ไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลิน เอ็มและอิมมูโนโกลบูลิน จี ของโคสาว หลังฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีส สเตรน 19

ม.ร.ว. อำนวยพร เกษมสันต์ มนยา เอกทัตร์ ดิลก เกษรสมบัติ

สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *Brucella abortus* โดยวิธี *SAT* และ *2-ME* ในลูกโคสาว อายุ 3-9 เดือน ซึ่งได้รับวัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19 จำนวน 60 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ดังนี้ คือ กลุ่มอายุ 3-5 เดือน, 6-7 เดือน และ 8-9 เดือน พบว่า ในสัปดาห์แรกหลังการฉีดวัคซีนระดับของ *IgG* เท่ากับ 1212.87 *i.u.* และ *IgM* เท่ากับ 2752.75 *i.u.* ระดับของภูมิคุ้มกันลดลงเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 42 ซึ่ง *IgM* จะคงมีอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่ *IgG* หมดไป ระดับของ *IgM* จะสูงกว่าระดับ *IgG* ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ระดับของ *IgG* จะลดลงต่ำกว่า 25 *i.u.* ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ตัดสินการเป็นโรค ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 ดังนั้นวิธี *2-ME* จึงเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจแยกโคที่เป็นโรคจากโคที่ได้รับวัคซีนได้ หลังจากฉีดวัคซีนแล้ว 6 เดือน

การป้องกันกำจัดบรูเซลโลซีสในโคอาจจะทำได้โดยการตรวจทางอิมมูน-ซีรั่มวิทยา และคัดโคตัวที่เป็นโรคออกจากฝูงเพื่อทำลาย หรือโดยการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับโคโดยการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีสสเตรน 19 ซึ่งจะทำให้โคมีภูมิคุ้มกันโรคได้หลายปี การฉีดวัคซีนชนิดนี้ให้แก่โคสาวของเกษตรกรเป็นนโยบายของกรมปศุสัตว์ และได้ทำมาเป็นเวลาต่อเนื่องกันหลายปีแล้ว โดยโคทุกตัวที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะต้องมีเครื่องหมายกำกับ เป็นต้นว่าติดหมายเลข *Ear tag* ที่ใบหู หรือสักเครื่องหมายบนใบหู หรือใช้เหล็กเผาไฟประทับบนผิวหนังให้เห็นเด่นชัด แต่เครื่องหมายเหล่านี้เมื่อนานเข้าอาจจะหลุดหายไปหรือเลอะเลือนไป จึงทำให้เกิดการสับสนเกี่ยวกับประวัติของโคว่าได้รับการฉีดวัคซีนหรือไม่ ทำให้เกิดปัญหาต่อมาในการตรวจโรคบรูเซลโลซิสทางอิมมูน-ซีรั่มวิทยาคือทั้งโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนและโคที่เป็นโรคนี้จะมีแอนติบอดีไตเตอร์สูงเช่นกันในช่วงเวลาระยะหนึ่ง จึงไม่สามารถที่จะวินิจฉัยได้ว่าโคตัวใดเป็นโรค หรือโคตัวใดเป็นตัวที่ได้รับการฉีดวัคซีน เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้การวิจัยหาแอนติบอดีไตเตอร์ โดยเฉพาะ *IgG* และ *IgM* ในซีรั่มโคที่ได้รับการฉีดวัคซีนตั้งแต่ระยะแรกจนถึงระยะสุดท้ายก็จะเป็นหนทางหนึ่งในการแยกว่าแอนติบอดีที่มีนั้นเกิดจากการที่เป็นโรคหรือเกิดจากการที่ได้รับการฉีดวัคซีน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. โคสาวจำนวน 60 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้
   กลุ่มที่ 1 อายุ 3-5 เดือน จำนวน 20 ตัว
   กลุ่มที่ 2 อายุ 6-7 เดือน จำนวน 20 ตัว
   กลุ่มที่ 3 อายุ 8-9 เดือน จำนวน 20 ตัว
2. วัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19 ผลิตโดยกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
3. บรูเซลลาแอนติเจน ชนิด *Tube Agglutination test* ผลิตโดย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
4. อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ตรวจทางซีรั่มวิทยาในห้อง

ปฏิบัติการ

วิธีการ

1. เจาะเลือดโคสาวทั้ง 3 กลุ่ม ตรวจโดยวิธี *standard tube agglutination* ก่อนการฉีดวัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19
2. ฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 1 โด๊ส ทั้ง 3 กลุ่ม
3. เจาะเลือดโคทั้งหมดหลังฉีดวัคซีน ดังนี้

   มิถุนายน 2530-กรกฎาคม 2530 เก็บซีรั่มทุกสัปดาห์ ๆ ละครั้ง

   สิงหาคม 2530-มกราคม 2531 เก็บซีรั่ม 15 วันต่อครั้ง

   กุมภาพันธ์ 2531 เก็บซีรั่มเดือนละ 1 ครั้ง
4. นำซีรั่มมาตรวจหาไตเตอร์โดยใช้วิธี *standard tube agglutination test (SAT)* และ *2-mercaptoethanol agglutination test (2-ME).*

ผลการทดลอง

แอนติบอดีไตเตอร์จากซีรั่มสด *(Fresh serum)* ของโคทั้ง 3 กลุ่ม ก่อนได้รับวัคซีนให้ผลลบโดยวิธี *SAT* แต่หลังจากได้รับวัคซีนแล้ว 1 สัปดาห์ แอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 3965.61 *i.u.* และลดลงเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ต่อมาจนกระทั่งเหลืออยู่ 17.26 *i.u.* ในสัปดาห์ที่ 22 ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ตัดสินการเป็นโรค ในสัปดาห์ที่ 64 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ยังคงเหลืออยู่แต่น้อยมาก

