การแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสตับอักเสบในลูกเป็ด

พรทิพย์ ศิริวรรณ์ อุราศรี ตันตสวัสดิ์ สุรศักดิ์ ชื่นใจ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

ตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบจากลูกเป็ดอายุ 9-14 วัน ซึ่งป่วยตายจากการระบาดของโรคที่จังหวัดชลบุรี และระยอง โดยมีอาการและวิการของโรคคล้ายไวรัสตับอักเสบในเป็ด การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ตับบดทำเป็น 20% suspension ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักและไข่เป็ดฟัก ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมจากตับคัพภะเป็ด และฉีดลูกเป็ดทดลองที่ได้รับและไม่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบในเป็ด รวมทั้งพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้โดยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น พบว่าเชื้อไวรัสทำให้คัพภะไก่ตาย มีลักษณะ hemorrhage และบวมน้ำ ส่วนคัพภะเป็ดพบเฉพาะ hemorrhage เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลง ลูกเป็ดทดลองที่ได้รับวัคซีนสามารถคุ้มโรคได้ ส่วนลูกเป็ดทดลองที่ไม่ได้รับวัคซีนตาย 60-80% โดยมีอาการชัก คอแหงน ขาเหยียดไปด้านหลัง และตายอย่างรวดเร็ว ผ่าซากพบตับมีจุดเลือดออกชัดเจนเช่นเดียวกับลูกเป็ดป่วยตายจากท้องที่ ผลการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้ยืนยันว่าเป็นเชื้อไวรัสตับอักเสบในเป็ด

คำสำคัญ : ไวรัสตับอักเสบในเป็ด การแยกเชื้อ ลูกเป็ด

บทนำ

โรคไวรัสตับอักเสบในเป็ด เป็นโรคระบาดรุนแรงและเฉียบพลันในลูกเป็ด มีการแพร่ระบาดรวดเร็วและอัตราการตายสูง ลูกเป็ดตายหลังจากเกิดโรคภายใน 3-4 วันเท่านั้น โดยลูกเป็ดมีอาการซึม ไม่มีแรง นอนตะแคงชักและตายด้วยอาการคอแหงน ขาเหยียดไปด้านหลัง ลูกเป็ดป่วยจะตายภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ เมื่อผ่าซากพบวิการสำคัญที่ตับเป็นจุดเลือดออก โรคนี้แบ่งเป็น 3 types คือ type I, II และ III type I เกิดจากเชื้อ picornavirus มีความรุนแรงมากกว่า type อื่น ทำให้ลูกเป็ดอายุต่ำกว่า 1 สัปดาห์ตายอาจสูงถึง 95% ส่วนลูกเป็ดอายุ 4-5 สัปดาห์ อัตราการตายต่ำหรือไม่ตายเลย พบการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบชนิดนี้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา (Levine and Fabricant, 1950) จีน (Guo and Pan, 1984) และเกาหลี (Park, 1985) ส่วน type II เกิดจากเชื้อ astrovirus ทำให้ลูกเป็ดตาย 10-50 % มีรายงานเฉพาะในประเทศอังกฤษ (Gough et al, 1985; Gough, 1986) และ type III เกิดจากเชื้อ picornavirus ทำให้ลูกเป็ดตายไม่เกิน 30% มีรายงานเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกาเท่านั้น (Haider and Calnek, 1979; Toth, 1969) โรคไวรัสตับอักเสบทั้ง 3 type นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จากอาการ หรือวิการจากการผ่าซาก แต่ให้ผลแตกต่างกันโดยวิธีการแยกเชื้อไวรัสในไข่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยงและการฉีดลูกเป็ดทดลอง

ในประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับโรคไวรัสตับอักเสบในลูกเป็ดเป็นครั้งแรกในปี 2502 โดยปิยะและคณะได้แยกเชื้อจากการระบาดของโรคที่จังหวัดอยุธยา หลังจากนั้น พอ (2505) ทดลองฉีดเชื้อไวรัสที่แยกได้ให้ลูกเป็ดที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ดแล้ว 3 วัน พบว่าไม่มีความคุ้มโรค และจากสรุปรายงานแนวโน้มการเป็นโรคติดเชื้อของเป็ดและห่านระหว่างปี 2525-2531 โดยวรปีและคณะ (2533) พบโรคตับอักเสบของลูกเป็ดจำนวน 1.5%

