การป้องกันโรคจากเชื้อพาสเตอเรลลา มัลโตซิดาในหนูขาว โดยอิมมูนกลอบูลิน

PASSIVE IMMUNITY STUDY OF IMMUNOGLOBULINS AGAINST DUCK STRAIN OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* IN MICE

วิมลมาศ ลิปีพันธ์* สันติ ถุงสุวรรณ* เกรียงศักดิ์ สายธนู**

Vimolmas Lipipun Santi Thoongsuwan Kriengsag Saitanu

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กท. 10500

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok Metropolis 10500

**หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กท. 10500

Microbiological Division, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok Metropolis 10500

Abstract

In mouse passive protection test, two immunoglobulins prepared from formal inised whole cell vaccine and capsular polysaccharide of *Pasteurella multocida* were used. Anti-whole cell globulin 9.1 milligram gave 100% protection when challenge after immunoglobulin injection 72 hours and gave significantly protection when challenge after immunoglobulin injection 240 hours but this amount of anti-whole cell globulin could not protect mice which had been infected with *P. multocida* 5 hours before. Anti-capsular polysaccharide globulin 29.6 milligram gave 50% protection when challenge after 72 hours.

บทคัดย่อ

จากการทดสอบการป้องกันโรคในหนูขาว (mice) โดยใช้อิมมูนกลอบูลิน ซึ่งเตรียมจากวัคซีนสองชนิด คือ วัคซีนเชื้อตาย (formalinized whole cell vaccine) และวัคซีนแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Pasteurella multocida* ปรากฏว่าอิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายจำนวน 9.1 มิลลิกรัม สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ 100% เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 72 ชั่วโมง และให้ผลป้องกันโรคอย่างมีนัยสำคัญ (ระดับความเชื่อมั่น 95%) เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 240 ชั่วโมง แต่อิมมูนกลอบูลินจำนวนนี้ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคเมื่อหนูขาวได้รับเชื้อก่อนได้รับอิมมูนกลอบูลิน 5 ชั่วโมง ส่วนอิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนแคปซูลโพลีแซคคาไรด์จำนวน 29.6 มิลลิกรัม ให้ผลป้องกันการเกิดโรคได้เพียง 50% เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 72 ชั่วโมง

บทนำ

โรคอหิวาต์ในสัตว์ปีก (fowl cholera) มีสาเหตุจากเชื้อ *Pasteurella multocida* เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะด้านปศุสัตว์ เนื่องจากโรคนี้ได้ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงเป็ดในประเทศอย่างมหาศาล สัตว์ที่เป็นโรคนี้แบบเฉียบพลันจะมีอัตราการตายสูงมาก และทำให้เกิดการระบาดของโรค ซึ่งการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมักได้ผลค่อนข้างต่ำโดยเข้าใจว่าเชื้อสามารถต้านยาได้ วิธีการที่จะควบคุมการระบาดของโรคได้คือ การให้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพโดยวิธี active immunization หรือ passive immunization กรมปศุสัตว์โดยกองผลิตชีวภัณฑ์ได้ผลิตวัคซีนที่ใช้ป้องกันโรคอหิวาต์เป็ด ไก่ เพื่อใช้ในการป้องกันโรค โดยฉีดวคซีนนี้ทุก 3 เดือน ในขนาดตัวละ 2 ซีซี.

จากผลการวิจัยของ Penn and Nagy (1974) พบว่า การให้ active immunization โดยฉีดเชื้อ *P. multocida* เข้าในหนูขาวจะให้ผลภูมิคุ้มกันไม่ดี ดังนั้นการทำ active immunization ครั้งแรกจึงทำในกระต่าย และมีรายงานว่า killed fowl cholera vaccine สามารถกระตุ้นและสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน 1 ปี จากการทดลองในไก่ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถป้องกันการระบาดของโรค acute fowl cholera ได้ (Heddleston, 1962.)