ส่วนแอนติบอดีจากซีรั่มชุดเดียวกันซึ่งได้รับการ *treat* ด้วย *2-Mercaptoethanol* มีแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยของ *IgG 1212.86 i.u.* และ *IgM 2752.75 i.u.* และไตเตอร์เหล่านี้ก็ลดลงเรื่อย ๆ แต่ค่าของ *IgM* ยังคงมากกว่าค่าของ *IgG* อยู่เสมอ จนถึงสัปดาห์ที่ 12 ค่า *IgG* เฉลี่ยเท่ากับ 20.11 *i.u.* ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์การตัดสินการเป็นโรคของ *WHO* เช่นกัน จะเห็นได้ว่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรั่มสดและซีรั่มที่ *treat* ด้วย *2-ME* เมื่อตรวจด้วยวิธี *SAT* อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าระดับที่ใช้ตัดสินการเป็นโรคเมื่อประมาณ $2\frac{1}{2}$ เดือนหลังฉีดวัคซีน (ตารางที่ 1)

การเปรียบเทียบการตรวจวิธี *SAT* และ *2-ME* โดยใช้ค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 กลุ่มให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P < 0.05$)* (ภาพที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีในแต่ละกลุ่มก็จะให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P < 0.001$)* ทั้งสามกลุ่ม

การตรวจโดยวิธี *SAT* ในแต่ละกลุ่มให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P > 0.05$)* แต่ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 นั้น ระดับไตเตอร์ของกลุ่ม 1 จะสูงกว่า กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 (ภาพที่ 2) และการตรวจโดยวิธี *2-ME* ของทั้ง 3 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P > 0.05$)* เช่นกัน และระดับไตเตอร์ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ของแต่ละกลุ่มก็ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3)

Table 1 Averages of antibody titers by SAT in fresh sera and sera treated with 2-ME

Weeks	SAT		
		Treated Sera with 2-ME	
	Fresh sera	Ig.G.	Ig.M.
1	3,965.61	1,212.86	2,752.75
2	2,545.03	617.56	1,927.47
3	1,086.19	314.33	771.86
4	477.29	203.84	273.45
5	335.23	131.94	203.29
6	275.42	122.69	152.73
7	186.86	98.65	82.21
8	114.89	64.17	80.72
10	85.19	39.10	46.09
12	61.22	20.11	41.11
14	48.88	11.57	37.31
16	33.94	17.74	16.12
18	34.31	8.94	25.37
20	27.26	8.68	18.58
22	17.26	10.52	6.74
24	11.62	4.83	6.79
26	6.61	3.97	2.64
28	5.74	2.38	3.36
30	5.54	2.18	3.36
32	10.98	4.44	6.54
34	5.71	2.61	3.10
38	7.03	3.42	3.61
40	1.21	1.11	0.07
42	0.46	0.00	0.46
44	0.44	0.00	0.44
46	2.22	0.00	2.22
48	0.42	0.33	0.09
52	0.38	0.00	0.38
56	0.40	0.00	0.40
60	0.44	0.00	0.44
64	0.88	0.00	0.88

