

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันและการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหลอดลม
อักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไตในไก่เนื้อ



นายวัชชัย โพธิ์เฮือง

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์

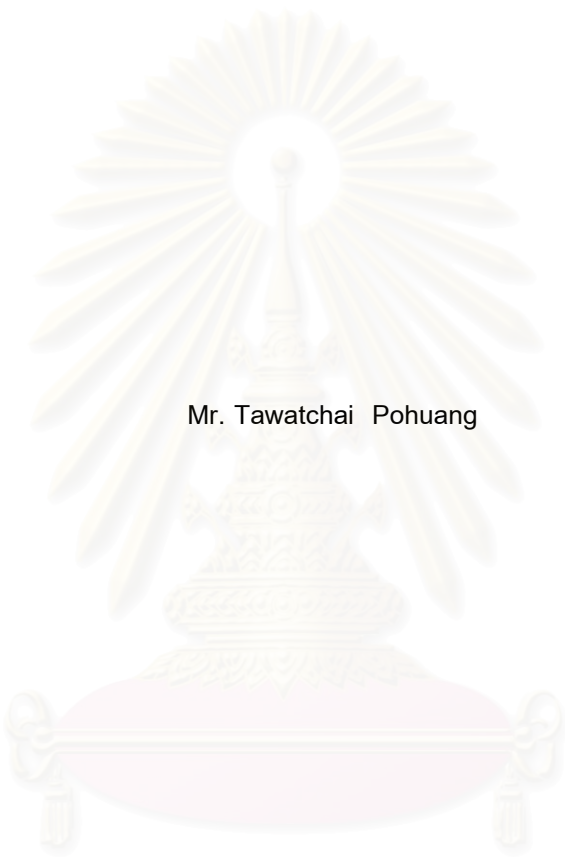
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5704-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUCLEOTIDE ANALYSIS OF S1 GENE AND PATHOGENESIS OF
NEPHROPATHOGENIC INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN BROILER CHICKENS



Mr. Tawatchai Pohuang

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

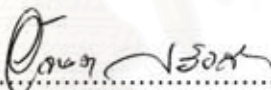
ISBN 974-17-5704-2


หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันและการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบทืดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่เนื้อ
โดย	ธวัชชัย โพธิ์เฮือง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวปีก
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทศิริพรชัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....  คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรอนพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

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

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทศิริพรชัย)

.....  กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศศักดิ์ อรวีระกุล)

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

ธวัชชัย โพธิ์เอื้อง: การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันและการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่เนื้อ (NUCLEOTIDE ANALYSIS OF S1 GENE AND PATHOGENESIS OF NEPHROPATHOGENIC INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN BROILER CHICKENS) อ.ที่ปรึกษา: ศ.น.สพ. ดร. จิโรจ ศติปรีชญจันทร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.น.สพ.ดร. นิวัตร จันทศิริพรชัย จำนวนหน้า 52 หน้า. ISBN 974-17-5704-2

นำเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่ง ที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยมาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีนเอสวัน ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอร์เลสแบบรีเวอร์สทรานสคริปเตส-โพลีเมอร์เลสเซนรีแอคชัน (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) จากนั้นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์อื่นๆ ที่รายงานใน GenBank database พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันกับสายพันธุ์อื่นร้อยละ 61.28-77.44 จากนั้นทำการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อในไก่เนื้ออายุ 2 และ 14 วัน พบอัตราการตายในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน โดยมีอัตราการตายร้อยละ 58 และ 8 ในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน ตามลำดับ น้ำหนักตัวเฉลี่ยของไก่ที่ได้รับเชื้อมีค่าน้อยกว่าไก่อุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันมีแนวโน้มรุนแรงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน โดยพบคะแนนรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ท่อลมและไตของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีค่า 1.13 และ 1.00 ตามลำดับ ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วันมีค่า 1.00 และ 0.46 ตามลำดับ คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมและไตของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันมีค่า 2.13 และ 2.07 ตามลำดับ ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วันมีค่า 2.07 และ 1.40 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4775583731: MAJOR AVIAN MEDICINE

KEY WORD: INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS/ S1 GENE/ PATHOGENESIS/ CHICKENS

TAWATCHAI POHUANG: NUCLEOTIDE ANALYSIS OF S1 GENE AND PATHOGENESIS OF NEPHROPATHOGENIC INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN BROILER CHICKENS THESIS ADVISOR: PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR ASSIST. PROF. NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, Ph.D., 52 pp. ISBN: 974-17-5704-2.

One nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) field isolate, recovered from chickens in Thailand was studied using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequencing of the S1 gene. Compared with NIBV from GenBank, the nucleotide sequence of S1 gene of the isolate shared 61.28-77.44% identity. In pathogenesis experiment, 2- and 14-day old broiler chickens were inoculated with the isolate. The mortality rates were influenced by chicken age. Mortality rate of birds received the virus at 2- and -14 days old was 58 and 8%, respectively. The body weight of inoculated chickens of either age was significantly lower than those of controls ($p < 0.05$). Gross and histopathologic lesions of trachea and the kidney were more severe in birds received the virus at 2-days old. The average gross lesion scores of trachea and kidney of the 2-day old viral inoculated chickens were 1.13 and 1.00, respectively and 14-day old viral inoculated chickens were 1.00 and 0.46, respectively. The average histopathologic lesion scores of trachea and kidney of the 2-day old viral inoculated chickens were 2.13 and 2.07, respectively and the 14-day old viral inoculated chickens were 2.07 and 1.40, respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Medicine

Field of study Avian Medicine

Academic year 2005

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งมีความอดทนต่อความไม่รู้ของศิษย์ คอยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.น.สพ. ดร. นิวัตร จันทศิริพรชัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ในการทำงานทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งให้คำปรึกษาจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2548 ของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณ หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือด้านห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนที่ใช้ในการวิจัย คุณสมิตรา วัฒนินทร ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.น.สพ.ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล และ อ.สพ.ญ. จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานด้านอนุชีววิทยา

ขอขอบคุณ สพ.ญ. สุวัณษา วรรณรัตน์ สพ.ญ. กฤดา ชูเกียรติศิริ และน.สพ. ฉัตรชัย สารชัย ที่คอยให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณ สพ.ญ. ศิริลักษณ์ มีสุวรรณ และน.สพ. สิทธิชัย ประทุมศิริ เพื่อนที่คอยรับฟังปัญหาและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณ ผศ.สพ.ญ. กัลยา เจือจันทร์ ที่คอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์หลายอย่างต่อการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยรับผิดชอบงานแทนขณะที่ลาศึกษาต่อ

ท้ายที่สุดนี้ใคร่ขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพี่สาว บิดาและมารดา ที่คอยห่วงใยและเป็นแรงผลักดันให้มีความอดทนและตั้งใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
คุณสมบัติของ S1 glycoprotein.....	5
ความแตกต่างระดับโมเลกุลในยีนเอสวัน.....	6
การแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหูดดลมอักเสบติดต่อโดยใช้ยีนเอสวัน.....	8
อาการของโรคหูดดลมอักเสบติดต่อ.....	8
พยาธิกำเนิด.....	9
พยาธิวิทยา.....	10
การทำลายเชื้อไวรัสหูดดลมอักเสบติดต่อ.....	12
การป้องกันโรคหูดดลมอักเสบติดต่อ.....	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	15
การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน.....	15
1. เชื้อไวรัส.....	15
2. การสกัด RNA.....	15
3. Primer.....	15
4. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR.....	16
5. การวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR.....	16
6. การเตรียมผลผลิตจาก PCR ให้บริสุทธิ์.....	16
7. การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์.....	16

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ (ต่อ)

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	17
การศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหูดลมอักษะติดต่อกันชนิดที่ ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่เนื้อ.....	18
1. การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส.....	18
2. ไก่ทดลอง.....	19
3. การให้อาหารและน้ำ.....	20
4. การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา.....	20
5. การตรวจหาเชื้อไวรัส.....	21
6. การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสหูดลมอักษะติดต่อกัน.....	21
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	23
การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน.....	23
การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส.....	25
อาการป่วยและอัตราการตาย.....	27
น้ำหนักตัวไก่.....	28
รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ท่อมและไต.....	31
รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อมและไต.....	32
ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหูดลมอักษะติดต่อกัน.....	34
การตรวจหาเชื้อไวรัสหูดลมอักษะติดต่อกันด้วยวิธี RT-PCR.....	36
บทที่ 5 วิจารณ์ ข้อคิดเห็น และสรุปผลการทดลอง.....	40
รายการอ้างอิง.....	46
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	52

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่ที่รายงานใน GenBank ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์.....	17
4.1 การเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (%homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในยีนเอส วันระหว่างไวรัสหูดมออักเสบติดต่สายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้ จากไก่ป่วยในประเทศไทยและสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database.....	24
4.2 ค่าการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนไขฟักที่สังเกตเห็นจริงและค่าสะสม.....	26
4.3 อัตราการตายในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน.....	27
4.4 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อ เมื่ออายุ 2 วันและไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	29
4.5 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อ เมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	30
4.6 คะแนนรอยโรคทางมพยาธิวิทยาที่ทอลมหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	31
4.7 คะแนนรอยโรคทางมพยาธิวิทยาที่ไตหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้ รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	32
4.8 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ทอลมหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	33
4.9 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้ รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	33
4.10 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหูดมออักเสบติดต่ก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	34
4.11 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหูดมออักเสบติดต่ก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	35
4.12 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่ด้วยวิธี RT-PCR ในไก่กลุ่ม ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน.....	39

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ

2.1 ยีนโนมและยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต้อ	7
4.1 phylogenetic relationship ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเอสวันยีน ของไวรัสหูดมออักเสบติดต้อระหว่างชนิดที่แยกได้จากไก่ป่วยใน ประเทศไทย (THA001) และสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database	23
4.2 ตัวอ่อนที่เกิดสภาพแคะแกรน และตัวอ่อนปกติ	26
4.3 ไตของตัวอ่อนที่มีการสะสมของยูเรต	27
4.4 อาการป่วยของไก่ที่ได้รับเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต้อ	28
4.5 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่อ อายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ	29
4.6 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่อ อายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ	30
4.7 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหูดมออักเสบติดต้อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ	35
4.8 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหูดมออักเสบติดต้อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ	36
4.9 PCR amplified product จากทอลมของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน	37
4.10 PCR amplified product จากไตของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน	37
4.11 PCR amplified product จากทอลมของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน	38
4.12 PCR amplified product จากไตของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน	38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis, IB) เป็นโรคที่พบได้บ่อยและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก โดยทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจในไก่ทุกอายุ (Parsons et al., 1992) แต่ความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปตามอายุของไก่ พบว่าไก่อายุน้อยมีอาการป่วยรุนแรงและอัตราการตายสูงกว่าไก่อายุมาก (Animas et al., 1994) และไก่ที่ติดเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเนื้อเลวลง โรคหลอดลมอักเสบติดต้อยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจ ทำให้ไก่ป่วยและตายมากขึ้น (Ziegler et al., 2002) การเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ส่งผลให้อัตราการไข่ลดลง 30% จากระดับปกติ (Gough et al., 1992) นอกจากนี้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อหลายชนิดทำให้เกิดรอยโรคที่ไต (nephropathogenic infectious bronchitis, NIB) โดยทำให้ไตอักเสบ (nephritis) ขยายใหญ่ สีซีด และมีการสะสมของยูเรต (urate) ในท่อไต พบได้ทั้งไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Ziegler et al., 2002)

อุบัติการณ์ของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดทำให้เกิดรอยโรคที่ไต พบรายงานในหลายประเทศ เช่น การเกิดโรคในไก่เนื้อที่ประเทศเบลเยียม อัตราการตาย 30% (Pensaert and Lambrechts, 1994) และประเทศสหรัฐอเมริกา อัตราการตาย 23% (Ziegler et al., 2002) ประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ได้เกือบทุกพื้นที่ทั่วประเทศ ถือเป็นโรคประจำถิ่น (endemic disease) โดยพบการเกิดโรคในไก่กระทองอายุระหว่าง 14-28 วัน ที่จังหวัดอุดรธานี อัตราการตาย 1-15% (นิยมศักดิ์ อุบลุม และคณะ, 2526) การเกิดโรคไตบวมจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กระทองที่อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา (ศักดิ์ชัย หิมะทองคำ สุณีย์ หิมะทองคำ และสละ กองสมัคร, 2528) การเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พัทลุง ระนอง ปัตตานี กระบี่ ตรัง และสงขลา โดยพบในไก่กระทองอายุ 12-44 วัน 29 ราย ไก่ไข่ อายุ 8-40 สัปดาห์ 5 ราย และในไก่พื้นเมืองอายุ 3 เดือน 1 ราย พบว่าไก่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจร่วมกับไตบวม 21 ราย และพบไตบวมอย่างเดียว 4 ราย (ชื่องมาศ อันตรเสน สมพงศ์ สหพงศ์ และคณะ, 2533)

ปัจจุบันวิธีการป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่นิยมคือ การใช้วัคซีน แต่อย่างไรก็ตามยังสามารถพบการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่ที่ได้รับวัคซีน

ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงาน หรือเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม จากรายงานของ Gough และคณะ (1992) พบการระบาดของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่พ่อแม่พันธุ์เป็นเชื้อที่แตกต่างจากสายพันธุ์ Massachusetts 41 (M41), D274 และ D1468 อุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่พบรายงานในหลายประเทศ เช่น การเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่ไข่ที่ประเทศจีน จากผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันพบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 5 ชนิด มีความเหมือนกันถึง 95-99 % แต่เชื้อที่แยกได้มีความเหมือนกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่รายงานใน GenBank เพียง 60-81 % (Liu and Kong, 2004) การเกิดโรคในไก่ไข่ที่รัฐนิวยอร์ก ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าเชื้อที่แยกได้มีลำดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากวัคซีนสายพันธุ์ DE 072 3.8% และ 6.4% ตามลำดับ และเชื้อที่แยกได้กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์ DE 072 ได้ แต่แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ DE 072 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่แยกได้จากไก่ป่วย แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้จากไก่ป่วยเป็นเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปของสายพันธุ์ DE 072 (Mondal, Lucio-Matinez, and Naqi, 2001) ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ที่แตกต่างจากที่เคยพบจากการแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้จากไก่ในเขตภาคใต้ โดยตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่ง 2 ตัวอย่างเป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจอย่างเดียว ส่วนอีก 3 ตัวอย่างพบรอยโรคที่ไตร่วมด้วย ผลการแยกซีโรไทป์ด้วยวิธี alpha neutralization test พบว่าเชื้อ 1 ตัวอย่างถูกยับยั้งด้วยแอนติซีรัมของ Connecticut, H52 และวัคซีนสายพันธุ์ของกรมปศุสัตว์ เชื้อ 2 ตัวอย่างเป็นสายพันธุ์เดียวกับวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ส่วนเชื้ออีก 2 ตัวอย่างที่แยกได้จากไก่ที่พบรอยโรคที่ไตไม่เข้าพวกใดเลย (ชื่องมาศ อันตรเสน, บุญเลิศ อ่าวเจริญ และนิमित เชื้อเงิน, 2533) นอกจากนี้ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อคือ การใช้วัคซีนที่ไม่ใช่ชนิดเดียวกับเชื้อก่อโรคจะไม่สามารถป้องกันโรคได้ (Pensaert and Lambrechts, 1994)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดก่อโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยกับสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database

