การศึกษาวัคซีนโรคหวัดติดต่อในไก่ที่ผลิตจากสายพันธุ์ท้องถิ่น

วันทนีย์ เนรมิตมานสุข* ประภาส เนรมิตมานสุข**
ทิพา ตันติเจริญยศ* ลัดดา ตรงวงศา*

บทคัดย่อ

วัคซีนโรคหวัดติดต่อในไก่สายพันธ์ท้องถิ่น เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* สายพันธุ์ 746 (serotype A) เป็นวัคซีนชนิด thimerosal-inactivated aluminum-hydroxide-adsorbed ฉีดในไก่ทดลองหนึ่งครั้ง ไก่เริ่มให้ HI แอนติบอดีไตเตอร์ หลังฉีด 2 สัปดาห์ และขึ้นสูงสุดสัปดาห์ที่ 5 สัปดาห์ที่ 13 แอนติบอดียังอยู่ในระดับ ที่สามารถคุ้มกันโรคได้ สำหรับไก่ที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 6 สัปดาห์ HI แอนติบอดีไตเตอร์ขึ้นสูงสุดสัปดาห์ที่ 13 และสัปดาห์ที่ 27 แอนติบอดียังสูงพอที่จะคุ้มกันโรคได้ จากการทดลองหยอดเชื้อพิษ 4 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ท้องถิ่น serotype A) ไก่ฉีดวัคซีนที่มีระดับ HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:5-1:10 และ 1:20-1:40 สามารถคุ้มกัน โรคได้ 100% เมื่อหยอดสายพันธุ์ 221 (serotype A ประเทศญี่ปุ่น) ไก่ฉีดวัคซีนจะให้ความคุ้มโรคได้ 90% ที่ HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:5-1:10 ให้ความคุ้มโรคได้ 100% ที่ HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:20-1:40 สำหรับสายพันธุ์ M (serotype C ประเทศสหรัฐอเมริกา) ไก่ทดลองที่ฉีดวัคซีนนี้แล้วไม่สามารถคุ้มกันโรคได้เลย

คำสำคัญ : วัคซีนโรคหวัดติดต่อ สายพันธุ์ท้องถิ่น

* สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กทม. 10900
** ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ ห้างฉัตร, ลำปาง.

บทนำ

โรคหวัดติดต่อในไก่ เป็นโรคทางระบบทางเดินหายใจในไก่ที่มีการระบาดแพร่หลายทั่วโลก มีรายงานการพบโรคนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 (Kato and Tsubahara, 1962; Page, 1962) แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคคือ เชื้อ *Haemophilus paragallinarum (H. paragallinarum)*

ไก่ที่ติดเชื้อจะมีอาการหน้าบวม น้ำมูกไหล ตาอักเสบ ในไก่ไข่ ไข่จะลดลง 10-40 เปอร์เซ็นต์ (Yamamoto, 1984) หรือรังไข่อาจถูกทำลายในไก่เนื้อเปอร์เซ็นต์การคัดทิ้งของซากจะสูงขึ้น อาการของโรคจะรุนแรงยิ่งขึ้นเมื่อมีโรคแทรกซ้อน

ปัจจุบันโรคหวัดติดต่อในไก่สามารถป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีนที่เป็น serotype เดียวกับที่มีการระบาดอยู่ในบริเวณนั้น ในประเทศไทยวัคซีนที่มีใช้อยู่นำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเชื้อ *H. paragalinarum* สายพันธุ์ท้องถิ่นของไทย ผลิตเป็นวัคซีนเพื่อศึกษานำร่องการผลิตวัคซีนจากสายพันธุ์ของไทยในอนาคต เปรียบเทียบระดับ HI แอนติบอดีไตเตอร์ในไก่ที่ฉีดวัคซีน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง และทดสอบผลการหยอดเชื้อพิษ 6 สายพันธุ์ในไก่ฉีดวัคซีนที่มี HI แอนติบอดีระดับต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมวัคซีน

เชื้อ *H. paragallinarum* สายพันธุ์ 746 (serotype A) เป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น ได้จากการเพาะแยกเชื้อไก่ป่วย ที่เป็นโรคหวัดติดต่อแล้วส่งมาชันสูตร ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยเก็บเชื้อไว้ที่ -80 °C ก่อนการเตรียมเป็นวัคซีน ฉีดเชื้อนี้เข้าในไข่ไก่ฟักอายุ 7 วัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C นำไข่แดงที่มีเชื้อ *H. paragallinarum* อยู่ เพาะลงใน S broth (วันทนีย์ และประภาส, 2528) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C นำเชื้อที่เพาะใน S broth เพาะลงใน S agar เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี CO_2 ประมาณ 3% ล้างเชื้อออกด้วย PBS pH 7.2 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ optical density = 0.47 ที่ wave length 550 (Spectronic 20 A Shimadzu) ตรวจการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ด้วยการเพาะลงใน Blood agar inactivated เชื้อด้วย 0.01% (V/v) thimerosal เติม 2% aluminum-hydroxide gel เป็น adjuvant ลงไป 25% (V/v) เพื่อเป็นวัคซีนฉีดให้ไก่ทดลองต่อไป

การเตรียมเชื้อสำหรับหยอดในไก่ทดลอง

เชื้อ *H. paragallinarum* สายพันธุ์ 746, 423, 112, 981 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น serotype A สายพันธุ์ 221 serotype A, จากประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์ M serotype C จากประเทศสหรัฐอเมริกา ทั้ง 6 สายพันธุ์ เพาะลงใน S broth 18 ชั่วโมง 37 °C

การเตรียมแอนติเจน

เป็นแอนติเจนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อสายพันธุ์ 746 เป็น KSCN treat sonicate antigen (Sawata et al, 1982)

ไก่ทดลอง

ลูกไก่คละเพศ อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 2 ชุด ชุดละ 150 ตัว

การทำวัคซีนที่เตรียมขึ้นในไก่ทดลอง

ไก่ที่ใช้ในการทดลองครั้งแรกจำนวน 150 ตัว อายุ 6 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอ 1 ซีซี จำนวน 100 ตัว และที่เหลืออีก 50 ตัวไม่ฉีดวัคซีน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ เจาะเลือดไก่ตรวจก่อนการฉีดวัคซีน 1 ครั้ง หลังการฉีดวัคซีนแล้วเจาะเลือดตรวจทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ หลังจากนั้นเจาะ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง จนถึงสัปดาห์ที่ 13

ไก่ชุดที่สองจำนวน 150 ตัว อายุ 6 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังที่บริเวณหลังคอ 1 ซีซี จำนวน 100 ตัว หลังจากฉีดครั้งแรก 6 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนซ้ำอีกครั้งในปริมาณ 1 ซีซีเท่ากัน อีก 50 ตัวไม่ฉีดวัคซีนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ เจาะเลือดไก่ตรวจก่อนการฉีดวัคซีน 1 ครั้ง หลังการฉีดวัคซีนแล้วเจาะเลือดตรวจทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ หลังจากนั้นเจาะ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง จนถึงสัปดาห์ที่ 27

การตรวจระดับ HI แอนติบอดีไตเตอร์

วิธีการตรวจใช้วิธีของ Sawata et al (1982) และ RBC ที่ใช้เป็นเลือดแกะที่ fix ด้วย glutaldehyde (Bing et al., 1967) ตรวจหา HI แอนติบอดีใน microplate

การหยอดเชื้อในไก่ทดลอง

แบ่งไก่ทดลองทั้งสองชุดออกเป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วย

ไก่ที่มี HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:5-1:10 จำนวน 10 ตัว

ไก่ที่มี HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:20-1:40 จำนวน 10 ตัว

หยอดเชื้อ *H.paragallinarm* กลุ่มละ 1 สายพันธุ์ ที่จมูกไก่ทั้งสองข้าง ข้างละ 0.1 มล. ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่ง สายพันธุ์ 746, กลุ่มที่สอง สายพันธุ์ 423, กลุ่มที่สาม สายพันธุ์ 112, กลุ่มที่สี่ สายพันธุ์ 981, กลุ่มที่ห้า สายพันธุ์ 221, กลุ่มที่หก สายพันธุ์ M

เลี้ยงแยกห้อง กลุ่มละห้องไม่ปะปนกัน หลังจากหยอดเชื้อ 7 วัน ฆ่าแล้วใช้ swab ป้ายที่ infraorbital sinus เพาะลงบน blood agar ฉีดทับด้วยเชื้อ *Staphylococcus epidermis* (เพื่อเป็นตัวให้ "V" Facter ช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. paragallinarum)* เก็บไว้ที่ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO_2 3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูเชื้อที่ขึ้น ถ้าพบเชื้อ *H. paragallinarum* แสดงว่าไม่มีความคุ้ม