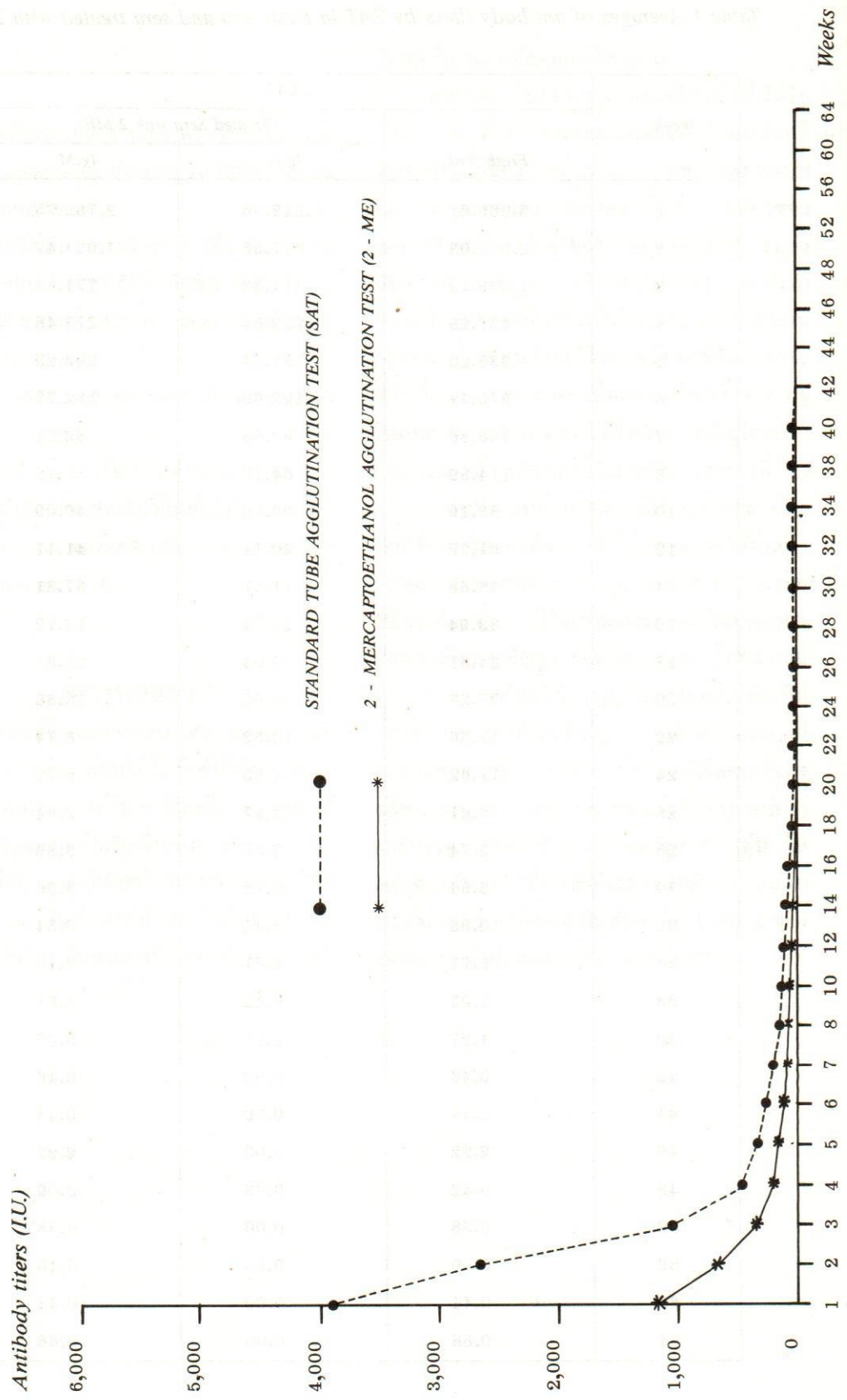

Fig 1. Three groups averages of antibody titers by SAT and 2-ME.

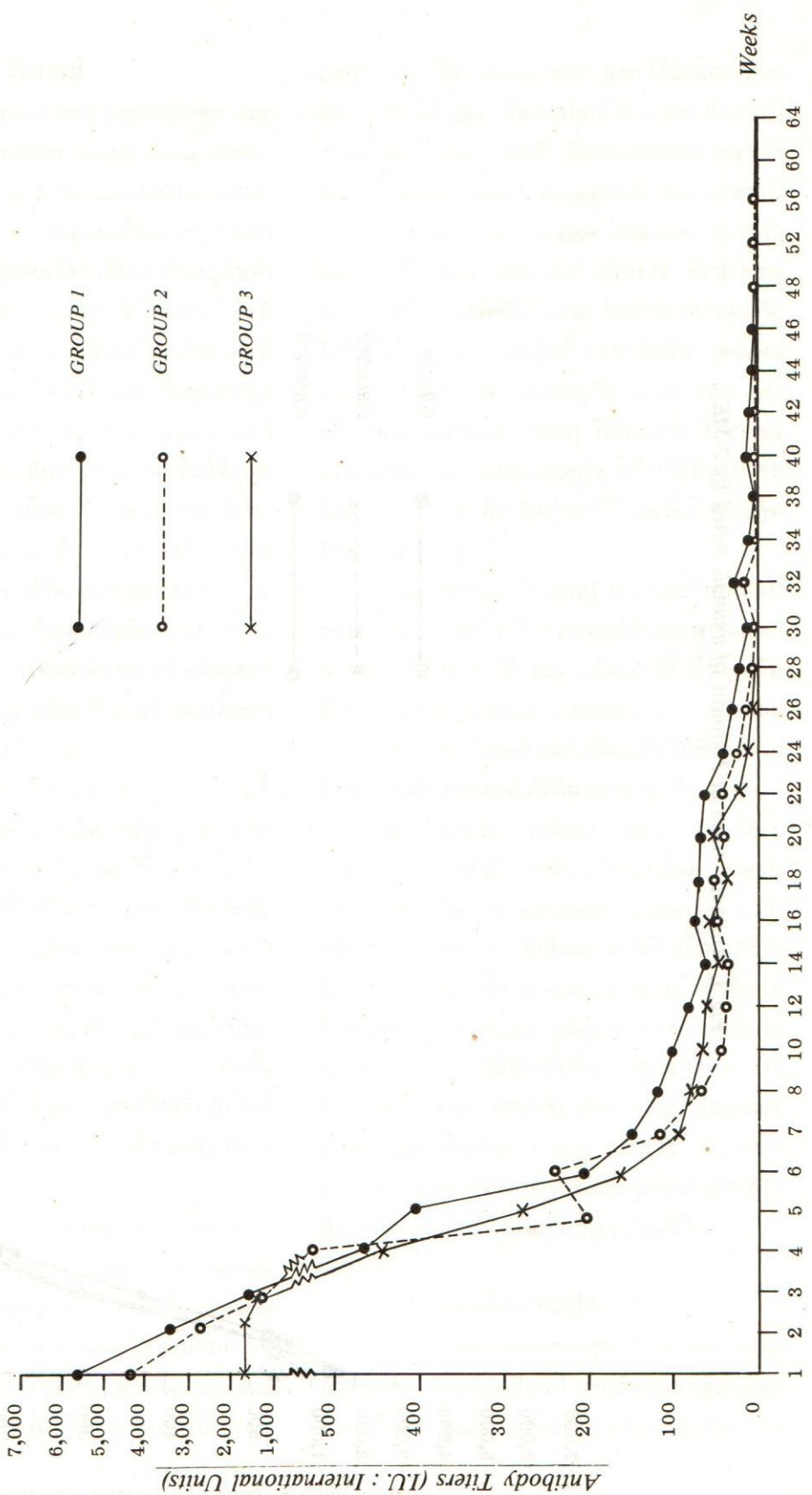

Fig. 2 Antibody titers in 3 groups of animals tested by SAT.

