การประยุกต์ใช้ Intradermal test เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการทำวัคซีนอีโคไล ในสุกร

กชกร ดิเรกศิลป์[1*] เกศวดี อันทระบุตร[2] กุลยา ฉันทะกุล[2] และณัฐรินทร์ ชัยอาวุธ[2]

[1] ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2] นักศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 043-364491 E-mail: kochakrn@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ทดสอบภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง (Intradermal test, ID test) เพื่อวัดการตอบสนองจากการทำวัคซีนอีโคไลในสุกร โดยการฉีดอีโคไลแอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเข้าที่ชั้นผิวหนังบริเวณโคนใบหูด้านหลังและอ่านผลจากการขยายใหญ่หรือบวมแดง ณ บริเวณที่ฉีด เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในครั้งแรกทดสอบสุกรอายุ 6 สัปดาห์จำนวนทั้งหมด 32 ตัว เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย ของตุ่มนูน ณ บริเวณที่ฉีดอ่านผลเมื่อ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.77 มิลลิเมตร (0-7 มิลลิเมตร) และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางจะลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off) ของเส้นผ่าศูนย์กลางที่ $\geq$ 5 มิลลิเมตร พบว่าสุกรให้ผลบวก 6/32 ตัว จากนั้นแบ่งสุกรที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบจำนวน 26 ตัวออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำวัคซีน (n=13) และกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีน (n=13) โดยฉีดวัคซีนอีโคไลชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทดสอบแอนติเจนในปริมาณ 2 มิลลิลิตรเข้ากล้ามเนื้อ 2 สัปดาห์ต่อมาทำการตรวจ ID test และอ่านผลที่ 24 ชั่วโมงหลังฉีดแอนติเจน พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่มที่ทำวัคซีนมีค่าเท่า 5.38 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนมีค่าเท่ากับ 2.53 มิลลิเมตร สุกรจำนวน 2 ตัวในกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนให้ผลบวกเทียม ทั้งนี้อาจเนื่องจากได้รับแอนติเจนมากเกินไปจากการทำ ID test ที่ผิดพลาดและต้องทำซ้ำ พบสุกรเพียงหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีน ให้ผลลบ การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ID test สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีนในสุกรได้ ซึ่งมีความไวเท่ากับ 92% และความจำเพาะเท่ากับ 85%

คำสำคัญ: การทดสอบภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง การตอบสนองจากการทำวัคซีน อีโคไล สุกร

บทนำ

การทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในสุกรเป็นที่นิยมปฏิบัติกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ความวิตกกังวลในเรื่องการดื้อยาหรือสารตกค้างในเนื้อสุกรทำให้แนวโน้มการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แบคทีรินเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จำเป็นต้องมีการตรวจสอบและเลือกชนิดที่แอนติเจนตรงกันกับชนิดของเชื้อที่กำลังระบาดในฟาร์ม นอกจากการเสื่อมคุณภาพของวัคซีนอันเนื่องจากการขนส่งและการเก็บรักษาแล้ว สายพันธุ์หรือซีโรไทป์ของเชื้อที่มีอยู่ในวัคซีนซึ่งไม่ตรงกับเชื้อที่กำลังระบาดในฟาร์มพบว่าเป็นสาเหตุหลักของความล้มเหลวในการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรค (Bor and Bilkel, 2003) เช่น วัคซีนป้องกันโรคแกลสเซอร์ (Takahashi *et al.*, 2001) เป็นต้น

การทดสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่ชั้นผิวหนัง (Intradermal test; ID test) เป็นวิธีการที่ใช้ทดสอบกับสัตว์หลายชนิด ซึ่งปฏิกริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะเป็นแบบ Delayed-type hypersensitivity (Scherba *et al.*, 1983) ทำโดยการใช้แอนติเจนในปริมาณ 0.1-0.2 มิลลิลิตร ฉีดเข้าชั้นผิวหนัง ทำให้เกิดตุ่มนูนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตรหรือมากกว่า (DeBoer and Hillier, 2001) และอ่านผลจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่ผิวหนังภายหลังการฉีดแอนติเจนภายใน 24 -48 ชั่วโมง โดยการสังเกตผื่นแดง (erythema) หรือตุ่มนูน (wheal) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของผื่นแดงหรือตุ่มนูน (DeBoer and Hillier, 2001) หรือสังเกตจุดเนื้อตายกลางตุ่มนูน (Johannes *et al.*, 2003) หรือตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดจากการแทรกซึมของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (mononuclear cells) ซึ่งประมาณร้อยละ 80-90 เป็นลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และร้อยละ 10-20 เป็นแมคโครฟาจ (activated macrophages) (Hernandez *et al.*, 2005)