ผลการทดลอง

วัคซีนที่เตรียมขึ้นจากสายพันธุ์ 746 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นเมื่อฉีดในไก่ทดลองหนึ่งครั้งจะมี HI แอนติบอดีขึ้นหลังจากฉีด 2 สัปดาห์ และ Geometricmean ของ HI แอนติบอดีจะขึ้นสูงสุดที่ 1:49.2 ในสัปดาห์ที่ 5 ในสัปดาห์ที่ 13 HI แอนติบอดีจะอยู่ที่ 1:12.6 (รูปที่ 1) สำหรับไก่ทดลองที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง ห่างกัน 6 สัปดาห์ Geometricmean ของ HI แอนติบอดีจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 13 ถึง 1:425.8 และจะลดลงเหลือ 6.7 ในสัปดาห์

ที่ 27 (รูปที่ 2)

จากการหยอดเชื้อ *H. paragallinarum* 6 สายพันธุ์ ในไก่ที่ฉีดวัคซีนที่มี HI แอนติบอดีไตเตอร์ 1:5-1:10, 1:20-1:40 ผลปรากฏว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น 4 สายพันธุ์ วัคซีนสามารถให้ความคุ้มโรคได้ 100% ส่วนสายพันธุ์ 221 จากประเทศญี่ปุ่น วัคซีนสามารถคุ้มกันโรคได้ 90% และ 100% ตามลำดับ แต่สำหรับสายพันธุ์ M จากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็น serotype C วัคซีนไม่สามารถคุ้มกันโรคได้เลย (ตารางที่ 1)

สรุปและวิจารณ์

ใน 1 ซีซีของวัคซีนที่เตรียมขึ้นมีเชื้อ *H. paragallinarum* อยู่ 4.2 x 10^9 CFU วัคซีนมีลักษณะเป็นน้ำสีขาวขุ่นเนื่องจาก Aluminum-hydroxide ที่ผสมอยู่เป็น adjuvant ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในไก่ให้ขึ้นสูงและนาน (Matsumoto and Yamamoto, 1971; Reid and Blackall, 1986) วัคซีนนี้ฉีดได้ง่ายโดยเฉพาะการฉีดเข้าใต้หนังบริเวณคอ

การใช้ thimerosal เป็นตัว inactivate เชื้อ *H. paragallinarum* ทำให้วัคซีนที่ได้ เวลาฉีดในไก่ ไก่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดีกว่าการใช้ formalin (Blackall and Reid, 1987)

ไก่ที่ฉีดวัคซีนนี้โดยเฉลี่ยแล้วถ้ามี HI แอนติบอดีตั้งแต่ 1:5 ขึ้นไป จะสามารถคุ้มกันการติดเชื้อ *H.paragallinarum* serotype A ที่เป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นเดียวกันได้ แต่สำหรับสายพันธุ์ M จากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็น serotype C ไก่ไม่สามารถคุ้มกันโรคได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *H.paragallinarum* ไม่สามารถทำให้ไก่สร้างภูมิคุ้มโรคในเชื้อที่ต่าง serotype กัน (Kume et al, 1980)