2. เพื่อศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหูดดลหมอกเสบติดต่อชนิดก่อโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยในไก่เนื้ออายุต่างๆ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหูดดลหมอกเสบติดต่อสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยกับสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database ส่วนที่ 2 ทำการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อในไก่อายุ 2 และ 14 วัน โดยประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคจากอัตราการตาย น้ำหนักไก่มีชีวิต รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมและไต การตรวจหาเชื้อจากท่อลมและไต และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันภายหลังจากได้รับเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบลำดับของนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหูดดลหมอกเสบติดต่อสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยกับสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database
2. นำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาวัคซีนจากสเตรนท้องถิ่นในประเทศไทย
3. นำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสเตรนท้องถิ่นในประเทศไทย ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา
4. ได้ข้อมูลการก่อโรคในไก่อายุต่างๆ ของเชื้อไวรัสหูดดลหมอกเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตที่แยกได้จากภาวะระบาดในท้องที่ในประเทศไทยเพื่อใช้เป็นแนวทางประกอบการวินิจฉัยโรค
5. ได้ข้อมูลประกอบการพิจารณาอายุของไก่ที่เหมาะสมในการให้วัคซีนและโปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคหูดดลหมอกเสบติดต่อ เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากการเกิดโรค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เกิดจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis virus, IBV) จัดอยู่ในสกุล (genus) โคโรนาไวรัส (*Coronavirus*) วงศ์ (family) โคโรนาไวรัส (*Coronaviridae*) มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) ขนาดประมาณ 28 กิโลเบส เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped) ฝักรอบนอกประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายกระบอง (club-shaped proteins) เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิดคือ โปรตีนนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid protein, N), ไกลโคโปรตีนเมมเบรน (membrane glycoprotein, M) และ ไกลโคโปรตีนสไปค์ (spike glycoprotein, S) โดย S glycoprotein แบ่งออกเป็น S1 glycoprotein ซึ่งมีลักษณะเป็นกระเปาะยื่นออกจากตัวเชื้อไวรัส และ S2 glycoprotein ซึ่งมีปลายด้านหนึ่งติดกับ S1 glycoprotein และปลายอีกด้านหนึ่งยึดกับผิวของเชื้อไวรัส (Cavanagh, 1983)

เชื้อไวรัสชนิดนี้มีหลายสายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการก่อโรคในไก่รุนแรงแตกต่างกัน จากการทดลองของ Albassam, Winterfield และ Thacker (1986) เปรียบเทียบความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส NIB สายพันธุ์ Gray, Holte, Australian T และ Italian 731 (II 731) ในไก่พันธุ์ white leghorn อายุ 2 วัน ได้รับความเข้มข้น 10^5 embryo infectious dose 50% (EID_{50})/ตัว พบว่า 4 วันหลังจากได้รับเชื้อ ไก่ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Holte เกิดรอยโรคที่ไตเพียงเล็กน้อย แต่ในไก่ที่ได้รับเชื้อ สายพันธุ์ Australian T, Gray และ II731 พบรอยโรครุนแรงปานกลางและรอยโรครุนแรงมากขึ้นในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของรอยโรคในแต่ละสายพันธุ์ พบว่ารอยโรคที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ Australian T มีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ II731, Gray และ Holte ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chandra (1987) ซึ่งเปรียบเทียบความรุนแรงของอาการและรอยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส NIB สายพันธุ์ Gray, Holte, Australian T และ M41 ในไก่พันธุ์ white leghorn เพศผู้ อายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งได้รับความเข้มข้น 10^6 EID_{50} /ตัว พบอาการหายใจลำบากและมีเสียงดังครืดคราดในช่วง 2-7 วันหลังจากได้รับเชื้อ โดยพบอาการดังกล่าว 30%, 45%, 55% และ 100% ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Australian T, Holte, Gray และ M41 ตามลำดับ และในช่วง 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ พบไก่ตายจำนวน 8, 2, 1 และ 7 ตัว ในไก่ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Australian T, Holte, Gray และ M41 ตามลำดับ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคที่ไต พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค 85%, 35%, 20% และ 5% จากการได้รับเชื้อสายพันธุ์ Australian T, Holte, Gray และ M41 ตามลำดับ

ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ NIB นอกจากนี้จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อแล้ว Animas และคณะ (1994) พบว่าไก่อายุต่างกันมีความไวต่อเชื้อ NIB ต่างกัน โดยศึกษาในไก่พันธุ์ White leghorn อายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ให้เชื้อ NIB สายพันธุ์ Kagoshima-34 (K-34) ขนาด 10^6 EID₅₀/ตัว พบว่าในช่วง 3-6 วันหลังจากได้รับเชื้อ ไก่อายุ 2 สัปดาห์แสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจและท้องเสียรุนแรงกว่าไก่อายุ 4 และ 6 สัปดาห์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ignjatovic, Reece และ Ashton (2003) ที่พบว่าไก่พันธุ์ White leghorn สายพันธุ์ S และ HWL อายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ N/62 มีอัตราการตายมากกว่าอายุ 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าไก่แต่ละสายพันธุ์มีความไวต่อเชื้อต่างกันโดยสายพันธุ์ S และ HWL มีอาการป่วยมากกว่าไก่สายพันธุ์ W นอกจากนี้ปริมาณของเชื้อที่ไก่ได้รับมีผลต่อการก่อโรคแตกต่างกัน พบว่าไก่สายพันธุ์ W อายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับเชื้อขนาด 2×10^2 median ciliostatic dose (CD₅₀) ไม่แสดงอาการป่วย แต่เมื่อได้รับเชื้อขนาด 2×10^4 CD₅₀ ไก่แสดงอาการป่วย 70% และไก่สายพันธุ์ S อายุ 4 สัปดาห์มีอัตราการตาย 75% และ 45% จากการได้รับเชื้อขนาด 2×10^4 CD₅₀ และ 2×10^2 CD₅₀ ตามลำดับ

คุณสมบัติของ S1 glycoprotein

S1 glycoprotein เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological function) ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ โดยเป็นส่วนที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี (virus neutralizing antibody) และหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ phospholipase C แล้วสามารถเกิดการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดตอสายพันธุ์ M41 ที่ผ่านการแยกส่วนของ S1 glycoprotein ออกจากเชื้อไวรัส จะไม่สามารถกระตุ้นให้ไก่สร้างนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี (virus neutralizing antibody) และหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ phospholipase C แล้วไม่สามารถเกิดการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Cavanagh et al., 1986) จากการทดลองให้ N, M และ S1 glycoprotein ที่แยกได้จากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดตอชนิดก่อโรคที่โตสายพันธุ์ N1/62 และทำให้บริสุทธิ์ ขนาด 50 ไมโครกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อไก่พันธุ์ white leghorn พบว่าหลังจากไก่ได้รับ S1 glycoprotein ครั้งที่ 4 จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะและสามารถป้องกันการเกิดรอยโรคที่โต และต่อลม 86% และ 71% ตามลำดับ แต่ไก่ที่ได้รับโปรตีน N และ M ไม่พบการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะและไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคภายหลังจากได้รับเชื้อสายพันธุ์ N1/62 (Ignjatovic and Galli, 1994)

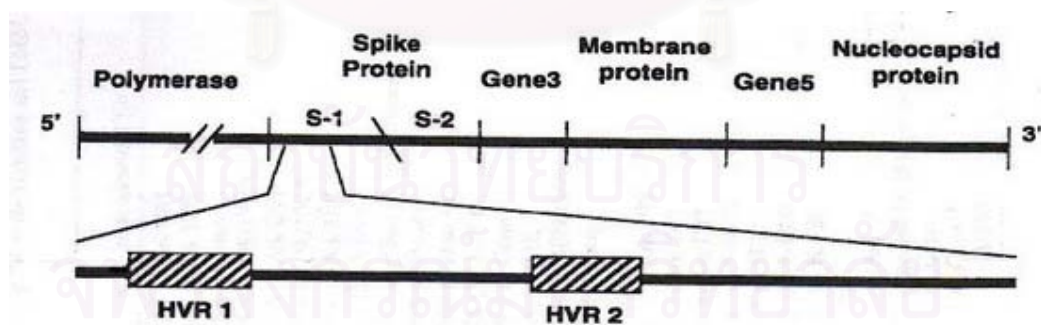
การวิเคราะห์โครงสร้างที่แสดงความเป็นแอนติเจน (antigenic structure) ใน S glycoprotein ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดตอสายพันธุ์ D207, D3896, D274, D3128, H120

และ B801 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) พบว่า S glycoprotein ประกอบด้วยตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี (epitope) 8 ตำแหน่ง โดย 6 ตำแหน่งตรวจพบใน S1 glycoprotein คือ S1-A ถึง S1-F และ 2 ตำแหน่งตรวจพบใน S2 glycoprotein คือ S2-G และ S2-H ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ S1 glycoprotein จะไม่ทำปฏิกิริยากับ S2 glycoprotein และตรวจพบระดับ virus neutralizing antibody ต่อ S1-A ถึง S1-E และ S2-G มีค่าสูงกว่า $2 \log_{10}$ (Koch et al., 1990) แต่จากผลการศึกษาของ Parr และ Collisson (1993) พบว่า S glycoprotein ของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อสายพันธุ์ Gray ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคที่ไต มี epitopes ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11 ชนิด โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 ชนิดสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ S glycoprotein ของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อสายพันธุ์ Arkansas DPI (Ark DPI), M41 และ Gray และพบว่า epitopes ที่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวเป็นชนิดที่เกิดจากการเรียงติดต่อกันของกรดอะมิโนบนสายโปรตีนอย่างต่อเนื่องหรือเป็นเส้นตรง ซึ่ง epitope แบบนี้จะคงอยู่แม้โปรตีนนั้นถูกย่อยเป็นชิ้นส่วนเล็กหรือถูกแปรสภาพไป เรียก epitope ชนิดนี้ว่า conformation independent epitope ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 7 ชนิด ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะต่อสายพันธุ์ Gray เท่านั้น และพบว่า epitopes ที่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวเป็นชนิดที่เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายโปรตีนที่อยู่ห่างกัน แต่เข้ามาใกล้กันจากการม้วนพับของสายโปรตีนแล้วรวมกันเป็น epitope ขึ้น เมื่อโปรตีนนั้นถูกแปรสภาพไป epitope เหล่านี้ก็จะถูกทำลายด้วย เรียก epitope ชนิดนี้ว่า conformation dependent epitope เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 11 ชนิดดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการทำให้ตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักเกิดสภาพแคระแกร็นและการยับยั้งการทำให้เกิดโรคที่ไตของเชื้อสายพันธุ์ Gray พบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเกิดสภาพแคระแกร็นของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟัก แต่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเกิดสภาพแคระแกร็นและไม่พบรอยโรคที่ไตของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟัก แสดงว่า epitopes บน S glycoprotein มีความเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อชนิดก่อโรคที่ไต

ความแตกต่างระดับโมเลกุลในยีนเอสวัน

กรดอะมิโนใน S1 glycoprotein เป็นองค์ประกอบที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่แสดงความเป็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบแต่ละสายพันธุ์ และพบว่าชนิดของกรดอะมิโนใน S1 glycoprotein ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อ 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ที่ 1 ได้แก่

สายพันธุ์ UK/6/82, D207/79 และ UK/142/86 ซีโรไทป์ที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ UK/123/82 และ ซีโรไทป์ที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ UK/123/82 และ NL/D3896/78 พบว่านิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันของ ซีโรไทป์ที่ 1 มีความแตกต่างกัน 19-32 นิวคลีโอไทด์ และซีโรไทป์ที่ 3 มีความแตกต่างกัน 11 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างซีโรไทป์ พบความแตกต่าง 19-34, 26-45 และ 19-34 นิวคลีโอไทป์ในซีโรไทป์ที่ 1 กับ 2, 1 กับ 3 และ 2 กับ 3 ตามลำดับ ส่วน ความแตกต่างของกรดอะมิโนพบว่าซีโรไทป์ที่ 1 มีความแตกต่างกัน 6-14 กรดอะมิโน และซีโรไทป์ ที่ 3 มีความแตกต่างกัน 8 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโนระหว่าง ซีโรไทป์ พบความแตกต่าง 10-17, 16-23 และ 20-23 กรดอะมิโนในซีโรไทป์ที่ 1 กับ 2, 1 กับ 3 และ 2 กับ 3 ตามลำดับ โดยพบความแตกต่างของกรดอะมิโนในยีนเอสวันตำแหน่งที่ 19-122 และ 251-374 (Cavanagh et al., 1992) สอดคล้องกับรายงานของ Kant และคณะ (1992) ที่พบความ ต่างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26-61, 132-149 และ 291-398 ใน S1 gene ของเชื้อไวรัส หลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ D207 และเชื้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (variant) จากสายพันธุ์ D207 ซึ่งความแตกต่างของชนิดกรดอะมิโนนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส (base substitution) ภายในกรดอะมิโน โดยพบการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่งหรือมากกว่า หนึ่งตำแหน่ง มีข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพบว่า ส่วนที่มักพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในยีน เอสวันเรียกว่าส่วนที่มีความหลากหลาย (hypervariable region) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ hypervariable region 1 ครอบคลุมกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 54-68 และ hypervariable region 2 ครอบคลุมกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 116-141 (Kusters et al., 1989) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงยีนโนมและยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ
ที่มา: Kingham et al., (2000)

การแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อโดยใช้นิวคลีโอไทด์

การที่ยีนเอสวันเป็นส่วนที่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโน จึงได้มีการนำส่วนของยีนเอสวันมาใช้เพื่อแยกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ Kwon, Jackwood, และ Gelb (1993) ทำการแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ด้วยวิธี RT-PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphism analysis; RFLP) ซึ่งวิธีนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนของยีนเอสวัน ที่มีขนาด 1720 base pairs (bp) จากนั้นตัดย่อยยีนเอสวัน ด้วยเอนไซม์ *HaeIII*, *XcmI* หรือ *BstYI* พบว่าสามารถแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้ตรงกับการแยกด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา และสามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้ โดยพบว่าเอนไซม์ *HaeIII* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ Holte, Arkansas, SE 17 และ Iowa 97 เอนไซม์ *XcmI* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ Beaudette, Connecticut และ Florida และเอนไซม์ *BstYI* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ Connecticut และ Florida จากรายงานของ Keeler และคณะ (1998) ได้ใช้วิธี RT-PCR เพิ่มจำนวนยีนเอสวัน เพื่อแยกซีโรไทป์ Massachusetts, Connecticut, Arkansas, JMk, Delaware (DE/072/92) และ California (CA/633/85) โดยออกแบบ primer ให้ครอบคลุมส่วน hypervariable ของเชื้อแต่ละซีโรไทป์ ซึ่งเชื้อแต่ละซีโรไทป์จะให้ผลผลิตจากกระบวนการ PCR ขนาด 355 261 308 550 492 และ 555 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนเอสวัน ซึ่งมีทั้งการใช้นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมด (Kuster et al., 1989; Zhou et al., 2004) และใช้เฉพาะส่วน hypervariable region (Gelb, et al., 2001)

อาการของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ

อาการของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อจะเริ่มด้วยอาการของระบบทางเดินหายใจ โดยมีการหายใจเสียงดังครืดคราด จามหรือไอ ภายใน 2 วันหลังจากได้รับเชื้อ ไก่ที่ป่วยจะพบการถ่ายเหลวเป็นน้ำมีสีเขียวปนขาวในช่วงวันที่ 3-11 หลังจากได้รับเชื้อ และจะพบการตายในวันที่ 5-9 หลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นไก่จะเริ่มกินอาหารได้ปกติในวันที่ 13 หลังจากได้รับเชื้อ และจะหายป่วยเป็นปกติในวันที่ 16 หลังจากได้รับเชื้อ (Chen et al., 1996)