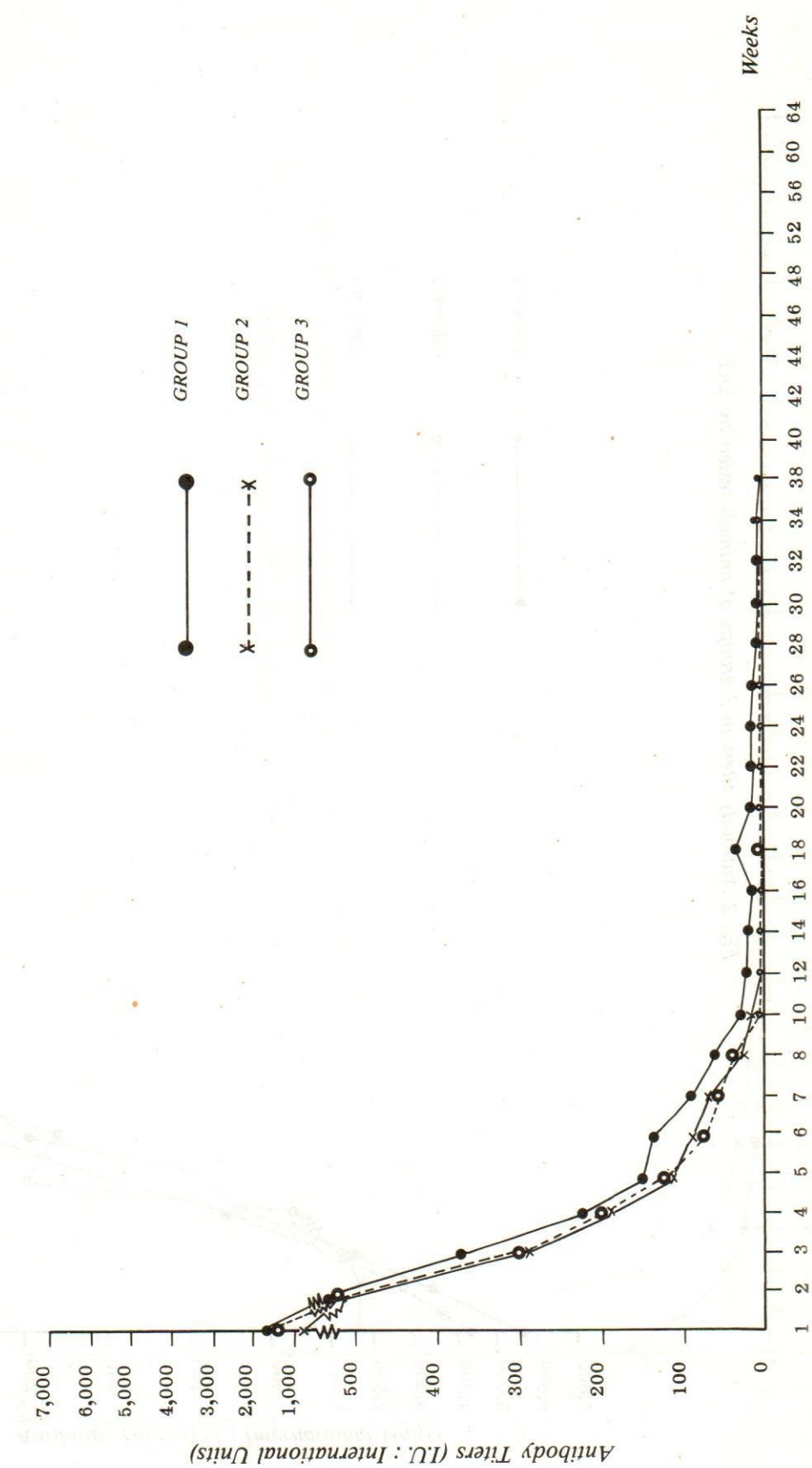

Fig 3. Anitbody titers in 3 groups of animals tested by 2-ME.

วิจารณ์

ในพื้นที่ที่มีการระบาดของบรูเซลโลซิส และลูกโคสาวได้รับการฉีดวัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19 เมื่ออายุ 5-8 เดือน จะมีการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนไม่เหมือนกัน ในฝูงโคที่ติดโรคการตอบสนองจะถูกกดทำให้ไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินต่ำ ดังที่ *Novitskii* และคณะ (1983) ได้รายงานว่าโคที่เป็นโรคบรูเซลโลซีส หลังฉีดวัคซีนแล้ว 15-20 วัน มีไตเตอร์เฉลี่ย 207 *i.u.* โดยวิธี *SAT* ในขณะที่ฝูงที่ไม่มีประวัติว่าเคยเป็นบรูเซลโลซิส มีแอนติบอดีเฉลี่ย 1004 *i.u.* ซึ่งตรงกับการทดลองครั้งนี้ซึ่งพบว่าในช่วง 15-20 วัน เมื่อตรวจโดยวิธี *SAT* มีไตเตอร์ *2545.30 i.u.-1086.19 i.u.* ส่วนการตรวจโดย *2-ME* หลังฉีดวัคซีน 15 วัน มีไตเตอร์เฉลี่ย 617.56 *i.u.* และ หลังฉีด 20 วัน ไตเตอร์เฉลี่ย 314.33 *i.u.* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไตเตอร์ของ *IgM* และ *IgG* (ตรวจโดยวิธี *SAT*) และไตเตอร์ของ *IgG* (ตรวจโดยวิธี *2-ME*)

