บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1.การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA ในไก่ทดลอง

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

3.1.1.1.กลุ่มทดลองที่ 1 ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ สเตรน H120 โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 1 วัน และให้วัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 10 วัน

3.1.1.2.กลุ่มทดลองที่ 2 ให้วัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา เมื่ออายุ 10 วัน

3.1.1.3. กลุ่มควบคุม ไม่ให้วัคซีน

3.1.2.เจาะเลือดไก่กลุ่มทดลองที่ 1, 2 เมื่ออายุ 28 , 35 และ 42 วัน

เจาะเลือดไก่กลุ่มควบคุม เมื่ออายุ 1 , 10 , 21 , 28 , 35 และ 42 วัน

3.1.3.ตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA

3.2.การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA ในไก่เนื้อจากฟาร์ม

3.2.1.เจาะเลือดไก่เนื้อที่ให้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ สเตรน H120 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ 1-2 ครั้ง จำนวน 4 ฟาร์ม แต่ละฟาร์ม เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ๆ ละ 10 ตัวอย่าง ที่อายุ 28 , 35 และ 42 วัน

3.2.2.ตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และ สเตรนแมสซาชูเซตส์ ด้วยวิธี VN และระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA

ไก่เนื้อจากฟาร์มมีประวัติดังนี้ คือ ไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres จากฟาร์มในจังหวัดอุบลราชธานี ฟาร์มที่ 1 และ 2 มีประวัติการได้รับวัคซีน คือ อายุ 7 วัน ให้วัคซีนรวมซึ่งประกอบด้วยวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B 1 และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรน H 120 โดยการหยอดตา อายุ 14 วัน ให้วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชนิดรุนแรง โดยการละลายน้ำ

I20129496

ไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres จากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี มีประวัติการได้รับวัคซีน คือ อายุ 7 วัน ให้วัคซีนรวมซึ่งประกอบด้วยวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นสเตรน B 1 และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นสเตรนแมสซาชูเซตส์ โดยการหยอดตา และให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายสเตรน La Sota อายุ 14 วัน ให้วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชนิดรุนแรง โดยการละลายน้ำ

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

3.3.การเก็บตัวอย่างเลือดและซีรัม

3.3.1.เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปีก (Wing vein) ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ Eppendorf ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.3.2.ปั่นแยกซีรัม

3.3.3.แยกซีรัมใส่ Eppendorf และแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจระดับแอนติบอดีต่อไป

3.4.การเตรียมไวรัสสำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี VN

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน 4/91 และสเตรนแมสซาชูเซตส์ (M41) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทอินเตอร์เวท (Intervet) ประเทศเนเธอร์แลนด์

3.4.1.เตรียม pCEK monolayer อายุ 2 วัน ใน tissue culture flask (TC flask) ขนาด 87.5 ตารางเซนติเมตร โดยใช้เซลที่ความเข้มข้น 2.5 x 10^6 เซลต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซล Medium 199 / Ham's F10 (M199/F10) ที่มี fetal calf serum (FCS) 5 เปอร์เซ็นต์ 17.5 มิลลิลิตร

3.4.2.เทอาหารเลี้ยงเซลเก่าทิ้ง เติม IBV ลงใน pCEK โดยใช้ไวรัส 0.001 MOI (multiplicity of infection) ในอาหารเลี้ยงเซล M199/F10 ที่มี FCS 0.75 เปอร์เซ็นต์ 2.5 มิลลิลิตร

3.4.3.นำ TC flask ไปอบใน CO_2 incubator (CO_2 5 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.4.เติมอาหารเลี้ยงเซล M199/F10 ที่มี FCS 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มจนถึง 25 มิลลิลิตร

3.4.5.นำ TC flask ไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 – 4 วัน ขึ้นกับการเกิด CPE (รูปที่ 2) คือ เกิด CPE ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จึงนำ TC flask มาแช่แข็ง