เนื่องจากเคยมีรายงานการแยกเชื้อไวรัสตับอักเสบในลูกเป็ดเพียงครั้งเดียว โดยใช้ไข่ไก่ฟักและลูกเป็ดทดลอง (ปิยะและคณะ, 2502) ซึ่งเป็นระยะเวลานานมากแล้ว รายงานนี้เป็นการแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสจากลูกเป็ดเชอรี่ที่ป่วยตายโดยมีอาการซึม ไม่มีแรง ชัก คอแหงนตาย อัตราการตาย 10-60% จากการระบาดของโรคที่จังหวัด ชลบุรี และระยอง โดยใช้ไข่ไก่ฟัก ไข่เป็ดฟัก เซลล์เพาะเลี้ยง ฉีดลูกเป็ดทดลอง และวิธีนิวทรัลไลเซชั่นเพื่อยืนยันสาเหตุของการระบาดของโรคในครั้งนี้ ซึ่งมีความแตกต่างจากรายงานของโรคนี้ที่เคยมีมาแล้วในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ไข่เป็ดฟักอายุ 10-12 วัน และลูกเป็ดกากีอายุ 2 วัน จากกองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ซึ่งปลอดจากการฉีดวัคซีนและการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบในเป็ด และไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน จากคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอนติซีรั่มของไวรัสตับอักเสบในเป็ดจากประเทศสหรัฐอเมริกา และแอนติซีรั่มไวรัสตับอักเสบในเป็ดที่ผลิตขึ้นใช้ในประเทศโดยใช้ไวรัสสเตรนจากประเทศเนเธอร์แลนด์ (พอ, 2505) และแอนติซีรั่มของไวรัสกาฬโรคเป็ด (อุราศรีและคณะ, 2532)

วัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ด เป็นวัคซีนเชื้อเป็นสเตรน E-52 ของประเทศฝรั่งเศส

การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ฟัก

นำตับของลูกเป็ดที่ป่วยตายมาบดทำเป็น 20% suspension ใน phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นนำไปปั่น 6,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45μ นำมาฉีดเข้า allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก ไข่เป็ดฟัก และ chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่เป็ดฟัก ชนิดละ 7 ฟอง โดยมีกลุ่มควบคุมไม่ฉีดเชื้อชนิดละ 5 ฟอง ตรวจไข่ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เก็บ allantoic fluid และคัพภะที่ตายหลังฉีดเชื้อ 2 วันขึ้นไปนำมาบดรวมกัน ปั่น 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสสำหรับนำไปฉีดไข่ ต่ออีก 2 passages แล้วจึงเก็บเชื้อไวรัสจาก passage ที่ 3 ไว้สำหรับทดสอบต่อไปที่ -70°C

การผ่านเชื้อเข้าลูกเป็ดทดลอง

การทดลองที่ 1 นำตับของลูกเป็ดที่ตายบดทำเป็น 20% suspension และเชื้อไวรัสที่เก็บใน -70°C มาเติม chloroform 10% เพื่อลด chloroform sensitive viruses ซึ่งอาจปะปนมา เช่น กาฬโรคเป็ด โดยผสมให้เข้ากันเป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่น 2,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสใส่จานแก้วแกว่งเบาๆ

เพื่อให้ chloroform ส่วนที่ยังเหลืออยู่ระเหยไป แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45μ นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อลูกเป็ด ตัวละ 0.2 ml อย่างละ 10 ตัว และมีกลุ่มควบคุมไม่ฉีดเชื้อ 10 ตัว

การทดลองที่ 2 ให้วัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ด ฉีดเข้าใต้ผิวหนังลูกเป็ดตัวละ 0.5 ml จำนวน 10 ตัว หลังจากลูกเป็ดได้รับวัคซีน 12 วัน ฉีดเชื้อไวรัสเข้ากล้ามเนื้อตัวละ 0.2 ml ขณะเดียวกันฉีดเชื้อไวรัสให้ลูกเป็ดในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนจำนวน 10 ตัว เช่นเดียวกัน

สังเกตอาการสัตว์ทดลองทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ลูกเป็ดที่ตาย ผ่าซากตรวจวิการ และเก็บตับนำไปแยกเชื้อไวรัส

การผ่านเชื้อเข้า duck embryo liver cell (DEL)

เตรียมเซลล์ DEL จากตับของคัพภะเป็ดอายุ 17 วัน โดยทำให้เซลล์ละเอียดแล้ว trypsinized ด้วย 0.25% trypsin เพาะเซลล์ 5 x 10^5 cell/ml ในน้ำยาเพาะเลี้ยง (MEM, tryptose phosphate broth 10%, $NaHCO_3$ 0.07%, L-glutamine 0.03%, foetal calf serum 10%, penicillin 200 unit/ml และ streptomycim 200 μg/ml) นำเซลล์ไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่ 37°C หลังจากเซลล์ขึ้นเต็มแล้วผ่านเชื้อไวรัสที่เก็บที่ -70°C และจากตับของลูกเป็ดที่ป่วยตายลงในเซลล์เพาะเลี้ยง ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทุกวัน

การพิสูจน์เชื้อโดยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น

นำเชื้อไวรัสที่ได้จากการผ่านไข่ไก่ฟัก 3 passages มาเจือจาง โดยใช้ ten fold dilution จาก 10^{-1} ถึง 10^{-7} นำแต่ละ dilution มาผสม PBS ในปริมาตรเท่ากัน ฉีดเข้า allantoic cavity ของไข่ไก่ dilution ละ 5 ฟอง ขณะเดียวกันแบ่งแต่ละ dilution ของเชื้อไวรัสมาผสมกับแอนติซีรั่มของไวรัสตับอักเสบในเป็ด ในปริมาตรเท่ากัน ใส่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำแต่ละ mixture ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักชุดละ 5 ฟองเช่นกัน ตรวจไข่ฟักทุกวันเป็นเวลา 7 วัน คำนวณหาค่าไตเตอร์ของไวรัสและไวรัสผสมแอนติซีรั่ม ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) เพื่อหาค่าความแตกต่างของไตเตอร์ทั้งสองกลุ่ม (neutralization index, NI)

ในทำนองเดียวกันหาค่า NI ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ กับแอนติซีรั่มของกาฬโรคเป็ด

ผล

การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ฟัก

ผลการฉีดเชื้อเข้าไข่เป็ดฟัก พบว่าเมื่อฉีดเชื้อบน CAM ไข่เป็ดฟัก คัพภะทั้งหมดตายหลังจากฉีดเชื้อ 2 วัน เมื่อฉีดเข้า allantoic cavity คัพภะตาย 3 ฟอง หลังจากฉีดเชื้อ 3-4 วัน คัพภะมีลักษณะ hemorrhage เช่นเดียวกัน

ส่วนไข่ไก่ฟักใน passage แรก คัพภะตาย 5 ฟอง หลังจากฉีดเชื้อ 3-6 วัน โดยมีลักษณะ hemorrhage บวมน้ำ ตับสีเขียวและมีจุดเนื้อตาย ตัวที่รอดตายแคระแกรนมี allantoamniotic fluid และ egg yolk สีเขียว และเมื่อผ่านเชื้อใน passage ที่ 2 พบว่าคัพภะตายทั้งหมด หลังจากฉีดเชื้อ 3 วัน มีลักษณะ hemorrhage และบวมน้ำชัดเจน (รูปที่ 1)

การผ่านเชื้อเข้าลูกเป็ดทดลอง

การทดลองที่ 1 ลูกเป็ดที่ฉีดเชื้อตายอย่างละ 6 ตัว แสดงอาการชัก คอแหงน ขาถีบ และตายหลังฉีดเชื้อ 1-2 วัน มีบางตัวตายท่านอนตะแคง คอแหงน ขาเหยียดไปด้านหลัง เมื่อเปิดซากพบจุดและจ้ำเลือดที่ตับ (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับเป็ดที่ป่วยตายจากท้องที่ ส่วนลูกเป็ดกลุ่มควบคุมไม่ตาย

การทดลองที่ 2 ลูกเป็ดกลุ่มที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ด 12 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัส รอดตายทั้ง 10 ตัว ส่วนลูกเป็ดกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนตาย 8 ตัว หลังจากได้รับเชื้อ 1-3วัน โดยมีวิการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การผ่านเชื้อเข้า duck embryo liver cell (DEL)

พบการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect, CPE) ของเซลล์ที่ผ่านเชื้อที่เตรียมจากไข่ไก่ฟัก ไข่เป็ดฟักและตับของเป็ดป่วยตาย ใน passage แรกหลังจากผ่านเชื้อ 2 วัน โดยเซลล์มีลักษณะโค้งเป็นวงและต่อมาเซลล์เหี่ยวลง

การพิสูจน์โดยวิธีนิวทรัลไลเซชั่น

เชื้อ virus ที่แยกได้เมื่อผสมกับแอนติซีรั่มของไวรัสตับอักเสบในเป็ด และแอนติซีรั่มของกาฬโรคเป็ดมีค่า NI ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Neutralization index ของเชื้อไวรัสที่แยกได้กับแอนติซีรั่มชนิดต่างๆ

Antisera	Virus titer EID_{50}/ml	Virus-serum titer EID_{50}/ml	Neutralization index
1. แอนติซีรั่มตับอักเสบในเป็ด (สหรัฐอเมริกา)	$10^{6.2}$	$10^{2.5}$	3.7
2. แอนติซีรั่มตับอักเสบในเป็ด (เนเธอร์แลนด์)	$10^{6.2}$	$10^{1.7}$	4.5
3. แอนติซีรั่มกาฬโรคเป็ด	$10^{5.8}$	$10^{4.7}$	1.1