จากการศึกษาของดิลกและคณะ (2530) พบว่าในสัปดาห์ที่ 24 หลังการฉีดวัคซีนบรูเซลโลซีส ไตเตอร์จะมีค่าต่ำกว่า 25 *I.U.* โดยวิธี *SAT* และในลูกโคที่ฉีดวัคซีนควรเก็บซีรั่มมาตรวจหลังฉีดวัคซีนไปแล้วไม่น้อยกว่า 9 เดือน แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไตเตอร์ลดลงเหลือต่ำกว่า 25 *I.U. (20.11 I.U.)* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 โดยวิธี *2-ME* และในสัปดาห์ที่ 24 พบไตเตอร์เฉลี่ยเพียง 4.83 *I.U.* ดังนั้นในกรณีที่ตรวจโดยวิธี *2-ME* อาจเก็บซีรั่มลูกโคที่ฉีดวัคซีนมาตรวจได้หลังจากการฉีดวัคซีนเพียง 6 เดือน

Morgan (1967) และ *WHO (1986)* แนะนำว่า *2-ME* สามารถใช้ในการลด *Agglutinating antibody* ได้ โดยไม่มีผลกระทบกับ *IgG* ในขณะที่ *McMahon (1983)* ให้ข้อสังเกตว่า *dithiothreitol* ไม่สามารถจะใช้แทน *2-ME* ในการตรวจหา *IgG agglutinating antibody* ในซีรั่มโค ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงใช้ *2-ME* ในการลด *activity* ของ *IgM* ให้เหลือเฉพาะ *IgG* จึงทำให้ *titer* ที่ตรวจโดยวิธี *2-ME* ต่ำกว่าที่ตรวจโดยวิธี *SAT* ปกติ ซึ่งตรงตามรายงานของ *Suto* และคณะ (1968), *Chappel* และคณะ (1978), *Stemshorn (1985)* และ *Halder* และคณะ (1987) นอกจากนี้ *Tome* และคณะ (1987) ยังประสบความสำเร็จในการใช้วิธี *2-ME* ในการตรวจและคัดโคที่เป็นโรคออกจากฝูงโคที่เคยทำวัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19 นอกจากวิธี *2-ME* และ *SAT* แล้ว *Heck* และคณะ (1985) ได้เสนอว่าวิธี *ELISA* และ *Hemolysis in gel test (HIGT)* ก็เป็นวิธีที่สามารถใช้ทดสอบการเป็นโรคในฝูงโคที่ได้รับวัคซีนและติดโรคในเวลาต่อมา

Butler และคณะ (1986) ทำการเปรียบเทียบการทดสอบทางซีรั่มวิทยาหลายวิธี และพบว่าการตรวจโดยวิธี *SAT* ให้ *false positive* ได้ ซึ่งตรงกับข้อคิดเห็นของ *Chappel* และคณะ (1978) และ *Garin* และคณะ (1985) แต่วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ตรวจโรคบรูเซลโลซีสโดยทั่วไปในหลาย ๆ ประเทศ

Tsai และคณะ (1985) รายงานว่าในระยะเวลา 1 เดือน หลังฉีดวัคซีน *Brucella abortus* สเตรน 19 การตรวจโดยวิธี *complement fixation test (CFT)* และ *SAT* ไม่สามารถแยกไตเตอร์ที่ได้ว่าเกิดจากการฉีดวัคซีนหรือติดเชื้อ *Brucella abortus* อย่างไรก็ตามในรายที่ติดเชื้อ *Brucella* ภูมิคุ้มกันจะอยู่ในกระแสเลือดได้นานกว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีดวัคซีน จากการทดลองของ *Shi* และคณะ (1985) แสดงให้เห็นว่าการตรวจโดยวิธี *CFT, RBPT, SAT* และ *2-ME* ไม่สามารถจะแยกแกะที่ได้รับการฉีดวัคซีนจากแกะที่เป็นโรคบรูเซลโลซีสได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการกองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ นายสัตวแพทย์ประชุม อินทรโชติ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทับกวาง

กรมปศุสัตว์ อ.แก่งคอย จ.สระบุรี และสัตวแพทย์สมชาย ช่างทอง กลุ่มงานอิมมูนและซีรั่มวิทยาที่ช่วยให้การดำเนินงานไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ดิลก เกษรสมบัติ ; มนยา เอกทัตร์ ; โชคชัย นกเทศ ; ประชุม อินทรโชติ ; ถวัลย์ วรรณกุล ; โศภิษฐ์ ธัญลักษณากุล ; และสมชาย ช่างทอง. 2530 การศึกษาหาฮิวมอรอลแอนติบอดีในลูกโคเมีย อายุ 3-9 เดือน หลังฉีดวัคซีนบรูเซลโลซิส สเตรน 19. วารสารสัตวแพทย์ 8 : 90-99.
2. *Butler, J.E.; Seawright, G.L.; McGivern, P.L., and Gilsdorf, M. 1986. Preliminary evidence for a diagnostic Immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with Brucella abortus strain 19 and challenge exposed with strain 2308. Am. J. Vet. Res. 47 : 1258-1264.*
3. *Chappel, R.J. ; McNaught, D.J.; Bourke, J.A.; and Allan, G.S. 1978. Comparison of the results of some serological tests for bovine brurcellosis. J. Hyg. Camb. 80 : 365-371.*
4. *Chapple, R.J.; McNaught, D.J.; Bourke, J.A.; and Allan, G.S. 1978. The diagnostic efficiency of some serological tests for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb. 80 : 373-384.*
5. *Halder, S.K.; Sen, G.P. 1986. Reproductive behaviour and agglutinin pattern in natural Brucella infection in cows. Indian Vet. J. 63 : 607-610.*
6. *Heck, F.C., Nielsen, K.H., Williams. J.D., Crawford, R.P., and Adams, L.G. 1984. Sensitivity of serological methods for detecting antibody of vaccinated and non-vaccinated Brucella-infected cows. Aust. Vet. J. 61 : 265-266.*
7. *McMahon, K.J. 1983. Comparison of the 2-mercaptoethanol and dithiothreitol tests for determining Brucella immunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serum. Can. J. Comp. Med. 47 : 370-372.*
8. *Morgan, W.J.B. 1967. The serological diagnosis of bovine brucellosis; Central Veterinary Laboratory Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.*
9. *Novitskii, A.A.; Bazhin, M.A.; Kandaurov, I.; kosilov, I.A.; and Mironenko, A.T. (1983): Immune tolerant in cattle infected with Brucella abortus. Sel'Skokhz. Biol. 4 : 100-104.*
10. *Shi, P.Y.; Tai, Z.G.; and Li, D.Y. 1985. SPA coagglutination test and enzyme-linked SPA technique in the serological examination of sheep vaccinated with Brucella melitensis M5. Ani. Hus. Vet. Med. 16 : 252-253.*
11. *Stemshorn, B.W. 1985. Bovine Brucellosis-Diagnosis and Eradication. Can. Vet. J. 26 : 35-39.*
12. *Suto. T. and Isayama, Y. 1968. Gel filtration as a useful method to differentiate "Brucella" antibodies. International Symposium on Brucellosis, Tunis, Symp. Series immunobiol. Standard, Vol. 12 : 325-334.*
13. *Tome, J.S.G.; Rodriguey, E. del P.; and Samartino, L.E. 1987. Bovine brucellosis : elimination of reactors to 2-mercaptoethanol and rapid decrease of prevalence in a highly infected breeding herd. Vet. Argent. 4 : 71-74.*
14. *Tsai, Y.H.; Lu, Y.S.; Lin, D.F.; Lee, Y.L.; Isayama, Y.; and Sarahara, J. 1985. Antibody response of the cattle vaccinated with strain 19 Brucella abortus. Taiwan J. Vet. Med. Ani. Hus. 44 : 29-32.*
15. *Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser. No. 740. 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. 6th Report.*

Immunoglobulin M and immunoglobulin G titers of vaccinated brucellosis strain 19 heifers

M.R.Amnuayporn Kashemsant Monaya Ekgatat Dilok Gesornsombat

National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development, Bangkaen, BKK. 10900, Thailand.

ABSTRACT

Antibody titers against Brucella abortus were studied in 3 to 9 month heifers vaccinated with Brucella abortus strain 19 by standard SAT and 2-ME methods. Sixty heifers were divided into 3 groups, i.e., 3-5 months, 6-7 months, and 8 to 9 months, of 20 heifers each. there is no significant different among animal groups by both methods ($P > 0.05$). The level of IgG and IgM are 1212.87 and 2752.75 i.u., respectively, for the first week. The antibody titer decreased with time but IgM remained higher than IgG throughout the experiment. Level of IgG is below 25 i.u. (20.11 i.u.) at 12 weeks post vaccination. Twenty-four weeks post vaccination IgG level is only 4.83 i.u. Therefore, 2-ME can be used to differentiate vaccinated animals from diseased ones at 6 month after vaccination.

อภินันทนาการ

จาก

บริษัท เชียร์รี่ จำกัด

630/99 ซอยบุญพงษา ถนนพระปิ่นเกล้า กรุงเทพ 10700

โทร. 433-5530, 424-4365 **เทเล็กซ์** 72273 DTH TH

Preparation Of Fluorescent Antibody Conjugate For Rapid Diagnosis Of Duck Virus Enteritis

Urasri Tantaswasdi, M.R.Amnuayporn Kashemsant, Arunee Chaisingh, Porntip Siriwan, Sujira Parchariyanon

National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development, Bangkhen, Bangkok 10900, Thailand.

ABSTRACT

A fluorescent antibody conjugate for duck virus enteritis was prepared by preciptating immunoglobulin antibody from duck virus enteritis antiserum and conjugating with fluorescein isothiocyanate. The optimum dilution of this conjugate was determined by staining titration and the specificity was tested in tissue sections from six-week-old mixed-breed ducklings which were divided into four groups of 12 each. Duckings of Group I were inoculated intranasally with 0.5 ml of a preparation of virulent virus containing $10^{5.5}$ DLD_{50}/ml. Ducklings of Group II were vaccinated intramuscularly with 1 ml of vaccine containing $10^{5.3}$ $TCID_{50}$ of virus. Group III were similarly vaccinated as Group II and challenged after two weeks with the same dose of virulent virus as Group I. Duckling in Group IV received no virus and served as controls. One duckling from each group was killed daily from day 1 to 7 post inoculation. Tissue samples from the esophagus, liver, spleen, small intestine, thymus and bursa of Fabricius were collected and examined by the direct fluorescent antibody technique. The adjacent tissues were collected for pathological examination and virus isolation.

From day 3 post inoculation, viral antigen was detected in cells obtained from organs of Group I ducklings. The intensity of fluorescence was clearest in mucosal epithelial cells of the esophagus. Lesions and virus were detected only in Group I ducklings but not in ducklings of Group II, III and IV.

