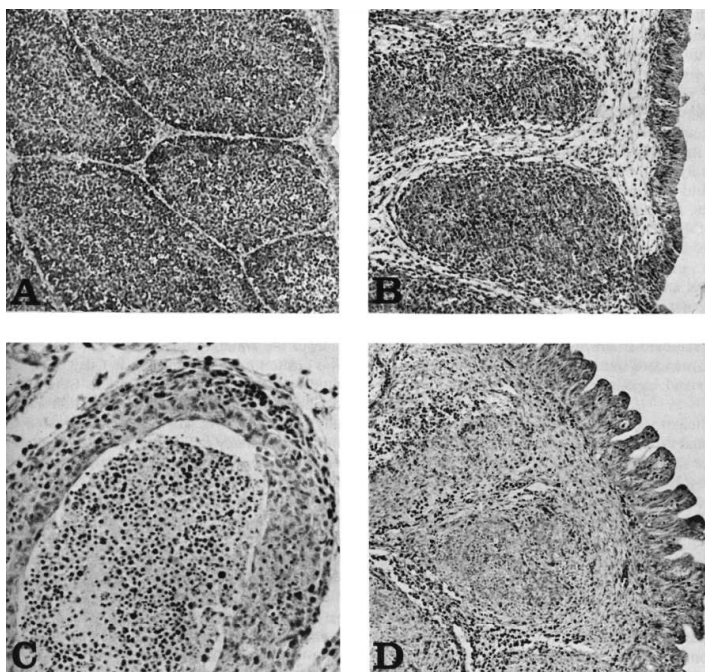
2.1.6.1 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (gross lesions)

ไก่ที่ป่วยจากการติดเชื้อจะมีภาวะขาดน้ำ กล้ามเนื้อออกเป็นสีดำน้ำ บ่อยครั้งพบเลือดออกที่กล้ามเนื้อและกล้ามเนื้อ พบเมือกในลำไส้ และไตเริ่มบวม ไก่ที่พบภาวะขาดน้ำรุนแรงอาจตายได้โดยพบไตปกติ พบว่าต่อมเบอริชาเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัส Cheville (1967) ทำการศึกษาน้ำหนักของต่อมเบอริชาหลังติดเชื้อเป็นระยะเวลา 12 วัน หลังติดเชื้อ 3 วันพบต่อมเบอริชาเริ่มขยายขนาด และน้ำหนัก เพราะการบวมน้ำและภาวะอักเสบซึ่งมีเส้นเลือดเข้ามาในบริเวณดังกล่าวมากขึ้น (hyperemia) ในวันที่ 4 จะมีขนาดเป็น 2 เท่าของปกติและขนาดจะลดลง ในวันที่ 5 ขนาดของต่อมเบอริชาจะกลับสู่ขนาดปกติ แต่จะเกิดการฝ่อ และวันที่ 8 เป็นต้นไปน้ำหนักของต่อมเบอริชาจะมีขนาดเป็น 1 ใน 3 ของปกติ นอกจากนี้ในช่วง 2 หรือ 3 วันหลังติดเชื้อ ต่อมเบอริชาจะพบวุ้นหนองสีเหลือง (gelatinous yellowish transudate) ปกคลุมที่ผิวด้านนอกของต่อมเบอริชาและจะหายไปเมื่อต่อมเบอริชากลับสู่ขนาดปกติซึ่งต่อมเบอริชาจะเปลี่ยนจากสีขาวมาเป็นสีครีม และต่อมเบอริชาจะกลายเป็นสีเทาในระหว่างที่เริ่มฝ่อลง การติดเชื้อที่ต่อมเบอริชา มักพบจุดเนื้อตาย และจุดเลือดออกที่ผิวของชั้นเยื่อเมือก (mucosal surface) ในต่อมเบอริชา ในไก่บางรายอาจพบเลือดออกภายในช่องท้อง ม้ามขยายใหญ่และพบจุดสีเทาขนาดไม่สม่ำเสมอที่ผิวของม้าม และพบเลือดออกที่เยื่อเมือก (mucosa) รอยต่อระหว่างกระเพาะแท้ (proventriculus) และกระเพาะบด (gizzard) ในไก่ที่ไวรับต่อโรคสูง เช่นไก่ไข่

2.1.6.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (microscopic lesions)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจากโรคเบอริชาอักเสบติดต่อ เกิดขึ้นที่โครงสร้างของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid) เป็นอันดับแรก เช่น ต่อมเบอริชา ม้าม ต่อมไทมัส ต่อมฮาร์เดอเรียน และทอนซิลไส้ตัน รอยโรคที่พบจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงที่ต่อมเบอริชาในช่วงแรก 1 วันหลังจากติดเชื้อ มีการเสื่อมและการตายของเม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมโฟไซต์ (B lymphocytes) ในส่วนของชั้นเม็ดลดา (medullar) ของต่อมเบอริชา ซึ่งลิมโฟไซต์ดังกล่าวจะถูกแทนที่ด้วยเม็ดเลือดขาวชนิด เฮเทอโรฟิล (heterophils) เศษเซลล์ (pyknotic debris) และ เรติคูโรเอนโดทีเรียล เซลล์ (reticuloendothelial cell) ส่วนของฟอลลิเคิลของต่อมเบอริชาทั้งหมดได้รับผลกระทบในช่วง 3-4 วันหลังจากการติดเชื้อ การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักที่ต่อ

เบอร์ซาจะเกิดในเวลาต่อมาจากสาเหตุของ การบวมน้ำ และการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล (heterophils) เมื่อการอักเสบลดลงจะเกิดช่องว่างในถุง ฟอลลิเคิล จากการตายของบีลิมโฟไซต์นอกจากนี้ก็จะเกิดไฟโบร พลาเซีย (fibroplasia) ที่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตรงช่องว่างระหว่างฟอลลิเคิล (interfollicular connective tissue) และมีการเพิ่มขึ้นของชั้นผิวเยื่อบุเซลล์ของต่อมเบอร์ซา (bursal epithelial layer) ทำให้ผิวเยื่อบุเซลล์มีลักษณะยื่นออกมาไม่สม่ำเสมอ (glandular) (Cheville, 1967) การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความเสียหายของฟอลลิเคิลในต่อมเบอร์ซาเมื่อได้รับเชื้อไวรัสไอบีดี

ที่มา : Saif, Y.M., Diseases of Poultry, 11th Edition (Iowa State: A Blackwell Publishing Company, 2003), P 169.

รูปที่ 1 A ฟอลลิเคิลปกติ บริเวณรอยต่อระหว่างฟอลลิเคิลเป็นเส้นเล็กๆ B หลังจากได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง เกิดการบวมน้ำที่รอยต่อระหว่างฟอลลิเคิล (interfollicle) และพบเซลล์เก็บกิน (phagocytic cells) และ เฮเทอโรฟิล (heterophils) เข้ามาแทรกอยู่มากขึ้น C. หลังจากได้รับเชื้อ 60 ชั่วโมง ส่วนของฟอลลิเคิลชั้นใน (medullary portion) มีเซลล์ที่ตายจำนวนมาก D. ภายในฟอลลิเคิลไม่พบเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบีเซลล์ และพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลจำนวนมาก

ผิวเยื่อบุเซลล์มีลักษณะนูนออกมา (glandular) จากการเพิ่มขึ้นของชั้นเยื่อบุผิวของต่อมเบอริชชา (bursal epithelial layer)

Survashe และคณะ (1979) ในไก่อายุ 1 วันที่ได้รับเชื้อไอบีดีพบว่าต่อมฮาร์เดอเรียนได้รับผลกระทบรุนแรง ซึ่งโดยปกติแล้วต่อมนี้จะมีเซลล์พลาสมา (plasma cell) เข้ามามากขึ้นตามอายุของไก่ การติดเชื้อไวรัสไอบีดีจะขัดขวางการเข้ามาของเซลล์พลาสมา ไก่ที่อายุ 1-7 สัปดาห์ต่อมที่ติดเชื้อจะมีประชากรของเซลล์พลาสมาน้อยกว่าไก่ปกติที่ไม่ติดเชื้อ 5- 10 เท่าในทางกลับกันไก่ที่ได้รับเชื้อไอบีดี ที่อายุ 3 สัปดาห์ จะพบการตายของเซลล์พลาสมาในต่อมฮาร์เดอเรียนที่ 5-14 วัน หลังให้เชื้อ โดยเซลล์พลาสมาจะลดจำนวนลง 51% ที่ 7 วันหลังจากให้เชื้อ อย่างไรก็ตามการลดจำนวนลงของเซลล์พลาสมา จะเกิดขึ้นเพียงช่วงหนึ่งและจะกลับมาปกติหลังจาก 14 วัน (Dohms et al., 1981)

รอยโรคที่ไตไม่มีความจำเพาะและอาจเกิดจากสภาวะขาดน้ำ Helmboldt และ Garner (1964) พบรอยโรคที่ไตน้อยกว่า 5% ของตัวอย่างไก่ป่วยโดยพบเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลที่เนื้อเยื่อไต

2.1.7 พยาธิกำเนิด (pathogenesis of the infectious process)

Helmboldt และ Garner (1964) ได้ศึกษาการติดเชื้อที่ต่อมเบอริชชาภายใน 24 ชั่วโมงจากการป้ายเนื้อในไก่ โดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence) ในการระบุการเดินทางของเชื้อไวรัส โดยตรวจหาเชื้อไวรัสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว แมคโครฟาจ (macrophages) และ เซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphoid cell) ในไส้ตัน โดยพบเชื้อไวรัสได้ที่ 4 ชั่วโมงหลังจากป้ายเนื้อที่ตับ 5 ชั่วโมงหลังการป้ายเนื้อ สามารถพบเชื้อไวรัสได้ในลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และเข้าสู่กระแสเลือด (viremia) ซึ่งจะกระจายไปที่เนื้อเยื่อของต่อมเบอริชชา ต่อมาที่ 11 ชั่วโมงหลังการป้ายเนื้อ จะเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดครั้งที่สอง (second viremia) จากเชื้อไวรัสที่เพิ่มจำนวนที่ต่อมเบอริชชา ซึ่งภาวะนี้จะเกิดร่วมกับการแสดงอาการป่วยของไก่ การกระจายของเชื้อไวรัสไปที่อวัยวะน้ำเหลือง อื่นๆมักเกิดหลังจากการแพร่กระจายของไวรัสในกระแสเลือดในครั้งที่สอง (second viremia)

2.1.8 การวินิจฉัยโรค (diagnosis)

การระบาดที่เกิดอาการแบบเฉียบพลันของโรคไอบีดีในฝูงไก่ที่มีความไวต่อโรคจะสามารถวินิจฉัยได้ง่ายจากอัตราการตายที่สูง ระยะเวลาเกิดโรคเร็ว ระยะฟักตัวสั้น และกลับมาปกติได้เร็ว นอกจากการศึกษาประวัติสัตว์ป่วยแล้ว ควรเก็บซากเพื่อการวินิจฉัยทางมหาวิทยาลัยวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอร์ซา รวมถึงการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ

2.1.8.1 การแยกเชื้อและระบุเชื้อ (isolation and identification)

ต่อมเบอร์ซาและม้ามเป็นเนื้อเยื่อที่นิยมใช้สำหรับการแยกเชื้อไวรัสไอบีดี แม้ว่าอวัยวะอื่นจะมีไวรัสอยู่แต่พบไวรัสในปริมาณน้อยและอาจพบเฉพาะเมื่อไก่อังคงมีภาวะไวรัสในกระแสเลือด (viremia) Hitchner (1970) ได้แสดงให้เห็นว่าเยื่อ chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ฟักอายุ 9-11 วัน สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนเพื่อแยกพิสูจน์เชื้อไวรัสได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้ถุงน้ำคร่ำ (allantoic sac) และถุงไข่แดง (yolk sac) ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสได้ โดยตัวอ่อนจะตายที่ 3-5 วัน McFerran และคณะ (1980) รายงานว่า เชื้อไวรัสที่แยกโดยเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนของไข่ไก่ฟัก (chicken embryo fibroblast ; CEF) ตรวจพบไวรัสได้ 3 ใน 7 ตัวอย่าง ดังนั้นการแยกเชื้อ IBDV จึงควรทำในไข่ไก่ฟักมากกว่าในเซลล์เพาะเลี้ยง CEF หรือเซลล์จากอวัยวะอื่นเช่นตับหรือไต นอกจากนี้มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (cell lines) จากเซลล์ลิโฟไซตชนิด บีเซลล์ ในการแยกเชื้อได้เช่นกัน การยืนยันเชื้อด้วยใช้เทคนิคทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ และการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope ; EM) ร่วมกับการเลี้ยงเชื้อในไข่ฟัก หรือเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องอาศัยการแยกเชื้อและการเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้โพลีบ นิวคลีอิก (nucleic acid probes) และการใช้วิธี antigen-capture enzyme immunoassays ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไอบีดีจากเนื้อเยื่อโดยตรงถือเป็นวิธีที่มีข้อดีคือวินิจฉัยได้เร็ว นอกจากนี้การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) ถือเป็นวิธีการระบุเชื้อที่มีความไว และความจำเพาะสูง ทำให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อได้โดยตรงไม่ต้องผ่านการเพิ่มจำนวนในไข่ฟัก

2.1.8.2 การตรวจทางซีรัมวิทยา (serology)

นอกจากการตรวจหาเชื้อไวรัสแล้วการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธีตรวจระดับแอนติบอดีจากซีรัมที่เพิ่มขึ้น หรือ แพร์ซีรัม (pair serum) สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคได้โดยผลการตรวจครั้งที่ 1 ในไก่ที่แสดงรอยโรค และผ่านไป 2-3 สัปดาห์เปรียบเทียบกับผลการตรวจครั้งที่ 2 โดยผลของระดับภูมิคุ้มกันควรต่างกัน อย่างน้อย 4 เท่า

2.1.9 การป้องกันโรค

2.1.9.1 ด้านการจัดการ

ควรเลี้ยงไก่อายุเดียวกันทั้งฟาร์ม การเลี้ยงไก่หลายอายุในฟาร์มเดียวกัน จะควบคุมโรคได้ยาก เนื่องจากเมื่อมีโรคระบาดเกิดขึ้น โรคจะวนเวียนอยู่ในฟาร์มอย่างต่อเนื่อง และควรเข้มงวดในระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การเข้าออกฟาร์มของคน สัตว์ อุปกรณ์ และยานพาหนะ เพื่อป้องกันการนำโรคเข้าฟาร์ม ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรงเรือนและอุปกรณ์การเลี้ยงอย่างมีประสิทธิภาพ มีระยะเวลาในการพักโรงเรือนนานพอ เลือกใช้ยาฆ่าเชื้อโรงเรือนและอุปกรณ์การเลี้ยงอย่างมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสไอบีดี ได้แก่ กลูตาราลดีไฮด์ ฟอรัมาลิน คลอรีน คลอรามิน โซดาไฟ และปูนขาว ผสมยาฆ่าเชื้อให้ถูกสัดส่วนและฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึง โดยปกติฟาร์มมักใช้ยาฆ่าเชื้อมากกว่า 1 ครั้ง และใช้ยาฆ่าเชื้อมากกว่า 1 ชนิด

2.1.9.2 การให้วัคซีนป้องกันโรค

วัคซีนมี 2 ชนิดคือ ชนิดเชื้อเป็น และชนิดเชื้อตาย การให้วัคซีนเชื้อเป็น วิธีที่นิยมมากที่สุดคือการละลายน้ำให้ไก่กิน แต่วิธีอื่นที่ให้ได้ เช่น การพ่นเป็นละอองหยาบ หรือจับหยอดปากที่ละตัว สำหรับวัคซีนเชื้อตาย ให้โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ วัคซีนเชื้อเป็นแบ่งตามระดับความรุนแรงในการก่อโรคเป็น 3 ระดับคือ ชนิดรุนแรงน้อย (mild vaccine) ชนิดรุนแรงปานกลาง (intermediate) และชนิดรุนแรงมาก (intermediate-plus หรือ hot vaccine) ซึ่งวัคซีนชนิดรุนแรงน้อยเป็นวัคซีนที่ไม่นิยมใช้เนื่องจากผลในการป้องกันโรคต่ำมาก