วิจารณ์

การแยกเชื้อไวรัสตับอักเสบในเป็ด โดยใช้ไข่ฟักครั้งนี้ใช้ทั้งไข่ไก่ฟัก และไข่เป็ดฟัก แต่ลักษณะวิการที่พบแตกต่างกัน ในไข่ไก่ฟักคัพภะตายภายใน 3-6 วัน โดยมีลักษณะ hemorrhage และบวมน้ำอย่างชัดเจน คัพภะที่ตายระยะหลังหรือไม่ตายมีลักษณะแคระแกร็น allantoamniotic fluid และ egg yolk เป็นสีเขียวและมีจุดเนื้อตายที่ตับเช่นเดียวกับรายงานของปิยะและคณะ (2502) และ Woolcock and Fabricant (1991) ส่วนคัพภะเป็ดตายภายใน 2-4 วัน ซึ่งเร็วกว่าคัพภะไก่แต่ลักษณะวิการพบเฉพาะ hemorrhage ของคัพภะเท่านั้นไม่พบว่าบวมน้ำ เนื่องจากวิการของคัพภะเป็ดไม่มีลักษณะเฉพาะและไข่เป็ดฟักหาได้ยากกว่าไข่ไก่ฟัก ฉะนั้นการแยกเชื้อไวรัสตับอักเสบในเป็ด โดยทั่วไปจึงใช้ไข่ไก่ฟักมากกว่าไข่เป็ดฟัก (Haider, 1980; Toth, 1975)

จากการทดลองใช้เซลล์ DEL ผ่านเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไข่ฟักและจากตับลูกเป็ดตาย จะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใน 2 วัน โดยเซลล์จะโค้งเป็นวง ซึ่งต่อมาจะเหี่ยว แสดงว่า DEL มีความไวต่อเชื้อไวรัสและสามารถใช้แยกเชื้อไวรัสจากท้องที่ได้ดี (Woolcock, 1986) นอกจากนั้น Davis and Woolcock (1986) รายงานว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบในเป็ดนี้ยังสามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด เช่น duck embryo kidney cell, turkey embryo fibroblast cell และ quail embryo fibroblast cell เป็นต้น

เชื้อไวรัสจากตับลูกเป็ดที่ตายและจากที่แยกได้นี้ เมื่อนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อให้ลูกเป็ดอายุ 2 วัน ทำให้ลูกเป็ดตาย 60% หลังจากฉีดเชื้อ 1-2 วันโดยลูกเป็ดตัวแรกตายหลังฉีดเชื้อไม่ถึง 20 ชั่วโมง ลูกเป็ดทดลองที่ตายแสดงอาการป่วย มีวิการที่ตับเป็นจุดและจ้ำเลือดขนาดใหญ่บ้างเล็กบ้างไม่แตกต่างจากเป็ดที่ป่วยตายจากท้องที่ เช่นเดียวกับการทดลองของ Gough and Spackman (1981) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตับอักเสบในเป็ดให้ลูกเป็ดอายุ 2 วันแล้วทำให้ลูกเป็ดตาย 40-60% ซึ่งความรุนแรงของเชื้อไวรัสจะสูงขึ้นเมื่อผ่านเข้าลูกเป็ดจำนวนมากครั้งขึ้น ตามรายงานของ Woolcock (1991) ที่รายงานการตายของลูกเป็ดถึง 100% เมื่อใช้ไวรัสที่ทำให้รุนแรงขึ้นโดยผ่านในลูกเป็ด 33 passages

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการชันสูตรโรคโดยใช้ไข่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยงและฉีดลูกเป็ดทดลองดังกล่าวข้างต้น การฉีดลูกเป็ดทดลองเป็นวิธีที่ดีที่สุดเพราะมีความไวต่อเชื้อไวรัสมากและทำให้เกิดวิการที่ตับ หลังจากฉีดเชื้อเพียง 16 ชั่วโมง (Toth, 1975) แต่โรคไวรัสตับอักเสบในเป็ด มี 3 types ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จากอาการหรือวิการต้องอาศัยทั้งไข่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยง และลูกเป็ดทดลองร่วมกัน (Woolcock, 1989) เชื้อไวรัสที่แยกได้ในการทดลองครั้งนี้สามารถเจริญได้ดีทั้งในไข่ไก่ฟัก ไข่เป็ดฟัก และทำให้ลูกเป็ดทดลองตายภายใน 2 วัน โดยมีวิการที่ตับชัดเจน ตลอดจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับไวรัสตับอักเสบในเป็ด type I (Woolcock, 1989; Woolcock and Fabricant, 1991) ซึ่งต่างจาก type II ที่ type II จะทำให้ไข่เป็ดฟักและไข่ไก่ฟักตายได้ต้องผ่านเชื้อหลาย passages และเชื้อไวรัสไม่สามารถเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งที่เตรียมจากไก่และเป็ด เมื่อฉีดลูกเป็ดทดลองจะตาย 20% ภายใน 2-4 วัน (Gough et al., 1985; Woolcock, 1986) สำหรับ type III ไม่สามารถเจริญในไข่ไก่ฟักได้และทำให้ไข่เป็ดฟักตายไม่แน่นอน เมื่อฉีดลูกเป็ดทดลองจะตายต่ำกว่า 20% ภายใน 2-4 วัน จากการผ่านเชื้อไวรัสลงใน duck embryo kidney cell cultures ใน passage แรกๆ ไม่พบ CPE (Haider and Calnek, 1979)