ไก่ที่ได้รับเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อจะแสดงอาการซึม ไม่กินอาหาร ปีกตก เปลือกตาปิด มีการบวมรอบตาและปาก สะบัดหัว จาม หายใจหอบ ถ่ายเหลว ไขลด ในไก่ที่แสดงอาการป่วยเมื่ออายุ 29 สัปดาห์ พบว่ามีการไขลดลง 8% ภายใน 1 สัปดาห์ ไก่ตาย 0.65% ภายใน 1 วัน

และพบไก่ตาย 1.5% ภายใน 2 สัปดาห์ ในไก่ไข่ที่แสดงอาการป่วยเมื่ออายุ 50 สัปดาห์ พบว่าการไข่ลดลงจาก 51.9% เหลือเพียง 29.5% ในช่วง 4 สัปดาห์ของการป่วย (Parsons et al., 1992) มีรายงานว่าไก่ไข่ที่ได้รับเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อจะให้ไข่ที่มีสีเปลือกไข่ซีด ซึ่งเริ่มพบประมาณ 3 วันหลังจากได้รับเชื้อ และพบว่ามากกว่า 50% ของไก่ที่ได้รับเชื้อ จะพบไข่ที่มีสีเปลือกไข่ซีดในช่วง 2 สัปดาห์แรกภายหลังจากได้รับเชื้อ และไข่บางตัวอาจให้ไข่ที่มีสีเปลือกไข่ซีดจนถึง 4 สัปดาห์หลังจากได้รับเชื้อ แต่ส่วนใหญ่จะให้ไข่ที่มีสีปกติในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ (Cook and Huggins, 1986) ไก่ไข่ที่ได้รับเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อเมื่ออายุ 1 วัน จะทำให้เกิดความเสียหายต่อรังไข่และท่อไข่อย่างถาวร ซึ่งจะมีผลต่อการให้ไข่และคุณภาพของไข่ โดยพบว่าพบว่ามีถึงร้อยละให้ไข่จะมีไก่ที่ไม่ให้ไข่ ถึง 26% ส่วนไก่ที่สามารถให้ไข่ได้จะพบไข่ที่มีคุณภาพไม่ดี 20% (Crinion, Ball, and Hofstad, 1971) และพบว่าเมื่อไก่อายุ 8 และ 9 เดือนจะให้ไข่เพียง 55.7% และ 50.0% ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าไก่ที่ไม่ได้รับเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับที่อายุเดียวกันที่ให้ไข่ 76.3% และ 77.6% ตามลำดับ และคุณภาพของไข่ที่ได้จากไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 1 วัน จะมีคุณภาพไม่ดี โดยพบไข่ที่มีรูปร่างผิดปกติ เนื่องจากการสะสมของแคลเซียมบนผิวเปลือกไข่ไม่เท่ากัน ไข่แดงแยกตัวออกจากไข่ขาว และไข่ขาวมีลักษณะเหลวเป็นน้ำ (Crinion, 1972)

พยาธิกำเนิด

เชื้อไวรัส NIB ทำให้เกิดโรคทั้งระบบทางเดินหายใจและไต หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสผ่านทางระบบทางเดินหายใจ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่ทอลมได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ (Chong and Apostolov, 1982) ในวันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ จะพบเชื้อไวรัสที่เซลล์เยื่อบุทอลม ซึ่งเชื้อไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนและกระจายตัวอยู่ในเซลล์เยื่อบุทอลม ทำให้ไก่แสดงอาการไอ หายใจเสียงดังครืดคราด ในวันที่ 4 หลังจากได้รับเชื้อ จะพบเชื้อปริมาณมากในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุทอลม โดยเชื้อไวรัสจะทำลายเซลล์ และเซลล์เยื่อบุทอลมทำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุทอลม ในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าเชื้อไวรัสที่เซลล์เยื่อบุทอลมมีปริมาณน้อยลง และในวันที่ 8-20 จะไม่พบเชื้อไวรัสที่เซลล์เยื่อบุทอลม (Chen et al., 1996)

การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเข้าสู่ไต จะพบเชื้อในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์เยื่อบุท่อไต ในวันที่ 4 หลังจากได้รับเชื้อ โดยพบเชื้อใน proximal convoluted tubules (Chong and Apostolov, 1982), collecting ducts, collecting tubules และ distal convoluted tubules ซึ่งตำแหน่งของท่อไตที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ จากรายงานของ Chong และ Apostolov (1982) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ Australian T มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อมากที่สุดที่ท่อไตส่วน proximal convoluted tubules และจากรายงานของ Chen et al. (1996) พบว่า

เชื้อสายพันธุ์ MA-87 มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อมากที่สุดที่ท่อไตส่วน collecting ducts, collecting tubules และ distal convoluted tubules ในวันที่ 6-8 หลังได้รับเชื้อ พบเชื้อปริมาณมากใน collecting ducts, collecting tubules, distal convoluted tubules และ Henle's loop แต่พบเชื้อปริมาณน้อยใน proximal convoluted tubules นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ใน macula densa และสามารถพบเชื้อได้บ้างใน macrophage ปริมาณของเชื้อไวรัสที่ไตจะน้อยลงในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ และจะไม่พบเชื้อที่ไตเลยในวันที่ 16-20 หลังจากได้รับเชื้อ (Chen et al., 1996)

พยาธิวิทยา

รอยโรคที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจากการผ่าซากไก่ป่วย จะเริ่มพบได้ในวันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ โดยจะพบ hyperemia และ catarrhal exudates เล็กน้อยที่ท่อลม จากนั้นในวันที่ 4-8 หลังได้รับเชื้อจะพบการหนาตัวของเยื่อบุท่อลม ทำให้ผิวของเยื่อบุท่อลมไม่เรียบ ซึ่งรอยโรคดังกล่าวจะหายไปในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ รอยโรคที่ไตที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะเริ่มพบในวันที่ 4 หลังจากได้รับเชื้อ โดยจะพบไตบวม มีสีซีด ท่อไตและ ureter ขยายใหญ่และมีการคั่งของยูเรตอยู่ภายใน รอยโรคที่พบจะมีความรุนแรงมากในวันที่ 5-8 หลังจากได้รับเชื้อหรือในไก่ที่ตายจากนั้นความรุนแรงของรอยโรคจะลดลงและพบว่าในวันที่ 10-20 หลังได้รับเชื้อพบลักษณะไตบวมเพียงเล็กน้อย (Chen et al., 1996)

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลม ในวันที่ 2 หลังได้รับเชื้อ พบว่าซีเลียของเซลล์เยื่อบุท่อลมหายไปและบางเซลล์บวมหรือเกิดการเสื่อมแบบ vacuolar degeneration เซลล์ที่เกิดการเสื่อมหรือตายจะเกิดการลอกหลุด นอกจากนี้ยังพบการคั่งเลือด การบวมน้ำ และมีการแทรกของ heterophils ในชั้น lamina propria ในวันที่ 4-6 หลังได้รับเชื้อพบการแทรกของ heterophils และ lymphocytes ในเยื่อบุท่อลมและชั้น basal cells พบ macrophages จำนวนเล็กน้อยในชั้น lamina propria ในวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อพบว่าเซลล์เยื่อบุท่อลมมีการเรียงเป็นชั้น ๆ โดยพบทั้งเซลล์ที่มีลักษณะ cuboidal และ columnar เริ่มพบซีเลียบนเซลล์เยื่อบุท่อลม นอกจากนี้ยังมีการแทรกของ lymphocytes, plasma cells และ heterophils จำนวนเล็กน้อยภายในชั้น lamina propria รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมจะเป็นปกติในวันที่ 10-20 หลังจากได้รับเชื้อ (Chen et al., 1996)

Nakamura และคณะ (1991) ได้จำแนกระยะของการเกิดโรคที่ท่อลมจากรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลมได้ดังนี้

Degenerative stage พบเซลล์เยื่อบุท่อลมบางเซลล์เปลี่ยนจากรูปว่าง columnar เป็นค่อนข้างกลม มีซีเลียสั้นลงและเริ่มลอกหลุดจาก basement membrane มักพบการแทรกของ heterophils ระหว่างเซลล์เยื่อบุและ basal cells อาจพบ heterophils และเซลล์ที่ลอกหลุดในช่องว่างของท่อลม เกิดการเสื่อมและเกิดการลอกหลุดของเซลล์สร้างเมือก (goblet cells) นอกจากนี้ส่วน lamina propria และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ที่อยู่ระหว่างกระดูกอ่อนของท่อลมมีการบวมน้ำ และมีการแทรกของ lymphocytes และ heterophils จำนวนเล็กน้อย

Hyperplastic stage พบการขยายขนาดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุท่อลม แต่ยังไม่พบซีเลีย มักพบ heterophils ทั้งปกติและเสื่อมแล้วอยู่ระหว่างเซลล์เยื่อบุ ไม่พบ goblet cells และ alveolar mucus glands อาจพบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียสในส่วนที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบเซลล์เยื่อบุที่มีลักษณะเป็น stratified squamous epithelium และพบ heterophils , lymphocytes และ plasma cells จำนวนเล็กน้อยอยู่ใน lamina propria

Recovery stage พบเซลล์เยื่อบุที่มีลักษณะเป็น columnar ciliated cells พบ goblet cells และส่วน crypts ของเซลล์เยื่อบุมี alveolar mucus glands พบ lymphocytes และ plasma cells จำนวนเล็กน้อยอยู่ใน lamina propria

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตเริ่มพบภายหลังจากตรวจพบเชื้อไวรัสที่เซลล์เยื่อบุท่อไต ในวันที่ 4 หลังได้รับเชื้อจะพบการเปลี่ยนแปลงของท่อไตส่วน collecting duct, collecting tubules และ distal convoluted tubules โดยพบการขยายของท่อไต เกิดช่องว่างภายในเซลล์เยื่อบุท่อไต และเกิดการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุท่อไต นอกจากนี้ยังพบการคั่งเลือดเล็กน้อย การบวมน้ำ และการแทรกของ heterophils ในวันที่ 6-8 หลังได้รับเชื้อจะพบการเสื่อมแบบ vacuolar degeneration การตายและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วน collecting duct, collecting tubules, distal convoluted tubules และ Henle's loop การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของไตส่วนอื่นๆ เช่น interstitium พบการแทรกของ heterophils และ lymphocytes จำนวนมาก พบการขยายของช่อง Bowman's space ในบาง glomeruli ในวันที่ 10-13 หลังได้รับเชื้อพบการเสื่อมและการตายของเซลล์เยื่อบุ collecting duct, collecting tubules และ distal convoluted tubules เพียงเล็กน้อย มีการแทรกเป็นกลุ่มของ lymphocytes และ plasma cells กระจายทั่วไปในส่วน interstitium และในช่วงนี้เริ่มพบการสร้างเซลล์เยื่อบุทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลาย โดยพบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียส (mitotic figures) สัดส่วนระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสซึมสูง ในวันที่ 16-20 หลังได้รับเชื้อ พบ lymphoid nodules ในส่วน interstitium ท่อไตที่ถูกทำลายส่วนใหญ่จะเป็นปกติ มีการขยายเล็กน้อยของ collecting duct, collecting tubules และ distal convoluted tubules และพบการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุบางเซลล์ (Chen et al., 1996)

Chandra (1987) ได้จำแนกระยะของการเกิดโรคที่ไตจากรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตได้เป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะเฉียบพลัน (acute phase) 1-7 วันหลังจากได้รับเชื้อ พบการเสื่อมและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุท่อไตหลายระยะ มีการตายของเซลล์เยื่อบุเล็กน้อย พบเซลล์เยื่อบุที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียส มีการแทรกของ mononuclear cells และ heterophils รอบท่อไต glomeruli และชั้น submucosa ของ ureters ใน interstitium พบการแทรกของ heterophils และ lymphocytes

ระยะกึ่งเฉียบพลัน (subacute phase) 8-14 วันหลังจากได้รับเชื้อ พบการเปลี่ยนแปลงของท่อไตเช่นเดียวกับระยะเฉียบพลัน ท่อไตมีการขยายขนาดเนื่องจากการแทรกของเซลล์อักเสบจำนวนมากใน interstitium อาจพบการรวมตัวของเซลล์อักเสบเป็นกลุ่ม (focal aggregate) โดยพบกลุ่มของเซลล์อักเสบเหล่านี้กระจายอยู่ทั่วไต นอกจากนี้ยังพบการแทรกของเซลล์อักเสบริบรอบ glomeruli มากขึ้น เซลล์อักเสบที่พบมากคือ lymphocytes, heterophils และ plasma cells ตามลำดับ

ระยะเรื้อรัง (chronic phase) 15-21 วันหลังจากได้รับเชื้อ พบรอยโรคอย่างอ่อนที่ท่อไต ไม่พบเซลล์เยื่อบุที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียส ท่อไตที่ถูกทำลายส่วนใหญ่จะเป็นปกติ พบ plasma cells และ lymphocytes ที่ไตบางส่วน ระยะนี้จะพบการเปลี่ยนแปลงทั้งในส่วน medulla และ cortex

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของท่อนำไข่ พบว่าไกซึ่งเคยได้รับเชื้อเมื่ออายุ 1 วันและไม่ให้ไข่ จะมีความผิดปกติของท่อนำไข่ โดยพบท่อนำไข่ส่วนที่มีความผิดปกติยาวประมาณ 5 มิลลิเมตรถึง 5 เซนติเมตร มีลักษณะบางใส อยู่ระหว่างท่อนำไข่ส่วน magnum กับ isthmus นอกจากนี้ยังพบไข่แดงแตกในช่องท้อง รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าส่วนที่มีความผิดปกติเป็นส่วนที่ไม่มีการพัฒนาของต่อมภายในท่อนำไข่ (glandular hypoplasia) (Crinion et al., 1971)

การทำลายเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจะถูกทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อ (infectivity) เมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรด pH 3 และสภาวะความเป็นด่าง pH 12 นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Zhou et al., 2004) การทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยสารเคมี ได้แก่ phenol ที่ pH 4.3 (Gelb et al., 2001) 0.05% Betapropiolactone (BPL) นาน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Ignjatovic and Galli, 1994) การใช้ 0.1% Betapropiolactone นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส สามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อแต่ยังคงคุณสมบัติในการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง การใช้ 0.1% formalin นาน 6 ชั่วโมงที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อ ทำลายคุณสมบัติในการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงและทำลายเชื้อไวรัสได้ พบว่าสามารถทำให้เชื้อลดปริมาณได้ถึง 32 เท่า (King, 1984) การใช้ 0.1% formalin นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อ และทำลาย RNA ของเชื้อ นอกจากนี้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันจะถูกทำลายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม พบว่าการใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 15 นาทีสามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อ แต่ยังสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อ การใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ไม่สามารถทำลายเชื้อสายพันธุ์ Ark, Beaudette, M41 และ Connecticut (Jackwood, Yousef and Hilt, 1997) แต่สามารถทำลายเชื้อ SC021202 ที่แยกได้ในประเทศจีน (Zhou et al., 2004)

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันมีความทนทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยพบว่าการใช้เอนไซม์ protenase K นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Jackwood et al., 1997) 0.25% trypsinase นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 0.5% หรือ 1% trypsinase นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อได้ นอกจากนี้การแช่แข็งเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่เก็บใน allantoic fluid แล้วทำให้ละลายซ้ำๆ กัน 5-10 ครั้ง ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ (Zhou et al., 2004)