2.1.9.2.1 วัคซีนชนิดรุนแรงปานกลาง (intermediate)

ในช่วงเวลาที่มีการแพร่ระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2533-2534 มีการให้วัคซีนชนิดรุนแรงปานกลางทุกชนิดเท่าที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในขณะนั้น ซึ่งบางครั้งให้วัคซีนถึง 3 ครั้ง แต่ไม่สามารถควบคุมโรคระบาดได้ ตัวอย่างของวัคซีนชนิดรุนแรงปานกลางที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เช่น ไบโอกัมโบโร เบอร์ซาเบลนเอ็ม เบอร์ซาแวก 3 เบอร์ซีน 2 ดี 78 กัมโบแวกซ์ ฮิปปรากัมโบโร ไวเบอร์ซาจี ไวเบอร์ซาซีอี ซีแวกเบอร์ซาแอล และซีแวกกัมโบแอล เป็นต้น

2.1.9.2.2 วัคซีนเชื้อตาย (inactivated vaccine)

ต่อมาเริ่มมีการนำวัคซีนเชื้อตายมาใช้พบว่าช่วยลดความสูญเสียลงได้บางส่วน และใช้ในไก่พันธุ์ ที่อายุ 19-20 สัปดาห์เพื่อให้มีระดับภูมิคุ้มกันในการส่งผ่านไปให้ลูกไก่ได้มากขึ้นและช่วยให้ระดับภูมิคุ้มกันในกลุ่มไก่แต่ละตัวมีความสม่ำเสมอมากขึ้น (uniformity)

2.1.9.2.3 วัคซีนชนิดแรง (intermediate-plus or hot vaccine)

วัคซีนในกลุ่มนี้สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ค่อนข้างดี ปัจจุบันคาดว่าฟาร์มไก่เนื้อให้วัคซีนประเภทนี้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 ของประชากรไก่ ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ ชนิดแรงกว่าปานกลางเล็กน้อย เช่น เบอร์ซาเอฟ แทดกัมโบโรแวกฟอร์ท ชนิดที่แรงมาก เช่น ไอบีดีเบลน เบอร์ซาแวก โนบิลิส 228E เบอร์ซีน 3 ฮิปปรากัมโบโร ซีเอส/80 และซีแวกไอบีดีแอล

2.1.9.2.4 ผลเสียของการให้วัคซีนชนิดแรง

วัคซีนชนิดแรง สามารถป้องกันไก่ตายจากโรคระบาดได้จริง โดยให้วัคซีนได้แม้ขณะลูกไก่มีระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ แต่ขณะเดียวกันวัคซีนชนิดแรงมากอาจทำให้ไก่ป่วยหรือตายได้ นอกจากนี้ ยังมีผลเสียต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และมีผลกดภูมิคุ้มกัน ทำให้ไก่มีการตอบสนองต่อวัคซีนอื่นๆ ได้ไม่ดี (Allan et al., 1972) และมีความไวต่อการติดเชื้อโรคต่างๆ โดยเฉพาะในไก่ไข่ ซึ่งมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสไอบีดีมากกว่าไก่เนื้อ

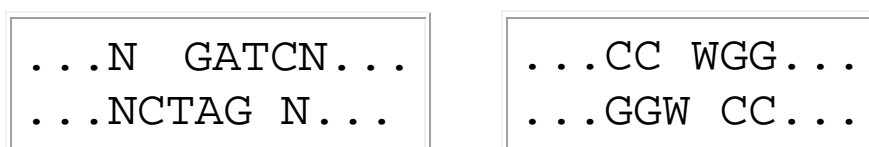
2.1.9.3 การเลือกชนิดของวัคซีน

กรณีพบโรคในฟาร์มบ่อยๆ และพบความเสียหายมาก ควรเลือกใช้วัคซีนชนิดแรง แต่ถ้าพบโรคไม่บ่อยนักหรือมีความเสียหายไม่มาก ควรเลือกให้วัคซีนชนิดแรงปานกลาง แต่มาตรการที่จำเป็นที่สุดที่จะทำให้การควบคุมโรคได้ผลดีคือการควบคุมเชื้อโรคภายในฟาร์มด้วยการเน้นการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ โดยเลือกใช้ยาฆ่าเชื้อที่ฆ่าเชื้อไวรัสไอบีดีได้ ใช้สัดส่วนให้ถูกต้อง ทำการฆ่าเชื้อให้ทั่วถึง พักโรงเรือนนานพอ เลี้ยงไก่อายุเดียวกันทั้งฟาร์ม และควบคุมการเข้า-ออกฟาร์มของคน สัตว์ อุปกรณ์ และยานพาหนะ เป็นต้น

2.2 การตรวจแยกเชื้อและการจำแนกเชื้อ ด้วยวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP เป็นวิธีการศึกษาสารพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR หรือ RT-PCR) ร่วมกับเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP; Restriction fragment length polymorphism) (Jackwood and Sommer, 1997; Jackwood et al., 2001) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างเพื่อระบุสายพันธุ์โดยอาศัยความแตกต่างในส่วนของลำดับเบสของแต่ละสายพันธุ์ซึ่งอาจมีการกลายพันธุ์ (mutation) ส่งผลให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) เดียวกันมีขนาดแตกต่างกัน เมื่อแยกโดยอาศัยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *Mbo*I และ *Bst*NI ในการแยกความแตกต่างของสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์ vvIBDV-CU1 และ IBDV W2512 โดยเอนไซม์ *Mbo*I และ *Bst*NI มีจุดตัดจำเพาะดัง รูปที่ 2 จากซ้ายไปขวา



ที่มา : Jackwood and Sommer, 1997; Jackwood et al., 2001

รูปที่ 2 จุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I (ซ้าย) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*NI (ขวา)

2.3 วัคซีนป้องกันโรคชนิด อิมมูนคอมเพล็กซ์

2.3.1 โครงสร้างของวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์

วัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ คือ วัคซีนที่ส่วนของแอนติเจน (ไวรัส) จับกับส่วนของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น หรือเรียกว่า antigen antibody complex vaccine ซึ่งเป็นการจับกันระหว่างไวรัสจากวัคซีนไอบีดี สเตรอน W2512 ระดับความรุนแรงมาก (intermediate plus) กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไอบีดี (Whitfill et al., 1995) โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดีประกอบด้วย H chain 2 สาย และ L chain 2 สาย เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เป็นรูปตัว “Y” โดยปลายด้านบนสุดของตัว Y ประกอบด้วย บริเวณ แปรปรวน (variable region) เรียกว่า Fab fragment ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของแอนติบอดี บริเวณแปรปรวนนี้ ประกอบด้วยตำแหน่งที่จับกับแอนติเจน (antigen binding site) 2 แห่ง ซึ่งมีผลต่อความเฉพาะของแอนติบอดีและบริเวณ คงตัว (constant region) เรียกว่า Fc fragment ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไอบีดีนี้เป็น monoclonal IgG ที่ส่วนของด้าน Fc ถูกจับกับโปรตีน A (ชิ้นส่วนผนังของแบคทีเรีย *S. aureus*) ที่จำเพาะต่อด้าน Fc ในตำแหน่งของ complement binding site และเหลือส่วนของ Fab ไว้สำหรับเกิดปฏิกิริยาจับกับเชื้อไวรัสไอบีดี สเตรอน W2512 โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมานี้เรียกว่า viral neutralizing factor (VNF) (Patent US4493825; Platt et al., 1985) โดยมีความแตกต่างจาก Mab (maternal antibody) ต่อไวรัสไอบีดีในส่วนของ Fc ซึ่งทำให้ไม่เกิดกลไกการทำงานของ complement หลังจากการจับกันของเชื้อไวรัสจากวัคซีนไอบีดี สเตรอน W2512 กับแอนติบอดีต่อไอบีดี

2.3.2 กลไกการทำงานของวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์

โดยกลไกการทำงานของวัคซีนนี้ เมื่อทำวัคซีนในไขไก่ฟักที่อายุ 18 วัน หรือให้ทางใต้ผิวหนังบริเวณคอในไก่อายุ 1 วัน พบว่าวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์จะเข้าสู่กระแสเลือด และอวัยวะน้ำเหลือง ซึ่งส่วนของอิมมูนคอมเพล็กซ์จะถูกจับยึดกับขาของเซลล์ที่มีชื่อ ว่า เซลล์ฟอลลิคูลาร์เดนไดรติก (follicular dendritic cells) และสามารถถูกเก็บไว้ได้นานในเซลล์นั้น (Jeurissen et al., 1998) โดยเมื่ออิมมูนคอมเพล็กซ์มาถึงอวัยวะน้ำเหลืองจะถูกจับโดยแมคโครฟาจ ซึ่งจะเป็นตัวนำส่งอิมมูนคอมเพล็กซ์ไปสู่เซลล์ฟอลลิคูลาร์เดนไดรติก (follicular dendritic cells) ที่บริเวณ germinal centre ของโซน ไพรมารีฟอลลิเคิล (primary follicle) (Phan et al., 2007) และอิมมูน

คอมเพล็กซ์จะถูกจับกับขาของเซลล์ฟอลลิคูลาร์ เดนไดรติก (follicular dendritic cells) ด้วย Fc receptor ซึ่งจับกับแอนติเจนหรือส่วนของเชื้อไวรัสของวัคซีน โดยขบวนการปลดปล่อยไวรัสออกจากเซลล์ฟอลลิคูลาเดนไดรติกจะไปเพิ่มจำนวนในอวัยวะน้ำเหลือง จะเกิดเมื่อมีการเสื่อมสลายของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส โอปีดี สเตรอน W2512 ตามปริมาณและค่าครึ่งชีวิตของแอนติบอดีนั้นๆ ซึ่งสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้หลังจากได้รับวัคซีนไปแล้วประมาณ 5-15 วัน (Jeurissen et al., 1998; Corley et al., 2001 ; Corley et al., 2002)

2.3.3 การตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนโอปีดีซินิไดมูนคอมเพล็กซ์

ไวรัสวัคซีนจะเริ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ต่อมเบอริชชา ม้าม และไทมัส ซึ่งสามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของไวรัสในเซลล์ดังกล่าวได้หลังจากให้วัคซีนมาแล้ว 5 -10 วัน ในไก่ปลอดตัวก่อโรคจำเพาะ (specific pathogen free) เมื่อได้รับวัคซีนผ่านไข่ฟักอายุ 18 วัน (Jeurissen et al., 1998; Corley et al., 2001) นอกจากนี้เมื่อได้รับวัคซีนทางใต้ผิวหนังบริเวณคอในไก่ปลอดตัวก่อโรคจำเพาะอายุ 1 วัน จะตรวจพบเชื้อไวรัสได้หลังจากได้รับวัคซีนมาแล้ว 14 วัน (Ivan et al., 2005) และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้ในวันที่ 9-15 หลังจากการได้รับวัคซีนในไข่ไก่ฟักที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ (Corley et al., 2002) โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสจากวัคซีนภายหลังจากได้รับวัคซีนที่ใต้ผิวหนังบริเวณคอเมื่ออายุ 1 วันโดยยังไม่มีการศึกษาในไก่ที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาในการตอบสนองของวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ซึ่งมีทั้งปัจจัยในเรื่องของระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ และวิธีการให้วัคซีน นอกจากนี้การแพร่กระจายของไวรัสวัคซีนในอวัยวะเนื้อเยื่อน้ำเหลืองพบว่ามีความแตกต่างกันเมื่อให้โดยวิธีที่แตกต่างกัน กรณีได้รับวัคซีนโดยฉีดไข่ไก่ ฟักอายุ 18 วัน สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้ทั้งในต่อมไทมัส ม้าม และต่อมเบอริชชา (Jeurissen et al., 1998) ในขณะที่เมื่อให้วัคซีนทางใต้ผิวหนังบริเวณคอในไก่อายุ 1 วันมักจะพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้เฉพาะในต่อมเบอริชชาเท่านั้น (Ivan et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายของไวรัสในไข่ฟักซึ่งพบว่าไวรัสจากวัคซีนเมื่อให้ในไข่ฟักจะสามารถกระจายไปสู่อวัยวะน้ำเหลืองได้หลายแห่ง (Sharma et al., 1989)

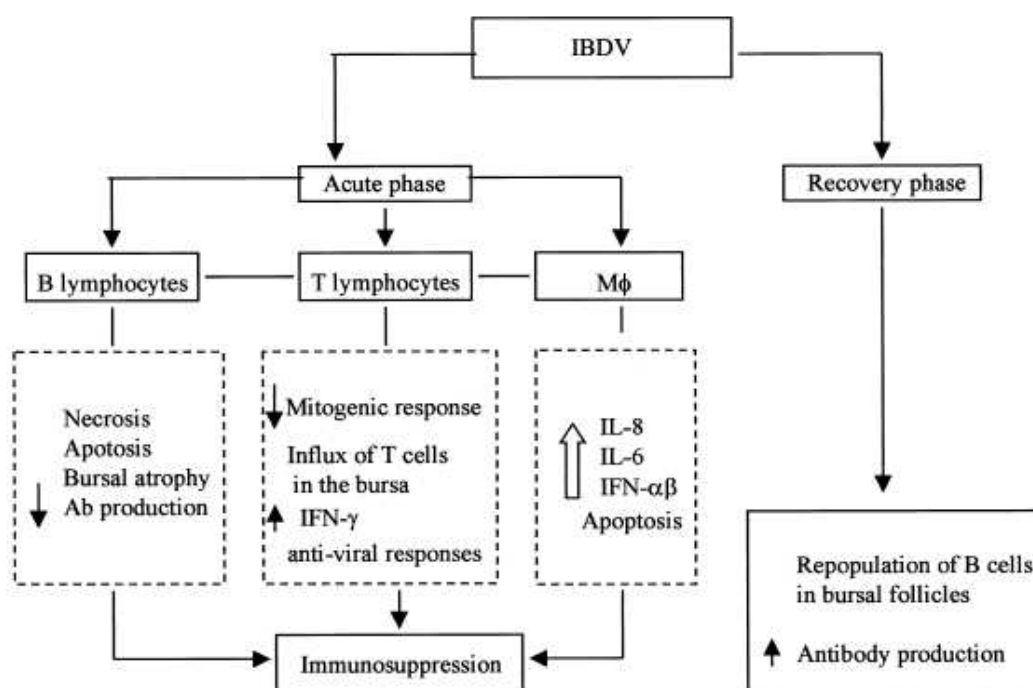
2.3.4 ประสิทธิภาพของวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์

ประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันจากไก่ที่ได้รับวัคซีนชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ พบว่าวัคซีนสามารถป้องกันโรคจากเชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันได้ (Haddad et al., 1997) ในด้านของความปลอดภัยของวัคซีน เมื่อเปรียบเทียบความเสียหายของต่อมเบอร์ซา พบว่าการจับกันของแอนติบอดีกับไวรัสวัคซีนช่วยลดความเสียหายของต่อมเบอร์ซาจากไวรัสวัคซีนได้ (Kumar and charan, 2001) ในขณะที่บางการศึกษาพบว่าวัคซีนไม่สามารถช่วยลดความเสียหายของต่อมเบอร์ซาได้เมื่อได้รับเชื้อไวรัสในระดับความรุนแรงชนิด wIBDV (Chansiripornchai and Sasipreeyajan, 2008; 2009) นอกจากนี้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่มีผลในการรบกวนประสิทธิภาพจากการได้รับวัคซีนอื่น เช่น วัคซีนนิวคาสเซิล และถือว่ามีความปลอดภัยสูงโดยไม่พบความเสียหายของต่อมเบอร์ซาจากไวรัสวัคซีน (Kelemen et al., 2000) ซึ่งแตกต่างจากวัคซีนเชื้อเป็นชนิดปกติเมื่อให้ที่ระยะเวลาเดียวกัน

2.4 การตอบสนองของวัคซีนในด้านภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ และภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ

เชื้อไวรัสไอบีดีมีผลทำลายต่อมเบอร์ซา ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อระบบภูมิคุ้มกันของไก่ โรคนี้พบการแพร่ระบาดทั่วโลก เชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อกัน เป็นไวรัสที่มีอวัยวะเป้าหมายที่ บี ลิมโฟไซต์ ในต่อมเบอร์ซา (Kaufer and Weiss, 1980) ซึ่งส่งผลกระทบต่อ บี เซลล์และ อิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ในกระแสเลือด (Ivanyi and Morris, 1976; Giambrone et al., 1977; Hirai et al., 1981; Rodenberg et al., 1994) จากหลักฐานการถูกทำลายของบีเซลล์ในต่อมเบอร์ซา นอกจากนี้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในอวัยวะน้ำเหลืองอื่นๆได้เช่น ม้าม ไทมัส ต่อมทอนซิล ที่ไส้ตัน (Ivanyi and Morris, 1976; Hirai et al., 1981; Rodenberg et al., 1994) ซึ่งเชื้อไวรัสไอบีดีสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ใน บี เซลล์ของลิมโฟไซต์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อไวรัสได้ในเซลล์แมคโครฟาจ จากหลักฐานการพบเชื้อไวรัสไอบีดี ซึ่งอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นนอกและชั้นในของต่อมไทมัส (corticomedullary junction) โดยที่ยังไม่พบหลักฐานการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T cell (Sharma et al., 1989) เชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันจึงเป็นสาเหตุให้เกิดสภาวะกดภูมิคุ้มกันในไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งส่วนของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำและชนิดฟั้งเซลล์โดยพบว่าผลกระทบต่อระบบ ภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์น้อยกว่าระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Giambrone et al., 1977; Confer et al., 1981; Sharma et al., 1989)

จากการศึกษาของ Corley และคณะ (2002) ในด้านการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน ชนิดฟิงเซลล์ของไก่ เมื่อได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ต่อเชื้อ ไวรัสเบอร์ซาก์เสบติดต่อ พบว่าไก่ ปลอดภัยกว่าโรคจำเพาะที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ทางไข่ไก่ฟักอายุ 18 วันจะพบการลดลง ของค่าความสามารถในการตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิด T cell หรือ mitogenic response ของ ม้าม ในวันที่ 9 หลังจากได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์จากนั้นจะเพิ่มกลับมาปกติ ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาของ Sharma และ คณะ (2000) โดยสามารถอธิบายได้ว่าเกิดจาก Nitrite oxide (NO) ซึ่งมีผลลดค่าการตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิด T cell หรือ mitogenic response ซึ่งสร้างมาจาก เซลล์แมคโครฟาจ จากการกระตุ้นของ IFN- γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งมาจากลิมโฟไซต์ชนิด Th 1 โดยผลลดค่าการตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิด T cell หรือ mitogenic response ที่เกิดขึ้นต่อลิม โฟไซต์ชนิด T cell จากวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์มีผลเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการได้รับวัคซีนเชื้อ เป็น (Corley and Giambrone, 2002) โดยกลไกการก่อโรคจากเชื้อไวรัสไอบีดีต่อการตอบสนอง ของลิมโฟไซต์นั้นแสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งเชื้อไวรัสไอบีดีชอบเซลล์ บี ลิมโฟไซต์ที่มีการแบ่งตัวเพิ่ม จำนวนหรือเซลล์ที่อยู่ในระยะพร้อมแบ่งตัว proliferate B cell ซึ่งพบอยู่ในชั้นใน (medulla part) ของต่อมเบอริซา (Beug et al., 1981) ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสในต่อมเบอริซาจะสามารถพบ การเคลื่อนมาสะสมของ ลิมโฟไซต์ชนิด ที เซลล์ ชนิด Th ($CD4^+$) เข้ามาแทรกอยู่รอบๆฟอลลิเคิล ของต่อมเบอริซาสูงสุดในวันที่ 7 หลังจากการติดเชื้อ และพบลิมโฟไซต์ชนิด CTL ($CD8^+$) เข้ามา แทรกอยู่ที่ชั้นในของต่อมเบอริซาภายในฟอลลิเคิล (Sharma et al., 2000) โดย Th เซลล์เป็นส่วน สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง IFN- γ และ IL-2 ช่วยเรียกเซลล์ แมคโครฟาจ และ CTL เข้ามา ทำลายเชื้อไวรัสและเกิด apoptosis ของ B lymphocyte ความเสียหายจากต่อมเบอริซาจะเกิดขึ้น จากการเข้าทำลายเชื้อไวรัสจากแมคโครฟาจ และ CTL เป็นสำคัญ



รูปที่ 3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจจากเชื้อไวรัสไอบีดีทีมา; Sharma et al. (2000)

มีการศึกษาถึงปริมาณลิมโฟไซต์ชนิด ทีเซลล์ในส่วนของ helper T cell (Th) โดยศึกษาการแสดงออกที่ผิวเซลล์ในส่วนของ CD4⁺ และ cytotoxic T cell (CTL) โดยศึกษาการแสดงออกที่ผิวเซลล์ในส่วนของ CD8⁺ จากการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ต่อเชื้อไวรัสไอบีดีทีพบว่า ปริมาณลิมโฟไซต์ทั้งชนิด CD4⁺ และ CD8⁺ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีน และไม่ได้รับวัคซีน ทั้งในการศึกษาปริมาณประชากรลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดและในม้าม (Rodenberg et al., 1994; Corley and Giambrone, 2002)

แสดงให้เห็นว่าการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ ส่งผลต่อการลดค่าการตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิด T cell หรือ mitogenic response ในระยะเวลาสั้นๆ ในช่วงแรกที่วัคซีนเพิ่มจำนวนในต่อมเบอร์ธา โดยที่ไม่มีผลต่อปริมาณประชากรที่ ลิมโฟไซต์ ชนิด CD4⁺ หรือ CD8⁺ (Corley and Giambrone, 2002) ในกระแสเลือดและในม้าม ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลจากการได้รับเชื้อจากธรรมชาติ แต่ระดับความรุนแรงจะสูงกว่าจากวัคซีนเชื้อเป็น และวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ตามลำดับ (Rodenberg et al., 1994; Corley and Giambrone, 2002) ปัจจุบันมีการศึกษาด้าน

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์จากการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่ปลอดตัวก่อโรคจำเพาะ โดยให้วัคซีนในไข่ไก่ฟัก (*in ovo*) ที่อายุ 18 วัน แต่ยังไม่มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ของการป้องกันโรคจากวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ที่ได้รับวัคซีนได้ผิวหนังคอที่อายุ 1 วัน ในไก่ที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่

2.5 การศึกษา ภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์เม็ดเลือด (flow cytometry)

flow cytometry คือ การตรวจนับหรือวัดลักษณะจำเพาะของอนุภาค (particles) หรือเซลล์ (cells) ที่กำลังไหลผ่านลำแสงเป็นแถวเรียงเดียว โดยลักษณะที่สามารถนับหรือวัดได้โดยตรง คือขนาดของเซลล์ (cell size) และเม็ดแกรนูโลในเซลล์ (granularity) ส่วนลักษณะชนิดอื่น ๆ เช่น การแสดงออกที่พื้นผิวเซลล์ (surface markers) และ การแสดงออกภายในเซลล์ (intracellular markers) จำเป็นจะต้องใช้การย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) หรืออิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immuno-fluorescence) จึงจะสามารถทำการตรวจนับหรือวัดได้ ข้อจำกัดของเซลล์ที่จะสามารถใช้ โฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) ทำการศึกษาได้ จะต้องเป็น อนุภาคอิสระแขวนลอยอยู่ใน ของเหลว (fluid) เท่านั้น เนื้อเยื่อจะต้องถูกทำให้แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆก่อน Flow cytometer คือ เครื่องมือที่ใช้ในการทำ flow cytometry ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญ 4 ส่วน คือ ระบบการขนส่งอนุภาคในของเหลว (fluidic system), ระบบการกระตุ้นอนุภาคด้วยแสง (optical system), ระบบตัวตรวจจับพลังงานหลังการกระตุ้น (detector system) และ ระบบการแปลผลข้อมูล (data processing system)

2.5.1 การใช้ flow cytometry ในงานเม็ดเลือดขาว

Immunophenotyping of lymphocytes คือ การตรวจนับชนิดของประชากรลิมโฟไซท์ โดยการย้อมด้วยสีที่จำเพาะต่อพื้นผิว (specific surface markers) เช่น CD4 (T-helper) หรือ CD8 (T-suppressor/cytotoxic) ด้วย monoclonal Ab ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง เช่น FITC หรือ R-PE เป็นต้น จากนั้นจึงนำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer เนื่องจากลิมโฟไซท์ แต่ละ ชนิดของประชากรลิมโฟไซท์ (sub-population) จะมีความจำเพาะของพื้นผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน จึงสามารถใช้ผลการย้อมในการแยกชนิดของมันได้

บทที่ 3

การทดลองที่ 1

ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อชนิดอิมมูนคอมเพล็กซ์ในไก่เนื้อ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบติดต่อที่อายุ 21 วันหรือ 28 วัน

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อ หากได้รับเชื้อไวรัสในวันที่ 21 หรือ 28 ของอายุไก่และการแสดงออกของเชื้อไวรัสในวัคซีนในด้านของระยะเวลาการเพิ่มจำนวน การคงอยู่ และการแพร่กระจายของไวรัสไปสู่อวัยวะน้ำเหลือง เมื่อไก่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์โดยการฉีดวัคซีนได้ผิวหนังคอเมื่อไก่อายุ 1 วัน

3.1. สัตว์ทดลอง

ไก่เนื้อเพศเมีย อายุ 1 วัน จำนวน 186 ตัว สายพันธุ์ Cobb 500 น้ำหนักเฉลี่ย 40 กรัม จากฟาร์มกรุงไทย จังหวัดชลบุรี ที่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ที่ได้ผิวหนังบริเวณคอจำนวน 72 ตัวและไก่เนื้ออายุ 1 วันที่ไม่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์จำนวน 114 ตัว

3.2 วิธีการทดลอง

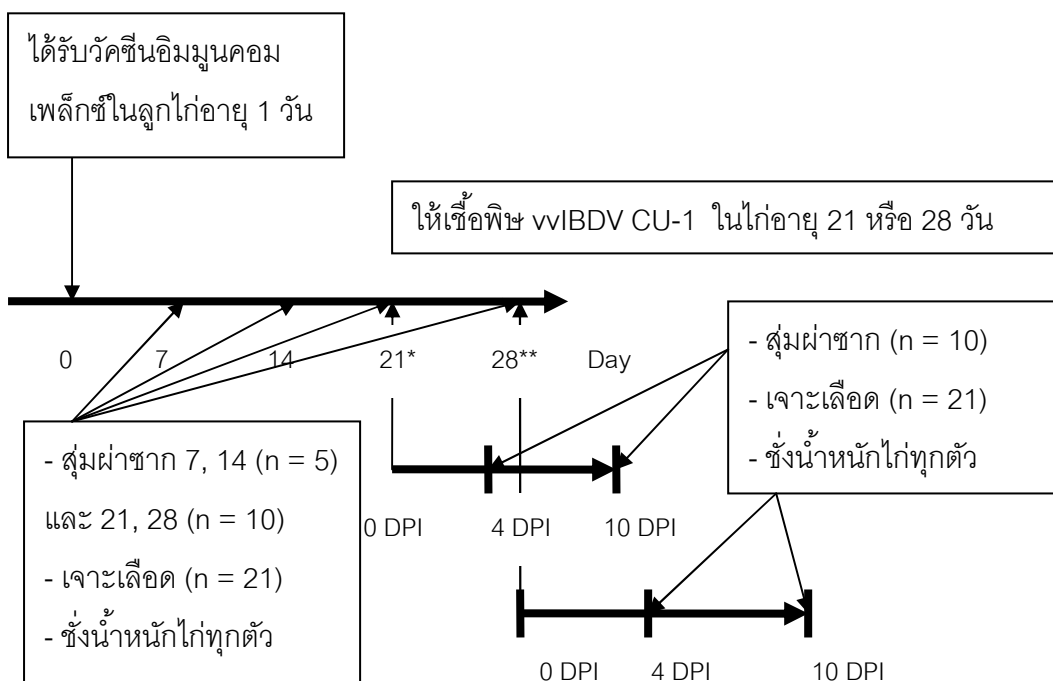
ไก่เนื้อ อายุ 1 วัน จำนวน 186 ตัว ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ (IBDV strain W2512) ให้โดยวิธีฉีดเข้าได้ผิวหนังบริเวณคอจำนวน 72 ตัวและไก่เนื้ออายุ 1 วันที่ไม่ได้รับวัคซีนดังกล่าวจำนวน 114 ตัว ลูกไก่เนื้อ อายุ 1 วันทั้งสองกลุ่มแยกเลี้ยงกันคนละห้องทดลองซึ่งห่างจากกันและไม่มีทางเดินของอากาศเชื่อมต่อกัน ทำการชั่งน้ำหนักทุกตัว เจาะเลือด และแบ่งมาผ่าซากทุกสัปดาห์ จำนวน 5 ตัวอย่างต่อกลุ่ม ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 แบ่งมาผ่าซากกลุ่มละ 10 ตัว เพื่อศึกษาการแสดงออกของวัคซีนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนเมื่อไก่ได้รับการป้องกันเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์รุนแรงโดยจะนำมาทดสอบกับเชื้อพิษ vIBDV-CU1 ในสองช่วงอายุ โดยจะนำไก่จากทั้งสองกลุ่มข้างต้นมาจัดกลุ่มเพื่อการทดลองป้องกันเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน และ ที่อายุ 28 วันดังนี้

การทดลองประสิทธิภาพของวัคซีนเมื่อไก่ได้รับเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์รุนแรงมาก (CU-1) ที่อายุ 21 วัน โดยแบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 21 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำๆละ 7 ตัว ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 1A ไก่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์ที่อายุ 1 วันและได้รับการป้องกันเชื้อ vIBDV-CU1

จัดเป็นกลุ่มทดลอง ไก่กลุ่มที่ 2A ไม่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับการป้อนเชื้อ wIBDV-CU1 จัดเป็นกลุ่มควบคุมบวก ไก่กลุ่มที่ 3A ไม่ได้รับวัคซีนและป้อนสารละลายยับฟเฟอร์จัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ เก็บข้อมูลน้ำหนักตัวไก่เจาะเลือดและ แบ่งมาผ่าซากครั้งละ 10 ตัวต่อกลุ่มที่ 0, 4 และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

การทดลองประสิทธิภาพของวัคซีนเมื่อไก่ได้รับเชื้อไวรัสโอบีดีสายพันธุ์รุนแรงมาก (CU-1) ที่อายุ 28 วัน โดยแบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 21 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำๆละ 7 ตัว เช่นกัน ได้แก่ไก่กลุ่ม 1B ที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ที่อายุ 1 วันและได้รับการป้อนเชื้อ wIBDV-CU1 จัดเป็นกลุ่มทดลอง ไก่กลุ่ม 2B ไม่ได้รับวัคซีนมาก่อนและได้รับการป้อนเชื้อ wIBDV-CU1 จัดเป็นกลุ่มควบคุมบวก ไก่กลุ่ม 3B ไม่ได้รับวัคซีนและป้อนสารละลายยับฟเฟอร์จัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ เก็บข้อมูลน้ำหนักตัวไก่เจาะเลือด และแบ่งมาผ่าซากครั้งละ 10 ตัวต่อกลุ่มที่ 0, 4 และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนการดำเนินงานการทดลองที่ 1

* = ให้เชื้อพิษ wIBDV CU-1 ในไก่อายุ 21 วัน

** = ให้เชื้อพิษ wIBDV CU-1 ในไก่อายุ 28 วัน

3.3 วิธีทางห้องปฏิบัติการ

3.3.1 การเตรียมซีรัม การเก็บรักษาซีรัม และการวิเคราะห์หาค่า Ab titer ต่อโรคเบอริซซาลักเสบติดต่อดังวิธี ELISA