เมื่อทดลองฉีดเชื้อไวรัสที่แยกได้ให้ลูกเป็ดกลุ่มที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ดมาก่อนแล้ว พบว่าไม่มี

การตายเลย แต่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนตาย 80% แสดงว่าวัคซีนที่ลูกเป็ดได้รับสามารถกระตุ้นให้ลูกเป็ดมีความคุ้มต่อเชื้อไวรัสที่แยกได้ดี การให้ live attenuated vaccine จะทำให้ลูกเป็ดมีความต้านทานโรคได้ดีหลังได้รับวัคซีน 2 วันขึ้นไป (Asplin, 1958; Hwang, 1974; Crighton and Woolcock, 1978) ดังนั้นการฉีดวัคซีนให้แก่ลูกเป็ดรอบๆ บริเวณที่มีการระบาดของโรคจะช่วยป้องกันการเกิดโรคได้ดี และควรพิจารณาให้วัคซีนพ่อแม่พันธุ์เพื่อให้ถ่ายทอดภูมิคุ้มกันมายังลูกด้วย พ่อแม่พันธุ์ที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบในเป็ดชนิดเชื้อเป็นจะถ่ายทอดภูมิคุ้มกันมายังลูกทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสจนถึงอายุ 3 สัปดาห์ (Gough and Spackman, 1981) หลังจากนั้นลูกเป็ดมีอายุมากขึ้นจะมีความต้านทานต่อเชื้อได้ตามธรรมชาติ

จากการพิสูจน์เชื้อโดยวิธีนิวทราลไลเซชั่นของเชื้อไวรัสที่แยกได้กับแอนติซีรั่มของไวรัสตับอักเสบในเป็ดทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีค่า NI เท่ากับ 3.7 และ 4.5 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้นี้เป็นไวรัสตับอักเสบในเป็ด และมี antigenicity ไม่แตกต่างจากสเตรนของสหรัฐอเมริกาและเนเธอร์แลนด์ แต่จากการทดลองของ พอ (2505) พบว่าแอนติซีรั่มที่เตรียมจากไวรัสตับอักเสบในเป็ด ไม่สามารถนิวทราลไลซ์เชื้อไวรัสสเตรนของเนเธอร์แลนด์ได้ ดังนั้น เชื้อไวรัสนที่แยกได้ในครั้งนี้จึงน่าจะมีความแตกต่างทาง antigenicity กับเชื้อไวรัสที่แยกได้โดยปิยะและคณะ (2502)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์บางปะกง กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่เอื้อเฟื้อไข่เป็ด และลูกเป็ดทดลอง สพ.ญ.ทาริกา ประมูลสินทรัพย์ ที่ช่วยดูแลสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ปิยะ ชัยสิทธิยุทธการ, ประเสริฐ วิมลสุต, และเจริญ แก้วทับ 2502 โรคระบาดของลูกเป็ดที่พบใหม่ สัตวแพทยสาร 10 (2) : 52-61.

พอ จินดาวณิค 2505 การศึกษาทดลองเกี่ยวกับโรคตับอักเสบติดต่อของลูกเป็ด, สัตวแพทยสาร 13 (2) : 23-32.

วรปี สุวัฒนวิโรจน์, นฤมล ชัยมงคล, จำเรียง อรวรรณนุกูล, นิตยา ดิลกเกียรติ, และ รุ่งนภา รัตนราชชาติสกุล 2533 แนวโน้มการเป็นโรคติดเชื้อของเป็ดและห่าน 2525-2531 ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 9 กรมปศุสัตว์ หน้า 305-311.

อุราศรี ตันตสวัสดิ์, ม.ร.ว.อำนวยพร เกษมสันต์, อารุณี ชัยสิงห์, พรทิพย์ ศิริวรรณ์, สุจิรา ปาจริยานนท์ 2532 การเตรียมฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีคอนจูเกตสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคกาฬโรคเป็ด สัตวแพทยสาร 40 (3-4) ; 79-83.

Asplin, F.D. 1958. An attenuated strain of duck hepatitis virus. Vet. Rec. 70 : 1226-1230.