การทำ ID test ในสุนัขจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งด้านข้างของช่องอกเพื่อทดสอบการเกิดภูมิแพ้จากสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่างๆ รวมทั้งการเกิดภูมิแพ้จากอาหารและยา (Lammintausta and Kortekangas-Savolainen, 2005) นับว่าเป็นวิธีการที่มีความไวสูงและสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า (Hillier, 2002) การทำ ID test ในโคและกระบือจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งใต้โคนหาง นิยมใช้ในการทดสอบการติดเชื้อ *Mycobacterium bovis* และ *Mycobacterium avium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรควัณโรค (Kanameda *et al.*, 1999; Thom *et al.*, 2004) การทำ ID test ในสุกรจะฉีดแอนติเจนที่ตำแหน่งหลังโคนหู เพื่อวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Psueudorabies) โดยใช้แอนติเจนที่ได้จากส่วน neucleocapsid ของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies virus) (Scherba *et al.*, 1983; Smith and Mengeling, 1977) และนอกจากนี้ ID test ในสุกรยังใช้สำหรับทดสอบการติดเชื้อวัณโรคและโรคไฟลามทุ่ง (Johannes *et al.*, 2003)

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีน อีโคไล (*E.coli*) โดยวิธี ID test เนื่องจาก ID test เป็นวิธีการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็วและสามารถทำการทดสอบและอ่านผลได้ภายในฟาร์มโดยไม่ต้องใช้ห้องปฏิบัติการหรือใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังเช่นวิธีทางซีรัมวิทยาอื่นๆ และเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ ID test สำหรับวินิจฉัยโรคและประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากวัคซีน รวมทั้งการทดสอบเพื่อการเลือกใช้วัคซีนให้ตรงกับซีโรไทป์ที่ก่อโรคในฟาร์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลอง

เลือกฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรแบบเข้าหมด-ออกหมด (all-in/all-out pig flow) สุกรเลี้ยงอยู่ในโรงเรือนปิด (evaporative building) และเป็นสุกรที่มีสุขภาพดี โดยสุ่มเลือกสุกรอนุบาลอายุ 6 สัปดาห์ จำนวนทั้งหมด 32 ตัว ทำการทดสอบ ID test เพื่อดูปฏิกิริยาการตอบสนองให้แน่ใจว่าสุกรไม่เคยมีภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่ทดสอบมาก่อน (screening test) อ่านผลการตอบสนองที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากฉีดแอนติเจน โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน ณ บริเวณที่ฉีด จากนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะสุกรที่ให้ผลการตอบสนองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แบ่งสุกรที่ได้จำนวนทั้งหมด 26 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 13 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ทำวัคซีน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนหรือกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมจากแอนติเจนชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทดสอบ ID test ในปริมาณ 2 มิลลิลิตรเข้ากล้ามเนื้อที่บริเวณต้นคอให้แก่สุกรกลุ่มที่ 1 หลังจากฉีดวัคซีนไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดสอบ ID test ซ้ำในสุกรทุกตัว วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่บริเวณที่ฉีด บันทึกผลการทดลอง