จากผลการวิจัยของ Vimolmas et al (1982) ซึ่งได้รายงานไว้เมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อวัคซีนเชื้อตายโดยทำลายเชื้อด้วยฟอร์มาลีน และวัคซีนแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *P. multocida* โดยการตรวจหาระดับแอนติบอดีจากซีรัมด้วยวิธี agglutination และวิธี indirect hemagglutination ตามลำดับ อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายให้การป้องกันโรคในหนูขาวได้ดีกว่าอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *P. multocida* เมื่อฉีดเชื้อตาย (ในปริมาณ 30 เท่าของปริมาณเชื้อที่ทำให้หนูขาวตาย 50%) หลังจากฉีดอิมมูนกลอบูลิน 24 ชั่วโมง

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการป้องกันโรคในหนูขาว โดยใช้อิมมูนกลอบูลินที่เตรียมจากเซลล์เนื้อตายและแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ของ *P. multocida* โดยที่หนูขาวได้รับเชื้อก่อนและหลังการให้อิมมูนกลอบูลิน เชื้อที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเชื้อไลโอฟีไลส์ของ *P. multocida* สายพันธุ์ที่แยกได้จากการระบาดของโรคอหิวาต์ในเป็ดที่จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2523 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัสดุและวิธีการ

เชื้อ *P. multocida* เป็นเชื้อไลโอฟีไลส์ สายพันธุ์ที่แยกได้จากการระบาดของโรคอหิวาต์ในเป็ดที่จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2523

สัตว์ทดลอง หนูขาว เพศเมีย น้ำหนักตัวละ 20 กรัม

อิมมูนกลอบูลินจากซีรัมกระต่ายต่อวัคซีนเชื้อตายของเชื้อ *P. multocida* (agglutination titer = 1,600) และอิมมูนกลอบูลินจากซีรัมกระต่ายต่อวัคซีนที่เตรียมจากแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *P. multocida* (indirect hemagglutination titer = 6,400) (Vimolmas et al, 1982)

หาปริมาณ LD_{50} (50% Lethal Dose) ของเชื้อ *P. multocida* ในหนูขาว (Vimolmas et al, 1982; Merchant and Packer, 1971)

เพาะเชื้อ *P. multocida* บน blood tryptose agar และบ่มเชื้อที่ 37° ซ. 24 ชั่วโมง ล้างเชื้อออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำเกลือ (0.9%) ทีปราศจากเชื้อ ทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ (0.9%) ให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นจะมีจำนวนเซลล์ต่างกัน

2 เท่า และนำแต่ละความเข้มข้นของเชื้อมานับปริมาณเชื้อที่มีชีวิต (viable count) โดยวิธี pour plate โดยเพาะเชื้อใน tryptose agar Suspension ของแบคทีเรียที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น 2.5 x 32, 2.5 x 16, 2.5 x 8, 2.5 x 4 และ 2.5 x 2 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ และใช้ 0.4 มิลลิลิตร ของเชื้อแต่ละความเข้มข้นฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) หนูขาวกลุ่มละ 10 ตัว และนับจำนวนหนูตายหลังจากฉีดเชื้อ 72 ชั่วโมง คำนวณหาปริมาณ LD_{50} โดยวิธีของ Litchfield *et al* (1949)

การป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินในหนูขาว (Vimolmas et al, 1982; Carpenter, 1975; Merchant and Packer, 1971)

ใช้อิมมูนกลอบูลินจากซีรัมกระต่ายต่อวัคซีนเชื้อตาย ปริมาณ 9.1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ในหนูขาวจำนวน 80 ตัว และใช้เชื้อในปริมาณ 30 LD_{50} ฉีดเข้าช่องท้องในหนูขาวกลุ่มละ 20 ตัว หลังจากฉีดอิมมูนกลอบูลินแล้ว 72, 120, 168 และ 240 ชั่วโมงตามลำดับ ทำกลุ่ม control ในหนูขาว 20 ตัว โดยฉีดน้ำเกลือ (0.9%) แทนอิมมูนกลอบูลิน และฉีดเชื้อเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น และนับจำนวนหนูตายหลังจากฉีดเชื้อ 72 ชั่วโมง

ใช้อิมมูนกลอบูลินจากซีรัมกระต่ายต่อวัคซีนที่เตรียมจากแคปซูลแอนติเจนปริมาณ 29.6 มิลลิกรัม ทำเช่นเดียวกันกับข้างบน

ใช้เชื้อประมาณ 30 LD_{50} ฉีดเข้าช่องท้องหนูขาวจำนวน 40 ตัว หลังจากนั้น 5 ชั่วโมง ใช้อิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนเชื้อตายฉีดเข้าใต้ผิวหนังในหนูขาว 20 ตัว ๆ ละ 9.1 มิลลิกรัม และฉีดเข้าช่องท้องในหนูขาวอีก 20 ตัว นับจำนวนหนูขาวที่ตายหลังจากฉีดอิมมูนกลอบูลิน 72 ชั่วโมง ทำกลุ่ม control ในหนูขาว 20 ตัว โดยฉีดน้ำเกลือ (0.9%) แทนการฉีดอิมมูนกลอบูลิน