(freeze) ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -70 องศาเซลเซียส

3.4.6.ละลาย (thaw) TC flask เก็บสารแขวนลอยที่ได้จากการละลาย

3.4.7.ปั่นสารแขวนลอยที่ได้ ที่ความเร็ว 3,000 x *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.8.เก็บไวรัสที่อยู่ในส่วนน้ำ (supernatant) แบ่งใส่ใน eppendorf หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.4.9.หาปริมาณไวรัส หลังจากแช่แข็ง 1-2 สัปดาห์

3.5.การเตรียม pCEK

3.5.1.ใช้ไข่ไก่ฟัก (จากไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres จากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี) อายุ 18 – 19 วัน นำมาส่องตรวจเพื่อคัดแยกเฉพาะเอมบริโอ (embryo) ที่มีชีวิต ฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.5.2.กระเทาะเปลือกไข่บริเวณ air space ใช้ปากคีบหนีบเอมบริโอวางลงบน petridish เปิดช่องท้องเอมบริโอด้วยกรรไกรและปากคีบ แยกลำไส้ออกจากลำตัว ใช้กรรไกรตัดลำตัวเอมบริโอ 2 ข้างของกระดูกสันหลัง เก็บไตใส่ในบีกเกอร์ (beaker) ซึ่งมี PBS (phosphate buffer saline) ทิ้งให้ไตนอนก้น แล้วเท PBS ทิ้ง ตัดไตให้ละเอียดใน petridish ด้วยมีดผ่าตัด แยกเยื่อหุ้มไตออก

3.5.3.เก็บไตที่ตัดละเอียดแล้วใน flask เติมทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 10 มิลลิลิตรต่อ 1 ไต กวนด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็ว 550 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้ตกตะกอน กรองด้วยฟิลเตอร์ที่มี pore size ขนาด 100 ไมครอน

3.5.4.นำส่วนน้ำที่ได้จากการกรองมาเติม FCS ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของทริปซิน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 500 x *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง

3.5.5.เติมอาหารเลี้ยงเซล Medium B8 ที่มี FCS 5 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตรลงใน centrifugation pot เพื่อละลายตะกอนเซล นำไปปั่นที่ความเร็ว 500 x *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนเซล โดยใช้อาหารเลี้ยงเซล 1.25 มิลลิลิตรต่อ 1 ไต

3.5.6.นำสารแขวนลอยเซลที่ได้มาทำ two – fold dilution ใน microtiterplate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลุมที่เซลตกตะกอนเป็น monolayer เป็นหลุมที่มีความเข้มข้นของเซลประมาณ 3×10^6 เซลต่อมิลลิลิตร

3.5.7.นำ pCEK ที่เตรียมให้ได้ความเข้มข้นของเซลประมาณ 3×10^5 เซลต่อมิลลิลิตร เติมลงใน microtiterplate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลเกาะเป็น monolayer (รูปที่ 1)

3.6.การตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี VN

3.6.1.นำซีรัมตัวอย่าง , positive และ negative IBV serum ไป inactivate เพื่อกำจัด non specific neutralization activity ของซีรัมโดยการแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.6.2.เจือจางซีรัม ด้วยอาหารเลี้ยงเซล M199/F10 ที่มี FCS 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้มีระดับการเจือจางในหลุมแรก เป็น 1 : 16 โดยใช้ซีรัม 12.5 ไมโครลิตรและอาหารเลี้ยงเซล 187.5 ไมโครลิตร ในหลุมถัดไป เติมอาหารเลี้ยงเซล 100 ไมโครลิตร ทำ two – fold dilution จนถึงหลุมสุดท้าย

3.6.3.เจือจางไวรัสให้ได้ความเข้มข้น 100 $TCID_{50}$ / 50 ไมโครลิตร เติมไวรัสที่เจือจางแล้วลงในซีรัมที่เจือจางแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 – 90 นาที นำ serum-virus mixture 100 ไมโครลิตร ไปเติมลงใน microtiterplate ที่มี pCEK monolayer อยู่ นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–4 วัน

3.6.4.นำไวรัสที่เจือจางแล้วมาทำ ten – fold dilution ในหลอดทดลอง ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} เพื่อทำ back titration