Crighton, G.W. and Woolcock, P.R. 1978. Active immunisation of ducklings against duck virus hepatitis. Vet. Rec. 102 : 358-361.

Davis, D. and Woolcock, P.R. 1986. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species. Res. Vet. Sci. 41 : 133-134.

Gough, R.E. 1986. Duck hepatitis type 2 associated with an astrovirus. In Acute Virus Infections of Poultry. J.B. Mcferran and M.S. McNulty (eds.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, Neth. p. 223-230.

Gough, R.E., Borland, E.D., Keymer, I.F. and Stuart, J.C. 1985. An Outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. Avian Pathol. 14 : 227-236.

Gough, R.E. and Spackman, D. 1981. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks. Avian Pathol. 10 : 471-479.

Guo. Y.P. and Pan, W.S. 1984. Preliminary identification of the duck hepatitis virus serotypes isolated in Beijing, China. Chin. J. Vet. Med. 10 : 2-3. (Abstrs Vet. Bull. 1986 : 378).

Haider, S.A. 1980. Duck virus hepatitis. In : Isolation and Identification of Avian Pathogens, 2nd Edition. S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase, and J.E. Williams (eds.), Am. Assoc. Avian Pathol; Kennett Square, PA. p. 75-76.

Haider, S.A. and Calnek, B.W. 1979. In vitro isolation, propagation, and characterization of duck hepatitis virus type III. Avian Dis. 23 : 715-729.

Hwang, J. 1974. Susceptibility of poultry to duck hepatitis viral infection. Am. J. Vet. Res. 35 : 477-479.

Levine, P.P. and Fabricant, J. 1950. A hitherto undescribed virus disease of ducks in North America. Cornell Vet. 40 : 71-86.

Park, N.Y. 1985. Occurence of duck virus hepatitis in Korea. Korean J. Vet. Res. 25 : 171-174.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27 : 493-497.

Toth, T.E. 1969. Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. Avian Dis. 13 : 834-846.

Toth, T.E. 1975. Duck virus hepatitis. In Isolation and Identification of Avian Pathogens. S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase, and J.E. Williams (eds.), Am. Assoc. Avian Pathol; College Station, TX.p. 192-196.

Woolcock, P.R. 1986. An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. Avian Pathol. 15 : 75-82.

Woolcock, P.R. 1989. Duck virus hepatitis. In : Recommended diagnostic techniques and requirements for biological products. Volume I. p. 1/8-7/8.

Woolcock, P.R. 1991. Duck hepatitis virus type I : studies with inactivated vaccines in breeder ducks. Avian Pathol. 20 : 509-522.

Woolcock, P.R. and Fabricant, J. 1991. Duck virus hepatitis. In : Disease of Poultry, 9th edition. B.W. Calnek et al. (eds.), Iowa State University Press, Ames, Iowa. p. 192-196.