ผลการทดลอง

ผลการหาปริมาณ LD_{50} (50% Lethal Dose) ของเชื้อ *P. multocida* ในหนูขาว

หาปริมาณ LD_{50} โดยวิธีของ Litchfield et al (1949) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 LD_{50} ของเชื้อ *P. multocida* เท่ากับ 6 เซลล์ (ช่วงเชื่อมั่น 95% ของค่า LD_{50} คือ 4–9 เซลล์)

ตารางที่ 1 ค่า LD_{50} ต่อหนูขาว 1 ตัว ของเชื้อ *P. multocida*

Suspension เชื้อ *P. multocida* เซลล์/มิลลิลิตร	จำนวนหนูขาว		
	ทั้งหมด	ที่ตาย	ที่รอดชีวิต
2.5 × 2	10	0	10
2.5 × 4	10	4	6
2.5 × 8	10	8	2
2.5 × 16	10	8	2
2.5 × 32	10	10	0

LD_{50} = 6 เซลล์ (4–9 เซลล์)

ผลการป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินในหนูขาว

ผลการป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนเชื้อตาย และอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ในหนูขาว แสดงในตารางที่ 2 และตารางที่ 3 ตามลำดับ ส่วนผลการป้องกันของอิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนเชื้อตายในหนูขาว เมื่อหนูขาวได้รับเชื้อก่อนการฉีดอิมมูนกลอบูลิน แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 ผลการป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนเชื้อตาย

จำนวนชั่วโมงที่ฉีดเชื้อหลังจากฉีดอิมมูนกลอบูลิน	จำนวนหนูขาวในกลุ่มทดลอง		จำนวนหนูขาวในกลุ่ม control		P*
	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	
72	20	20	20	0	<0.05
120	20	16	20	0	<0.05
168	20	16	20	0	<0.05
240	20	8	20	0	<0.05

* Chi – square test

ตารางที่ 3 ผลการป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์

จำนวนชั่วโมงที่ฉีดเชื้อหลังจากฉีดอิมมูนกลอบูลิน	จำนวนหนูขาวในกลุ่มทดลอง		จำนวนหนูขาวในกลุ่ม control		P*
	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	
72	20	10	20	0	<0.05
120	20	0	20	0	
168	20	0	20	0	
240	20	0	20	0	

*Chi – square test

ตารางที่ 4 ผลการป้องกันโรคของอิมมูนกลอบูลินต่อวัคซีนเชื้อตายเมื่อหนูขาวได้รับเชื้อก่อนการฉีดอิมมูนกลอบูลิน 5 ชั่วโมง

Route ที่ฉีดอิมมูนกลอบูลิน	จำนวนหนูขาวในกลุ่มทดลอง		จำนวนหนูขาวในกลุ่ม control		P*
	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	ทั้งหมด	ที่รอดชีวิต	
ฉีดเข้าช่องท้อง	20	2	20	0	>0.05
ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	20	0	20	0	

*Chi – square test

บทวิจารณ์

จากการวิจัยของ Vimolmas et al (1982) พบว่า อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายปริมาณ 9.1 มิลลิกรัม ต่อหนูขาว 1 ตัว ให้ผลป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อ *P. multocida* ในหนูขาวได้ 100% ขณะที่อิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 14.8 มิลลิกรัม ต่อหนูขาว 1 ตัว ให้ผลป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อ *P. multocida* ในหนูขาวได้เพียง 25% ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องมาจากงานวิจัยดังกล่าว เพื่อศึกษาการนำอิมมูนกลอบูลินมาใช้ในการ

ป้องกันการเกิดโรคในหนูขาว โดยฉีดอิมมูนกลอบูลินในหนูขาวก่อน และฉีดเชื้อตามในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน และศึกษาการป้องกันโรคโดยใช้อิมมูนกลอบูลินเมื่อหนูขาวได้รับเชื้อก่อน

ในการทดสอบผลการป้องกันโรคจากเชื้อ *P. mnltocida* โดยใช้อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายจำนวน 9.1 มิลลิกรัม ซึ่งให้ผลป้องกันโรคในหนูขาวได้ 100% ในการวิจัยไม่ได้ทดลองหาปริมาณที่น้อยกว่า 9.1 มิลลิกรัม ที่ยังคงให้ผลป้องกันโรคในหนูขาวได้ 100% เนื่องจากมีปริมาณอิมมูนกลอบูลินจำนวนจำกัด ส่วนอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ไม่สามารถใช้ในปริมาณที่มากกว่า 29.6 มิลลิกรัมได้ เพราะว่าทำให้ปริมาตรของอิมมูนกลอบูลินมากกว่า 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้เกิดเนื้อตายที่บริเวณที่ฉีด และอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 29.6 มิลลิกรัม ให้ผลป้องกันโรคได้ 50% ภายใน 72 ชั่วโมง