3.6.5.การอ่านผลระดับแอนติบอดีของซีรัม อ่านเป็นส่วนกลับของ $\log_2$ ของหลุมที่ซีรัมมีการเจือจางมากที่สุด โดยที่ไวรัสถูก neutralize คือ ไม่เกิด CPE ความเข้มข้นของไวรัสแสดงในรูป $\log_{10}$ $TCID_{50}$ / มิลลิลิตร และคำนวนโดยวิธีของ Reed และ Muench (Reed and Muench,1938) ไวรัสควรมีความเข้มข้น 100 $TCID_{50}$ / 50 ไมโครลิตร โดยมีเกณฑ์ความเข้มข้นที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงระหว่าง 30 ถึง 300 $TCID_{50}$ / 50 ไมโครลิตร negative IBV serum จะต้องมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 0 และ positive IBV serum จะต้องมีระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง $\pm$ 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับแอนติบอดีมาตรฐานเฉลี่ยจากบริษัทอินเตอร์เวท

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

3.7.การตรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA

ใช้ชุดตรวจสอบแอนติบอดีสำเร็จรูปต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี ELISA ของบริษัท Kirkegaard & Perry Laboratory, Inc. (KPL) , แมรี่แลนด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา

การคำนวณ serum to positive ratio (SP) ใช้สูตร

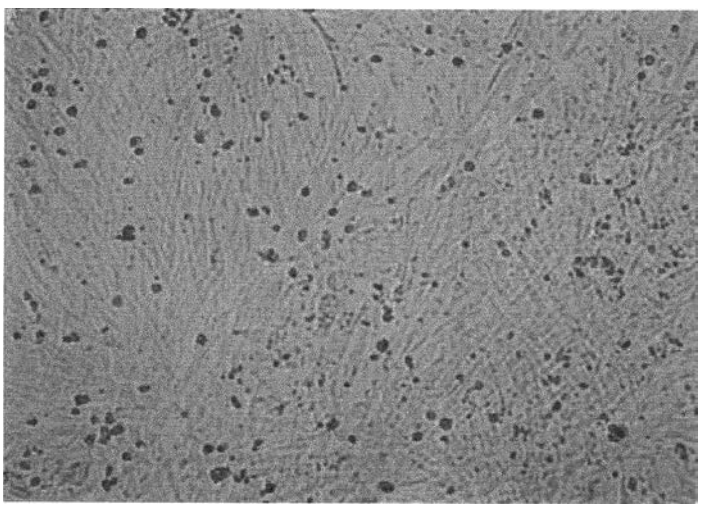
$$SP = \frac{\text{OD sample - OD negative control}}{\text{OD positive control - OD negative control}}$$

การคำนวณ titre ใช้สูตร $\log_{10}$ titre = (1.642 × $\log_{10}$ SP) + 3.568

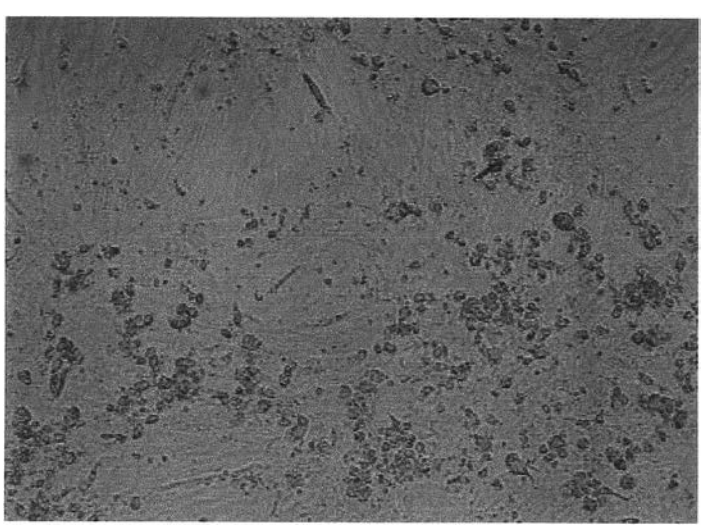
titre = antilog of $\log_{10}$ titre

3.8.การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการแสดงผลการศึกษา



รูปที่ 1 pCEK monolayer ปกติ



รูปที่ 2 pCEK เกิด CPE