นำเลือดที่บรรจุอยู่ในหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) มาวางบนพื้นราบโดยวางหลอดบรรจุในแนวขนานไปกับพื้น และวางทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดแข็งตัว (coagulate) ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเลือดด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการแยกซีรัม เลือดที่แข็งจะหดตัว (clot retraction) และแยกออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนของเม็ดเลือดและส่วนของซีรัม จากนั้นทำการแยกเก็บซีรัมโดยใช้ micro pipette ดูดเก็บซีรัมที่ได้ใส่ในหลอดบรรจุ (microtube) และเก็บรักษาซีรัมที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาค่า Ab titer ต่อโรคต่อมเบอริซซาลักเสบติดต่อดังวิธี ELISA (Synbiotics, USA) ซึ่งทำการอ่านค่าโดยใช้เครื่อง ELISA reader จะได้ค่าออกมาเป็นหน่วยของค่าความดูดกลืนคลื่นแสง (optical density หรือ OD) ซึ่งจะมีค่า อยู่ระหว่าง 0-2 โดยค่าที่ได้จะนำไปคำนวณให้ได้เป็นค่า Ab titer และนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

3.3.2 ตรวจหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อ

การย่อยเซลล์ (cell lysis) โดยบดชิ้นเนื้อ ต่อมเบอริซซา ม้าม และไทมัส ทำเป็น 10% suspension ปั่นแยกตะกอนออกเก็บส่วนใสซึ่งมีไวรัสอยู่ สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience corp, Taiwan) และเก็บตัวอย่าง RNA ที่ได้จากการสกัดที่ -20 องศาเซลเซียสตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีของ (Jackwood and Sommer 1997; Jackwood et al., 2001) โดยเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วนของ VP2 ยีน ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของตัวเชื้อไวรัสและการเกิด neutralizing epitope โดยใช้ primer forward (IBDV-FN, 5'-GCC CAG AGT CTA CAC CAT AAC-3') และ primer reverse (IBDV-RN, 5'-CCC GGA TTA TGT CTT TGA AAG-3') ผลผลิตที่ได้จาก RT-PCR มีขนาด 743-base-pair ซึ่งเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วนของ VP2 ยีนที่ตำแหน่ง nucleotides 606 ถึง 1348 โดยใช้ปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 µl ของ RNA ต้นแบบ, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 0.6 mM primer และ 10 unit เอนไซม์ RNase เติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายคือ 50 µl ปฏิกิริยาของ RT-PCR

มีขั้นตอนดังนี้คือ reverse transcriptase 45 ° C 45 นาที initial denaturation 15 นาที ที่ 95 ° C และ denaturation (30 วินาที ที่ 94 °C) annealing (30 วินาที ที่ 60 °C) elongation (30 วินาที ที่ 72 °C) จำนวน 35 รอบและ final extension 10 นาทีที่ 72 °C

การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) และการย้อมเจล โดยการเตรียมเจล (1% agarose gel) ลงในช่องใส่เจล (gel chamber) จากนั้นนำไปวางใน ถาด อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis chamber) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิด TBE 0.5x ผสมสี ย้อม (loading dye) กับ ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) บนแผ่นพาราฟิน (paraffin) อัตราส่วน 1:5 และปิเปตปริมาตร 15 µl ลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ความต่าง ศักย์ 100 โวลต์ 40 นาทีจากนั้นย้อมสีย้อมดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่ง จะทำปฏิกิริยากับแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV) และสามารถมองเห็นผลผลิตพีซีอาร์นั้นได้

3.3.3 การแยกชนิดสารพันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Jackwood and Sommer, 1997; Jackwood et al., 2001)

โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbol* และ *BstNI* โดยนำผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและอ่านผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเช่นกัน ซึ่งส่วนของ VP2 ยีนจากเชื้อไวรัสโอบีดี สายพันธุ์ wIBDV strain CU-1 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbol* จะได้ชิ้นส่วนของแถบ DNA ดังนี้คือ 362,192 และ ต่ำกว่า 100 bp และเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstNI* จะได้ ชิ้นส่วนของ DNA band ดังนี้คือ 424, 172 และ 119 ในส่วนของ VP2 ยีนจากเชื้อไวรัสโอบีดีจาก วัคซีน IBDV strain 2512 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbol* จะได้ชิ้นส่วนของ DNA band ดังนี้คือ 402 และ 232 และเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstNI* จะได้ชิ้นส่วนของ DNA band ดังนี้คือ 173, 154, 139 และ 119

3.3.4 การประเมินรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอ์รชา (gross lesion and histopathological lesion score)

จากการตรวจพบวุ้นที่ต่อมเบอ์รชาในวันที่ 4 หลังจากให้เชื้อไวรัส IBDV โดยประเมินการตรวจพบหรือตรวจไม่พบวุ้นที่ต่อมเบอ์รชา จากการเก็บต่อมเบอ์รชาไก่หลังจากให้เชื้อไวรัส vvIBDV-CU1 เป็นเวลา 4 และ 10 วัน (days post inoculation; DPI) นำไป fix ด้วย 10% buffered formalin นำไปผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา และย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) โดยการให้คะแนนรอยโรคมี่ทั้งหมด 5 score ดังนี้ (Muskett et al., 1979)

0 = ไม่มีรอยโรค

1 = พบลิมโฟไซต์เซลล์ถูกทำลายเล็กน้อย โดยไม่พบการตายและการบวมน้ำ

2 = พบลิมโฟไซต์เซลล์ถูกทำลายปานกลาง และพบการตายของเซลล์และมีการบวมน้ำที่รอยต่อระหว่างฟอลลิเคิล

3 = พบลิมโฟไซต์เซลล์ถูกทำลายจำนวนมากกว่า 50%

4 = พบลิมโฟไซต์เล็กน้อยและ พบ reticular cell เข้ามาแทนที่และพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟบรัส (fibrous tissue) ฟอลลิเคิลฝ่อ เกิดช่องว่างภายในฟอลลิเคิล ส่วนของเยื่อบุหน้าตัวมากขึ้น

5 = ฟอลลิเคิลหายไป และมีเนื้อเยื่อไฟบลาส (fibrous tissue)

3.3.5 การคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอ์รชาต่อน้ำหนักตัวไก่

การคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอ์รชา (bursa to body weight ratios) (Lucio and Hitchner, 1979) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{bursa to body weight ratio} = (\text{bursa weight} / \text{body weight}) \times 1000$$

3.4 การเตรียมเชื้อไวรัส เบอ์รชากักเสบติดต่อ สำหรับเชื้อพิษ

ใช้เชื้อไวรัสเบอ์รชากักเสบติดต่อ ซีพียู 1 (vvIBD-CU-1) ซึ่งแยกได้จากพื้นที่ในประเทศไทย มีระดับความรุนแรงมาก (very virulent IBDV) (Sasipreeyajan, 2004) ความเข้มข้น 4×10^5 EID₅₀/ตัว ขนาด 300 μ l/dose ซึ่งสามารถทำให้เกิดรอยโรคแสดงอาการป่วยและตายใน 10 วัน

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราส่วนการตรวจพบเชื้อไวรัสด้วย Chi's square test และรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาและจุลพยาธิวิทยาด้วย Mann-whitney U test และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างกลุ่มของระดับไตเตอร์ ค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ ด้วย ANOVA และ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.6 ผลการทดลอง

3.6.1 อัตราการตาย (mortality rate)

ไม่พบการตายในไก่ทุกกลุ่มการทดลอง

3.6.2 แอนติบอดีไตเตอร์ต่อไวรัสไอบีดี (antibody titers against IBDV)

จากการทดลองนี้พบว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในลูกไก่ทุกกลุ่มมีค่าน้อยกว่า 500 ในวันที่ 14 ของการทดลองและไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 21 ของการทดลองเป็นต้นไป นอกจากนี้พบว่าในไก่ที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่มยังไม่มี การตอบสนองของวัคซีนในวันที่ 21 หรือ 28 จากการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่อายุ 1 วัน

3.6.3 ค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ (bursa to body weight ratio)

ค่าอัตราส่วนต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ ใช้ในการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของต่อมเบอริซา ในด้านของขนาดที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเทียบกับน้ำหนักตัวไก่จากการทดลองนี้ในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราส่วนต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่อระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอิม มูล คอมเพล็กซ์ และไม่ได้รับวัคซีนรายสัปดาห์

Group	Mean bursa/body weight ratios \pm SD			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Vaccine	1.67 \pm 0.60 n=5	1.63 \pm 0.22 n=5	2.19 \pm 0.55 n=10	2.15 \pm 0.45 n=10
None vac.	1.59 \pm 0.29 n=5	1.83 \pm 0.36 n=5	1.72 \pm 0.30 n=10	2.34 \pm 0.53 n=10

หลังจากให้เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 อัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่อของ กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มไม่ได้รับวัคซีนอิมมูมคอมเพล็กซ์ (กลุ่มที่ 1A เทียบกับ กลุ่มที่ 2A และ กลุ่มที่ 1B เทียบกับ กลุ่มที่ 2B) ที่ 4 และ 10 วันหลังจากให้เชื้อ vIBDV (DPI) ไม่มีความแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่อที่ 4 DPI หลังจากได้รับการป้อนเชื้อไวรัสอิมมูมคอมเพล็กซ์ vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน ในไก่อกลุ่มที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A) มีค่าสูงกว่าไก่อที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 2A) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2, ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่อในแต่ละกลุ่มเมื่อ ได้รับการป้อน เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน

Group	Mean bursa/body weight ratios \pm SD		
	Day 21*, 0 DPI**	Day 25, 4 DPI	Day 31, 10 DPI
1A	2.19 \pm 0.55	1.82 \pm 0.48 ^b	0.56 \pm 0.19 ^a
lcx vaccine	n=10	n=10	n=10
2A		1.26 \pm 0.39 ^a	0.56 \pm 0.18 ^a
Positive Ctr.		n=10	n=10
3A	1.72 \pm 0.30	1.77 \pm 0.28 ^b	1.47 \pm 0.46 ^b
Negative Ctr.	n=10	n=10	n=10

^{a,b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริซาต่อน้ำหนักตัวไก่ในแต่ละกลุ่มเมื่อได้รับการป้อน เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน

Group	Mean bursa/body weight ratios \pm SD		
	Day 28*, 0 DPI**	Day 32, 4 DPI	Day 38, 10 DPI
1B	2.16 \pm 0.46	1.41 \pm 0.62	0.45 \pm 0.05 ^a
Icx vaccine	n=10	n=10	n=10
2B		1.66 \pm 0.65	0.60 \pm 0.17 ^a
Positive Ctr.		n=10	n=10
3B	2.35 \pm 0.53	1.35 \pm 0.52	1.16 \pm 0.38 ^b
Negative Ctr.	n=10	n=10	n=10

^{a,b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

3.6.4 รอยโรคทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอริซา (gross and histopathological lesion scores of bursa)

ผลการทดลองให้เชื้อไวรัสในไก่อายุ 21 วัน พบว่าต่อมเบอริซาหลังจากได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ณ วันที่ 4 DPI ในไก่ที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A) และไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 2A) มีอัตราส่วนของการพบวุ้นที่ต่อมเบอริซา 9/10 และ 10/10 ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีความแตกต่างจากไก่กลุ่มควบคุมลบ (กลุ่มที่ 3A) (0/10) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4)

ผลการทดลองให้เชื้อไวรัสในไก่อายุ 28 วัน การพบวุ้นที่ต่อมเบอริซาหลังจากได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ณ วันที่ 4 DPI ในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1B) และไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน

(กลุ่มที่ 2B) มีอัตราส่วนของการพบวุ้นที่ต่อมเบอริชา 8/10 และ 9/10 ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากไก่ควบคุมลบ (กลุ่มที่ 3B) (0/10) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอริชาในไก่ที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A เทียบกับ กลุ่มที่ 2A และ กลุ่มที่ 1B เทียบกับกลุ่มที่ 2B) ที่ 4 DPI และ 10 DPI มีคะแนนรอยโรคไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่สามารถป้องกันความเสียหายของต่อมเบอริชาจากเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ทั้งในทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา

ตารางที่ 4 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวนไก่ที่พบวุ้นที่ต่อมเบอริชาเมื่อได้รับการป้องกันเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน

Group	Mean histopathological lesion score \pm SD			Gelatinous on bursa
	Day 21, 0 DPI**	Day 25, 4 DPI	Day 31, 10 DPI	
1A Icx vaccine	0 (n=10)	4.2 \pm 0.84 ^a (n=5)	4.1 \pm 0.57 ^a (n=10)	9/10 ^a
2A Positive Ctr.	0 (n=10)	4.6 \pm 0.55 ^a (n=5)	4.4 \pm 0.52 ^a (n=10)	10/10 ^a
3A Negative Ctr.		0 ^b (n=5)	0 ^b (n=10)	0/10 ^b

^{a,b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 5 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวนไก่ที่พบวุ้นที่ต่อมเบอร์ซาเมื่อได้รับการ
ป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน

Group	Mean histopathological lesion score \pm SD			Gelatinous on bursa
	Day 28*, 0 DPI**	Day 32, 4 DPI	Day 38, 10 DPI	
1B Icx vaccine	0.2 \pm 0.63 (n=10)	4.4 \pm 0.52 ^a (n=10)	4.2 \pm 0.82 ^a (n=10)	8/10 ^a
2B Positive Ctr.	0.1 \pm 0.31 (n=10)	4.4 \pm 0.53 ^a (n=9)	4.6 \pm 0.52 ^a (n=10)	9/10 ^a
3B Negative Ctr.		0.2 \pm 0.63 ^b (n=10)	0 ^b (n=10)	0/10 ^b

^{a,b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

3.6.5 การตรวจพบเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 โดยวิธี RT-PCR

จากการตรวจสอบสารพันธุกรรมในอวัยวะน้ำเหลืองทั้งสามชนิดได้แก่ ต่อมเบอร์ซา ม้าม และ ไทมัส ในไก่ที่ได้รับวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ซึ่งสามารถแยกจากเชื้อไวรัสไอบีดี (vIBD-CU-1) ได้ด้วยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) นั้นพบว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไอบีดีจากวัคซีนได้ในไก่อายุ 7 วันและ 14 วันในอวัยวะน้ำเหลืองทั้งสามชนิดและเชื้อไวรัสจากวัคซีน สามารถตรวจพบได้เล็กน้อยหลังจากวันที่ 14 ถึงวันที่ 32 ของอายุไก่ (ตารางที่ 6) หลังจากไก่ได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 แล้ว 4 วันพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจาก vIBDV-CU1 ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งในไก่ที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A และกลุ่มที่ 1B) และไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 2A และ กลุ่มที่ 2B) (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ได้นอกจากนี้ยังพบว่าในไก่ตัวที่ตรวจพบเชื้อไวรัสจากวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ได้ในตัวเดียวกันและอวัยวะเดียวกันดังแสดงในต่อมเบอร์ซาไก่กลุ่ม 1B วันที่ 32 ของอายุไก่ในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 การตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ ใน ต่อมเบอริซา ม้าม และไทมัส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่างระหว่างไถ่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนและไม่ได้รับวัคซีน

Group	RT-PCR virus detection			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Vaccine	5, 4, 5	5, 5, 5	0, 0, 0	0, 0, 1
None vaccine	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0

ตารางที่ 7 การตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ และเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์รุนแรงชนิด wIBDV-CU1 ใน ต่อมเบอริซา ม้าม และไทมัส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง เมื่อป้อนเชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน

Group	RT-PCR virus detection		
	Day 21*, 0 DPI**	Day 25, 4 DPI	Day 31, 10 DPI
1A (Icx vaccine)	0,0,0 ^A / 0,0,0 ^B	1,0,0 / 5,0,0	0,0,0 / 0,0,0
2A (Pos. Ctr.)		0,0,0 / 5,0,0	0,0,0 / 0,0,0
3A (Neg. Ctr.)	0,0,0 / 0,0,0	0,0,0 / 0,0,0	0,0,0 / 0,0,0

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

^A ; ผลตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัส IBVD สายพันธุ์ 2512

^B ; ผลตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัส wIBD สายพันธุ์ CU-1

ตารางที่ 8 แสดงการตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์ 2512 จากวัคซีนภูมิคุ้มกันคอมเพล็กซ์ และเชื้อไวรัสไอบีดีสายพันธุ์รุนแรงชนิด vIBDV-CU1 ใน ต่อมเบอริชชา ม้าม และ ไทมัส ตามลำดับจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง เมื่อป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน

Group	RT-PCR virus detection		
	Day 28*, 0 DPI**	Day 32, 4 DPI	Day 38, 10 DPI
1B (Icx vaccine)	0,0,1 ^A / 0,0,0 ^B	2,0,0 / 4,0,0	0,0,0 / 0,0,0
2B (Pos. Ctr.)		0,0,0 / 5,0,0	0,0,0 / 0,0,0
3B (Neg. Ctr.)	0,0,0 / 0,0,0	0,0,0 / 0,0,0	0,0,0 / 0,0,0

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

^A ; ผลตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัส IBDV สายพันธุ์ 2512

^B ; ผลตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัส IBDV สายพันธุ์ CU1

3.6.6 น้ำหนักตัวไก่และอัตราการแลกเนื้อ (body weight and feed conversion ratio; FCR)

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน และกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A เทียบกับ 2A และกลุ่มที่ 1B เทียบกับ 2B) แสดงในตารางที่ 9 และตารางที่ 10 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 4 DPI และ 10 DPI ค่าอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ของไก่ที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1A) และกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 2A) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นค่า อัตราการแลกเนื้อ (FCR) ของไก่ที่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 1B) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน (กลุ่มที่ 2B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและอัตราการแลกเนื้อของไก่แต่ละกลุ่มเมื่อได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน

Group	Mean body weight \pm SD (gram/bird)			FCR 21-31
	Day 21*, 0 DPI**	Day 25, 4 DPI	Day 31, 10 DPI	
1A Icx Vaccine	698.57 \pm 15.90 n=21	914.76 \pm 38.68 ^a n=21	1300.91 \pm 54.67 n=11	1.71 \pm 0.03
2A Positive Ctr.	700.48 \pm 31.38 n=21	941.90 \pm 52.12 ^b n=21	1312.73 \pm 61.98 n=11	1.63 \pm 0.05
3A Negative Ctr.	700.48 \pm 36.94 n=21	948.10 \pm 44.90 ^b n=21	1348.18 \pm 71.95 n=11	1.66 \pm 0.13

^{a b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับเชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและอัตราการแลกเนื้อของไก่แต่ละกลุ่มเมื่อได้รับเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน

Group	Mean body weight \pm SD (gram/bird)			FCR 28-38
	Day 28*, 0 DPI**	Day 32, 4 DPI	Day 38, 10 DPI	
1B Icx Vaccine	921.43 \pm 40.04 n=21	1221.90 \pm 47.92 ^{ab} n=21	1337.27 \pm 51.79 ^a n=11	2.16 \pm 0.14 ^b
2B Positive Ctr.	921.43 \pm 37.32 n=21	1249.52 \pm 92.11 ^{bc} n=21	1426.36 \pm 148.95 ^b n=11	1.80 \pm 0.10 ^a
3B Negative Ctr.	919.52 \pm 37.48 n=21	1290.95 \pm 74.63 ^c n=21	1563.64 \pm 55.73 ^c n=11	1.67 \pm 0.16 ^a

^{a b c}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ; ได้รับเชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

3.7 วิจัยและสรุปผล

จากการทดลองนี้พบว่าระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในลูกไก่ทุกกลุ่มมีค่าน้อยกว่า 500 ในวันที่ 14 ของการทดลองและไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 21 ของการทดลองเป็นต้นไป นอกจากนี้พบว่าในไก่ที่ได้รับวัคซีนทุกกลุ่มยังไม่พบระดับแอนติบอดีต่อโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อกันในวันที่ 21 หรือ 28 หลังการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่อายุ 1 วัน แสดงให้เห็นว่าบทบาทในการป้องกันโรคจากภูมิคุ้มกันชนิดพั้งเซลล์อาจมีความสำคัญในการป้องกันโรคจากการให้เชื้อพิษไวรัส wIBDV-CU1 ในวันที่ 21 หรือ 28 ซึ่งควรต้องทำการศึกษาต่อไป ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chansiripornchai and Sasipreeyajan (2005; 2007; 2009) ซึ่งไม่พบการตอบสนองของแอนติบอดีไโตเตอร์จากการได้รับวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในช่วงเวลาดังกล่าวเช่นกัน ในด้านผลกระทบต่อต่อมเบอร์ซาจากวัคซีน ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นดังตารางที่ 3 พบว่าวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่มีผลกระทบต่ออัตราส่วนต่อมเบอร์ซาต่อน้ำหนัก ตัวไก่ รวมถึงในส่วนของคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอร์ซาในไก่ก่อนให้เชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ระหว่างไก่ที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์และไม่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์มีคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของต่อมเบอร์ซาไม่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่มีผลต่อการก่อความเสียหายต่อต่อมเบอร์ซา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงขนาดของต่อมเบอร์ซาต่อน้ำหนักตัวไก่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chansiripornchai and Sasipreeyajan (2009) และ Kumar (2001)

ในด้านของความปลอดภัยของวัคซีน เมื่อเปรียบเทียบความเสียหายของต่อมเบอร์ซาจากวัคซีนชนิดนี้ พบว่าการจับกันของแอนติบอดีกับไวรัสวัคซีนในรูปของอิมมูโนคอมเพล็กซ์ช่วยลดความเสียหายของต่อมเบอร์ซาจากไวรัสวัคซีนได้ นอกจากนี้วัคซีนชนิดนี้ไม่มีผลรบกวนประสิทธิภาพจากการได้รับวัคซีนอื่น เช่น วัคซีนนิวคาสเซิล วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน (infectious bronchitis) จากผลของความเสียหายของต่อมเบอร์ซาจากไวรัสวัคซีน (Kelemen et al., 2000) ซึ่งแตกต่างจากวัคซีนไอบีดีเชื้อเป็นชนิดปกติเมื่อให้ที่ระยะเวลาเดียวกัน ในด้านประสิทธิภาพในการป้องกันความเสียหายที่ต่อมเบอร์ซาจากวัคซีน พบว่าจากการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่เนื้อ หลังจากให้เชื้อไวรัส wIBDV-CU1 ในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน สามารถเกิดความเสียหายจากการได้รับวัคซีนได้ทั้งทางมหาพยาธิวิทยา (การเกิดวุ้นที่ต่อมเบอร์ซา) และทางจุลพยาธิวิทยา (คะแนนรอยโรคของต่อมเบอร์ซาจากความเสียหายของเซลล์พอลลิเคิล) ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่

สามารถช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับต่อมเบอริชา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chansiripornchai and Sasipreeyajan (2009) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส vVIBD สายพันธุ์ CU-1 ในระดับที่ให้ตามเอกสารฉบับนี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อต่อมเบอริชาหลังจากให้เชื้อไปแล้ว 10 วันแม้ว่าไก่กลุ่มนั้นจะได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ ในส่วนของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากวัคซีน (IBDV 2512) และไวรัสจากการทดสอบเชื้อ (vVIBD CU-1) พบว่าวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์สามารถแพร่กระจายไปที่อวัยวะน้ำเหลืองอื่นๆ ได้แก่ ต่อมเบอริชา ม้าม และไทมัส โดยสามารถตรวจพบได้ในวันที่ 7 และ 14 ของอายุไก่จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการการศึกษาอื่นที่พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสจากวัคซีนได้ตั้งแต่วันที่ 5-15 หลังจากการได้รับวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ (Jeurissen et al., 1998; Corley et al., 2001; Ivan et al., 2005) นอกจากนี้ในไก่ที่ตรวจพบวัคซีนในต่อมเบอริชา ยังคงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่ใช้ในการให้เชื้อพิษ vVIBD CU-1 ได้ในอวัยวะเดียวกันแสดงให้เห็นว่าต่อมเบอริชาสามารถติดเชื้อไวรัสไอบีดีได้มากกว่า 1 ชนิดรวมถึงสายพันธุ์จากวัคซีน

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ต่อโรคต่อมเบอริชาอีกเสบติดต่อกันไม่ช่วยในการป้องกันความเสียหายของต่อมเบอริชาจากการติดเชื้อไวรัสไอบีดีชนิด vVIBDV CU-1 และสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของไวรัสจากวัคซีนได้ตั้งแต่วันที่ 7-14 หลังจากไก่ได้รับวัคซีน ในอวัยวะน้ำเหลืองทั้งสามชนิดคือ ต่อมเบอริชา ม้าม และต่อมไทมัส

บทที่ 4

การทดลองที่ 2

การศึกษา การตอบสนองของเซลล์ ลิมโฟไซต์ชนิด T helper cell lymphocyte ต่อการ
ได้รับวัคซีน โรคเบอร์ซาลักเสบติดต่อ ชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ในไก่เนื้อ

4.1 สัตว์ทดลอง

ไก่เนื้อ อายุ 22 วัน เพศเมีย จำนวน 25 ตัว เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ ลิมโฟไซต์
ชนิด helper T lymphocyte ต่อการได้รับวัคซีน โรคเบอร์ซาลักเสบติดต่อ ชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์
ในไก่เนื้อ

4.2 วัคซีนในการทดลอง

วัคซีนในการทดลองนี้ประกอบด้วย วัคซีนเชื้อเป็นไอบีดี (IBD Blen[®]) ให้โดยการป้อน 30
µl/dose และวัคซีนไอบีดีชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ (Transmune[®]) ให้ด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง
ปริมาตร 0.1 ml บริเวณคอ โดยวัคซีนทั้งสองชนิดประกอบด้วยเชื้อไวรัสไอบีดีชนิด w 2512 ระดับ
ความรุนแรงมาก (intermediate plus) ความเข้มข้น 10^2 EID₅₀/dose

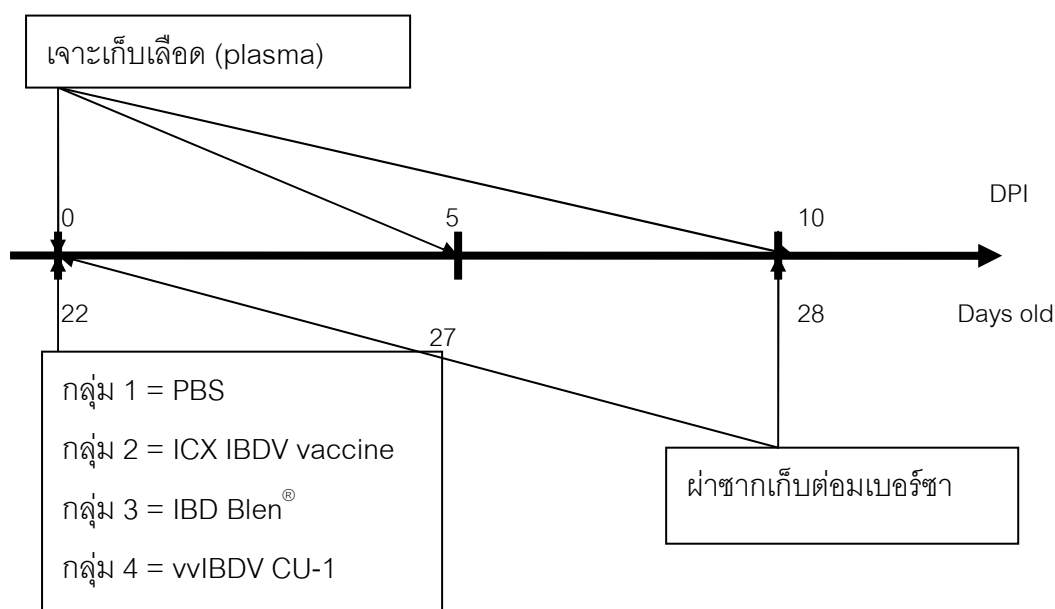
4.3 การเตรียมเชื้อไวรัส เบอร์ซาลักเสบติดต่อ สำหรับเชื้อพิษ

ใช้เชื้อไวรัสเบอร์ซาลักเสบติดต่อ ซียู 1 (vvIBD-CU-1) ซึ่งแยกได้จากพื้นที่ในประเทศไทย
มีระดับความรุนแรงมาก (very virulent IBDV) (Sasipreeyajan, 2004) ความเข้มข้น 4×10^5
EID₅₀/ตัว ขนาด 300 µl/dose ซึ่งสามารถทำให้เกิดรอยโรคแสดงอาการป่วยและตายใน 10 วัน

4.4 วิธีการทดลอง

ไก่เนื้อ อายุ 22 วัน เพศเมีย จำนวน 25 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 5 ตัว ทำการผ่าซาก
เก็บอวัยวะต่อมเบอรัซาลักเสบติดต่อของเชื้อไวรัส IBDV ก่อนเริ่มการทดลองสุ่มไก่
จำนวน 5 ตัวหรือที่ 0 DPI จากนั้นแบ่งไก่ออกเป็น 4 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 ไก่เนื้ออายุ 22 วันจำนวน 5
ตัว ให้สารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) ด้วยการป้อนปาก จัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มที่ 2 ไก่เนื้ออายุ
22 วันจำนวน 5 ตัว ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ ทางใต้ผิวหนังบริเวณคอ จัดเป็นกลุ่มทดสอบ

วัคซีนชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ กลุ่มที่ 3 ไก่เนื้ออายุ 22 วัน จำนวน 5 ตัว ได้รับความเชื้อเป็น (IBD Blen[®]) ด้วยการป้อนจัดเป็นกลุ่มทดสอบวัคซีนชนิดเชื้อเป็น กลุ่มที่ 4 ไก่เนื้ออายุ 22 วัน จำนวน 5 ตัว ให้เชื้อไวรัสชนิด vvIBDV-CU1 ด้วยการป้อนจัดเป็นกลุ่มควบคุมบวก ทำการชั่งน้ำหนักตัวไก่ทุกตัวทุกกลุ่ม และวัดอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักต่อมเบอร์ชาต่อน้ำหนักตัวไก่และ ผ่าซาก วันที่ 0 และ วันที่ 10 ของการทดลอง และตรวจหาสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไอบีดีและเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาสัดส่วนประชากรของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ในวันที่ 0, 5 และ 10 ของการทดลอง แสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 5



รูปที่ 5 แผนการดำเนินงานทดลองที่ 2

ตารางที่ 11 การแบ่งกลุ่มการทดลองที่สอง

กลุ่ม	สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ไก่ได้รับ	การเก็บตัวอย่างจาก เลือด	เก็บต่อมเบอ์ชา
กลุ่มที่ 1 (n=5)	สารละลายบัพเฟอ์	วันที่ 0, 5 และ 10 ของ การทดลอง	วันที่ 0 และ 10 ของการ ทดลอง
กลุ่มที่ 2 (n=5)	วัคซีนอิมมุนคอม เพิ้ลท์	วันที่ 0, 5 และ 10 ของ การทดลอง	วันที่ 0 และ 10 ของการ ทดลอง
กลุ่มที่ 3 (n=5)	วัคซีนเชื้อเป็น (IBD Blen [®])	วันที่ 0, 5 และ 10 ของ การทดลอง	วันที่ 0 และ 10 ของการ ทดลอง
กลุ่มที่ 4 (n=5)	เชื้อไวรัส wIBDV- CU1	วันที่ 0, 5 และ 10 ของ การทดลอง	วันที่ 0 และ 10 ของการ ทดลอง

4.5 วิธีทางห้องปฏิบัติการ

4.5.1 ตรวจสอบสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อและการแยกชนิดสารพันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธี RFLP

ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.2 และ 3.3.3

4.5.2 การคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอ์ชาต่อน้ำหนักตัวไก่ (Bursa to body weight ratio)

การปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.5

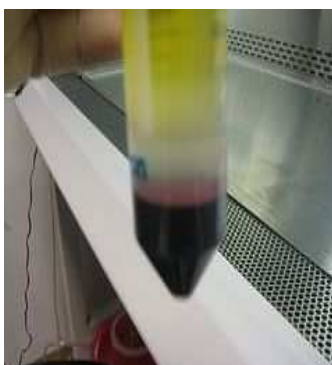
4.5.3 การตรวจทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์ โดยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (flow cytometer)

4.5.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด (blood collection)