The first occurrence of duck virus enteritis (DVE) in Thailand was in 1976.[8] The causal herpesvirus was isolated at that time.[9] The disease spreaded rapidly and caused severe morbidity with mortality rates approaching 100 per cent. At present, there is no effective treatment for the disease. Therefore, prompt and accurate diagnosis is essential for effective control of the disease. Immunofluorescence is one of the most sensitive technique for detection of DVE virus. In Thailand, however, this technique is seldomly employed because fluorescent antibody (FA) conjugate for DVE is not-produced locally, is difficult to import from abroad, and is sometimes unavailable from foreign sources. Most diagnosis relies upon isolation of the virus by inoculation of embryonated duck eggs or ducklings. The technique usually requires a week or more to yield results.

The purpose of the present study was to prepare FA conjugate and to determine the best organ for rapid and effective diagnosis of DVE.

Materials and Methods

Ducklings : For preparation of antiserum and for testing the quality of the FA conjugate, 58 six-week-old mixed-breed ducklings (Khaki-Campbell x native duck) known to be free of DVE and not vaccinated against DVE, were obtained from the Animal Husbandry Division, Department of Livestock Development (DLD).

Embryonated duck eggs : For investigating the presence of DVE in various organs, about 1,700 embryonated duck eggs, 11/to 14-day-old, were obtained from the same source.

Duck virus enteritis vaccine : At tenuated DVE vaccine, batch number 34/30, with a titre of $10^{6.3}$ median tissue culture infective doses per-milliliter (TCID 50/ ml), was obtained from the

Veterinary Biologics Division, DLD.Duck virus enteritis virus : A local DVE virus was used. This strain was isolated from the liver and spleen of an affected duck in Thailand.[9] It was passaged four times in ducks to increase its virulence. The virus suspension used contained $10^{6.5}$ median duck lethal does per milliliter (DLD 50 / mi). Important supplies : For preparing the FA conjugate, a chromatography column,saturated ammonium sulfate solution, fluorescein isothiocyanate (FITC), Sephadex G-25, diethyl aminoethyl cellulose grade 52 (DEAE 52), and various buffers, particularly, carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5, 0.005 M phosphate buffer + 0.1 M NaCl and 0.2 M NaCl, pH 7.2, phosphate buffered saline (PBS)pH 7.2, and 0.85% normal saline were used.

Preparation of antiserum

One 200-dose vial of DVE vaccine from the DLD was reconstituted with 20 ml of 2% casitone diluent. One ml dose of this vaccine was administered intramuscularly into each of 10 six-week-old ducklings.Three weeks after vaccination, a 1 ml dose of the virulent virus was inoculated intravenously into each of the ducklings. Two weeks later,the ducklings were bled, the sera were collected, and the neutralization index(NI) was determined.

Preparation of fluorescent antibody conjugate

Adapting the method of Kawamura (1977),antiserum with NI higher than 3.5 was precipitated with ammonium sulfate. The precipitation was done by using 50% saturated solution, followed by 3 times precipitation with 33% saturated solution. Ammonium sulfate was removed by dialysis against PBS. Protein concentration was determined. The amount of FITC, carbonate-bicarbonate buffer, and normal saline to be used were calculated. FITC dissolved in the carbonate-bicarbonate buffer was added dropwise to the protein solution,to which the normal saline had been added. Conjugation was performed at room temperature over a period of two hours with continuous stirring on a magnetic stirrer. Free FITC was removed from conjugated globulin by using Sephadex G-25 equilibrated with PBS. Following dialysis,the conjugate was further purified by $DEAE_{52}$ equilibrated with 0.005 M phosphate buffer.

Testing of the quality of the fluorescent antibody conjugate prepared

(1) The F/P ratio was calculated according to the following formula :

$$A/B \times 0.41$$

A = estimation of fluorochrome concentration (ug/ml),obtained by measuring the optical density (OD) of the FA conjugate at a wave length of 495nm and multiplying by 5.71

B = estimation of protein concentration (mg/ml), obtained by measuring the OD at 280 nm and then applying the formula :

$$(OD_{280} - (OD_{495} \times 0.053)) \times 0.75$$

(2) The optimum dilution of the conjugate was determined by staining-titration.Two-fold dilutions of the conjugate were made from 1:8 to 1:256. Each dilution was used to stain two tissue sections from ducks infected with DVE virus and two tissue sections from non-infected ducks.

(3) The specificity of the conjugate was tested on tissue sections from four groups of 12 ducklings each, which had been treated as follows :

Group I	ducklings were each inoculated intranasally with 0.5 ml of virulent DVE virus containing $10^{5.5}$ DLD_{50}/ml.
Group II	ducklings were each vaccinated intramuscularly with 1 ml of DVE vaccine containing $10^{5.3}$ $TCID_{50}$ of virus.
Group III	ducklings received the same dose of vaccine virus as Group II and then were challenged two weeks later with the same dose of virulent virus as Group I.

Group IV was the control group receiving neither virus nor vaccine.

One duckling from each group was killed daily from day 1 to 7 postinoculation. Tissue sections from the esophagus, liver, spleen, small intestine, thymus and bursa of Fabricius of each duckling were stained with the conjugate. Pathological lesions in those organs were evaluated using standard technique. Virus isolation was attempted through embryonated duck eggs.

Results

The mean NI of the antisera prepared was 3.7 and the F/P ration of the FA conjugate was 1.209.

The highest dilution that gave positive results was 1 : 64. The dilution was set to be 1 fluorescent antibody unit (FAU). In the diagnosis, 1 : 16 of this conjugate which is corresponded to 4 FAU was used (Table 1). None of the tested dilutions stained sections from control ducklings.