การป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

การป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันด้วยวัคซีนเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย แต่เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันมีหลายสายพันธุ์ การให้วัคซีนที่เป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กับเชื้อก่อโรคจะให้ผลในการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ (cross protection) ไม่ดีหรือป้องกันโรคไม่ได้เลย (Endo-Munoz and Faragher, 1989) ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่มีหลายสายพันธุ์ สำหรับประเทศไทยมีวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันจำหน่ายในท้องตลาดได้แก่ สายพันธุ์ Ma5, Connecticut, Massachusetts, Holland, Armidale A3, 4/91, Arkansas 99 และ C90/66 (จิโรจ ศศิปรีชญานันท์, 2547) ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนแต่ละชนิดในการป้องกันโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็น จากการศึกษาของ Albassam et al. (1986) พบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์ H120 เมื่ออายุ 10 วัน และได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันสายพันธุ์ Gray, Holte, Australian T และ Italian หลังจากได้รับวัคซีน 4 สัปดาห์ ไม่มีรอยโรคที่หลอดลม แต่ยังคงพบรอยโรคที่ไต 50-70% จากรายงานของ Pensaert และ Lambrechts (1994) พบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์ H120 หรือ H52 ไม่สามารถลดการติดเชื้อที่ไตหลังจากได้รับเชื้อสายพันธุ์ B1648 ที่ได้จากภาวะระบาดในท้องที่ แต่วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ B1648 สามารถป้องกันโรคได้ดี และ

จากรายงานของ Parsons และคณะ (1992) พบว่าวัคซีน สายพันธุ์ H120 สามารถป้องกันการเกิดโรคจากสายพันธุ์ M41 ซึ่งอยู่ในซีโรไทป์เดียวกันได้ดี จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการใช้วัคซีนป้องกันการโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันได้ผลดี จะต้องใช้วัคซีนสายพันธุ์เดียวกันกับเชื้อก่อโรคหรืออยู่ในซีโรไทป์เดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน

1. เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสหูดกลมอักเสบบิดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต ที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทยสายพันธุ์หนึ่ง ซึ่งเก็บไว้ในรูปของ allantoic fluid แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำออกมาละลายที่อุณหภูมิต่ำ ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสโดยฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ทาง allantoic cavity นำไขไก่ฟักเข้าตู้ฟักไขอุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บไขไก่ฟักในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บ allantoic fluid จากไขไก่ฟัก แล้วนำ allantoic fluid ที่ได้เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส (Ignjatovic et al., 2003) เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

2. การสกัด RNA

นำ allantoic fluid ที่เตรียมได้มาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Real Biotech, Taiwan) ดังนี้ นำ allantoic fluid จำนวน 200 ไมโครลิตร มาย่อยด้วย VB buffer containing carrier RNA 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 10 นาที เติมน้ำ 70% ethanol 400 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มการจับของ RNA บนผิว membrane จากนั้นล้างสิ่งปนเปื้อนบนแผ่นกรองด้วย Wash 1 buffer และ Wash buffer (concentrated) ในชุดสกัด RNA สำเร็จรูปดังกล่าว แล้วเติมน้ำ RNase-free water 50 ไมโครลิตร เพื่อล้างสาย RNA ที่ติดอยู่บนแผ่นกรอง ออก เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เตรียมนำไปใช้ในงานต่อไป

3. Primer

Primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ S1 gene ออกแบบโดยใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสหูดกลมอักเสบบิดต่อที่มีรายงานใน GenBank มาทำการจัดเรียงด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999) ซึ่ง primer ที่ได้ครอบคลุมส่วนของ hypervariable region

S1-forward (CTTTTGTTCACACTATGTAG)

S1-reverse (AGTACCATTAACAAAATAAGC)

4. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR

นำ RNA ที่ได้จากการสกัดมาสังเคราะห์เป็น cDNA และเข้าสู่ปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, USA) ดังนี้ AccessQuick™ Master Mix 25 ไมโครลิตร RNase free water 17 ไมโครลิตร AMV Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร S1-forward primer 1 ไมโครลิตร S1-reverse primer 1 ไมโครลิตร และ RNA ต้นแบบ (template) ที่ได้จากการสกัดดังกล่าวข้างต้น 5 ไมโครลิตร เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที และที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก โดยแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	45 วินาที
Polymerization	72 องศาเซลเซียส	90 วินาที
Final polymerization step	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

5. การวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR

นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 ug/ml แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง ultraviolet transilluminator ซึ่งจะได้ผลผลิตที่ขนาด 611 คู่เบส (base pairs, bp)

6. การเตรียมผลผลิตจาก PCR ให้บริสุทธิ์

ทำการแยกแถบของ PCR product จาก 1% agarose gel electrophoresis แล้วเตรียมให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA) โดยเติม Membrane Binding Solution บนแถบ PCR product ที่แยกได้ แล้วทำให้ gel ละลายที่อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส เท gel ที่ละลายแล้วลงใน SV minicolumn ปั่นเหวี่ยง 14,000 g 1 นาที นำ SV minicolumn ใส่ลงใน collecting tube แล้วเติม Membrane Wash Solution จากนั้นปั่นเหวี่ยง 14,000 g 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 และ 5 นาที ตามลำดับ นำ SV minicolumn ไปใส่ใน microcentrifuge tube แล้วเติม Nuclease-free water ปั่นเหวี่ยง 14,000 g 1 นาที เก็บผลผลิตที่ได้ ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่อไป

7. การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตจาก PCR ที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์ ส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยวิธี ABI Prism™ BigDye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในเอกสารของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไปอ่านผลด้วย ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่รายงานใน GenBank ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบความเหมือนของนิวคลีโอไทด์

สายพันธุ์	ประเทศ	Accession no.
JMK	สหรัฐอเมริกา	L14070
Gray	สหรัฐอเมริกา	L14069
PA/171/99	สหรัฐอเมริกา	AF419314
PA/4327/97	สหรัฐอเมริกา	AY789944
N9/74	ออสเตรเลีย	AIU29452
N2/75	ออสเตรเลีย	AIU29523
N1/62	ออสเตรเลีย	AIU29522
B1648	เบลเยียม	X87238
UK2/91	อังกฤษ	Z83976
BJQ	จีน	DQ070839
LS2	จีน	AY278246
LD3	จีน	AY277632
LHI10	จีน	AY273193
JP9758	ญี่ปุ่น	AY296746
JP/Ibaraki/2003	ญี่ปุ่น	AB120652
JP/Shimane/2002	ญี่ปุ่น	AB120651
K069-01	เกาหลี	AY257061
K507-01	เกาหลี	AY257064

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดก่อโรคที่โตที่แยกได้กับสายพันธุ์ที่รายงานไว้ใน GenBank database จำนวน 18 สายพันธุ์ (ดังตารางที่ 3.1)

จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999) เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดกลุ่ม phylogenetic relationship ของเชื้อด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)

การศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่เนื้อ

1. การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต ที่แยกได้จากไก่ป่วยในห้องที่ของประเทศไทย 1 ชนิด ซึ่งเก็บไว้ใน allantoic fluid แช่แข็ง -70°C องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อไวรัส โดยเตรียมเชื้อไวรัสให้เป็นสารละลายเจือจาง 10 เท่า (10 fold serial dilution) ซึ่งเริ่มแรกจะใช้เชื้อที่เก็บไว้ใน allantoic fluid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงใน eppendorf ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline, PBS) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงใน eppendorf ที่มี PBS ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันจนถึง eppendorf สุดท้าย จากนั้นฉีดสารละลายเชื้อแต่ละ dilution เข้าในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน (Jackwood et al., 2003) dilution ละ 6 ฟอง หลังการฉีดเชื้อ 5-7 วัน ทำการเปิดเปลือกไข่เพื่อตรวจดูตัวอ่อนในไข่ไก่ฟัก แล้วบันทึกจำนวนตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักที่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยจะพบการเกิดสภาพแคระแกร็นและมียูเรตที่ไต ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (Ziegler et al., 2002) นำผลการทดสอบตั้งแต่ dilution ที่ทำให้ตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักเกิดการเปลี่ยนแปลง 100% จนถึง dilution ที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเลย มาคำนวณหาค่าการเปลี่ยนแปลงสะสม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตอบสนอง (response) สะสม ของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักต่อเชื้อไวรัส แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส ในหน่วย embryo infectious dose 50% ($\text{EID}_{50}/0.1 \text{ ml}$) ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938) ดังนี้

วิธีนี้จะคำนวณจากค่าสะสม โดยหาตำแหน่ง 50% response ของค่าสะสม ซึ่งอยู่ระหว่าง 2 dilution จากนั้นหาค่า proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

A = % response สะสม ค่าแรกที่สูงกว่า 50%

B = % response สะสม ค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = dilution ของไวรัสที่ให้ค่า A

X = ลำดับการเจือจางไวรัส (dilution factor)

แทนค่าในสูตร

$$PD = \frac{A-50}{A-B}$$

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร

$$\log EID_{50} = (\log C) - (PD \times \log X)$$

2. ไม้ทดลอง

ไม้เนื้อพันธุ์ Arber Acres เพศเมีย อายุ 1 วัน จำนวน 150 ตัว สุ่มไม้แบ่งออกเป็นกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม้จำนวน 24 ตัว ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เมื่ออายุ 2 วัน

กลุ่มที่ 2 ไม้จำนวน 24 ตัว ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เมื่ออายุ 14 วัน

กลุ่มที่ 3 ไม้จำนวน 24 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมของกลุ่มที่ 1 และ 2 ได้รับ PBS เมื่ออายุ 2 และ 14 วัน

กลุ่มที่ 4 ไม้จำนวน 24 ตัว ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เมื่ออายุ 2 วัน

กลุ่มที่ 5 ไม้จำนวน 24 ตัว ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เมื่ออายุ 14 วัน

กลุ่มที่ 6 ไม้จำนวน 30 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมของกลุ่มที่ 5 และ 6 ได้รับ PBS เมื่ออายุ 2 และ 14 วัน

โดยกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้เก็บข้อมูลอัตราการป่วยและอัตราการตาย และกลุ่มที่ 4 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่ใช้ศึกษาโรคที่หลอดลมและไต

ให้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อซึ่งได้จากการหาความเข้มข้นของเชื้อในข้อที่ 1 โดยการหยอดตา ปริมาณ 0.1 ml/ตัว ความเข้มข้น $10^{5.85} EID_{50}/0.1 ml$

สังเกตอาการและบันทึกจำนวนไม้ป่วย-ไม้ตายในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ทุกวันเป็นเวลา 21 วัน หลังจากได้รับเชื้อ และชั่งน้ำหนักไม้รายตัวในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ

ทำการสุ่มเจาะเลือดจากไม้ 10 ตัว/กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ในวันที่ 0 7 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

ไม้ที่ตายในกลุ่มที่ 1 และ 2 นำมาผ่าซากเพื่อดูรอยโรคทางมพยาธิวิทยา และทำการสุ่มไม้ป่วยในกลุ่มที่ 4 และ 5 จำนวน 3 ตัว/กลุ่ม ในวันที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 หลังจากได้รับเชื้อ และจากกลุ่มที่ 6 จำนวน 3 ตัว/ครั้ง ในวันเดียวกันเพื่อทำเมตาซามาต แล้วนำซากไม้มาผ่าดูรอยโรคที่ท่อลม (trachea) และไตโดยให้คะแนนรอยโรคตามวิธีของ Wang และ Huang (2000) ดังนี้

ท่อลม

0 = ปกติ

- 1 = มีเมือกเล็กน้อย
- 2 = มีเมือกจำนวนมาก
- 3 = มีเมือกจำนวนมากและมีการคั่งเลือด

ไต

- 0 = ปกติ
- 1 = ไตบวม พบยูเรตเมื่อตรวจภายใต้กล้อง stereomicroscope
- 2 = ไตบวม มียูเรตเล็กน้อยเมื่อมองด้วยตาเปล่า
- 3 = ไตบวม มียูเรตจำนวนมากเมื่อมองด้วยตาเปล่า

เก็บท่อลมส่วนล่าง (distal portion) และไตส่วนหน้าด้านขวา (cranial right lobe) แชนใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน เพื่อตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และเก็บท่อลมส่วนบน (proximal portion) และไตด้านซ้าย (left lobe) เพื่อไปตรวจหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน (Ignjatovic et al., 2002)

3. การให้อาหารและน้ำ

ให้ไก่มีอาหารและน้ำกินตลอดเวลา

4. การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

ตัวอย่างท่อลมและไตที่เก็บใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน นำมาผ่านการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา ย้อมด้วย haematoxylin and eosin (H&E) และให้คะแนนรอยโรค ตามวิธีของ เชิดชัย และคณะ (2542) ดังนี้

ท่อลม

- 0 = ปกติ
- 1 = ซิลเลียหายไป epithelium ลอกหลุดบางส่วน มี lymphoid infiltration เล็กน้อยในชั้น lamina propria และ submucosa
- 2 = ซิลเลียหายไป epithelium hyperplasia มี lymphoid infiltration ปานกลางในชั้น lamina propria และ submucosa
- 3 = ซิลเลียหายไป epithelium hyperplasia มี lymphoid infiltration มากในชั้น lamina propria และ submucosa

ไต

- 0 = ปกติ
- 1 = มี lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue เป็นบริเวณเล็กๆ 1-2 แห่ง
- 2 = มี lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue เป็นบริเวณเล็กๆ 3-4 แห่ง
- 3 = มี lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue เป็นบริเวณกว้าง

5. การตรวจหาเชื้อไวรัส

การตรวจหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันจากตัวอย่างท่อลมและไตไก่อกลุ่มที่ 4 5 และ 6 จะทำการรวมตัวอย่างท่อลม 3 ตัวอย่างหรือไต 3 ตัวอย่างจากไก่ที่ฆ่าในวันเดียวกันและกลุ่มเดียวกัน โดยนำตัวอย่างมาตัดย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้ละเอียด แล้วเติม PBS เพื่อทำให้เป็นสารละลาย (suspension) 20% น้ำหนัก/ปริมาตร (w/v) (Animas et al., 1994) นำสารละลายที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยง 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน ยีนเอสวัน ข้อที่ 2-5

6. การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน

เลือดที่ได้จากการเจาะเลือดซึ่งเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือดทิ้งไว้ให้ซีรัมแยกออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป infectious bronchitis antibody test kit (BioChek, Holland) ชุดทดสอบนี้มีลักษณะเป็น microtitre plate 96 หลุม ซึ่งแต่ละหลุมจะถูกเคลือบด้วยเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์แล้ว (inactivated IBV antigen) ขั้นตอนการตรวจจะเริ่มจากการเจือจางซีรัม 1 ต่อ 500 จากนั้นเติมซีรัมที่ผ่านการเจือจางแล้วลงในหลุมของ microtitre plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย wash buffer จากนั้นเติม sheep anti-chicken Immunoglobulin G (IgG) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย wash buffer จากนั้นเติม substrate reagent ซึ่งมีสาร p-Nitrophenyl Phosphate เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase จะเกิดสีเหลือง ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution จากนั้นนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง microtitre plate reader ใช้ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านผลได้ไปคำนวณหาค่า sample to positive ratio (S/P ratio) ตามสูตร ดังนี้

$$S/P = \frac{\text{Mean of test sample} - \text{Mean of negative control}}{\text{Mean of positive control} - \text{Mean of negative control}}$$

ค่า S/P ratio ที่ได้นำมาคำนวณหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Log}_{10} \text{ titre} = 1.0(\log_{10} \text{ S/P}) + 3.62$$

$$\text{titre} = \text{antilog}$$

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1) **น้ำหนักตัวไม่มีชีวิต** เปรียบเทียบน้ำหนักตัวมีชีวิตของไก่อะหว่างกลุ่มที่ได้รับเชื้อกับกลุ่มควบคุมในช่วงอายุเดียวกันด้วยวิธี Unpaired t-test

7.2) **ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกัน** เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อกันของไก่อะหว่างกลุ่มที่ได้รับเชื้อกับกลุ่มควบคุมในช่วงอายุเดียวกันด้วยวิธี Unpaired t-test

7.3) **รอยโรคของท่อลมและไตทางมหัพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา** วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี Kruskal Wallis test