เลือดทั้งหมดถูกเก็บจากหลอดเลือดดำที่ปีกของไก่ (brachial vein) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร โดยใส่สารกันเลือดแข็งตัว alsever's solution ในอัตราส่วนสารกันเลือดแข็งต่อปริมาตรเลือด 1 : 1 โดยตัวอย่างเลือดจะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมง

4.5.3.2 การแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte isolation)

นำตัวอย่างเลือดในแต่ละตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) ที่มี BSA 1% เป็นส่วนประกอบในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นเทเลือดปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงบนสารละลาย ficoll ซึ่งมีความถ่วงจำเพาะ 1.077 (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว $800 \times g$ นาน 30 นาทีซึ่งจะเกิดการแยกชั้นของเม็ดเลือด พลาสมา และ ชั้นบางๆของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ตรงกลาง ดังแสดงในรูปที่ 6 ให้ใช้ปิเปตดูดชั้นดังกล่าวจนหมดและนำไปปั่นล้างอีกครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) 4 มิลลิลิตรที่ $400 \times g$ นาน 7 นาทีหลังจากปั่นล้างครั้งสุดท้ายเก็บตะกอนที่ได้มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) ที่มี BSA 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปนับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยแผ่นสไลด์นับเม็ดเลือด (Neubauer counting chamber; Hausser Scientific, Blue Bell, Pennsylvania, USA)



รูปที่ 6 การแยกชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte)

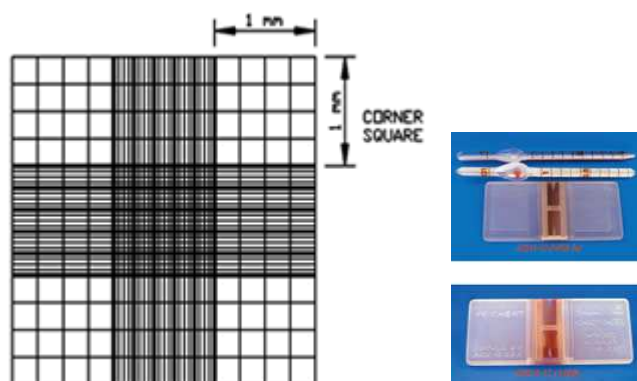
4.5.3.3 การย้อมเซลล์มีชีวิตด้วยสีย้อม trypan blue (test of cell viability)

ใช้สี trypan blue 0.4% ต่อสารละลาย PBS ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาทีและทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะย้อมไม่ติดสีด้วย Hemocytometer (Neubauer counting chamber) ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 95%

4.5.3.4 การนับเม็ดเลือดด้วย Hemocytometer และการคำนวณหาความเข้มข้น

ถ้าเซลล์เม็ดเลือดขาวตกตะกอนควรเขย่าให้เข้ากันก่อน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ย้อมสีแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตรนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และนับเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีทั้งสี่มุมของตารางในสไลด์นับเม็ดเลือด ดังรูปที่ 7 โดยความเข้มข้นของเซลล์ที่นับได้จะมีค่าดังแสดงในสูตรนี้

$$\begin{aligned} \text{Cell Concentration} &= \text{Dilution} \times (\text{จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีชีวิตที่นับได้ใน 4 ช่อง} / 4.0) \times 10^4 \\ &= \text{___ cell / ml} \end{aligned}$$



ที่มา: Neubauer counting chamber; Hausser Scientific, Blue Bell, Pennsylvania, USA

รูปที่ 7 เครื่อง hemocytometer และตำแหน่งในการนับเซลล์ลิมโฟไซต์

สารแอนติบอดีต่อผิวเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4 และ CD3 ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังนี้

1. mouse anti-chicken CD4-R-PE
2. mouse anti-chicken CD3-FITC

(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, USA)

4.5.3.5 วิธีการย้อมสีเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย สารแอนติบอดีจำเพาะติดสีเรืองแสง (Dual staining CD4 R-PE and CD3 FITC)

เตรียมเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ความเข้มข้น 1 ล้านเซลล์/มล. ปริมาณ 1 มล. ย้อมด้วยสารแอนติบอดีทั้งสองชนิดดังแสดงข้างต้นในอัตราส่วนตามบริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีในที่มีดหลังจากนั้นนำไปปั่นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) ที่ 400 x g นาน 7 นาที ตะกอนที่ได้นำไปเติม ddH₂O (deionized water) 2 มล. เพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดงที่อาจเหลืออยู่ปั่นเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มีดหลังจากนั้นปั่นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อีก 1 ครั้ง ที่ 400 x g นาน 7 นาทีและเก็บตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือเติม 2% paraformaldehyde เก็บไว้ที่ 4 °C ในที่มีด รอทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (flow cytometry machine) โดยนำตัวอย่างเข้าตรวจวิเคราะห์ในวันถัดมาไม่เกิน 24 ชั่วโมงหลังจากย้อมเซลล์

4.5.3.6 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (Flow cytometer)

วิเคราะห์ด้วยแสง อาร์กอนความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร โดยแสงสีเขียวของฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) จากสารเรืองแสงชนิด FITC ตรวจจับด้วย FL1 channel (530/30 nm band pass filter) และ แสงสีส้มจากสารเรืองแสงชนิด R-PE ตรวจจับด้วย FL2 channel (585/ 42 nm band pass filter) เซลล์ทั้งหมดในแต่ละตัวอย่างจะถูกนับด้วยเครื่องทั้งสิ้น 20,000 – 100,000 เซลล์

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติของอัตราส่วนการตรวจพบเชื้อไวรัสด้วย Chi's square test และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างกลุ่มของค่าอัตราส่วนน้ำหนักรวมเบอริชชาต่อน้ำหนักตัวไก่ และประชากรลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ด้วย ANOVA และ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4.7 ผลการทดลอง

4.7.1 ตรวจหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อของต่อมเบอร์ด้า และการแยกชนิดสารพันธุกรรม DNA ที่ได้จาก RT-PCR โดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไอบีดี ในกลุ่มต่างๆที่ได้แสดงผลในตารางที่ 12 พบว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับ วัคซีนชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์ วัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) และเชื้อไวรัส wIBD-CU1 สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไอบีดีด้วยวิธี RT-PCR แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสจาก สเตรน wIBD-CU1 และเชื้อไวรัสจากวัคซีนสเตรน IBD 2512 ได้เข้าไปเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อของต่อมเบอร์ด้า นอกจากนี้เมื่อนำสารพันธุกรรมดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbol* และ *BstNI* สามารถยืนยันว่าเชื้อไวรัสไอบีดีจากวัคซีนเชื้อเป็น อิมมูโนคอมเพล็กซ์ และเชื้อไวรัส wIBD-CU1 ไม่มีการแพร่กระจายข้ามกลุ่มการทดลอง จากตารางที่ 12 ที่ 0 DPI ก่อนการให้วัคซีนไอบีดีหรือเชื้อไวรัสไอบีดี wIBD-CU1 พบว่าตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไอบีดี แสดงให้เห็นว่าไก่เนื้อที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ไม่เคยผ่านการสัมผัสเชื้อไวรัสหรือวัคซีนไอบีดีมาก่อน ในวันที่ 10 หลังจากให้เชื้อไวรัสจากวัคซีนไอบีดี IBD 2512 หรือไวรัสไอบีดี wIBD-CU1 พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไอบีดีดังได้แสดงในตารางที่ 12 ซึ่งเมื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมที่พบโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสไอบีดีข้ามกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 12 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัส IBDV

Group	RT-PCR virus detection	
	0 DPI	10 DPI
Gr. 1 negative control		0/5 ^a
Gr. 2 IBD Transmune [®]		4/5 ^b
Gr. 3 IBD BLEN [®]	0/5 ^A	5/5 ^b
Gr. 4 wIBDV CU-1		5/5 ^b

^A; จำนวนไก่ที่ตรวจพบสารพันธุกรรม/จำนวนไก่ที่ตรวจทั้งหมด

^{a,b}; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.7.2 ค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่ (bursa to body weight ratio)

ผลการคำนวณค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก้แสดงในตารางที่ 13 โดยไก่ที่ได้รับวัคซีนทั้งสองชนิดคือ อิมมูโนคอมเพล็กซ์วัคซีน และวัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) มีค่าอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัคซีนทั้งสองชนิดไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของต่อมเบอริชาเมื่อได้รับวัคซีนไปแล้วเป็นเวลา 10 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวกซึ่งได้รับเชื้อไวรัสไอบีดีชนิด vvIBD-CU1 มีอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก้ต่ำกว่า กลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นถึงผลของเชื้อไวรัสไอบีดีชนิด vvIBD-CU1 ที่ส่งผลต่อต่อมเบอริชาให้มีขนาดเล็กลงหลังจากติดเชื้อไวรัสแล้ว 10 วัน

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่

Group	Mean bursa/body weight ratios \pm SD	
	0 DPI	10 DPI
Gr. 1 negative control		1.77 \pm 0.24 ^b (n=5)
Gr. 2 IBD Transmune [®]	2.34 \pm 0.22 (n=5)	1.70 \pm 0.57 ^b (n=5)
Gr. 3 IBD BLEN [®]	(n=5)	1.26 \pm 0.59 ^{ab} (n=5)
Gr. 4 vvIBDV CU-1		0.67 \pm 0.32 ^a (n=5)

^{a,b}; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.7.3 ผลการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดพียงเซลล์ โดยวิธี Flow Cytometry

จากการศึกษาปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ในกระแสเลือดของไก่ ซึ่งมีการแสดงออกของผิวเซลล์ชนิด CD4⁺ CD3⁺ ต่ออัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T lymphocyte cell ทั้งหมดซึ่งแสดงออกของผิวเซลล์ชนิด CD3⁺ ในวันที่ 5 และ 10 หลังจากให้วัคซีนทั้งสองชนิด และเชื้อไวรัสไอบีดีในแต่ละกลุ่มทดลองแสดงดังตารางที่ 14 โดยพบว่าก่อนการได้รับวัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีที่ 0 วันไก่ในทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 5 หลังจากได้รับวัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่าไก่แต่ละกลุ่มมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ ชนิด helper T lymphocyte ไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นกันและในวันที่ 10 หลังจากได้รับวัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่าไก่ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 หรือ กลุ่มควบคุมลบ กลุ่มให้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ และ กลุ่มให้วัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) ตามลำดับมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ ชนิด helper T lymphocyte ไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวกซึ่งให้เชื้อไวรัส vvIBDV-CU1 มีอัตราส่วนปริมาณ helper T lymphocyte สูงขึ้นมากกว่ากลุ่มอื่นๆโดยสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด helper T lymphocyte ต่อทีลิมโฟไซต์เซลล์

Group	Mean number of helper T lymphocyte (CD4 ⁺ CD3 ⁺)/CD3 ⁺ ± SD		
	0 DPI	5 DPI	10 DPI
Gr. 1 (Negative ctr)	51.12 ± 16.39 (n=5)	48.41 ± 10.13 (n=5)	47.22 ± 7.15 ^{ab} (n=5)
Gr. 2 (Transmune [®])	42.94 ± 10.16 (n=5)	36.61 ± 9.67 (n=5)	39.66 ± 7.08 ^a (n=5)
Gr. 3 (IBD BLEN [®])	54.63 ± 19.83 (n=5)	39.40 ± 8.36 (n=5)	42.65 ± 8.26 ^{ab} (n=5)
Gr. 4 (vvIBDV-CU1)	44.41 ± 13.88 (n=5)	42.94 ± 15.88 (n=4)	52.85 ± 7.94 ^b (n=5)

^{a,b}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.7.4 ผลของน้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม

จากการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวไก่ในวันที่ 0 และ 10 วันหลังจากได้รับวัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีซึ่งแสดงดังตารางที่ 15 โดยพบว่าก่อนได้รับวัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีไก่ในแต่ละกลุ่มการทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวไก่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากได้รับ วัคซีนหรือให้เชื้อไวรัสไอบีดีที่ 10 วันพบว่าไก่ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 หรือกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มให้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ และ กลุ่มให้วัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) ตามลำดับมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ไก่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไก่ในกลุ่มที่ 4 หรือกลุ่มควบคุมบวกซึ่งให้เชื้อไวรัส wIBDV-CU1 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มให้วัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®])

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวไก่

Group	Mean body weight \pm SD (gram/bird)	
	0 วัน	10 วัน
Gr. 1 negative control	1228.00 \pm 19.24 (n=5)	2044.00 \pm 179.80 ^b (n=5)
Gr. 2 IBD Transmune [®]	1228.00 \pm 19.24 (n=5)	2030.00 \pm 90.00 ^b (n=5)
Gr. 3 IBD BLEN [®]	1228.00 \pm 32.71 (n=5)	1948.00 \pm 153.52 ^{ab} (n=5)
Gr. 4 wIBDV CU-1	1228.00 \pm 23.87 (n=5)	1800.00 \pm 47.43 ^a (n=5)

^{ab}: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.8 วิจัยและสรุปผล

จากการศึกษานี้พบว่าวัคซีนไอบีดีทีทั้งชนิด อิมมูโนคอมเพล็กซ์ และวัคซีนชนิดเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) ไม่ส่งผลต่อขนาดต่อมเบอริชาในไก่ที่ได้รับวัคซีนเมื่อเทียบกับไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนโดยพบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีน อิมมูโนคอมเพล็กซ์ มีแนวโน้มขนาดของต่อมเบอริชาใหญ่กว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น (IBD BLEN[®]) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังสังเกตได้จากค่าอัตราส่วนของต่อมเบอริชาต่อน้ำหนัก ตัวไก่ใน ตารางที่ 9 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ Chansiripornchai และ Sasipreeyajan (2005, 2007 และ 2009) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลของวัคซีนไอบีดีต่อการกดภูมิคุ้มกันต่อการได้รับวัคซีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนชนิดอิมมูโนคอมเพล็กซ์จะไม่ส่งผลกระทบต่อขนาดของต่อมเบอริชาอื่นจากความเสียหายของต่อมเบอริชาซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างแอนติบอดีเนื่องจากมี B lymphocyte อยู่เป็นจำนวนมากในขณะที่วัคซีนเชื้อเป็นส่งผลกระทบต่อขนาดของต่อมเบอริชาอื่น ๆ มากกว่าจากผลความเสียหายของต่อมเบอริชาที่มากกว่า (Kelemen et al., 2000)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนทั้งชนิด อิมมูโนคอมเพล็กซ์ วัคซีนชนิดเชื้อเป็น หรือการให้เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ต่อประชากรลิมโฟไซต์ชนิด T cell ในส่วนของ T helper cell lymphocyte ในกระแสเลือดพบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณลิมโฟไซต์ชนิด helper T cell ดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ที่พบว่าเชื้อไวรัสไอบีดีไม่ส่งผลกระทบต่อประชากร T cell (Corley and Giambrone, 2002) ในกระแสเลือดและในม้าม จากการทดลองนี้ไก่ในกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัส vIBDV-CU1 มีอัตราส่วนประชากรลิมโฟไซต์ชนิด T cell ในส่วนของ T helper cell lymphocyte ในกระแสเลือดสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่นในวันที่ 10 ของการทดลอง (ตารางที่ 14) เนื่องจากไก่ในกลุ่มดังกล่าวได้รับเชื้อไวรัสไอบีดีชนิด vIBDV CU-1 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายของต่อมเบอริชามากกว่ากลุ่มอื่นจากหลักฐานของอัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่ ส่งผลให้มีการเคลื่อนเข้ามาของเซลล์ T lymphocyte จากต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ เข้าสู่กระแสเลือดและแทรกในเนื้อเยื่อของต่อมเบอริชาและก่อให้เกิดความเสียหายของต่อมเบอริชามากขึ้นตามปริมาณของทีลิมโฟไซต์ที่เข้าแทรก (T lymphocyte infiltration) (Rautenschlein et al., 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sharma และคณะ (2000) พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสไอบีดีชนิดรุนแรง พบว่าต่อมเบอริชาของไก่สามารถตรวจพบการเคลื่อนของ T helper cell lymphocyte เข้ามาจาก 7.2% เป็น 47.8 % ในวันที่ 7 หลังจากติดเชื้อไวรัส จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนอิมมูโนคอม

เพ็ล็กซ์ ไม่ส่งผลต่อปริมาณประชากรของ T helper cell lymphocyte สอดคล้องกับขนาดของต่อมเบอริชาที่ไม่ได้รับผลกระทบจากการได้รับวัคซีนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส vVIBD CU-1

สรุปได้ว่าการศึกษานี้พบว่า วัคซีนภูมิคุ้มกันคอมเพ็ล็กซ์ไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่ และไม่ส่งผลต่อปริมาณประชากรลิมโฟไซต์ชนิด helper T cell ในกระแสเลือด

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

สรุปการศึกษาครั้งนี้พบว่า การให้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ถือว่ามีความปลอดภัย ต่อลูกไก่แม้ว่าจะได้รับวัคซีนชนิดนี้ในลูกไก่อายุ 1 วัน และวัคซีนดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพในการ ป้องกันโรคไอบีดีจากเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากวัคซีน (IBDV 2512) และไวรัสจากการทดสอบเชื้อ (vIBD CU-1) พบว่าวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์สามารถ แพร่กระจายไปที่อวัยวะน้ำเหลืองอื่นๆได้ ได้แก่ต่อมเบอริซา ม้าม และไทมัส โดยสามารถตรวจพบ สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ในวันที่ 7 และ 14 ของอายุไก่ นอกจากนี้ในไก่ที่ตรวจพบวัคซีนใน ต่อมเบอริซา ยังคงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากการป้อนเชื้อ (challenge) คือ vIBD CU-1 ได้ใน ต่อมเบอริซาเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าต่อมเบอริซาสามารถติดเชื้อไวรัสไอบีดีได้มากกว่า 1 ชนิด แม้ว่าจะได้รับสายพันธุ์จากวัคซีนมาก่อน นอกจากนี้ในการศึกษาการตอบสนองของวัคซีนต่อ ปริมาณประชากรเซลล์ ที ลิมโฟไซต์ ชนิด T helper cell lymphocyte (Th) ในกระแสเลือดพบว่า เชื้อไวรัส IBDV ส่งผลต่อระดับปริมาณประชากร Th ในกระแสเลือดเล็กน้อย ในขณะที่วัคซีนอิมมูโน คอมเพล็กซ์และวัคซีนเชื้อเป็นไม่มีผลกระทบต่อปริมาณประชากร Th ในกระแสเลือด

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาที่ช่วยยืนยันถึงความปลอดภัยของวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ต่อต่อมเบอริซา ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ในเรื่องผลของประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคยังไม่ชัดเจน แม้ว่า ไก่ที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์จะตรวจพบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้ในวันที่ 7-14 วันหลังจากได้รับวัคซีน แต่ก็ไม่พบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำหรือแอนติบอดีไต เตอร์จากวัคซีน ก่อนที่จะมีการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV CU-1 ในวันที่ 21 หรือ 28 นอกจากนี้การ ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไม่ช่วยป้องกันความเสียหายของต่อมเบอริซาจากการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV CU-1 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าซึ่งพบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์เป็นส่วนสำคัญ ในการป้องกันความเสียหายของต่อมเบอริซาจากเชื้อไวรัสไอบีดี (Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2005) แม้ว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ตรวจไม่พบการตอบสนองของ วัคซีนต่อระดับแอนติบอดีไตเตอร์ (seroconversion) ก่อนที่จะได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV CU-1 แต่การให้วัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์ถือเป็นการนำส่งแอนติเจนให้ลูกไก่ได้รับก่อนที่จะมีการ ติดเชื้อไวรัสโดยที่ภูมิคุ้มกันจากแม่ (maternal immunity) ไม่ทำลายเชื้อไวรัสจากวัคซีน เนื่องจาก

ปัญหาของวัคซีนเชื้อเป็นในปัจจุบันพบปัญหาการรบกวน (interfere) ของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ไก่ โดยในลูกไก่ที่มี Mab (maternal antibody) สูงในวันที่ได้รับวัคซีนจะพบการทำลายเชื้อไวรัสจากวัคซีน (neutralize) ในขนาดที่ลูกไก่ที่มี Mab ต่ำในวันที่ได้รับวัคซีนจะมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อไวรัสไอบีดี ดังนั้นการให้วัคซีน อิมมูโนคอมเพล็กซ์ถือเป็นรูปแบบหนึ่งในการนำส่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ และสามารถแน่ใจได้ว่าลูกไก่ทุกตัวได้รับวัคซีน

การให้วัคซีนเชื้อเป็นซ้ำในลูกไก่ที่ได้รับวัคซีนอิมมูโนคอมเพล็กซ์อาจช่วยให้การได้รับวัคซีนป้องกันโรคไอบีดีมีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยอาศัยแนวคิดการกระตุ้นซ้ำของระบบภูมิคุ้มกันโดยไก่ที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำจะมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าปกติจาก ลิมโฟไซต์ชนิดจดจำ (memory cell) ทั้ง บี เซลล์ และ ที เซลล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรคในฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อ

รายการอ้างอิง

- Allan, W.H., Faragher, J.T. and Cullen, G.A. 1972. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 90: 511-512.
- Bayliss, C.D., Spies, U.K., Shaw, R.W., Peters, A., Papageorgio, H., Muller and Boussnell, M. 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71: 1303-1312.
- Becht, H., Müller, H. and Müller, H.K. 1988. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 631-640.
- Benton, W.J., Cover, M.S. and Rosenberger, J.K. 1967. Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Dis.* 11: 430-438.
- Beug, H., Müller, H., Grieser, S., Doederlein, G. and Graf, T., 1981. Hematopoietic cells transformed in vitro by REVT avian reticuloendotheliosis virus express characteristics of very immature lymphoid cells. *Virology* 115: 295-309.
- Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2005. The efficacy of intermediate and intermediate-plus infectious bursal disease vaccine for the prevention of infectious bursal disease in broilers. *Thai J. Vet. Med.* 34(4): 91-96.
- Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2008. Efficacy of *in ovo* infectious bursal disease vaccine injected in 1 day-old broilers for Infectious bursal disease prevention. *Procs. 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Association (FAVA 2008).* 27-30 October 2008, Bangkok, Thailand. p. 9-10.
- Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2009. Comparison of the efficacy of the immune complex and conventionally live vaccine in broilers against infectious bursal disease infection. *Thai J. Vet. Med.* 39(2): 115-120.
- Chettle, N., Stuart, J.C. and Wyeth, P.J. 1989. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 125: 271-272.

- Cheville, N.F. 1967. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chicken. *Am J Pathol* 51: 527-551.
- Confer, A.W., Springer, W.T., Shane, S.M. and Donovan, J.F. 1981. Sequential mitogen stimulation of peripheral blood lymphocytes from chickens inoculated with infectious bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 42(12): 2109-2113.
- Corley, M.M. and Giambrone, J.J. 2002. Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route. *Avian Dis.* 46(4): 810-815.
- Corley, M.M., Giambrone, J.J. and Dormitorio, T.V. 2001. Detection of infectious bursal disease vaccine viruses in lymphoid tissues after in ovo vaccination of specific-pathogen-free embryos. *Avian Dis.* 45(4): 897-905.
- Corley, M.M., Giambrone, J.J. and Dormitorio, T.V. 2002. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay after in ovo vaccination of commercial broilers. *Avian Dis.* 46(4): 803-809.
- Cosgrove, A. S. 1962. An apparently new disease of chickens avian nephrosis. *Avian Dis.* 6: 385-389.
- Dohms, J. E., Lee, K.P. and Rosenberger, J.K. 1981. Plasma cell changes in the gland of harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. *Avian Dis.* 25: 683-695.
- Giambrone, J.J., Donahoe, J.P., Dawe, D.L. and Eidson, C.S. 1977. Specific suppression of the bursa-dependent immune system of chicks with infectious bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 38(5): 581-583.
- Haddad, E.E., Whitfill, C.E., Avakian, A.P., Ricks, C.A., Andrews, P.D., Thoma, J.A. and Wakenell, P.S. 1997. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41(4): 882-889.
- Helmboldt, C.F. and Garner, E. 1964. Experimentally induced Gumboro disease (IBA). *Avian Dis.* 8: 561-575.

- Hirai, K., Funakoshi, T., Nakai, T. and Shimakura, S. 1981. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis.* 25(2): 484-496.
- Hitchner, S.B. 1970. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult. Sci.* 49: 511-516.
- Howie, R.I., and Thorsen, J. 1981. Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can. J. Comp. Med.* 45: 315-320.
- Ivan, J., Nagy, N., Magyar, A., Kacskovics, I. and Meszaros, J. 2001. Functional restoration of the bursa of Fabricius following in ovo infectious bursal disease vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79(3-4): 235-248.
- Ivan, J., Velhner, M., Ursu, K., German, P., Mato, T., Dren, C.N. and Meszaros, J. 2005. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Can. J. Vet. Res.* 69(2): 135-142.
- Ivanyi, J. and Morris, R. 1976. Immunodeficiency in the chicken. IV. An immunological study of infectious bursal disease. *Clin. Exp. Immunol.* 23(1): 154-165.
- Jackwood, D.J., Saif, Y.M. and Hughes, J.H. 1984. Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis.* 28: 990-1006.
- Jackwood, D.J. and Sommer, S.E. 1997. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 41(3): 627-637.
- Jackwood, D.J., Byerley, E.H. and Sommer, S.E. 2001. Use of a genetic marker for wild-type potentially pathogenic infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 45(3): 701-705.
- Jeurissen, S.H., Janse, E.M., Lehrbach, P.R., Haddad, E.E., Avakian, A. and Whitfill, C.E. 1998. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology.* 95(3): 494-500.
- Kaufer, I. and Weiss, E. 1980. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect. Immun.* 27(2): 364-367.

- Kelemen, M., Forgach, K., Ivan, J., Palya, V., Suveges, T., Toth, B. and Meszaros, J. 2000. Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease. *Acta. Vet. Hung.* 48(4): 443-454.
- Kumar R, and Charan S. 2001. Virus enhancement following infection with antibody-coated infectious bursal disease virus (IBDV) in chickens. *Ind. J. Exp. Biol.* 39: 1314–1317.
- Lucio, B. and Hitchner, S.B. 1979. Response of susceptible versus immune chicks to killed, live-modified, and wild infectious bursal disease virus vaccines. *Avian Dis.* 23(4): 1037-1050.
- Lukert, P.D. and Saif, Y.M. 2003. Infectious Bursal Disease. In: *Diseases of Poultry* 11th ed. Iowa State: A Blackwell Publishing Company. 161-179.
- McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Conner, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S. and Allan, G.M. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9: 395-404.
- Mundt, E., Beyer, J. and Müller, H. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virusinfected cells. *J. Gen. Virol.* 76: 437-443.
- Muskett, J. C., Hopkins, I.G., Edwards, K.R. and Thornton, D. H. 1979. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.* 104(15).
- Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., Cyster, J.G. 2007. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol* 8: 992-1000.
- Platt, K.B. and Reed, D.E. 1985. Purified and antigenically selective vaccines for domestic animals. Iowa State University Research Foundation, Ames, Iowa. Patent number: 4,493,825.
- Rautenschlein, S., Yeh, H.Y., Njenga, M.K. and Sharma, J. M. 2002. Role of intrabursal T cell in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cell promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch. Virol.* 147: 285-304.

- Rosenberger, J. K. and Cloud, S. S. 1985. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:357.
- Rodenberg, J., Sharma, J.M., Belzer, S.W., Nordgren, R.M. and Naqi, S. 1994. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 38(1): 16-21.
- Saif, Y.M. 2003. *Disease of Poultry*, 11th Edition (Iowa state: A Blackwell Publishing Company), P 169.
- Sasipreeyajan, J. 2004. Gumboro Disease. In: *Management and Important Diseases in Broiler Chickens*. (3rd ed.) Bangkok, Thanapress and Graphic. 61-72.
- Sasipreeyajan, J., Wanarak, S. and Chansiripornchai, N. 2007. Efficacy of three intermediate-plus infectious bursal disease vaccine in broiler chickens. *Thai J. Vet. Med.* 58 (3): 58-67.
- Sharma, J.M., Dohms, J.E. and Metz, A.L. 1989. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 33(1): 112-124.
- Sharma, J. M., I. J. Kim, S. Rautenschlein and H. Y. Yeh. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 24: 223-35.
- Snedeker, C., Wills, F.K., and Moulthrop, I.M. 1967. Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Dis.* 11: 519-528.
- Survashe, B.D., Aitken, I.D. and Powell, J.R. 1979. The response of the harderian gland of the fowl to antigen given by the ocular route. I. Histological changes. *Avian Pathol.* 8: 77-93.
- Vandenberg, T.P., Eterradossi, N., Toquin, D. and Meulemans, G. 2000. Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease) in *Diseases of Poultry: world trade and public health implications*. *Scientific and Technical Review of the OIE*, 19 (2), 527-543.

- Whitfill, C.E., Haddad, E.E., Ricks, C.A., Skeeles, J.K., Newberry, L.A., Beasley, J.N., Andrews, P.D., Thoma, J.A. and Wakenell, P.S. 1995. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis.* 39(4): 687-699.
- Winterfield, R.W. and S. B. Hitchner. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23: 1273-1279.
- Winterfield, R.W., Hitchner, S.B., Appleton, G.S. and Cosgrove, A.S. 1962. Avian nephrosis, nephritis and Gumboro disease. *L & M News Views.* 3: 103.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ข้อมูลการทดลองไก่รายตัวจากการทดลองที่ 1.

ตารางที่ 16 น้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อได้รับการป้องกันเชื้อไวรัส vWIBD-CU1 ในวันที่ 21 ของอายุไก่

Day 21* (0 DPI**)									
Number	Group 1A			Group 2A			Group 3A		
	1A/1	1A/2	1A/3	2A/1	2A/2	2A/3	3A/1	3A/2	3A/3
1	720	710	690	720	690	650	700	730	740
2	690	720	680	700	720	740	710	700	720
3	680	690	720	720	730	720	730	690	610
4	720	680	710	700	700	720	690	730	720
5	700	720	680	730	720	670	730	700	700
6	700	700	710	610	610	700	710	660	700
7	680	680	690	730	730	700	660	720	660
Day 25 (4 DPI)									
Number	Group 1A			Group 2A			Group 3A		
	1A/1	1A/2	1A/3	2A/1	2A/2	2A/3	3A/1	3A/2	3A/3
1	900	900	930	980	1030	970	960	970	950
2	900	870	960	1000	930	940	960	880	1000
3	900	890	900	990	930	970	910	990	1050
4	950	980	930	950	980	960	930	980	850
5	920	1000	900	820	990	950	930	1000	900
6	830	890	870	890	940	920	950	950	900
7	930	920	940	910	830	900	950	950	950
Day 31 (10 DPI)									
Number	Group 1A			Group 2A			Group 3A		
	1A/1	1A/2	1A/3	2A/1	2A/2	2A/3	3A/1	3A/2	3A/3
1	1310	1240	1380	1360	1200	1350	1390	1360	1390
2	1280	1310	1220	1340	1390	1310	1410	1380	1280
3	1300	1250	1360	1290	1310	1340	1390	1200	1420
4	1280	1380		1200	1350		1360	1250	

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 17 น้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อ ได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vvIBD-CU1 ในวันที่ 28 ของอายุไก่