การเตรียมแอนติเจนและวัคซีน

เชื้อ*อีโคไล*ที่ใช้เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากสุกรป่วยด้วยอาการท้องเสียและผ่านการจำแนกแยกเชื้อตามวิธีมาตรฐานของเชื้ออีโคไล คือมีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีกรัมลบ โคโลนีบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาด 1-2 มิลลิเมตร และมีลักษณะแฉะเยิ้ม โคโลนีมีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey และมีสีมันวาวคล้ายตะกั่ว (metallic sheen) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue รวมทั้งให้ผลการทดสอบทางชีวะเคมี "IMViC" test ที่เป็นคุณสมบัติของเชื้ออีโคไล เชื้ออีโคไลนี้เป็นเชื้อที่ทำให้เม็ดเลือดแดงในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (blood agar) แตก (alpha-hemolytic *E.coli*) นำเชื้ออีโคไลที่ บริสุทธิ์ (pure culture) ไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาจากตู้บ่มเชื้อ แล้วขูดเอาเชื้อ 1-2 โคโลนีลงไปในหลอดแก้วซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเขย่าให้เชื้อมีการกระจายตัวแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยพบว่า Brain Heart Infusion broth จะเปลี่ยนจากลักษณะสีเหลืองใสไปเป็นสีเหลืองขุ่น หลังจากนั้นนำไป

ปั่นล้างโดยนำเอาหลอดแก้วที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์ของเชื้ออีโคไลที่อยู่ด้านล่างของหลอด ทำการล้างเซลล์อีกประมาณ 3-4 ครั้งหรือจนกระทั่งน้ำเปลี่ยนเป็นสีใส ด้วย PBS (pH 7.2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้ได้มากที่สุดรวมทั้งของเสียที่เกิดขึ้นจากขบวนการเจริญเติบโตของเชื้อ นำเซลล์ที่ได้ไปเติม PBS และเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^9 CFU/ml และทำให้หมดสภาพโดยใช้ความร้อน (heat inactivation) ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป การเตรียมแอนติเจนสำหรับ ID test ทำตามวิธีมาตรฐาน (Lin and Mallavia, 1998) และการเตรียมวัคซีนอีโคไลทำโดยนำแอนติเจนที่ได้ผสมกับสื่อวัคซีนชนิดสื่อน้ำอลูมินัม (ทัศนีย์, 2543)

การทดสอบความปลอดภัยของแอนติเจน

การทดสอบว่าแอนติเจนที่ได้จากเชื้ออีโคไลนั้นเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ทำโดยการนำแอนติเจนที่ได้ไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar อีกครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล ไม่พบการเจริญของโคโลนีของเชื้ออีโคไลแสดงว่าเชื้อตายหมดแล้ว และทำการทดสอบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นๆ รวมทั้งเชื้อราด้วย เพื่อแสดงว่าแอนติเจนที่ได้ไม่มีการปนเปื้อน

การทำ ID test และการอ่านผล

ทำการทดสอบ ID test ทำโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (Tuberculin syringe) ต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 22 ยาว ½ นิ้ว ฉีดแอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเข้าไปในชั้นผิวหนังที่ตำแหน่งโคนหูด้านหลังของสุกร อ่านผลการตอบสนองที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากฉีดแอนติเจน โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่บริเวณที่ฉีด บันทึกผลการทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

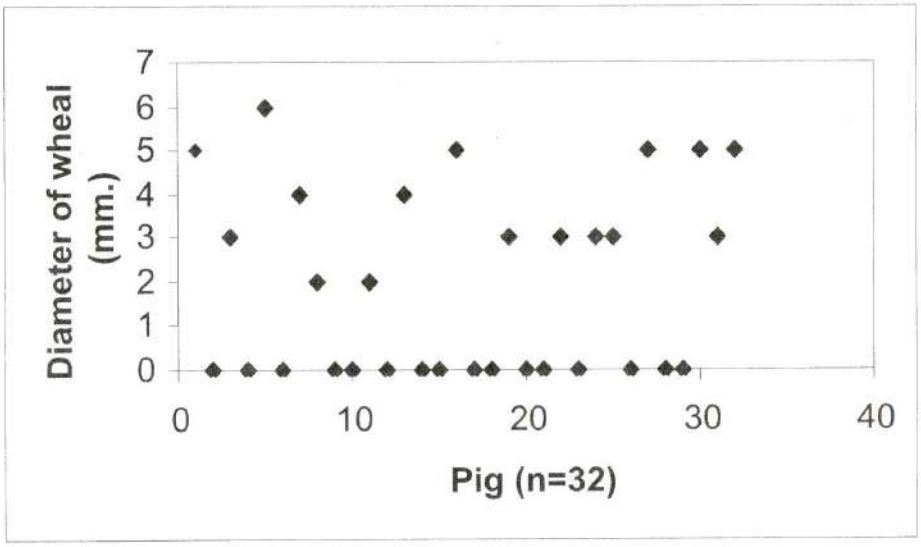
คำนวนค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off value) ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test โดยใช้ค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ให้ผลบวกที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะในการทดสอบ (specificity) เกินกว่าร้อยละ 80 และใช้วิธีการทางสถิติ Paired t-test เพื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test ของสุกรอนุบาลในกลุ่ม ที่ทำวัคซีนและกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีน

ผลการทดลอง

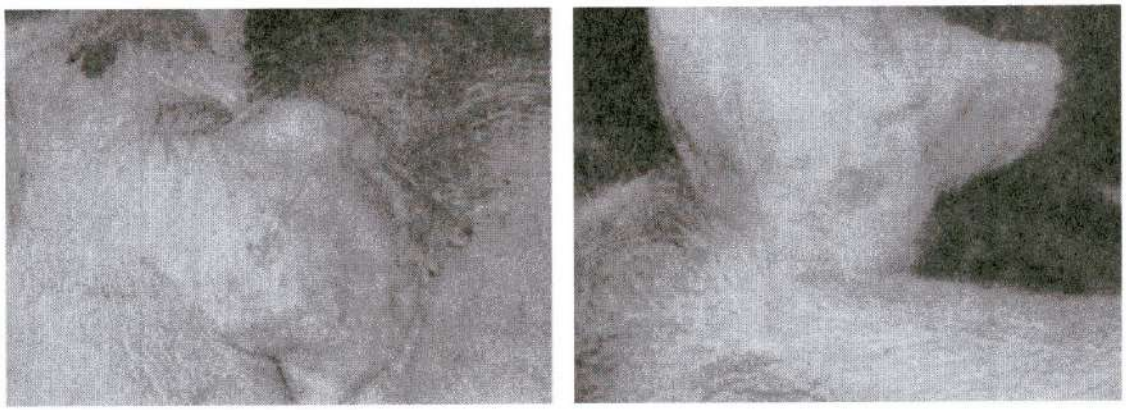
การทดสอบ ID test ครั้งแรกในสุกรอนุบาลอายุ 6 สัปดาห์จำนวนทั้งหมด 32 ตัว สุกรทุกตัวมีสุขภาพปกติและไม่มีอาการที่แสดงถึงภาวะปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (anaphylaxis) หรือการระคายเคืองจากแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ อ่านผลเมื่อ 24 ชั่วโมงหลังฉีด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.77 มิลลิเมตร (0-6 มิลลิเมตร) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังฉีด และสุกรบางตัวมีเพียงจุดแดงจากรอยเข็มฉีดยาเท่านั้น เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐานของเส้นผ่าศูนย์กลางที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร พบว่ามีสุกรจำนวน 6 ตัว จากทั้งหมด 32 ตัว ที่ทดสอบให้ผล ID test เป็นบวก ซึ่งคาดว่าสุกรทั้ง 6 ตัวนี้เคยสัมผัสเชื้ออีโคไลมาก่อนแล้ว จึงคัดออก จากการทดลอง (รูปที่ 1)

ผลการทดสอบ ID test 2 สัปดาห์หลังจากทำวัคซีน เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของตุ่มนูนที่ 24 ชั่วโมงของกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนมีค่าเท่ากับ 2.54 มิลลิเมตร (0-6 มิลลิเมตร) กลุ่มที่ทำวัคซีนมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 5.38 มิลลิเมตร (4-7 มิลลิเมตร) ซึ่งพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของทั้งกลุ่มที่ทำวัคซีนและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (รูปที่ 2) คำนวณค่ากำหนดมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนจากการทำ ID test โดยใช้วิธีทางสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ให้ผลการทดสอบเป็นบวกที่ให้ความไว (sensitivity) ร้อยละ 92 และความจำเพาะในการทดสอบ (specificity) ร้อยละ 85 (รูปที่ 3) ผลการทดสอบ ID test ในครั้งที่สองพบว่ามีสุกร ที่ให้ผลบวกจำนวน 14 ตัว (14/26) กลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลบวกจำนวน 12 ตัว (12/13) คิดเป็นร้อยละ 92.31 และกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนให้ผลบวกจำนวน 2 ตัว (2/13) คิดเป็นร้อยละ 15.38 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน เท่ากับ 6 และ 5 มิลลิเมตรตามลำดับ และมีสุกร 1 ตัว ในกลุ่มที่ทำวัคซีน (1/13) คิดเป็นร้อยละ 7.69 ให้ผลการทดสอบ ID test เป็นลบ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนเท่ากับ 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 4)