Table 1. Determination of the optimum staining dilution of FA conjugate

Source of tissue section	*Dilution of FA conjugate*					
	1 : 8	*1 : 16*	*1 : 32*	*1 : 64*	*1 : 128*	*1 : 256*
Infected duckling	+++	++	+	+	±	–
Normal duckling	–	–	–	–	–	–

+, ++, +++, = *Positive* *(weak, moderate, Strong)*
± = *Suspect*
– = *Negative*

Tissue sections from Group I (infected) ducklings fluoresced when stained with conjugate, starting from day 3 post inoculation onward. Fluorescence was observed in the nucleus and cytoplasm of mucosal epithelial cells and sometimes in epithelial cells of the esophageal submucosal glands (Fig. I), hepatocytes and bile duct epithelial cells, periarteriolar sheath cells and parenchyma of the spleen, reticular cells and crypt epithelial cells of the intestinal annular bands, medullary reticular cells of the thymus and bursa of Fabricius and occasionally in the corticomedullary epithelial cells of the bursa of Fabricius.

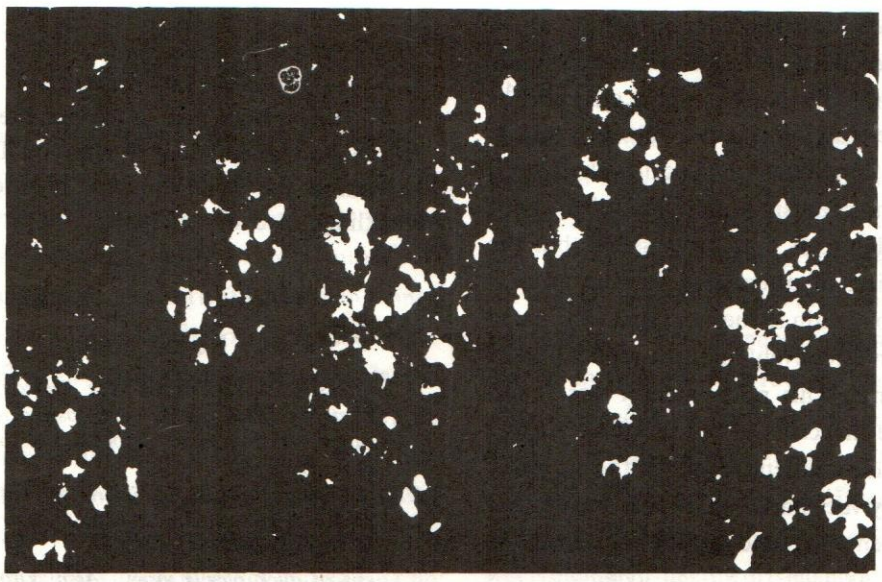

Fig I. Fluorescing granules are seen in the nucleus and cytoplasm of the mucosal epithelial cells in a section of esophageal tissue from a duckling infected with DVE. × 200.

At necropsy, DVE lesions were observed in the organs of ducklings from Group I. Submucosal petechiae and some minute ulcerative foci were scattered along the entire length of the esophagus. In the liver, white pinpoint necrotic foci and petechiae were observed with naked eye. Hemorrhagic annular bands were present in the small intestine, Thymus and bursa of Fabricius were atrophic. Tiny necrotic foci or petechiae were noted on the surface of the spleen. DVE virus was found in Group I duckling, whereas ducklings of GroupII, III and IV contained no lesions and virus was not detected.

Discussion

Although the NI was not high, it was possible to use the antiserum derived from the ducklings to prepare DVE conjugate for diagnosis. The preparation of the conjugate was not difficult and there were no problems of non-specific reactions because the F/P ratio was in the range 1-22.

The presence of viral antigen was detected only in tissues from ducklings of Group I which were infected with DVE virus. Virulent virus multiplies rapidly in the organ studied.[3,4,5] No positive reaction was present in either the vaccinated ducklings or vaccine-challenged ones. The mechanism underlying this has not been elucidated. It may be possible that the multiplication of attenuated vaccine virus is restricted to certain tissues and that vaccinated animals can effectively limit the replication of virulent virus. This phenomenon was found to be true in case of swine fever virus.[6] In the vaccine-challenged group, the antibody produced by vaccination may mask the antigen of the virulent virus and protect them from the conjugate.

The distribution of DVE viral antigen in both the nucleus and cytoplasm of infected cells is similar to those found in infectious laryngotracheitis.[7,12] However, the most striking fluorescence was seen in the epithelial cells lining the esophagus. Since DVE virus is one of the herpesviruses which are known to attack epithelial cells or cells derived from ectoderm and endoderm, it is not surprising that the result was most easily interpreted in this tissue.[11]

Erickson et al. (1974) developed FA cell culture technique for DVE diagnosis and found that it is the most sensitive technique and is as accurate as intramuscular ture, however, took time. In the present study, tissues from infected ducklings were stained directly, making it possible to obtain results within three hours. The accuracy of the results was very good, comparable to those obtained-with FA conjugate from the United States.[10] This indicaled that the quality of the FA conjugate prepared is high and can be used effectively in the detection of DVE.

Acknowledgment

The authors wish to express their thanks to the Animal Husbandry Division, DLD, for providing the embryonated duck eggs and ducklings used in this study.

References

1. *Erickson, G.A.; Proctor, S.J.; Pearson, J.E.; and Gustafson, G.A. 1974. Diagnosis of duck virus enteritis (duck plague). Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag. 17 : 85-90.*
2. *Kawamura, A.,Jr. 1977. Fluorescent Antibody Techniques and Their Application. 2nd ed. University of Tokyo Press, Tokyo. 292 pp.*

esis of duck plague virus. Arch. Virol. 50 83-95.