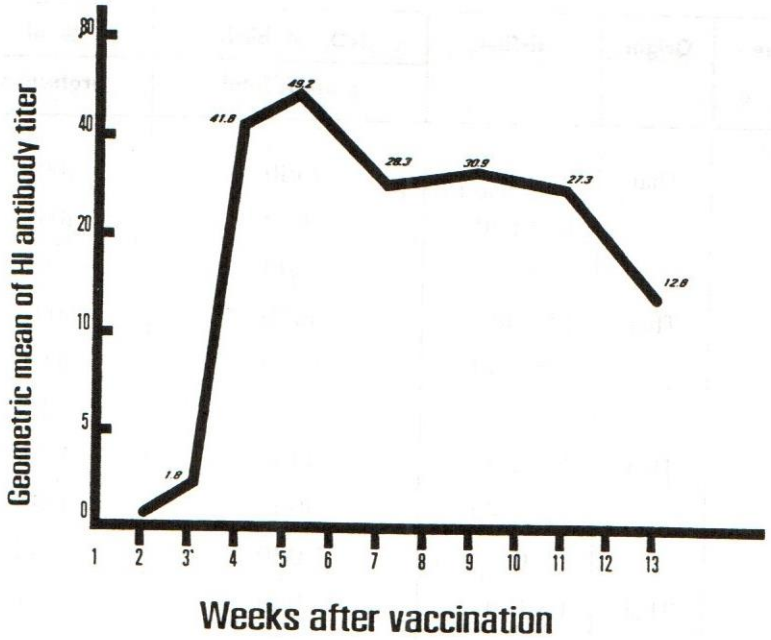
เชื้อ *H. paragallinarum* ที่เตรียมวัคซีนกับเชื้อที่หยอดจมูกแม้จะ serotype เดียวกัน แต่มาจากคนละท้องถิ่นกัน ความคุ้มโรคจะแตกต่างกันเล็กน้อยในไก่ที่มีระดับ HI แอนติบอดีต่ำ แต่ถ้าระดับ HI antibody สูงขึ้นถึง 1:40 ไก่จะสามารถให้การคุ้มกันโรคได้ 100% เช่นเดียวกัน

ไก่ที่มี HI แอนติบอดี เมื่อมีเชื้อ *H. paragallinarum* เข้าสู่ร่างกาย แอนติบอดีที่มีอยู่จะเป็นตัวทำลายเชื้อที่เข้าไป และเชื้อจะถูกทำลายหมดภายใน 24 ชั่วโมง (Kume et al, 1984) ดังนั้นไก่ที่มีแอนติบอดี serotype เดียวกับเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายจึงไม่เกิดโรค ในการทำวัคซีนเพียงครั้งเดียว ไก่สามารถคุ้มกันโรคได้ไม่ต่ำกว่า 13 สัปดาห์ ถ้าทำวัคซีนสองครั้ง ห่างกัน 6 สัปดาห์ จะคุ้มกันโรคได้ 27 สัปดาห์

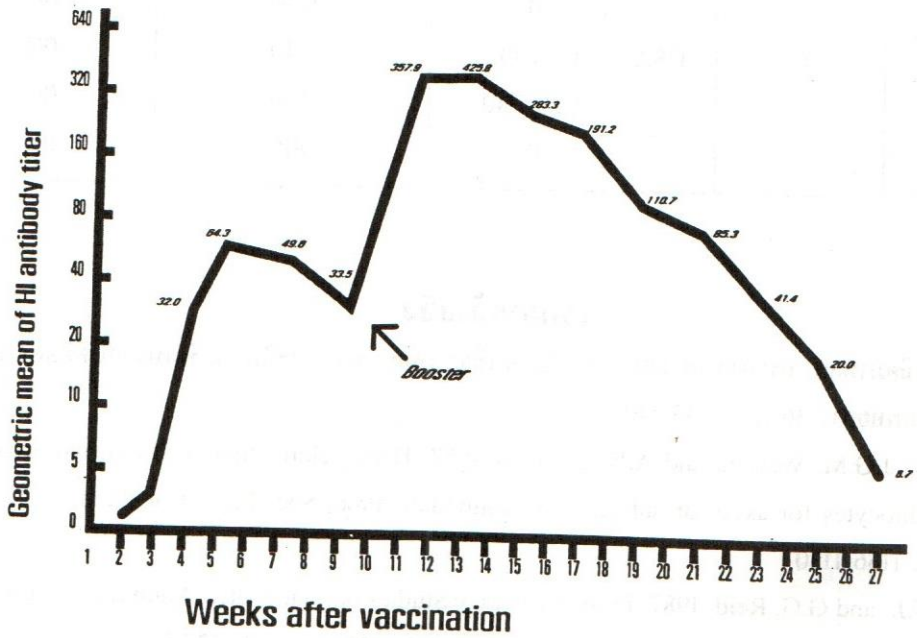
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องสัตว์ทดลอง, น.สพ. สุวิทย์ ลิมาวงษ์ปราณี, สพ.ญ. ดร. วัลลภา หนุนภักดี, สพ.ญ. จิรา คงครอง, สพ.ญ. พัชรี ทองคำคูณ และ สพ. นพพร โต๊ะมี