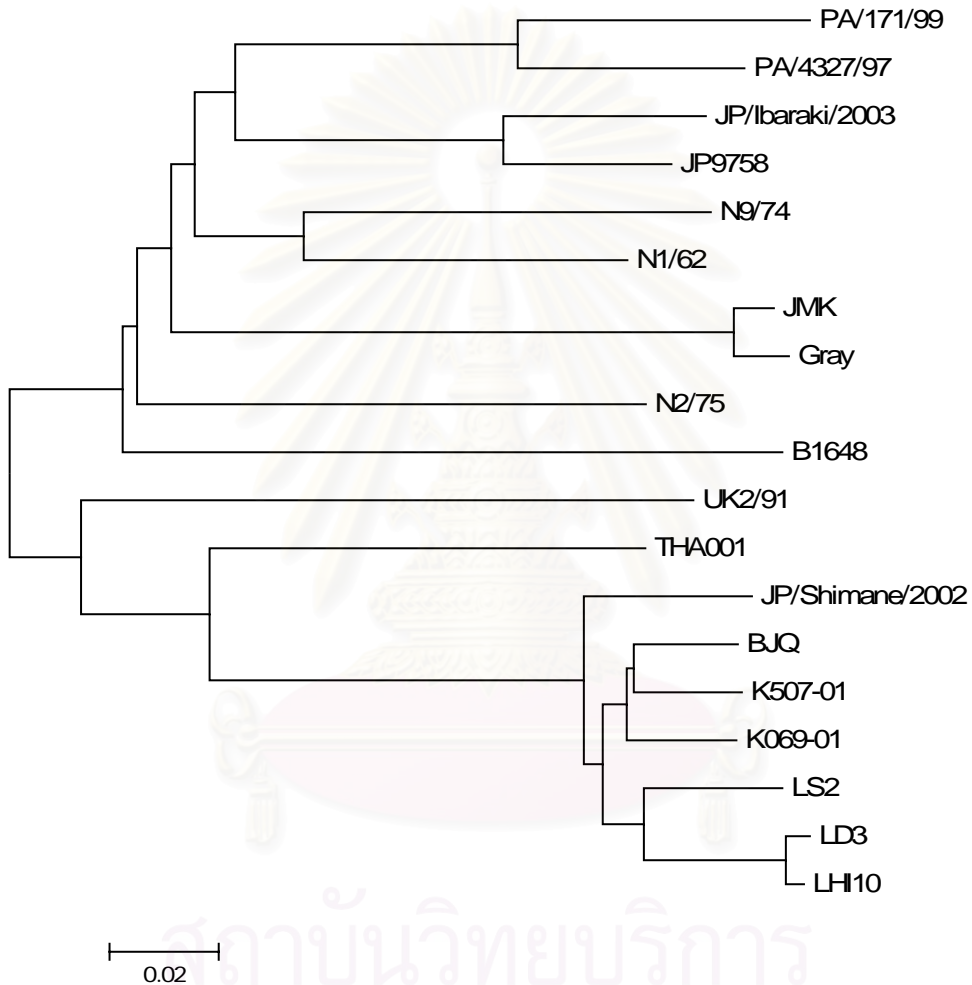
7.4) **การตาย** ใช้สถิติเชิงพรรณนาในรูปของอัตราการตาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน



ภาพที่ 4.1 แสดง phylogenetic relationship ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันของไวรัส หลอดลมอักเสบติดต่อระหว่างชนิดที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทย (THA001) และสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database

ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันที่ครอบคลุมส่วน hypervariable region และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทยและชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไต

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (%identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในยีนเอสวันระหว่างไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทย (THA001) และสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1. JMK	100																			
2. Gray	98.35	100																		
3. PA/171/99	71.18	71.72	100																	
4. PA/4327/97	72.51	72.21	89.11	100																
5. N9/74	71.71	71.69	71.39	74.65	100															
6. N2/75	71.89	71.83	70.89	74.28	76.38	100														
7. N1/62	74.57	73.67	74.15	78.55	83.79	76.30	100													
8. B1648	66.38	66.68	62.97	65.20	68.80	69.72	69.61	100												
9. UK2/91	62.34	61.70	64.29	65.03	65.58	66.83	66.22	60.02	100											
10. BJQ	57.75	56.01	59.76	62.15	64.77	67.09	65.59	61.06	67.54	100										
11. LS2	56.93	55.55	58.89	59.84	62.03	64.01	64.04	61.92	66.51	94.13	100									
12. LD3	55.02	54.30	59.88	60.82	63.44	63.62	62.99	60.43	65.87	92.05	93.56	100								
13. LHI10	54.74	54.03	59.25	60.08	64.15	63.98	63.02	60.17	66.22	92.05	93.56	99.07	100							
14. JP/Ibaraki/2003	69.51	69.42	76.22	77.16	74.93	75.73	77.95	67.33	63.27	60.47	58.41	58.90	59.93	100						
15. JP/Shimane/2002	59.62	55.16	56.54	59.00	64.06	63.88	65.59	61.65	66.63	93.72	92.73	90.78	90.78	61.10	100					
16. JP9758	70.69	71.26	76.03	78.06	75.83	76.03	80.63	70.14	65.33	62.45	61.02	60.43	60.80	92.57	63.52	100				
17. K069-01	58.62	56.87	59.55	60.61	64.89	67.43	65.73	63.27	67.25	96.09	94.84	92.54	92.54	60.25	94.24	63.19	100			
18. K507-01	57.73	55.98	60.71	62.30	64.24	65.40	66.12	59.66	66.89	94.90	93.49	91.80	92.01	59.58	92.19	61.94	94.63	100		
19. THA001	66.57	65.63	64.26	65.56	63.79	67.18	64.19	64.35	69.10	76.15	75.45	72.34	72.11	61.28	75.71	63.95	77.17	77.44	100	

สายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database พบว่าไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทย มีความเหมือนกับสายพันธุ์ JMK, Gray, PA/171/99, PA/4327/97, N9/74, N2/75, N1/62, B1648, UK2/91, BJQ, LS2, LD3, LHI10, JP9758, JP/Ibaraki/2003, JP/Shimane/2002, K069-01 และ K507-01 ร้อยละ 66.57, 65.63, 64.26, 65.56, 63.79, 67.18, 64.19, 64.35, 69.10, 76.15, 75.45, 72.34, 72.11, 61.28, 75.71, 63.95, 77.17 และ 77.44 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากผลการศึกษา phylogenetic relationship ในยีนเอสวันของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่ไทรระหว่างสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทยและสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database พบว่าไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่แยกได้ในเกาหลีใต้แก่ K069-01, K507-01 สายพันธุ์ที่แยกได้ในจีนได้แก่ BJQ, LS2, LD3 และ LHI10 และสายพันธุ์ที่แยกได้ในญี่ปุ่นได้แก่ JP/Shimane/2002 แสดงในภาพที่ 4.1

การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส

นำผลการทดสอบตั้งแต่ dilution ที่ทำให้ตัวอ่อนในไข่ไก่เกิดการเปลี่ยนแปลง 100% จนถึง dilution ที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเลย มาคำนวณหาค่าการเปลี่ยนแปลงสะสม และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตอบสนอง (response) สะสม ของตัวอ่อนในไข่ไก่ที่ฟักต่อเชื้อไวรัส ดังแสดงในตารางที่ 4.2 แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส ในหน่วย EID₅₀/0.1 ml ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938) ซึ่งวิธีนี้จะคำนวณจากค่าสะสม โดยหาดำแหน่ง 50% response ของค่าสะสม ซึ่งอยู่ระหว่าง 2 dilution จากนั้นหาค่า proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

A = % response สะสม ค่าแรกที่สูงกว่า 50%

B = % response สะสม ค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = dilution ของไวรัสที่ให้ค่า A

X = ลำดับการเจือจางไวรัส (dilution factor)

แทนค่าในสูตร

$$\begin{aligned} PD &= \frac{A-50}{A-B} \\ &= \frac{89-50}{89-43} \\ &= 0.85 \end{aligned}$$

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร

$$\begin{aligned}\log \text{EID}_{50} &= (\log C) - (\text{PD} \times \log X) \\ &= (-6) - (0.85)(1) \\ &= -6.85\end{aligned}$$

แสดงว่าที่ dilution $10^{-6.85}$ ไวรัสจะมีความเข้มข้น 1 EID_{50} /0.1 ml

ดังนั้นไวรัสที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น = $10^{6.85} \text{EID}_{50}$ /0.1 ml

ตารางที่ 4.2 ค่าการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนไข่ฟักที่สังเกตเห็นจริงและค่าสะสม

ระดับ การเจาะจง	การสังเกต		ค่าการสังเกตสะสม			เปอร์เซ็นต์
	เปลี่ยนแปลง	ปกติ	เปลี่ยนแปลง	ปกติ	อัตราส่วน	
10^{-5}	6	0	14	0	14/14	100
10^{-6}	5	1	8	1	8/9	89
10^{-7}	3	3	3	4	3/7	43
10^{-8}	0	6	0	10	0/10	0



ภาพที่ 4.2 ตัวอ่อนที่เกิดสภาพแคะแกระ็น (ซ้าย) และตัวอ่อนปกติ (ขวา)



ภาพที่ 4.3 ไตของตัวอ่อนมีการสะสมของยูเรต

อาการป่วยและอัตราการตาย

ภายหลังจากโก้ได้รับเชื้อ โก้แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ มีน้ำมูก มีน้ำตา ไอ จาม อ้าปากหายใจ หายใจเสียงดังครืดคราดและสะบัดหัว แสดงอาการของระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ อาการท้องเสีย ถ่ายเป็นน้ำมีสารยูเรตสีขาวปน อัตราการตายของโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันมีอัตราการตายสูงกว่าโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน โดยพบอัตราการตาย 58 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ในโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน ตามลำดับ โดยโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันตายระหว่างวันที่ 3-12 และโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วันตายระหว่างวันที่ 8-11 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ส่วนโก้กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไม่พบอาการป่วยและไม่มีโก้ตาย

ตารางที่ 4.3 อัตราการตายในโก้ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน

อายุโก้ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	จำนวนโก้ตาย (ตัว)						จำนวนโก้ตาย/ จำนวนโก้ทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)						
	0-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-21	
2	1	7	3	3	0	0	14/24 (58)
2*	0	0	0	0	0	0	0/24 (0)
14	0	0	1	1	0	0	2/24 (8)
14*	0	0	0	0	0	0	0/24 (0)

* โก้ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา



ภาพที่ 4.4 อาการป่วยของไก่ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อบนซ้าย แสดงอาการมีน้ำมูก บนขวา แสดงอาการมีน้ำตา

ล่างซ้าย แสดงอาการท้องเสีย

ล่างขวา แสดงการถ่ายเป็นน้ำมียูเรตปน

น้ำหนักตัวไก่

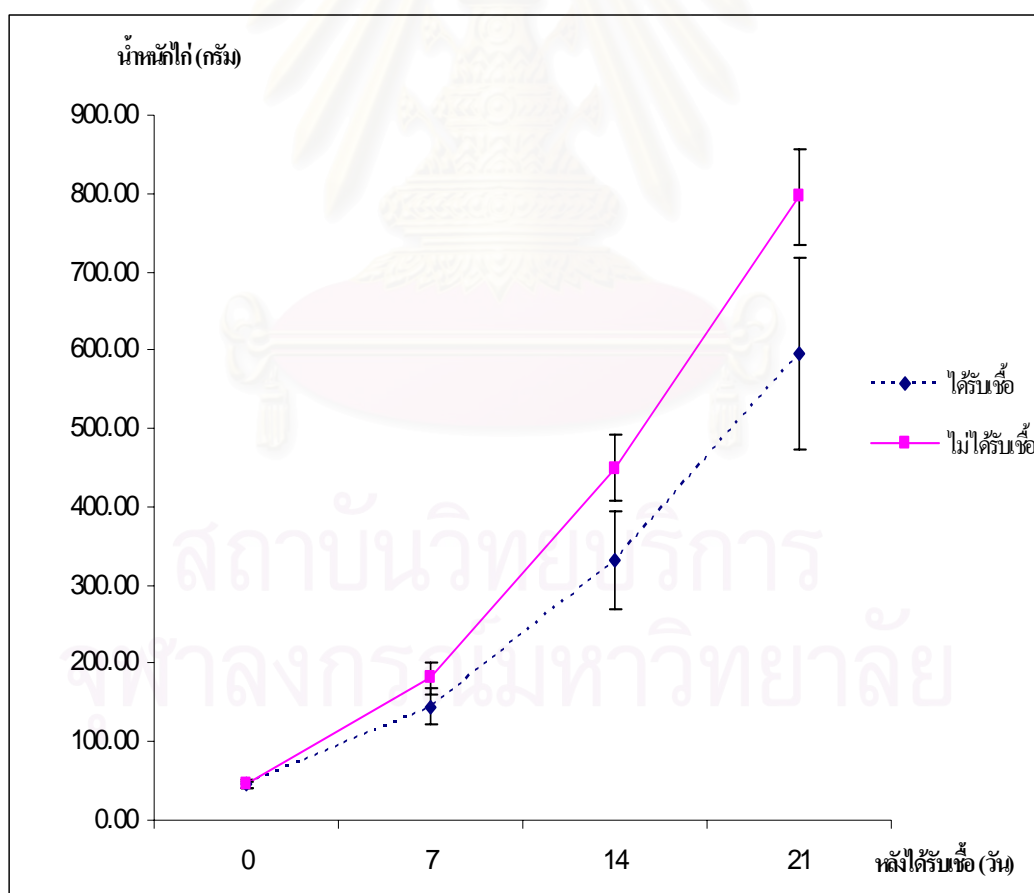
น้ำหนักตัวไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน แสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.5 พบว่าเมื่อไก่อายุ 2 วัน (ก่อนได้รับเชื้อ) น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน (กลุ่มที่ 1) และไก่กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 3) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 7 14 และ 21 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

น้ำหนักตัวไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แสดงในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.6 พบว่าเมื่อไก่อายุ 14 วัน (ก่อนได้รับเชื้อ) น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน (กลุ่มที่ 2) และไก่กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 3) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ภายหลังจากได้รับเชื้อ 7 14 และ 21 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)	น้ำหนักตัวไก่ (กรัม)	
	ไก่ที่ได้รับเชื้อ	ไก่กลุ่มควบคุม
0	46.5±4.7 ^a	45.4±4.6 ^a
7	145.3±22.2 ^a	181.4±20.5 ^b
14	331.0±62.2 ^a	449.8±42.9 ^b
21	595.0±122.6 ^a	795.8±60.9 ^b