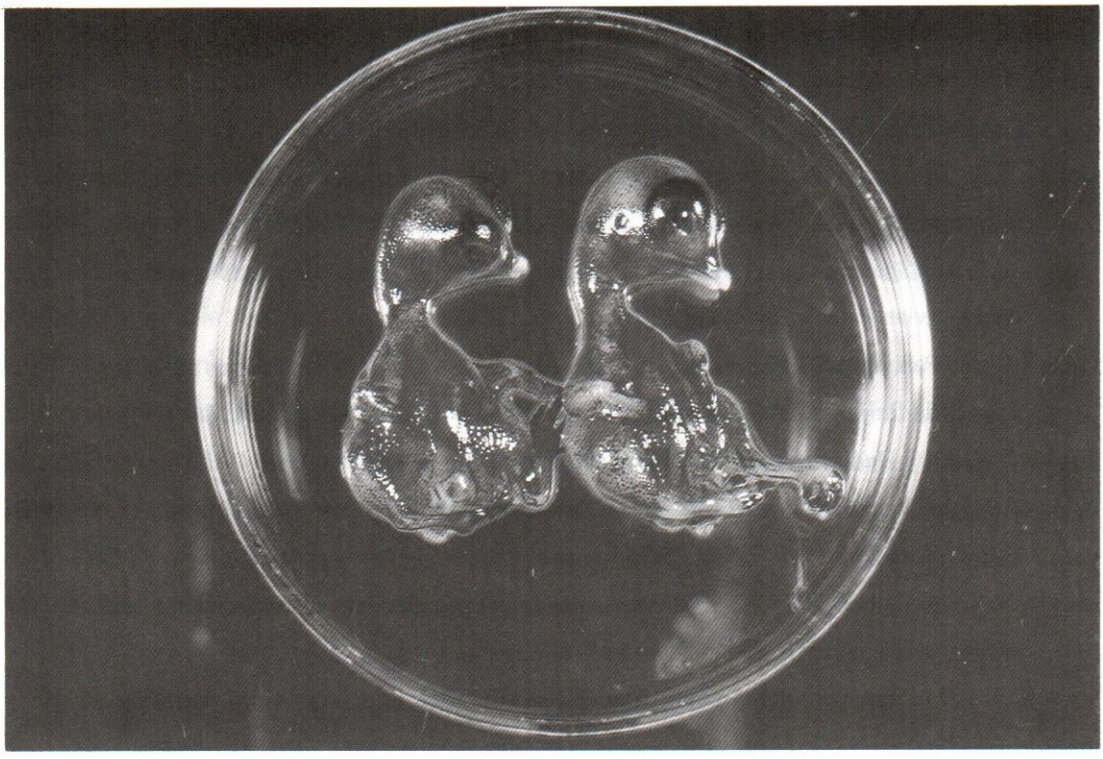


Fig. 1 Infected chick embryos showing hemorrhage and oedema

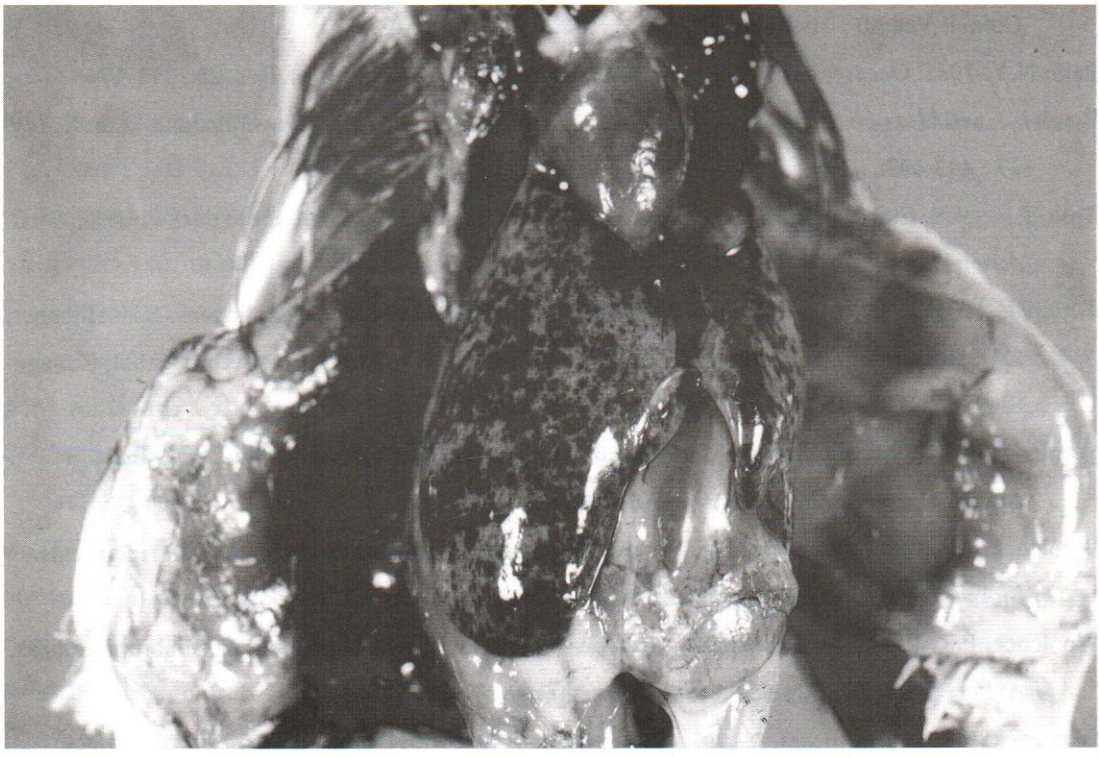


Fig. 2 Liver of experimental duckling with hemorrhagic lesions

Isolation and Identification of Duck Hepatitis Virus in Ducklings

Phontip Sirivan Urasri Tantaswasdi Surasak Chuenchai

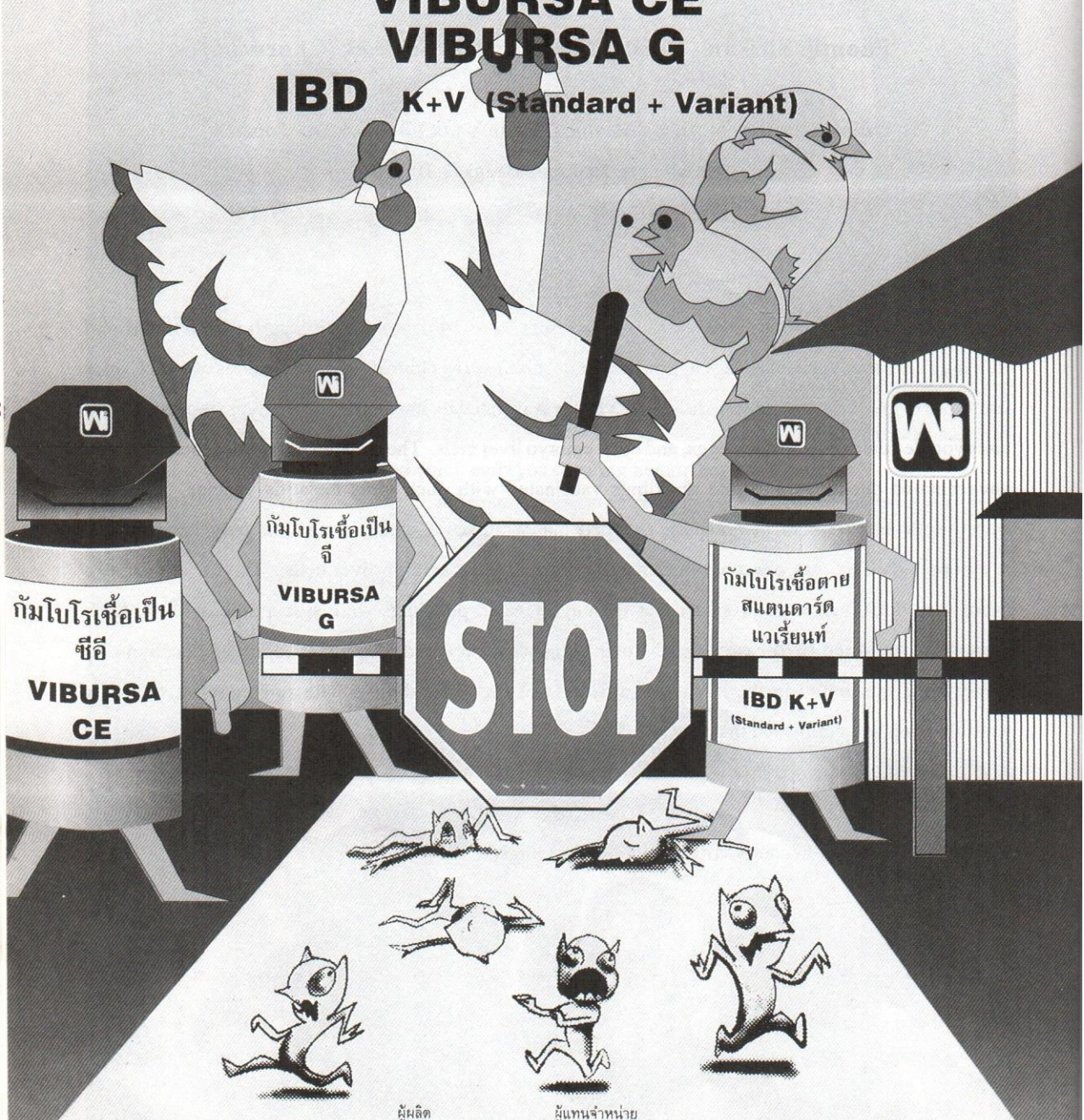
National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development,
Kasetklang, Jatuchak, Bangkok 10900.

Duck hepatitis virus (DHV) was isolated from 9- to 14-day-old ducklings from Chonburi and Rayong Provinces. The ducklings had an acute fatal disease, the clinical signs and lesions of which were similar to those of duck virus hepatitis. The virus was isolated by inoculating 20% liver suspension into embryonated chicken and duck eggs, and duck embryo liver cells. The isolated virus was inoculated into unvaccinated ducklings and into ducklings vaccinated with duck virus hepatitis vaccine. Chicken embryos developed both hemorrhage and oedema, while duck embryos showed only hemorrhage. A cytopathic effect was observed in primary culture of duck embryo liver cells. The experimentally vaccinated ducklings were protected but the unvaccinated ducklings were susceptible, with 60-80% mortality. As in the field cases, opisthotonic signs were observed, death was rapid, and ecchymotic hemorrhage was found in the liver. Identification of the isolated virus with reference antisera in a neutralization test confirmed that it was DHV.

Key words : Duck hepatitis virus, isolation, ducklings.

ผู้พิชิต กัมโบโร ตระกูลเวลโนว์น

VIBURSA CE
VIBURSA G
IBD K+V (Standard + Variant)



ผู้ผลิต

VINELAND®

บริษัท ไวน์แลนด์ ลาบอราทอรีส์ สหรัฐอเมริกา

ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท เวลโนว์น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

89/425 หมู่บ้านกรีนเลค หมู่ 2 ถ.บางนา-ตราด กม. 13
ต.ราชาเทวะ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540
โทร. 316-2265, 316-4854, 316-2158 FAX : 316-4377