การใช้อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายฉีดให้กับหนูขาวก่อนที่หนูขาวจะได้รับเชื้อ 72, 168 และ 240 ชั่วโมง ให้ผลป้องกันโรคได้ 100%, 80% และ 40% ตามลำดับ แสดงว่าในช่วงที่มีการระบาดของโรคอาจจะใช้อิมมูนกลอบูลินในการป้องกันโรคซึ่งได้ผล 80% ในช่วง 168 ชั่วโมง หลังจากให้อิมมูนกลอบูลิน ซึ่งช่วงนั้นการให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกัน (active immunization) โดยฉีดวัคซีนอาจให้ผลไม่ได้ทันท่วงที และเมื่อหนูขาวได้รับเชื้อ *P. multocida* ก่อน 5 ชั่วโมง พบว่าอิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อทั้งที่ให้โดยฉีดเข้าช่องท้องและฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ไม่สามารถให้ภูมิคุ้มกันในหนูขาวได้ ดังนั้น เมื่อมีการระบาดรุนแรงของโรค ควรรีบให้อิมมูนกลอบูลินก่อนที่สัตว์จะได้มีการติดเชื้อ

จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคในหนูขาวได้นานกว่าอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ โดยที่อิมมูนกลอบูลินทั้งสองชนิดเป็นอิมมูนกลอบูลินที่เตรียมจากกระต่าย และนำมาฉีดให้กับหนูขาว เพราะฉะนั้น อัตราการดูดซึม (absorption) การกระจาย (distribution) และการขับถ่าย (excretion) ของอิมมูนกลอบูลินทั้งสองชนิดในหนูขาวควรจะเหมือนกัน จากผลการวิจัยที่พบว่าอิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตาย ให้ผลป้องกันการเกิดโรคในหนูขาวได้ดีกว่าอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ ชี้ให้เห็นว่า คุณภาพของวัคซีนที่นำมาใช้ immunize กระต่ายให้สร้างแอนติบอดีจะมีผลต่ออิมมูนกลอบูลินที่นำมาใช้ใน mouse passive protection

สรุป

ผลการป้องกันโรคในหนูขาวโดยใช้อิมมูนกลอบูลินสองชนิด ปรากฏว่า อิมมูนกลอบูลินต่อเซลล์เชื้อตายปริมาณ 9.1 มิลลิกรัม สามารถป้องกันการเกิดโรคในหนูขาวได้ 100% เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 72 ชั่วโมง และให้ผลป้องกันโรคในหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญ (ระดับความเชื่อมั่น 95%) เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 240 ชั่วโมง และไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้เมื่อหนูขาวได้รับเชื้อก่อนได้รับอิมมูนกลอบูลิน 5 ชั่วโมง ส่วนอิมมูนกลอบูลินต่อแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 29.6 มิลลิกรัม ให้ผลป้องกันโรค 50% เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อ 72 ชั่วโมง และไม่สามารถป้องกันโรคได้เมื่อหนูขาวได้รับอิมมูนกลอบูลินก่อนได้รับเชื้อมากกว่า 120 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

Carpenter, P.L. 1975. Immunology and Serology. 3rd ed. Philadelphia, London and Toronto, W.B. Saunders Co.

Heddleston, K.L. 1962. Studies on Pasteurellosis. V. Two Immunogenic Types of *Pasteurella multocida* Associated with Fowl Cholera. Avian Dis. 6 : 315–321

Litchfield, J.T., Jr. and Wilcoxon, F. 1949. A Simplified Method of Evaluating Dose–Effect experiment. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99–113

Merchant, I.A. and Packer, R.A. 1971. Veterinary Bacteriology and Virology 7th ed. Iowa, Iowa State University Press.

Penn, C.W. and Nagy, L.K. 1974. Capsular and Somatic Antigens of *Pasteurella multocida*, Type B and E. Res. Vet. Sci. 16 : 251–259

Vimolmas Lipipun, Santi Thoongsuwan, Kriengsag Saitanu. 1982. The potency test of *Pasteurella multocida* vaccine and immunoglobulins. (เวชชสารสัตวแพทย์–กำลังพิจารณา)