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

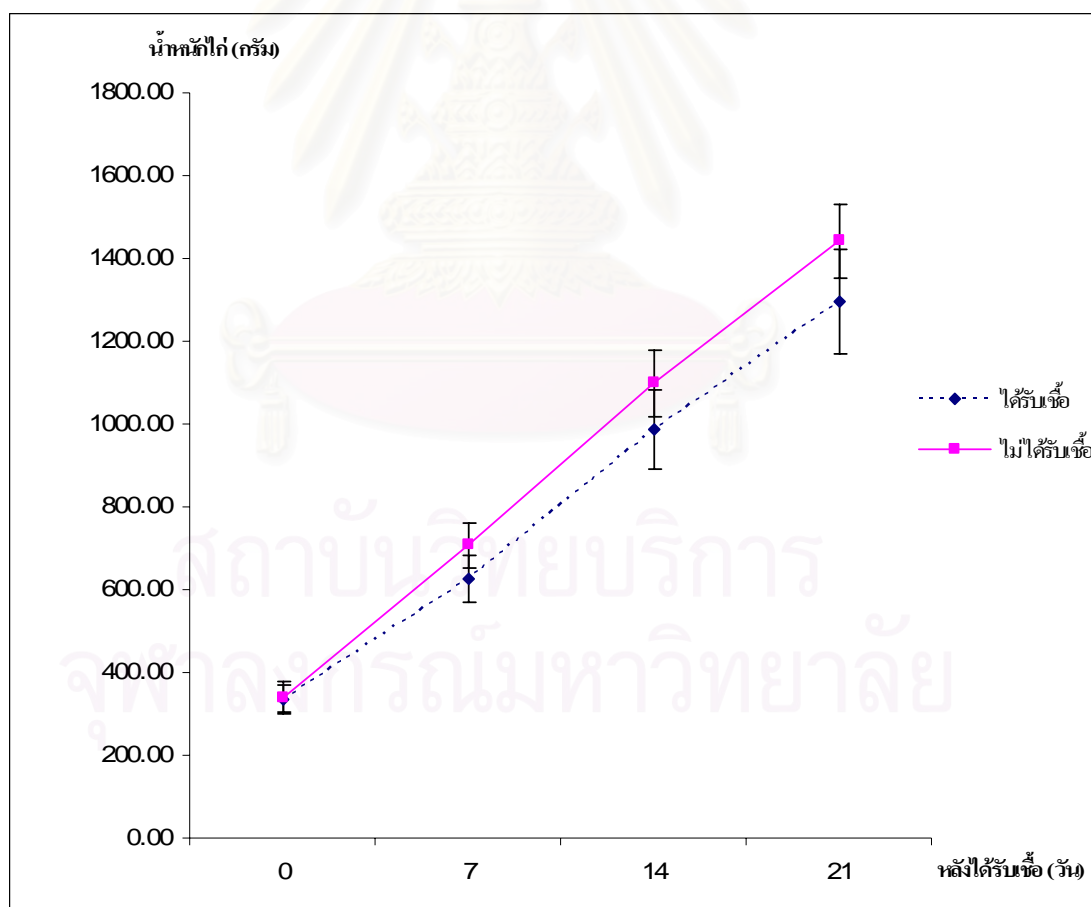


ภาพที่ 4.5 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)	น้ำหนักตัวไก่ (กรัม)	
	ไก่ที่ได้รับเชื้อ	ไก่อกลุ่มควบคุม
0	333.1±35.2 ^a	340.0±36.6 ^a
7	627.1±55.6 ^a	706.9±55.4 ^b
14	987.1±96.0 ^a	1097.9±78.5 ^b
21	1295.4±127.2 ^a	1441.7±90.5 ^b

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.6 น้ำหนักตัวไก่เฉลี่ยก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

รอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ทอลมและไต

ไก่ที่ได้รับเชื้อจะพบเมือกที่ทอลมในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ โดยสามารถพบเมือกปริมาณมากในช่วงสัปดาห์แรกหลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นปริมาณเมือกจะลดลงในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ ไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันพบรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ทอลมมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีคะแนนรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ทอลมเฉลี่ย 1.33 ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีคะแนนรอยโรคเฉลี่ย 1.00 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ส่วนไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อตรวจไม่พบรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ทอลม

ไก่ที่ได้รับเชื้อจะพบไตบวมเล็กน้อยในช่วงวันที่ 3-5 หลังจากได้รับเชื้อ และพบไตบวมและมียูเรตคั่งภายในท่อไตในช่วงวันที่ 5-7 หลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นจะพบไตบวมน้อยลงหรือไม่พบเลยในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ ไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันพบรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ไตมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีคะแนนรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ไตเฉลี่ย 1.00 ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีคะแนนรอยโรคเฉลี่ย 0.46 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อตรวจไม่พบรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ไต

ตารางที่ 4.6 คะแนนรอยโรคทางมหาวิทยาลัยวิทยาที่ทอลมหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

อายุไก่ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	คะแนนรอยโรคที่หลอดลม					เฉลี่ย
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)					
	1	3	5	7	14	
2	0,0,0	2,2,1	2,2,2	1,2,2	2,1,1	1.33 ^a
2*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b
14	0,0,0	2,2,2	2,1,1	1,1,2	1,0,0	1.00 ^a
14*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.7 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่อกลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

อายุไก่ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	คะแนนรอยโรคที่ไต					เฉลี่ย
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)					
	1	3	5	7	14	
2	0,0,0	0,0,0	3,3,3	3,3,0	0,0,0	1.00 ^a
2*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b
14	0,0,0	0,0,1	1,1,1	1,1,2	0,0,0	0.46 ^a
14*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมและไต

ไก่ที่ได้รับเชื้อจะเริ่มพบการหายไปของซีเลีย epithelium ลอกหลุดบางส่วน มี lymphoid infiltration เล็กน้อยในชั้น lamina propia และ submucosa ในไก่อบางตัว ภายในวันที่ 1 หลังจากได้รับเชื้อ โดยสามารถพบรอยโรคที่รุนแรงในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน จากนั้นรอยโรคจะเพิ่มระดับความรุนแรงมากขึ้น โดยยังสามารถพบรอยโรคได้จนถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลม พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยพบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมเฉลี่ย 2.13 ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีคะแนนรอยโรคเฉลี่ย 2.07 ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ส่วนไก่อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อตรวจไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลม

ไก่ที่ได้รับเชื้อจะเริ่มพบ lymphoid infiltration ที่ interstitial tissue เป็นบริเวณเล็กๆ 1-2 แห่งในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นรอยโรคจะเพิ่มระดับความรุนแรงมากขึ้น โดยยังสามารถพบรอยโรคได้จนถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไต พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

โดยพบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตเฉลี่ย 2.07 ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีคะแนนรอยโรคเฉลี่ย 1.40 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ส่วนไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อตรวจไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไต

ตารางที่ 4.8 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ท่อลมหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

อายุไก่ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	คะแนนรอยโรคที่ท่อลม					เฉลี่ย
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)					
	1	3	5	7	14	
2	0,0,3	2,2,3	1,1,3	2,3,3	3,3,3	2.13 ^a
2*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b
14	0,0,1	1,2,2	2,3,3	3,3,3	3,3,3	2.07 ^a
14*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.9 คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไตหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

อายุไก่ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	คะแนนรอยโรคที่ไต					เฉลี่ย
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)					
	1	3	5	7	14	
2	0,0,0	1,1,2	3,3,3	3,3,3	3,3,3	2.07 ^a
2*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b
14	0,0,0	0,1,1	1,2,3	0,1,3	3,3,3	1.40 ^a
14*	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0.00 ^b

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อน

ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน แสดงในตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.7 ก่อนได้รับเชื้อและภายหลังได้รับเชื้อ 7 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และกลุ่มควบคุมมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ภายหลังได้รับเชื้อ 14 และ 21 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย 1159.7 และ 1403.9 ซึ่งสูงกว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

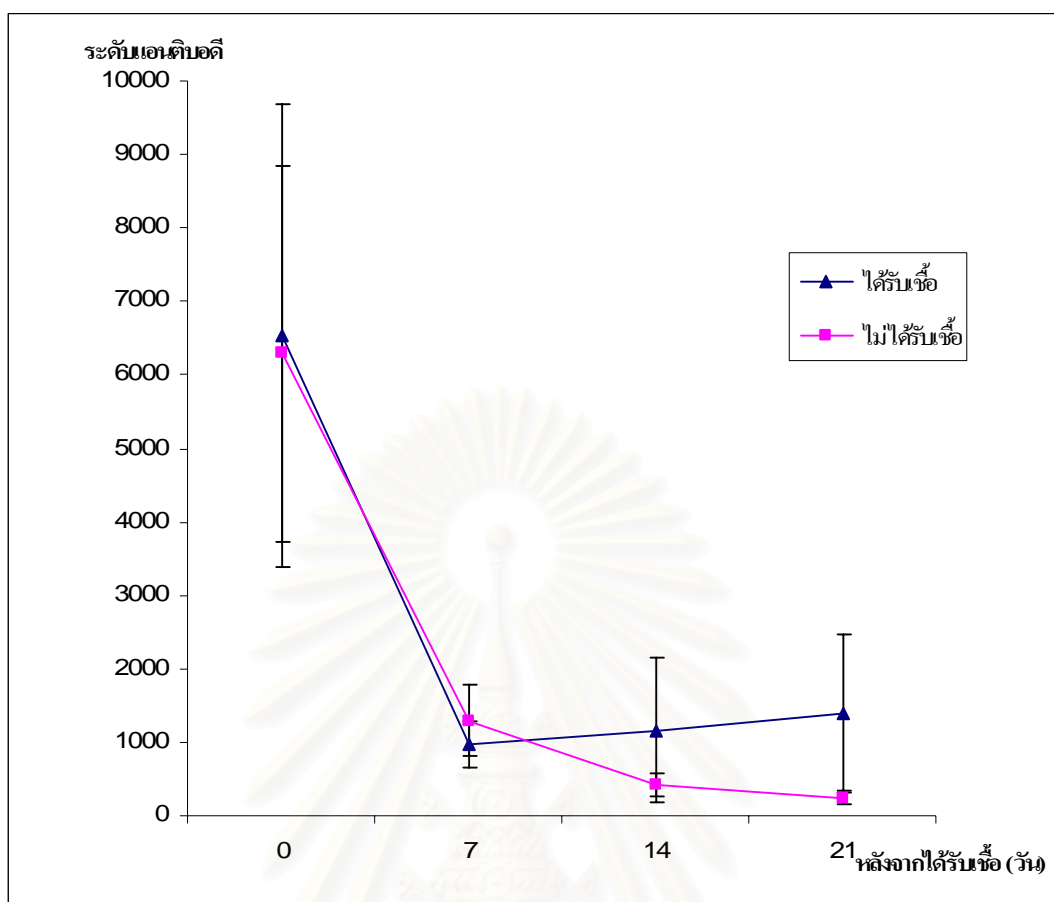
ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน แสดงในตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.8 ก่อนได้รับเชื้อและภายหลังได้รับเชื้อ 7 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และกลุ่มควบคุมมีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ภายหลังได้รับเชื้อ 14 และ 21 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย 1867 และ 1066.5 ซึ่งสูงกว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยของไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.10 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)	ระดับแอนติบอดี	
	ไก่ที่ได้รับเชื้อ	ไก่กลุ่มควบคุม*
0	6530.4±3146.48 ^a	6288±2548.2 ^a
7	970.1±311.83 ^a	1290.7±482.94 ^a
14	1159.7±982.89 ^a	419.9±160.82 ^b
21	1403.9±1058.71 ^a	229.8±78.8 ^b

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตาเมื่ออายุ 2 วัน

a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



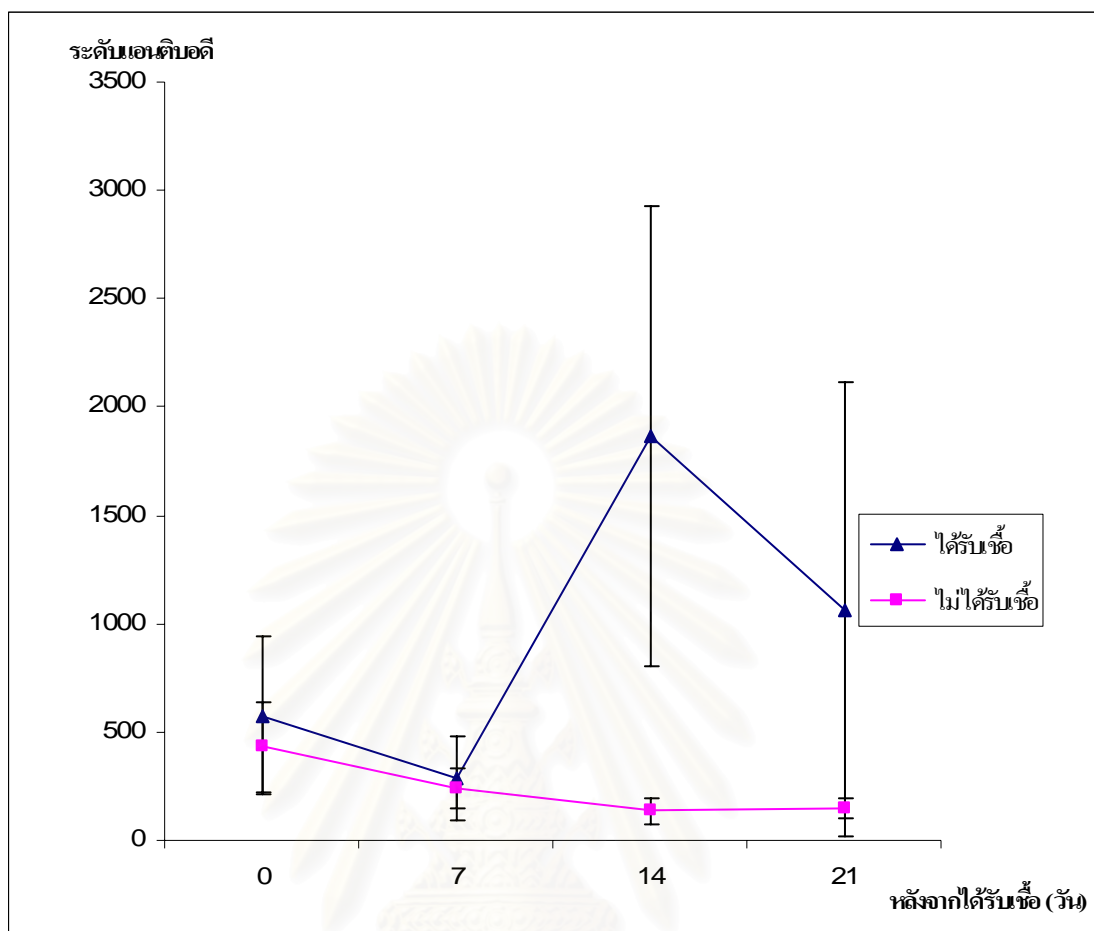
ภาพที่ 4.7 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่อกลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน และไก่อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

ตารางที่ 4.11 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่อกลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)	ระดับแอนติบอดี	
	ไก่อที่ได้รับเชื้อ	ไก่อกลุ่มควบคุม*
0	576.5±365.68 ^a	429.7±208.91 ^a
7	288.4±193.72 ^a	236.3±92.38 ^a
14	1867±1061.73 ^a	136.3±62.21 ^b
21	1066.5±1051.39 ^a	145.5±45.34 ^b

* ไก่อได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตาเมื่ออายุ 14 วัน

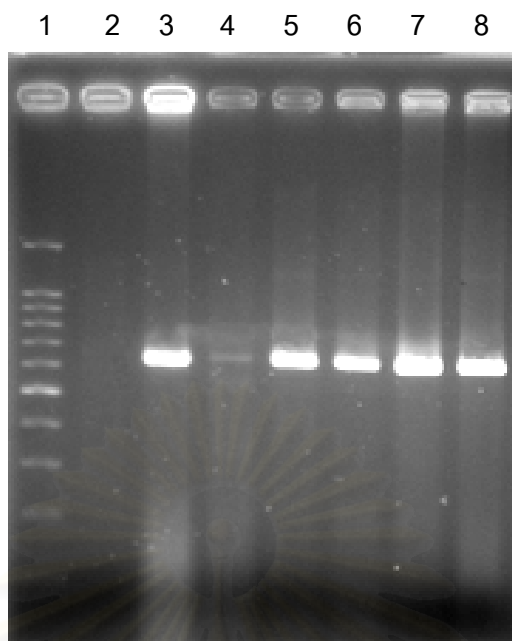
a, b- ตัวอักษรที่ต่างกันตามหลังตัวเลขในแนวนอนเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