Day 28* (0 DPI**)									
Number	Group 1B			Group 2B			Group 3B		
	1B/1	1B/2	1B/3	2B/1	2B/2	2B/3	3B/1	3B/2	3B/3
1	880	860	890	870	880	880	880	890	880
2	890	960	940	890	890	890	890	890	890
3	980	910	900	900	900	900	900	900	900
4	890	950	960	920	900	900	910	900	900
5	920	880	980	930	930	930	930	940	930
6	970	990	870	960	940	940	950	940	940
7	920	900	910	980	980	980	1010	1000	1000
Day 32 (4 DPI)									
Number	Group 1B			Group 2B			Group 3B		
	1B/1	1B/2	1B/3	2B/1	2B/2	2B/3	3B/1	3B/2	3B/3
1	1200	1270	1260	1200	1260	1230	1180	1180	1210
2	1140	1150	1200	1230	1250	1130	1260	1190	1160
3	1270	1300	1180	1180	1200	1180	1310	1320	1180
4	1260	1160	1150	1220	1200	1320	1300	1270	1330
5	1210	1100	1200	1140	1210	1230	1320	1260	1340
6	1210	1180	1140	1210	1220	1300	1000	1350	1330
7	1140	1240	1260	1330	1200	1250	1180	1270	1380
Day 38 (10 DPI)									
Number	Group 1B			Group 2B			Group 3B		
	1B/1	1B/2	1B/3	2B/1	2B/2	2B/3	3B/1	3B/2	3B/3
1	1310	1370	1360	1450	1210	1350	1570	1500	1580
2	1320	1390	1360	1100	1450	1470	1630	1630	1540
3	1310	1290	1440	1520	1500	1570	1640	1480	1550
4	1200	1260		1510	1560		1500	1580	

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 18 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริชาต่อน้ำหนักตัวไก่ ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอิม มูนคอมเพล็กซ์ และไม่ได้รับวัคซีนอิมมูนคอมเพล็กซ์รายตัว

Group	Number	Bursa/body weight ratios			
		Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Vaccine	1	1.06	1.93	1.89	2.43
	2	1.37	1.37	2.03	2.54
	3	1.04	1.46	2.11	2.35
	4	1.30	1.71	1.22	1.59
	5	1.26	1.70	1.80	1.64
	6			2.86	2.23
	7			2.69	2.51
	8			2.24	2.82
	9			1.97	1.62
	10			3.09	1.80
None vaccine	1	2.00	1.97	1.94	1.95
	2	1.63	1.89	1.47	2.90
	3	1.21	2.34	1.84	1.45
	4	1.46	1.44	1.39	2.14
	5	1.66	1.53	1.55	2.75
	6			1.72	2.02
	7			1.69	2.16
	8			2.45	2.81
	9			1.60	3.14
	10			1.59	2.16

ตารางที่ 19 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริชชาติ่อนน้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อ ได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vvIBD-CU1 ในวันที่ 21 ของอายุไก่

Number	Bursa/body weight ratios								
	21 day*, 0 DPI**			25 day, 4 DPI			31 day, 10 DPI		
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
	1B	2B	3B	1B	2B	3B	1B	2B	3B
1	1.89	1.94	1.44	1.16	1.94	0.53	0.95	2.17	
2	2.03	1.47	2.07	0.70	2.21	0.63	0.45	1.28	
3	2.11	1.84	1.79	0.99	1.80	0.36	0.54	0.76	
4	1.22	1.39	1.26	1.52	1.97	0.50	0.34	1.25	
5	1.80	1.55	2.23	2.11	1.98	0.64	0.56	1.53	
6	2.86	1.72	1.79	1.16	1.56	0.56	0.71	1.52	
7	2.69	1.69	0.96	0.97	1.66	0.45	0.44	1.23	
8	2.24	2.45	1.95	1.39	1.26	0.63	0.46	1.15	
9	1.97	1.60	2.46	1.51	1.49	0.32	0.68	2.27	
10	3.09	1.59	2.27	1.10	1.87	0.96	0.51	1.58	

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 20 อัตราส่วนของน้ำหนักต่อมเบอริชต่อน้ำหนักตัวไก่ รายตัวในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อ ได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vvIBD-CU1 ในวันที่ 28 ของอายุไก่

Number	Bursa/body weight ratios								
	28 day*, 0 DPI**			32 day, 4 DPI			38 day, 10 DPI		
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
	1B	2B	3B	1B	2B	3B	1B	2B	3B
1	2.43	1.94	1.01	1.30	1.68	0.52	0.36	0.99	
2	2.54	2.90	1.46	0.93	1.07	0.43	0.74	1.30	
3	2.35	1.45	1.11	1.22	1.42	0.37	0.54	1.14	
4	1.59	2.14	1.18	2.50	1.40	0.40	0.61	0.91	
5	1.64	2.75	2.00	2.30	1.19	0.50	0.39	0.74	
6	2.23	2.01	0.79	0.94	1.45	0.43	0.69	1.63	
7	2.50	2.16	2.47	2.76	2.52	0.44	0.64	1.30	
8	2.82	2.81	0.98	1.32	0.61	0.50	0.65	0.69	
9	1.62	3.14	0.94	1.60	1.32	0.45	0.70	1.87	
10	1.80	2.15	2.33	1.69	0.81	0.49	0.44	1.09	

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 21 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวเมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 21 วัน

Number	Histopathological lesion score								
	21 day*, 0 DPI**			25 day, 4 DPI			31 day, 10 DPI		
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
	1B	2B	3B	1B	2B	3B	1B	2B	3B
1	0	0		3	4	0	3	4	0
2	0	0		4	4	0	4	4	0
3	0	0		4	5	0	4	4	0
4	0	0		5	5	0	4	4	0
5	0	0		5	5	0	4	4	0
6	0	0					4	4	0
7	0	0					4	5	0
8	0	0				ND ¹	4	5	0
9	0	0					5	5	0
10	0	0					5	5	0

* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 21 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

¹ = Not done

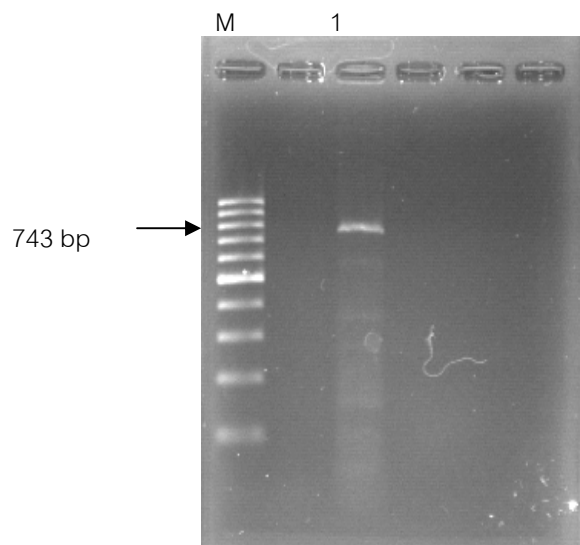
ตารางที่ 22 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยารายตัวเมื่อได้รับการป้อนเชื้อไวรัส vIBDV-CU1 ที่อายุ 28 วัน

Number	Histopathological lesion score								
	28 day*, 0 DPI**			32 day, 4 DPI			38 day, 10 DPI		
	Gr. 1B	Gr. 2B	Gr. 3B	Gr. 1B	Gr. 2B	Gr. 3B	Gr. 1B	Gr. 2B	Gr. 3B
1	0	0		4	4	0	3	4	0
2	0	0		4	4	0	3	4	0
3	0	0		4	4	0	4	4	0
4	0	0		4	4	0	4	4	0
5	0	0		4	4	0	4	5	0
6	0	0		4	5	0	5	5	0
7	0	0		5	5	0	5	5	0
8	0	0		5	5	0	5	5	0
9	0	0		5	5	0	5	5	0
10	2	1		5	ND ¹	2	5	5	0

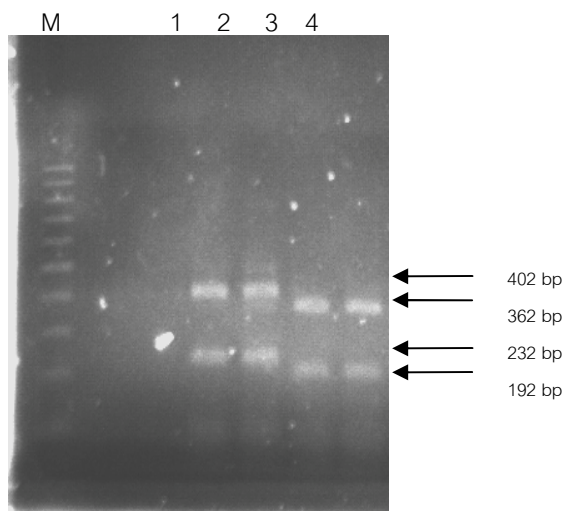
* ; ได้รับการให้เชื้อพิษที่อายุ 28 วัน และเก็บข้อมูลต่างๆที่ 4 วัน และ 10 วันหลังจากให้เชื้อพิษ

** ; DPI = Days post inoculation

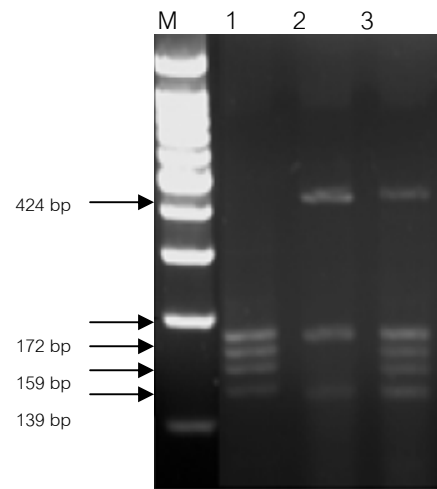
¹ = Not done



รูปที่ 8 แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดีเอ็ม M = Marker ; 1 = IBDV



รูปที่ 9 แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดีเอ็มถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ *Mbo*I โดยวิธี RFLP M = Marker ; 1 และ 2 = IBDV 2512 ; 3 และ 4 = vvIBDV-CU1



รูปที่ 10 แถบสารพันธุกรรม DNA ของไวรัสไอบีดีเมื่อถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ *Bst*NI โดยวิธี RFLP M = Marker ; 1 = IBDV 2512 ; 2 = vIBDV-CU1 ; 3 = พบทั้งสองสายพันธุ์

ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลองไก่รายตัวจากการทดลองที่ 2.

ตารางที่ 23. น้ำหนักตัวไก่รายตัวในวันเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

No. ^a	Body weight (gram/bird)	
	Day 22 (0 DPI)*	Day 32 (10 DPI)
1	1200	1840
2	1220	2150
3	1250	2280
4	1230	1900
5	1240	2050
6	1200	1950
7	1220	2060
8	1250	2120
9	1230	1920
10	1240	2100
11	1180	1960
12	1220	2090
13	1270	2100
14	1230	1840
15	1240	1750
16	1200	1770
17	1210	1880
18	1260	1800
19	1230	1790
20	1240	1760

^a = หมายเลขตัวไก่ลำดับที่ 1-5 จัดเป็นกลุ่มที่ 1 ; หมายเลข 6-10 จัดเป็นกลุ่มที่ 2 ; หมายเลข 11-15 จัดเป็นกลุ่มที่ 3 ; หมายเลข 16-20 จัดเป็นกลุ่มที่ 4

* ; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 24. อัตราส่วนน้ำหนักต่อมเบอร์ซาต่อน้ำหนักตัวไก่รายตัว

ตัวที่	bursa/body weight ratios							
	Day 22 (0 DPI) [*]				Day 32 วัน (10 DPI)			
	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4
1		2.24			2.04	1.97	1.35	1.16
2		2.19			1.77	1.03	2.17	0.48
3		2.20			1.64	2.52	1.28	0.68
4		2.72			2.01	1.41	0.95	0.74
5		2.34			1.50	1.58	0.57	0.31

; DPI = Days post inoculation

ตารางที่ 25. ผลการนับเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดไหลไซโตมิเตอร์จากเลือดไก่ในแต่ละอายุ

Day 22 (0 DPI) [*]				
No. ^a	CD4 ⁺ CD3 ⁺	CD4 ⁻ CD3 ⁺	CD3 ⁺	%Th cell [(CD3 ⁺ /CD4 ⁺ CD3 ⁺) x 100]
1	39	52	91	42.86
2	894	398	1292	69.20
3	83	222	305	27.21
4	352	275	627	56.14
5	736	487	1223	60.18
6	351	387	738	47.56
7	143	189	332	43.07
8	1499	1185	2684	55.85
9	266	676	942	28.24
10	116	174	290	40.00
11	309	124	433	71.36
12	749	295	1044	71.74
13	792	453	1245	63.61
14	57	110	167	34.13

No.	CD4 ⁺ CD3 ⁺	CD4 ⁻ CD3 ⁺	CD3 ⁺	%Th cell [(CD3 ⁺ / CD4 ⁺ CD3 ⁺) x 100]
15	217	455	672	32.29
16	88	148	236	37.29
17	359	213	572	62.76
18	511	493	1004	50.90
19	491	597	1088	45.13
20	67	191	258	25.97
Day 27 (5 DPI)				
No.	CD4 ⁺ CD3 ⁺	CD4 ⁻ CD3 ⁺	CD3 ⁺	%Th cell [(CD3 ⁺ / CD4 ⁺ CD3 ⁺) x 100]
1	2264	1836	4100	55.22
2	1572	1212	2784	56.47
3	1849	2589	4438	41.66
4	2098	4100	6198	33.85
5	4377	3604	7981	54.84
6	1043	3295	4338	24.04
7	2814	2946	5760	48.85
8	2393	3260	5653	42.33
9	2305	3928	6233	36.98
10	1920	4301	6221	30.86
11	3331	3792	7123	46.76
12	1639	1785	3424	47.87
13	546	1350	1896	28.80
14	1982	4010	5992	33.08
15	2414	3545	5959	40.51
16	1863	2014	3877	48.05
17	2168	2341	4509	48.08
18	1499	1185	2684	55.85
19	733	2977	3710	19.76

Day 32 (10 DPI)				
No.	CD4 ⁺ CD3 ⁺	CD4 ⁻ CD3 ⁺	CD3 ⁺	%Th cell [(CD3 ⁺ / CD4 ⁺ CD3 ⁺) x 100]
1	12565	11787	24352	51.60
2	12323	16260	28583	43.11
3	13037	11787	24824	52.52
4	9410	16342	25752	36.54
5	12464	11343	23807	52.35
6	12023	14898	26921	44.66
7	11415	16565	27980	40.80
8	8199	15736	23935	34.26
9	8710	19582	28292	30.79
10	12882	14064	26946	47.81
11	12048	18324	30372	39.67
12	12714	14965	27679	45.93
13	11856	21155	33011	35.92
14	10958	19314	30272	36.20
15	13277	12637	25914	51.23
16	14145	11312	25457	55.56
17	14655	8375	23030	63.63
18	12361	10913	23274	53.11
19	10446	14738	25184	41.48
20	13959	11510	25469	54.81

^a = หมายเลขตัวไก่ลำดับที่ 1-5 จัดเป็นกลุ่มที่ 1 ; หมายเลข 6-10 จัดเป็นกลุ่มที่ 2 ; หมายเลข 11-15 จัดเป็นกลุ่มที่ 3 ; หมายเลข 16-20 จัดเป็นกลุ่มที่ 4

* ; DPI = Days post inoculation

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ. วิสุทธิ์ ระวังเวช เกิดเมื่อวันที่ 29 ตุลาคม 2526 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี วุฒิการศึกษาศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี การศึกษา 2551 จากนั้นเข้าทำงานตำแหน่งสัตวแพทย์โครงการ หน่วยปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551 และ เข้ารับศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาอายุร ศาสตร์สัตวแพทย์ แขนงวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ในปี พ.ศ. 2552 ด้วยทุนของหน่วยปฏิบัติการ วิจัยสุขภาพสัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 16 (3/2554) ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2553 มีผลงาน ทางด้านวิชาการทั้งสิ้น 3 เรื่อง ได้แก่ เรื่องที่ 1. ชื่อเรื่อง “Comparison of the efficacy of enrofloxacin against *Escherichia coli* or *Pasteurella multocida* infection in chickens.” เรื่องที่ 2. ชื่อเรื่อง “The efficacy of *Escherichia coli* aroA-live vaccine in broilers against avian *E. coli* serotype o78 infection.” เรื่องที่ 3. ชื่อเรื่อง “The efficacy of tilmicosin against broiler chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum* isolated in Thailand.” โดย ผลงานทั้งหมดเกิดขึ้นในปี 2551-2553 ในขณะที่ปฏิบัติงานอยู่ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยสุขภาพสัตว์ ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปัจจุบันผู้เขียน ทำงานอยู่ ณ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์ ตำแหน่งสัตวแพทย์ประจำศูนย์สัตว์ทดลอง (The central of animal facility; CAF)