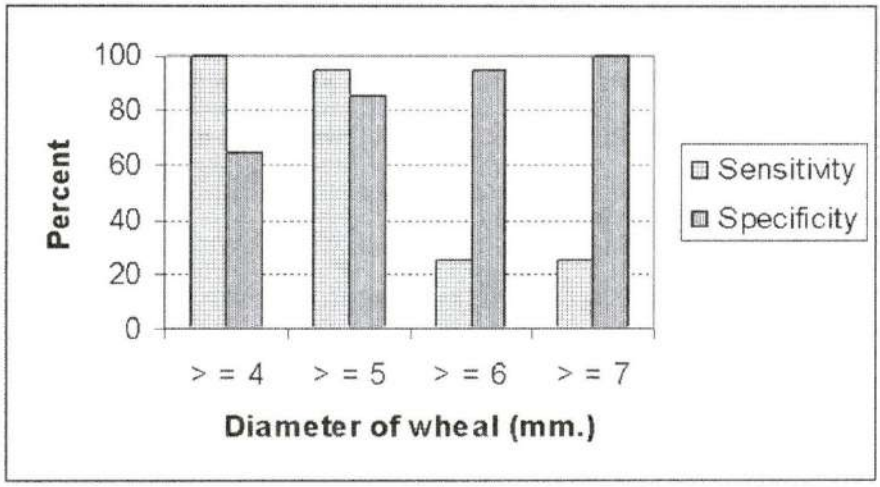
รูปที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (diameter) ของตุ่มนูน (wheal) อ่านผลที่ 24 ชั่วโมงหลังจากทำ ID test ทดสอบสุกรทั้งหมด 32 ตัว ใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off value) ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\geq$ 5 มิลลิเมตร



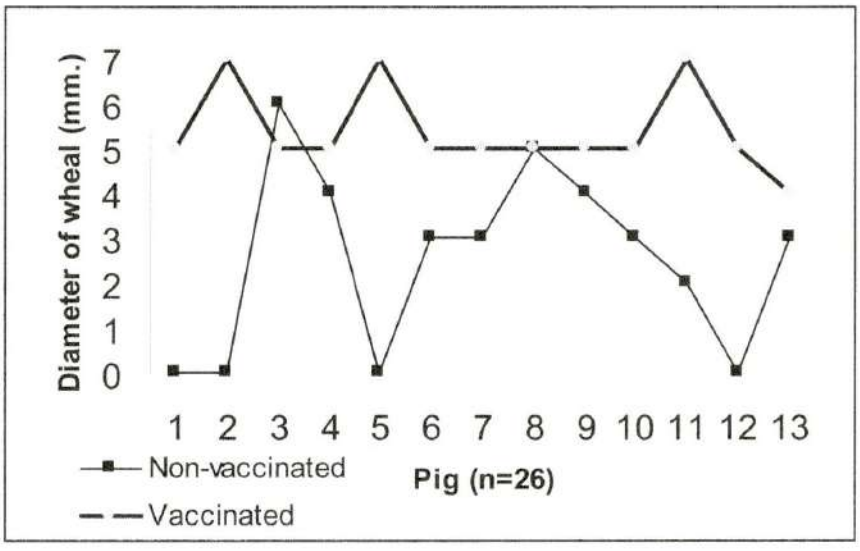
รูปที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างขนาดของตุ่มนูนหลังจากทำ ID test เมื่อเวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดแอนติเจน ระหว่างสุกรกลุ่มที่ไม่ทำวัคซีน (รูปซ้ายมือ) และสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีนอีโคไล (รูปขวามือ)