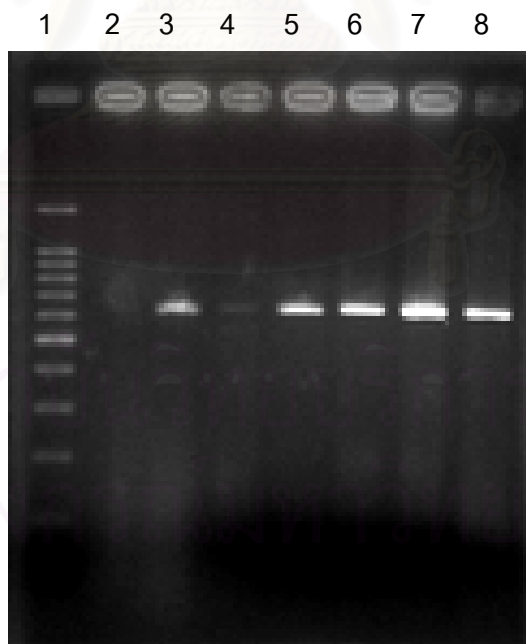
ภาพที่ 4.8 ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนและหลังจากได้รับเชื้อ ของไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน และไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

การตรวจหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR

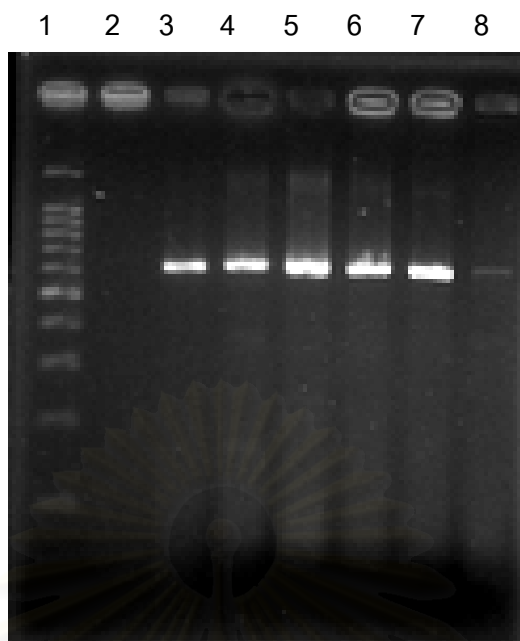
ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR แสดงในตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.9, 4.10, 4.11 และ 4.12 ไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนที่ท่อลมและไตได้ภายใน 1 วันหลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นจะตรวจพบจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วันหลังจากได้รับเชื้อ ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วันสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนที่ท่อลมได้ภายใน 1 วันหลังจากได้รับ แต่พบว่าที่ไตจะตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก่อนในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ จากนั้นจะตรวจพบจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วันหลังจากได้รับเชื้อ



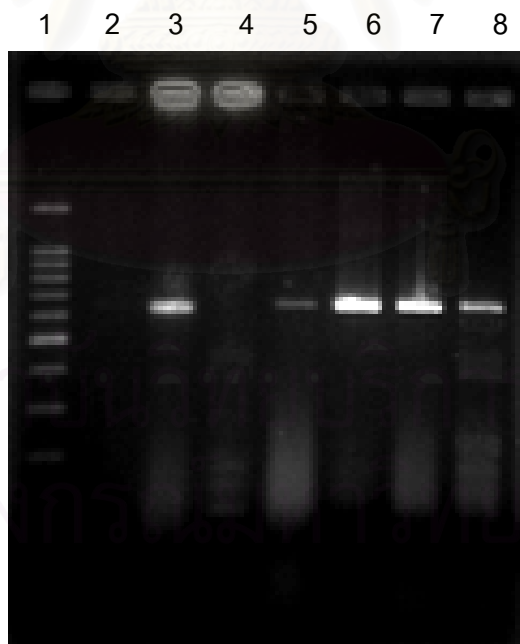
ภาพที่ 4.9 PCR amplified product จากท่อนมของกล้วยที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน 1 = molecular weight marker, 2 = negative control, 3 = positive control, 4 = 1 วันหลังได้รับเชื้อ, 5 = 3 วันหลังได้รับเชื้อ, 6 = 5 วันหลังได้รับเชื้อ, 7 = 7 วันหลังได้รับเชื้อ, 8 = 14 วันหลังได้รับเชื้อ



ภาพที่ 4.10 PCR amplified product จากไตของกล้วยที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน 1 = molecular weight marker, 2 = negative control, 3 = positive control, 4 = 1 วันหลังได้รับเชื้อ, 5 = 3 วันหลังได้รับเชื้อ, 6 = 5 วันหลังได้รับเชื้อ, 7 = 7 วันหลังได้รับเชื้อ, 8 = 14 วันหลังได้รับเชื้อ



ภาพที่ 4.11 PCR amplified product จากท่อลมของไก่อที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน 1 = molecular weight marker, 2 = negative control, 3 = positive control, 4 = 1 วันหลังได้รับเชื้อ, 5 = 3 วันหลังได้รับเชื้อ, 6 = 5 วันหลังได้รับเชื้อ, 7 = 7 วันหลังได้รับเชื้อ, 8 = 14 วันหลังได้รับเชื้อ



ภาพที่ 4.12 PCR amplified product จากไตของไก่อที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน 1 = molecular weight marker, 2 = negative control, 3 = positive control, 4 = 1 วันหลังได้รับเชื้อ, 5 = 3 วันหลังได้รับเชื้อ, 6 = 5 วันหลังได้รับเชื้อ, 7 = 7 วันหลังได้รับเชื้อ, 8 = 14 วันหลังได้รับเชื้อ

ตารางที่ 4.12 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสหูดลมอักษะบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR ในไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 14 วัน

อายุไก่ที่ได้รับเชื้อ (วัน)	ทอลม					ไต				
	หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)					หลังจากได้รับเชื้อ (วัน)				
	1	3	5	7	14	1	3	5	7	14
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* ไก่ได้รับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยการหยอดตา

+ = ตรวจพบเชื้อ

- = ตรวจไม่พบเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

การแยกกลุ่มของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ โดยใช้การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันมีรายงานการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากการแยกกลุ่มทางซีรัมวิทยา (ซีโรไทป์) ด้วยวิธี virus neutralization ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานนั้นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละซีโรไทป์ และเมื่อใช้ตรวจแยกเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากซีโรไทป์ซึ่งมีแอนติบอดีที่จำเพาะอยู่ก็จะทำให้ไม่สามารถบอกซีโรไทป์ของเชื้อได้ (Keeler et al., 1998) การแยกกลุ่มโดยใช้ RT-PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนเอสวันร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะก็เป็นวิธีที่นิยมใช้ แต่มีรายงานว่าเชื้อบางซีโรไทป์เช่น Gray กับ JMK มีรูปแบบของผลผลิตที่เกิดจากการตัดย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถแยกซีโรไทป์ดังกล่าวออกจากกันได้ (Kwon et al., 1993) การแยกกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน มีรายงานทั้งการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนเอสวันซึ่งประกอบด้วย 1720 base pair (Lee et al., 2004) การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน hypervariable region ซึ่งครอบคลุม hypervariable region I และ hypervariable region II มีหลายรายงาน โดยแต่ละรายงานใช้ขนาดของนิวคลีโอไทด์ที่ทำการวิเคราะห์แตกต่างกันไปได้แก่ 421 base pair (Lee, Hilt and Jackwood, 2001) 600 base pair (Keeler et al., 1998) และ 706 base pair (Gelb et al., 2001) แสดงให้เห็นว่าขนาดของนิวคลีโอไทด์ในส่วน hypervariable region I และ hypervariable region II ที่ใช้วิเคราะห์แยกกลุ่มของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อยุ่อย่างน้อยที่สุดต้องมีนิวคลีโอไทด์ประมาณ 421 base pair นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน hypervariable region I สามารถแยกกลุ่มของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้สอดคล้องกับการแยกกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนเอสวัน (Wang and Huang, 2000) แต่การแบ่งกลุ่มโดยวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันอาจไม่สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มทางซีรัมวิทยา ในกรณีที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในยีนเอสวันตรงตำแหน่ง epitopes แต่ไม่ทำให้การตอบสนองทางซีรัมวิทยาเปลี่ยนแปลง จะทำให้ได้เชื้อซีโรไทป์เดียวกันโดยอาจอยู่คนละกลุ่มเมื่อทำการแยกด้วยการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (Ziegler et al., 2002) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อดสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้ครอบคลุม hypervariable region I และ hypervariable region II และ primer ดังกล่าวจะทำให้ได้ผลผลิตจาก PCR ขนาด 611 base pair จึงเป็นส่วนที่สามารถใช้วิเคราะห์เพื่อแยกกลุ่มของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้

ผลการแยกกลุ่มของเชื้อโดย phylogenetic relationship พบว่าเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดลายพันธุหนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับสายพันธุที่แยกได้จากประเทศเกาหลี จีน และญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชีย แต่เมื่อพิจารณาความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยมีความเหมือนกับสายพันธุที่แยกได้จากประเทศต่างๆ 61.28-77.44 % เมื่อวิเคราะห์ตามข้อสรุปของ Kingham และคณะ (2000) ที่กล่าวว่าเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดที่มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันน้อยกว่าหรือเท่ากับ 75% จัดเป็นเชื้อต่างซีโรไทป์กัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Ziegler และคณะ (2002) ที่กล่าวว่าเชื้อสายพันธุ T, Holte, Gray, B1648 และ Bj1/01 มีความเหมือนของยีนเอสวัน 67.5-81.2% จัดเป็นเชื้อต่างกลุ่มกัน แสดงว่าเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสายพันธุที่แตกต่างจากเชื้อที่มีรายงานในประเทศอื่นๆ สอดคล้องกับการตรวจพบเชื้อในประเทศจีนที่รายงานโดย Liu และ Kong (2004) พบว่าเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดที่แยกได้ในประเทศจีนคือ LD3, LS2, LX4 LH2 และ LH10 มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์กับเชื้อที่แยกได้ในประเทศแถบยุโรป ออสเตรเลีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกาเพียง 48-79% และจากรายงานของ Yu และคณะ (2001) พบว่าเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดที่แยกได้ในประเทศจีน มาเลเซีย และสิงคโปร์ เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน พบว่าเชื้อบางสายพันธุมีความใกล้เคียงกับสายพันธุที่แยกได้ในยุโรป (D207) บางสายพันธุมีความใกล้เคียงกับสายพันธุที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (M41, Beudet และ Connecticut) และบางสายพันธุมีความใกล้เคียงกับสายพันธุที่แยกได้ในประเทศอิสราเอล (isolate 2886) แต่ที่น่าสนใจคือ บางสายพันธุมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ H120 ซึ่งเป็นสายพันธุในวัคซีนเชื้อเป็น แสดงว่าเชื้อก่อโรคที่แยกได้มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (recombination) กับสายพันธุในวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากการเกิด recombination ของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อด ของ Estevez, Villegas และ El-Attrache (2003) ที่พบว่าเมื่อฉีดเชื้อสายพันธุ Massachusetts และสายพันธุท้องถิ่น (D 072 like virus) เข้าในไข่ไก่ฟักฟองเดียวกัน จะตรวจพบเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันเหมือนกับสายพันธุตั้งต้นทั้งสองสายพันธุ จากรายงานของ จิโรจ ศศิปรีชญานันท์ (2004) พบว่าประเทศไทยมีวัคซีนป้องกันโรคหูดมออักเสบติดต่อดจำหน่ายในท้องตลาดหลายสายพันธุได้แก่ Massachusetts, Holland, Connecticut, Ma5, Armidale A3, 4/91, Arkansas 99 และ C90/66 และจากรายงานของ Lee, Sung และ Kwan (2004) พบว่าการใช้วัคซีนเชื้อเป็นที่มีความหลากหลายของสายพันธุในท้องที่เดียวกัน เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อด หรือทำให้เกิดเชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อดสายพันธุที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงาน ดังนั้นการใช้วัคซีนดังกล่าว อาจทำให้เกิดเชื้อสายพันธุใหม่ในประเทศไทย ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างสาย

พันธุ์ของเชื้อได้ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามธรรมชาติ (natural mutation) ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เช่น การเกิด point mutation และ insertion mutation ในเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ SC021202 ที่แยกได้ในประเทศจีน (Zhou et al., 2004)

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้เป็นชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต แต่เมื่อไก่ได้รับเชื้อแล้วพบว่าเชื้อสามารถทำให้ไก่ป่วยและแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจด้วย โดยพบอาการ มีน้ำมูก มีน้ำตา ไอ จาม อ้าปากหายใจ หายใจเสียงดังครืดคราดและสะบัดหัว รวมทั้งทำให้เกิดรอยโรคที่ท่อลมทั้งทางมหาวิทยาลัยและจุลพยาธิวิทยา แสดงว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสามารถก่อโรคร้ายในระบบทางเดินหายใจได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Purcell, Tham และ Surman (1976) ที่พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์ Australian T แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจอย่างอ่อนภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ พบอาการไอและจามอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ภายหลังจากได้รับเชื้อ และไก่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจจนถึงวันที่ 12 หลังจากได้รับเชื้อ การศึกษาของ Animas และคณะ (1994) พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์ K-34 แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจภายในวันที่ 3-6 หลังจากได้รับเชื้อ

การศึกษาคั้งนี้พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วันมีอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chong และ Apostolov (1982) ที่พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์ Australian T ทำให้ไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 1 วันมีอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 15 วัน โดยพบอัตราการตาย 44.8 % และ 25 % ในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 1 วันและ 15 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการศึกษาในไก่ที่อายุมากกว่า 14 วัน แต่ยังพบว่าแนวโน้มของอัตราการตายในไก่ที่ได้รับเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อเมื่ออายุน้อยมีอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุมาก จากผลการศึกษาของ Animas และคณะ (1994) พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์ K-34 เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ แสดงอาการป่วยรุนแรงและมีอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 4 และ 6 สัปดาห์ โดยพบว่าไก่ที่ใช้ศึกษากลุ่มอายุละ 4 ตัวมีการตาย 2 ตัวในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ แต่ไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 4 และ 6 สัปดาห์ไม่มีไก่ตาย ผลการศึกษาของ Ignjatovic และคณะ (2003) พบว่าไก่พันธุ์ White leghorn สายพันธุ์ S และ HWL ที่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์ N1/62 เมื่ออายุ 2 สัปดาห์มีอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งไก่สายพันธุ์ S ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 4 สัปดาห์ มีอัตรา

การตาย 90 % และ 45 % ตามลำดับ และไก่สายพันธุ์ HWL ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 และ 4 สัปดาห์ มีอัตราการตาย 70 % และ 25 % ตามลำดับ

เมื่อพิจารณา epitope ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดีของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ จะพบว่าบน S glycoprotein มี epitopes 11 ตำแหน่ง แบ่งออกเป็น epitopes ชนิดที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ 7 epitopes และชนิดที่ไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์ คือสามารถพบ epitope ชนิดเดียวกันในเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์อื่นๆ 4 epitopes (Parr and Collisson, 1993) ดังนั้นเมื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ที่มีการเคลือบผิวของ microtitre plate ด้วยเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ จึงสามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG หลายชนิด ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย epitopes แต่ละตำแหน่งดังกล่าวข้างต้น