รูปที่ 1 HI แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยในไก่ทดลองที่ฉีดวัคซีนครั้งเดียว



รูปที่ 2 HI แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ย



ตารางที่ 1 Correlation berween HI antibody titer at challenge and protection from challenge

Challenge strain	Serotype	Origin	Hi-Titer	NO. of birds protect/Total	% of protection
746	A	Thai	1:5-1:10	10/10	100%
			1:20-1:40	10/10	100%
			0	0/10	0%
423	A	Thai	1:5-1:10	10/10	100%
			1:20-1:40	10/10	100%
			0	0/10	0%
112	A	Thai	1:5-1:10	10/10	100%
			1:20-1:40	10/10	100%
			0	0/10	0%
981	A	Thai	1:5-1:10	10/10	100%
			1:20-1:40	10/10	100%
			0	0/10	0%
221	A	Japan	1:5-1:10	9/10	90%
			1:20-1:40	10/10	100%
			0	0/10	0%
M	C	USA	1:5-1:10	0/10	0%
			1:20-1:40	0/10	0%
			0	0/10	0%

เอกสารอ้างอิง

วันทนีย์ เนรมิตมานสุข, ประภาส เนรมิตมานสุข 2528 เชื้อฮีโมฟิลัส พารากาลลินารัม ที่พบจากโรคติดต่อในไก่ สัตวแพทยสาร 36 (2) : 133-140

Bing, D.H., J.G.M. Weyand and A.B. Stavitsky 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 1166-1170

Blackall, P.J., and G.G. Reid. 1987. Further Efficacy Studies on Inactivated Aluminum Hydroxide-Adsorbed Vaccines againt Infectious Coryza Avian Diseases. 31:527-532

Kato, K, and H. Tsubahara. 1962. Infectious Coryza of chickens II. Identification of isolates. NaH. Inst. An. HLth. quart. 2:239.

Kume, K., A. Sawata, and Y.Nakase. 1980. Immunologic Relation ship Between Page's and Sawata's Serotype Strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 40, (5) : 757-760

Kume, K., A. Sawata, and T. Nakai. 1984. Clearance of the Challenge Organisms from the upper Respiratory Tract of Chickens Injected with an Inactivated Haemophilus paragallinarum Vaccine. Jpn. J. Vet. Sci. 46(6) : 843-850

Matsumoto, M., and R. Yamamoto. 1971. Protective Quality of an Aluminum Hydroxide-Absorbed Broth Bacteria Against Infectious Coryza. Am. J. Vet. Res. 36:279-582

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

Reid, G.G. and P.J. Blackall. 1986. Comparison of Adjuvants for and Inactivated Infectious Coryza Vaccine Avian Diseases. 31 (1) : 59-62

Sawata, A., Kume, K., and Nakase, Y. 1982. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* Serotype 2 organism:Occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. Am. J. Vet. Res. 43 : 1311-1314

Yamamoto, R. 1984. Infectious Coryza. In:Diseases of poultry, 8th ed. M.S. Hofstad, Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid, and H.W. Yoder, Jr., eds. 1984. lowa State University Press, Ames, lowa. p. 178-186

A Study of an Infectious Coryza Vaccine Produced from Local Strain

Wantanee Neramitmansook* Prapahd Neramitmansook**
Tipa Tanticharoenyos* Ladda Trongwongsa*

Abstract

Haemophilus paragallinarum, field strain 746 (serotype A) was used in the preparation of infectious coryza vaccina. Birds received one vaccination of this thimerosal-inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccine, produced HI antibody titer at 2 weeks and increasingly become peak at 5th week post vaccination. The protection still remained after 13th week after vaccination. Whereas birds which were given 2 vaccinations with 6 weeks interval, developing highest level of HI antibody titer after 13th week and the protection were also detectable at the 27th week.

Results from challenging with 4 local strains (serotype A) revealed 100% protection in birds possesing 1:5-1:10 and 1:20-1:40 HI antibody titer. Comparing to 90% and 100% protection which were detcted in birds holding 1:5-1:10 and 1:20-1:40 HI antibody titer respectively when challenged with strain 221 (serotype A, Japan). Meanwhile birds challenged with strain M (serotype C, USA) developed no protection at all.

Key words : Infectious Coryza Vaccine, Local Strain

* National Institute of Animal Health
** Northern Veterinary Research Center