รูปที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของ ID test เมื่อใช้ค่ากำหนดมาตรฐาน (cut-off values) ที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างๆ กัน ทดสอบสุกรทั้งหมด 26 ตัว หลังจากทำวัคซีนอีโคไลได้ 2 สัปดาห์



รูปที่ 4 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูน ระหว่างสุกรกลุ่มที่ทำวัคซีน (vaccinated group) และกลุ่มควบคุม (non-vaccinated group) พบสุกรจำนวน 2 ตัวให้ผลบวกเทียม และสุกรหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลการทดสอบเป็นลบ



สรุปและวิจารณ์

การทำวัคซีนเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้รู้จักกับแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีน ปฏิกริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกิดจากวัคซีน สามารถตรวจสอบได้โดยการกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันกับวัคซีน ซึ่งเป็นการวัดการจดจำแอนติเจนและการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ ID test เป็นการทดสอบภูมิคุ้มกันแบบ Delayed-type hypersensitivity (DTH) ซึ่งเกิดจากการทำงานของ T lymphocytes แทนที่จะเป็น B lymphocytes หรือแอนติบอดี ดังนั้น จึงเรียกว่า Cell-mediated immunity reaction ซึ่งการตอบสนองค่อนข้างช้า คือใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน หลังจากกระตุ้นด้วยแอนติเจน (Type IV hypersensitivity) (Kanameda *et al.*, 1999; Scherba *et al.*, 1983; Thom *et al.*, 2004) เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ที่ผิวหนังที่มีชื่อเฉพาะว่า Langerhans cell จะจับกับแอนติเจนแล้วนำไปเสนอต่อ CD4+ T lymphocytes หรือ Memory T cells (Kimber and Cumberbatch, 1992) ถ้าระบบภูมิคุ้มกันเคยรู้จักกับแอนติเจนหรือหลังจากทำวัคซีน เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจดจำ (T-helper cell หรือ Memory T cell) ก็จะหลั่งสาร (lymphokines) ออกมากระตุ้นการทำงานและดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆ ให้มาสะสมที่บริเวณผิวหนังที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือเกิดรอยโรคที่ผิวหนังหรือตุ่มนูนแดงนั่นเอง (Kimber *et al.*, 2001) ดังนั้นการเกิดตุ่มนูนหรือเมื่อทำ ID test ที่ให้ผลเป็นบวกนั้นจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อร่างกายเคยสัมผัสกับแอนติเจนมาก่อน หรือหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน ซึ่งเป็นผลโดยตรงมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะของตัวสัตว์เอง (active immunity) ด้วยการตอบสนองที่ต้องอาศัยการทำงาน ของ Memory T cells นี้เองจึงทำให้ ID test สามารถแยกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการเคยสัมผัสเชื้อหรือแอนติเจนโดยตรงออกจากภูมิคุ้มกันที่ได้รับการถ่ายทอดจากแม่ (maternal immunity) ซึ่งการทดสอบทางซีรัมวิทยาโดยทั่วๆ ไม่สามารถแยกภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ID test สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาการตอบสนองที่จำเพาะต่อการทำวัคซีนอีโคไล ดังจะเห็นได้จากสุกรในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลการตอบสนองต่อการทดสอบ ID test โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนแดงที่ผิวหนังที่มีขนาดใหญ่กว่าและชัดเจนกว่ากลุ่มที่ไม่ทำวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.01$) เมื่อใช้แอนติเจนในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ค่ากำหนดมาตรฐานของเส้นผ่าศูนย์กลางของตุ่มนูนที่ให้ผลเป็นบวกในการศึกษานี้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นค่าที่มีความจำเพาะและความไวเท่ากับร้อยละ 85 และ 92 ตามลำดับ และควรอ่านผลที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลการอ่านคล้ายกันกับการศึกษาอื่น (DeBoer and Hillier, 2001)

ปฏิกิริยาผลบวกเทียมอาจเกิดได้จากการใช้แอนติเจนในปริมาณที่มากเกินไป หรือการระคายเคืองที่ผิวหนัง (Hillier and DeBoer, 2001) สุกรจำนวน 2 ตัวในกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนให้ผลบวกเทียม ทั้งนี้อาจเนื่องจากได้รับแอนติเจนมากเกินไปเพราะเทคนิคการฉีดที่ผิดพลาดทำให้ต้องฉีดแอนติเจนซ้ำ การฉีดแอนติเจนเข้าในชั้นผิวหนังด้วยขนาดที่เหมาะสมพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกันกับการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้การฉีดวัคซีนเข้าในชั้นผิวหนังเพื่อทำวัคซีน

ป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Mikulska-Skupien *et al.*, 2005; Vannier and Cariolet, 1991) โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (Kenney *et al.*, 2004; Kilbourne, 2005) และโรคพีอาร์อาร์เอส (Barfoed *et al.*, 2004) เป็นต้น พบสุกรเพียงหนึ่งตัวในกลุ่มที่ทำวัคซีนให้ผลลบ ซึ่งคาดว่าเวลา 2 สัปดาห์อาจน้อยเกินไปในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือถ้าหากว่าสามารถกระตุ้นวัคซีนซ้ำอีกหนึ่งเข็ม (อย่างน้อย 2 เข็ม) อาจทำให้ผลการตอบสนองของสุกรตัวนี้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ในขั้นต่อไปคือการทดสอบความจำเพาะของ ID test ต่อซีโรไทป์ของวัคซีน สำหรับตรวจสอบเบื้องต้นว่าวัคซีนที่ฉีดให้กับสุกรตรงกับซีโรไทป์ที่กำลังก่อโรคภายในฟาร์ม เพื่อลดความเสี่ยงจากความล้มเหลวในการทำวัคซีน และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการส่งตัวอย่างไปตรวจทางห้องปฏิบัติการเพราะสามารถทำการทดสอบได้เองภายในฟาร์ม อย่างไรก็ตามการทดสอบ ID test อาจเกิดผลบวกเทียมและผลลบเทียมได้ โดยผลบวกเทียมเกิดจากได้รับปริมาณแอนติเจนที่มากเกินไปเนื่องจากเทคนิคการฉีดที่ไม่ถูกต้อง หรือเกิดการระคายเคืองเนื่องจากแอนติเจนมีความเข้มข้นสูงและบริเวณที่ฉีดสกปรก ส่วนผลลบเทียมที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากการที่ฉีดพลาดเข้าที่บริเวณใต้ผิวหนังหรือได้รับแอนติเจนในปริมาณน้อย ดังนั้นจะต้องมีการฝึกฝนเทคนิคให้เกิดความชำนาญรวมทั้งต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ชัยยุทธ์ฟาร์ม อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่นที่อนุเคราะห์สุกรที่ใช้ใน การศึกษาครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิวิทยา และภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

ทัศนีย์ สุโกศล 2543. แอนติเจนและแอนติบอดี ใน: อิมโมนูวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 4 โรงพิมพ์ บริษัท พีพีเอส ซายน์เทคนิคัล จำกัด กรุงเทพ หน้า 35-63.

Barfoed, A., Kristensen, B., Dannemann-Jensen, T., Viuff, B., Botner, A., Kamstrup, S., and Blixenkrone Moller, M. 2004. Influence of routes and administration parameters on antibody response of pigs following DNA vaccination. *Vaccine* **22**(11-12), 1395-1405.

Bor, D., and Bilkel, G. 2003. Effect of vaccination against post- weaning oedema disease on piglet performance. *Journal of the Pig Veterinary Society* **52**, 106-110.

DeBoer, D., and Hillier, A. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **81**, 271-276.

Hernandez, A., Yager, J., Wilkie, B., Leslie, K., and Mallard, B. 2005. Evaluation of bovine cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) to various test antigens and a mitogen using several adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol.* **104**(1-2), 45-58.

Hillier, A. (2002). Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Veterinary Medicine* **10**, 224.

Hillier, A., and DeBoer, D. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **81**, 289-304.

Johannes, S., Hartinger, J., Hendriksen, C., Morton, D., and Cussler, K. 2003. Humane endpoints in the efficacy testing of swine erysipelas vaccines. *ALTEX* **20**(1), 11-15.

Kanameda, M., Ekgatat, M., Wongkasemjit, S., Sirivan, C., Pachimasiri, T., Kongkrong, C., Buchaphan, K., and Boontarat, B. 1999. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (Bubalus bubalis). *Preventive Veterinary Medicine* **39**(2), 129-135.

Kenney, R., Frech, S., Muenz, L., Villar, G., and Glenn, G. 2004. Dose sparing with intradermal injection of Influenza vaccine. *New England Journal of Medicine* **351**, 2295-2301.

Kilbourne, E. (2005). Intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med.* **352**(10), 1044-1046.

Kimber, I., Basketter, D., Berhold, K., Butler, M., Garrique, J., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S., and Wieman, C. 2001. Skin sensitisation testing in potency and risk assessment. *Toxicological Sciences* **59**, 198-208.

Kimber, I., and Cumberbatch, M. 1992. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol. Appl. Phamacol.* **117**, 137-146.

Lammintausta, K., and Kortekangas-Savolainen, O. 2005. The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity. *Br J Dermatol.* **152**(5), 968-974.

Lin, Z., and Mallavia, L. 1998. Membrane association of active plasmid partitioning protein A in Escherlichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11302-11312.

Mikulska-Skupien, E., Szweda, W., and Procajlo, Z. 2005. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated intradermallywith deleted Aujeszky's disease vaccine and challenged with virulent strain of Herpesvirus suis type 1. *Pol J Vet Sci.* **8**(1), 11-16.

Scherba, G., Turek, J., and Gustafson, D. 1983. Pseudorabies virus neucleocapsid antigen for skin testing in swine. *Journal of Clinical Microbiology* **17**, 539-544.

Smith, P., and Mengeling, W. 1977. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. *Can J Comp Med.* **41**(4), 364-368.

Takahashi, K., Naga, S., Yagihashi, T., Ikehata, T., Nakano, Y., Senna, K., Maruyama, T., and Murofushi, J. 2001. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with Haemophilus parasuis serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *Journal of Veterinary Medical Sciences* **63**(5), 489-491.

Thom, M., Morgan, J., Hope, J., Villarreal-Ramos, B., Martin, B., and Howard, C. 2004. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with Mycobacteriun bovis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **102**, 399-412.

Vannier, P., and Cariolet, R. 1991. Vaccination of pigs against Aujeszky's disease by the intradermal route using live attenuated and inactivated virus vaccines. *Vet Microbiol.* **26**(1-2), 11-23.

Application of intradermal test to detect immune responses to a single *E. coli* vaccination in pigs

Kochakorn Direksin[1], Katwadee Antharabut[2], Kullaya Chantakul [2] and Nattharin Chaiarwut[2]

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University.

[2]The sixth year student, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University.

*Corresponding author: Tel. 043-364491 E-mail: kochakrn@kku.ac.th

Abstract

Intradermal test (ID test) was conducted to detect immune responses to a single autogenous *E.coli*. vaccination in 6 weeks old pigs. A total volume of 0.1 ml antigen containing *E.coli* 10^9 CFU/ml was injected intradermally at the base of the pigs' ear. Diameters of the corresponding wheal at the injection site were measured at 24, 48, and 72 hours later. For the screening test, 32 pigs have an average diameter of 3.77 mm. (0-7 mm.) at 24 hour. Diameters of the wheals decrease gradually after 48 and 72 hours. Six pigs (6/32) were positive for the ID test when using cut-off values of $\geq$ 5 mm. The remaining 26 ID negative pigs were divided into 2 groups, vaccinated (n=13) and non-vaccinated (n=13) pigs. One shot of 2 ml of aluminum adjuvanted *E.coli* vaccine was injected at the pigs' neck muscle. The immune response was measured by ID test 2 weeks post-vaccination. At 24 hour, average wheal diameter of vaccinated pigs was 5.38 mm., and of non-vaccinated pigs was 2.53 mm. ($p<0.01$). Two pigs (2/13) in the non-vaccinated group have false positive ID test. This may be due repeated intradermal injections. They were received extra amounts of the antigen. Only one pig in the vaccinated group has negative ID test. The ID test is proved applicable with the sensitivity of 92% and specificity of 85%.

Keywords: Intradermal test, pig, vaccination response, *E. coli*