ระดับแอนติบอดีในไก่อายุ 2 วัน มีค่าเฉลี่ยสูงมาก เนื่องจากเป็นแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ไก่ จะเห็นได้จากการที่ระดับแอนติบอดีในกลุ่มควบคุมลดลงเรื่อยๆ เมื่ออายุมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ไก่มีความสอดคล้องกับรายงานของ Davelaar และ Kouwenhoven (1977) โดยพบว่าระดับนิวทรัลไลซิงแอนติบอดีต่อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ได้รับมาจากแม่ไก่จะตรวจพบสูงมากที่อายุ 1 วัน จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนหมดไปเมื่ออายุ 30 วัน จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ไก่ไม่มีผลในการป้องกันการก่อโรคของเชื้อที่ใช้ศึกษา เนื่องจากไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน พบอาการป่วยและการตายสูงในช่วง 7 วันแรกของการได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงที่มีระดับแอนติบอดีสูงมาก แสดงว่าภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ไก่ไม่ใช่นิวทรัลไลซิงแอนติบอดี จากเหตุผลดังกล่าวประกอบกับผลการวิเคราะห์ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวัน ที่พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงาน ดังนั้นแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ไก่และไม่มีผลในการป้องกันโรค จึงเป็นแอนติบอดีที่ไม่ใช่นิวทรัลไลซิงแอนติบอดี และเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย epitopes ที่ไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์ การตอบสนองของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา เริ่มพบการตอบสนองภายหลังจากวันที่ 7 ของการได้รับเชื้อ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cook และคณะ (1991) ที่ตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG ในวันที่ 9 ภายหลังจากไก่ได้รับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เป็นที่น่าสังเกตว่าแอนติบอดีที่สูงขึ้นในวันที่ 14-21 ภายหลังจากไก่ได้รับเชื้อ เป็นช่วงที่ไม่พบการตายของไก่ แสดงว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นภายหลังจากไก่ได้รับเชื้อมีผลในการยับยั้งเชื้อ ดังนั้นแอนติบอดีดังกล่าวจึงเกิดจากการกระตุ้นด้วย epitope ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์นั้นๆ และมีนิวทรัลไลซิงแอนติบอดีรวมอยู่ด้วย จึงมีผลในการยับยั้งเชื้อ สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่จะสามารถป้องกันการเกิดโรคได้

จะต้องเกิดจากเชื้อสายพันธุ์เดียวกันหรืออยู่ในซีโรไทป์เดียวกัน (Parsons et al. 1992; Pensaert and Lambrechts 1994)

ผลการศึกษาในครั้งนี้นี้แสดงให้เห็นว่าความต้านทานต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทยจะเพิ่มขึ้นตามอายุของไก่ ซึ่งจะเห็นได้จากอัตราการตาย และแนวโน้มความรุนแรงของรอยโรคทั้งทางมหาวิทยาลัยและจุลพยาธิวิทยาในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน น้อยกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 2 วัน ความต้านทานต่อโรคที่เพิ่มขึ้นตามอายุมีปัจจัยที่สำคัญคือ ระบบภูมิคุ้มกันของไก่ โดยพบว่าไก่อายุน้อยจะมีการพัฒนาของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์หรือบางส่วนยังไม่มีการพัฒนา รวมทั้งอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organs) ยังเจริญไม่เต็มที่ (Animas et al., 1994) จากรายงานของ Davelaar และ Kouwenhoven (1976) พบว่าต่อม Harderian ซึ่งเป็นอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันรอบนอก (peripheral lymphoid organs) อยู่บริเวณใต้ตา จะมีปริมาณของ plasma cells เพิ่มขึ้นตามอายุของไก่ จากการศึกษาพบว่าต่อม Harderian ของไก่อายุ 1-3 วัน ยังไม่มีการสะสมของ lymphoid cells และ plasma cells แต่ในไก่อายุ 20 วัน จะพบ plasma cells แล้ว เมื่อไก่ได้รับวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อกัน พบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนเมื่ออายุ 1 วัน จะเริ่มพบ plasma cells ที่ต่อม Harderian ในวันที่ 3 ภายหลังจากไก่ได้รับวัคซีน แต่ในวันเดียวกันไก่ที่ได้รับวัคซีนเมื่ออายุ 20 วัน พบปริมาณของ plasma cells เพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ผลการศึกษาของ Cook และคณะ (1991) ยังพบว่าไก่ที่ไม่มี B lymphocytes จะพบอาการของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันรุนแรงกว่าไก่ปกติ โดยพบการมีน้ำมูกและเมือกในท่อลมเป็นระยะเวลานาน ปริมาณเชื้อไวรัสที่แยกได้มากกว่า ตรวจพบเชื้อไวรัสที่อวัยวะต่างๆ เป็นระยะเวลานาน และซีเลียของท่อลมถูกยับยั้งการทำงานเป็นระยะเวลานานกว่าไก่ปกติ

นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกัน ยังเกิดจากความสามารถของเชื้อที่จะเพิ่มจำนวนที่อวัยวะเป้าหมาย ความรุนแรงของรอยโรคที่อวัยวะเป้าหมายซึ่งเกิดจากการทำลายของเชื้อ ความรวดเร็วของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานต่อเชื้อและการทำลายเชื้อ และระยะเวลาที่ใช้ในการกลับเป็นปกติของอวัยวะที่ถูกเชื้อทำลาย (Ignjatovic et al. 2003) จากผลการศึกษาของ Nakamura และคณะ (1991) พบว่าเซลล์เยื่อหุ้มที่มีซีเลียและเซลล์ที่สร้างเมือกของท่อลมของไก่ที่มีความไวต่อการติดเชื้อจะหายไป และใช้เวลาในการกลับเป็นปกตินานกว่าไก่ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ และสามารถตรวจพบเชื้อที่ท่อลมได้นานกว่าไก่ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ จากผลการศึกษาของ Ignjatovic และคณะ (2003) พบว่าการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเช่น lymphocytes ที่ไตของไก่ที่มีความต้านทานจะเกิดขึ้นเร็วกว่าไก่ที่มีความไวต่อเชื้อ โดยจะพบการตอบสนองของ lymphocytes ภายใน 3 วัน หลังจากได้รับเชื้อและรอยโรคที่ไตจะหายเป็นปกติได้ในวันที่ 5 หลังจากได้รับเชื้อ

สรุป เชื้อไวรัสหูดมออักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตสายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากไก่ป่วยในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต ซึ่งมีรายงานในประเทศอื่นๆ และการก่อโรคของเชื้อจะรุนแรงในไก่อายุน้อย

ข้อเสนอแนะ การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวที่แยกได้จากไก่ป่วยในท้องที่ของประเทศไทย แม้ผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์จะบ่งบอกว่าเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานแล้วก็ตาม ทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกได้จากประเทศไทยจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่ จึงควรศึกษาเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกได้จากประเทศไทยเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นตัวแทนของเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย นอกจากนี้เมื่อทราบแล้วว่า มีเชื้อสายพันธุ์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่เคยมีรายงาน ประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องศึกษาคือการป้องกันและควบคุมโรค ดังนั้นควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนหูดมออักเสบติดต่อในการป้องกันโรคสายพันธุ์นี้ ซึ่งจะช่วยให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์. 2547. การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรสแอนด์กราฟฟิค.
- ชื่องมาศ อันตรเสน, บุญเลิศ อ่าวเจริญ และนิมิต เชื้อเงิน. 2533. ซีโรไทป์ของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ในเขตภาคใต้โดยวิธีนิวตราไลเซชันเทสต์. ในประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 9, หน้า 316-321. 6-8 กันยายน 2533 ณ โรงแรมโกลเดนคราซอน จังหวัดนนทบุรี.
- ชื่องมาศ อันตรเสน, สมพงษ์ สหพงศ์, บุญเลิศ อ่าวเจริญ, นิมิต เชื้อเงิน และรุ่งทิภา กงกะนันท์. 2533. การศึกษาโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ในเขตภาคใต้. วารสารสงขลานครินทร์ 12(3): 273-279.
- เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล, กัลยา เจือจันทร์, วราภรณ์ ศุกลพงษ์ และกิงกาญจน์ สาระชู. 2542. การก่อโรคไตอักเสบในไก่ที่เกิดจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ. ในรายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ เกษตรภาคเหนือ ครั้งที่ 2 สาขาสัตวบาล/สัตวศาสตร์/สัตวแพทย์, หน้า 243-252. 8-10 ธันวาคม 2542 ณ สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่.
- นิยมศักดิ์ อูปทุม, วิมล จิระธนะวัฒน์, สมใจ ศรีหาคิม, นิมิต สีสิริกุล, วิมลพร จีระวัฒน์พงศ์, รื่นฤดี บุญยะโหดระ, บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และพรทิพย์ ศิริวรรณ. 2526. โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่กระตังซึ่งพบวิการที่ไต. เวชสารสัตวแพทย์ 13(1): 36-43.
- ศักดิ์ชัย หิมะทองคำ, สุณีย์ หิมะทองคำ และสละ กองสมัคร. 2528. การแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไตบวม. ในประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 12, หน้า 100-110. 2-4 ธันวาคม 2528 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

- Albassam, M.A., Winterfield, R.W. and Thacker, H.L. 1986. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 30(3): 468-476.

- Animas, S.B., Otsuki, K., Hanayama, M., Sanekata, T. and Tsubokura, M. 1994. Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at different ages. J. Vet. Med. Sci. 56(3): 443-447.
- Cavanagh, D. 1983. Coronavirus IBV: Structural characterization of the spike protein. J. Gen. Virol. 64: 2577-2583.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, D., Kant, A. and Koch, G. 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. Avian Path. 21: 33-43.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Darbyshire, H. and Peters, R.W. 1986. Coronavirus IBV: Virus retaining spike glycopeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. J. Gen. Virol. 67:1435-1442.
- Chandra, M. 1987. Comparative nephropathogenicity of different strains of infectious bronchitis virus in chickens. Poult. Sci. 66: 954-959.
- Chen, B.Y., Hosi, S., Nunoya, T. and Itakura, C. 1996. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. Avian Path. 25: 269-283.
- Chong, K.T. and Apostolov, K. 1982. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. J. Comp. Path. 92: 199-211.
- Cook, J.K.A. and Huggins, M.B. 1986. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus : their role in disease. Avian Path. 15: 129-138.
- Cook, J.K.A., Davison, T.F., Huggins, M.B. and McLaughlan, P. 1991. Effect of in ovo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C white leghorn chickens. Arch Virol. 118: 225-234.
- Crinion, R.A.P. 1972. Egg quality and production following infectious bronchitis virus exposure at one day old. Poult Sci. 51: 582-585.
- Crinion, R.A.P., Ball, A.R. and Hofstad, M.S. 1971. Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious brobchitis virus at one day old. Avian Dis. 15: 42-48.

- Davelaar, F.G. and Kouwenhoven, B. 1976. Changes in the Harderian gland of the chicken following conjunctival and intranasal infection with infectious bronchitis virus in one- and 20-day-old chickens. Avian Path. 5: 39-50.
- Davelaar, F.G. and Kouwenhoven, B. 1977. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. Avian Path. 6: 41-50.
- Endo-Munoz, L.B. and Faragher, J.T. 1989. Avian infectious bronchitis: cross protection studies using different Australian subtypes. Aust Vet J. 66(11): 345-348.
- Estevez, C., Villegas, P. and El-Attrache, J. 2003. A recombination event, induced in ovo, between a low passage infectious bronchitis virus field isolate and a highly embryo adapted vaccine strain. Avian Dis. 47: 1282-1290.
- Gelb, J., Jr., Ladman, S.B., Tamayo, M., Gonzalez, M. and Sivanandan, V. 2001. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. Avian Dis. 45: 1060-1063.
- Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J. and Pearson, D. 1992. A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Vet. Rec. 130: 493-494.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
- Ignjatovic, J., Aston, D.F., Reece, R., Scott, P. and Hooper, P. 2002. Pathogenesis of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. J. Com. Path. 126: 115-123.
- Ignjatovic, J. and Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. Arch Virol. 138: 117-134.
- Ignjatovic, J., Reece, R. and Ashton, F. 2003. Susceptibility of three genetic lines of chicks to infection with a nephropathogenic T strain of avian infectious bronchitis virus. J. Com. Path. 128: 92-98.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A. and Brown, T.P. 2003. Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. Avian Dis. 47: 627-632.

- Jackwood, M.W., Yousef, N.M.H. and Hilt, D.A. 1997. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. Avian Dis. 41: 105-110.
- Kant, A., Koch, G., Roozelaar, D.J., Kusters, J.G., Poelwijk, F.A.J. and van der Zeijst, B. A.M. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopeptide. J. Gen. Virol. 73: 591-596.
- Keeler, C.L., Jr, Reed, K.L., Nix, W.A. and Gelb, J., Jr. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S1) gene. Avian Dis. 42: 275-284.
- King, D.J. 1984. Observations on the preparation and stability of infectious bronchitis virus hemagglutination antigen from virus propagated in chicken embryos and chicken kidney cell cultures. Avian Dis. 28(2): 504-513.
- Kingham, B.F., Keeler, C.L., Jr, Nix, W.A., Ladman, B.S. and Gelb, J., Jr. 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1 gene. Avian Dis. 44:325-335.
- Koch, G., Hartog, L., Kant, A. and van Roozelaar, D.J. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. J. Gen. Virol. 71: 1929-1935.
- Kwon, M.H., Jackwood, M.W. and Gelb, J., Jr. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis. 37: 194-202.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 5: 150-163.
- Kusters, J. G., Niesters, H.G.M., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C. and van der Zeijst, B. A.M. 1989. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. Virology. 169: 217-221.
- Lee, C.W., Hilt, D.A. and Jackwood, M.W. 2001. Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 45:164-172.

- Lee, S.K., Sung, H.W. and Kwon, H.M. 2004. S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. Arch Virol. 149: 481-494.
- Liu, S. and Kong, X. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. Avian Path. 33: 321-327.
- Mondal, S.P., Lucio-Matinez, B. and Naqi, S.A. 2001. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE072. Avian Dis. 45: 1054-1059.
- Nakamura, K., Cook, J.K.A., Otsuki, K., Huggins, M.B. and Frazier, J.A. 1991. Comparative study of respiratory lesion in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. Avian Path. 20: 241-257.
- Parr, R.L. and Collisson, E.W. 1993. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. Arch Virol. 133: 369-383.
- Parsons, D., Ellis, M.M., Cavannagh, D. and Cook, J.K.A. 1992. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. Vet. Rec. 131: 408-411.
- Pensaert, M. and Lambrechts, C. 1994. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous strains. Avian Path. 23: 631-641.
- Purcell, A.D., Tham, L.V. and Surman, G.P. 1976. The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic " T " strain of virus. Aust Vet J. 52: 85-91.
- Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- Wang, C.H. and Huang, Y.C. 2000. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. Arch Vrol. 145: 291-300.
- Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Low, S. and Kwang, J. 2001. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolates from China and Southeast Asia. Avian Dis. 45: 201-209.

Zhou, J.Y., Zhang, D.Y. Ye, J.X. and Cheng, L.Q. 2004. Characterization of an avian infectious bronchitis virus isolated in China from chickens with nephritis. J. Vet. Med. B. 51: 147-152.

Ziegler, A.F., Ladman, B.S., Dunn, P.A., Schneider, A., Davison, S., Miller, P.G., Lu, H., Weinstock, D., Slem, M., Eckroade, R.J. and Gelb, J., Jr. 2002. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. Avian Dis. 46: 847-858.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธวัชชัย โพธิ์เฮื่อง เกิดวันพุธ ที่ 28 มกราคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดมหาสารคาม สำเร็จ การศึกษาระดับประถมศึกษา จากโรงเรียนบ้านหนองแวง เมื่อปีการศึกษา 2531 สำเร็จการศึกษา ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนบรบือ เมื่อปีการศึกษา 2534 สำเร็จการศึกษาระดับ มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสารคามพิทยาคม เมื่อปีการศึกษา 2537 เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2538 ด้วยทุน โครงการจุฬา-ชนบท สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต เมื่อปี การศึกษา 2543 หลังจากจบการศึกษาได้เข้าทำงานเป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์ ที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2544-2545 จากนั้นเข้าทำงานเป็น พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์ ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2545 จนถึงปัจจุบัน เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547 ด้วยทุนโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย