การทดลองประสิทธิภาพของเชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายผ่านไข่ในกระบือและสุกร*

Inoculation Experiments with LA Strain of Rinderpest Virus in Thai Buffaloes and in Thai Pigs

ครั้งที่ ๑

ในสมัยก่อน วัคซีนที่ใช้ฉีดป้องกันโรครินเดอร์เปสต์ให้แก่สัตว์เป็นวัคซีนจำพวกเชื้อตาย (Inactivated vaccine) ซึ่งผลิตได้โดยเอากระบือมาฉีดด้วยเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค เมื่อสัตว์เป็นโรคถึงขั้นที่เชื้อไวรัสมากพอที่จะใช้ทำเป็นวัคซีนได้ก็ฆ่าเก็บม้าม และต่อน้ำเหลืองต่าง ๆ เอาไปบดให้ละเอียด แล้วผสมกับสารเคมีบางอย่าง เพื่อฆ่าเชื้อไวรัสและช่วยเก็บรักษาไวรัสไม่ให้เสื่อมคุณลักษณะของการสร้างความคุ้มโรคในร่างกาย ในเมื่อฉีดเป็นวัคซีนเข้าไป การทำวัคซีนชนิดนี้ค่อนข้างยุ่งยากมาก ทั้งนี้เพราะจากกระบือตัวหนึ่งสามารถที่จะทำวัคซีนเอาไปฉีดสัตว์อื่นได้ประมาณ ๑๐๐ ตัวเท่านั้น นอกจากนี้ความคุ้มโรคในร่างกายสัตว์หลังจากได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว ก็มีไม่นาน นักทำให้ต้องฉีดซ้ำอยู่เรื่อย ไม่สะดวกแก่การปฏิบัติงาน

เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๙๑ องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ ได้เอื้อเฟื้อจัดส่งผู้เชี่ยวชาญ พร้อมด้วยเชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายที่อ่อนตัวแล้ว (Lapinized Rinderpest virus) มาให้ทำการทดลองจนเป็นผลสำเร็จ ใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรครินเดอร์เปสต์ให้แก่โคและกระบือได้ดีตลอดมา สำหรับสุกรวัคซีนชนิดนี้ยังมีความแรงมากอยู่ เมื่อฉีดเข้าไปจะทำให้เกิดปฏิกริยาขึ้นรุนแรงจนอาจทำให้

---

* การทดลองครั้งนี้ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่กองวิชาการและกองวัคซีนเขรุ่มปากช่อง กรมปศุสัตว์ ปี พ.ศ. ๒๕๐๑ บ.ก.

สุกรถึงตายได้ ฉะนั้นวัคซีนชนิดนี้จึงยังไม่สามารถจะใช้ในสุกรได้ โดยความรู้ที่ได้รับจากปฏิกริยาของวัคซีนรินเดอร์เปสต์ ชนิด ผ่านกระต่ายในสุกรนี้เอง เมื่อทางราชการได้จ้าง Dr. J.R.Hudson ผู้เชี่ยวชาญ จากประเทศอังกฤษมาทำการทดลองค้นคว้า เรื่องวัคซีนรินเดอร์เปสต์ที่ปากช่อง จึงสามารถผลิตวัคซีนรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายผ่านสุกรขึ้น (Lapinized ex pig vaccine) และใช้เป็นผลสำเร็จในโคและกระบือ ทำให้การปราบโรครินเดอร์เปสต์ สะดวกรวดเร็วขึ้น จนสงบลงระยะหนึ่ง อย่างไรก็ดี วัคซีนชนิดกระต่ายผ่านสุกรนี้ก็ยังไม่สามารถจะใช้ฉีดในสุกรของเราได้อยู่นั่นเอง

ต่อมาได้มีรายงานในนิตยสารวิทยาศาสตร์จากต่างประเทศว่า Dr. Junji Nakamura แห่งประเทศญี่ปุ่น ได้ทำการทดลองค้นคว้าผ่านเชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายเข้าในไข่ไก่ฟักอ็กทอดหนึ่ง (Lapinized Avianized Rinderpest virus) เพื่อให้เชื้ออ่อนตัวลงยิ่งขึ้นได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถนำเชื้อไวรัสที่เจริญเติบโตในไข่ไก่นั้นไปใช้เป็นวัคซีนสำหรับฉีดสร้างความคุ้มโรคในโคญี่ปุ่นและโคเกาหลี (Japanese and Korean cattle) ได้โดยไม่แสดงปฏิกริยารุนแรงแต่อย่างใด เหมือนเมื่อฉีดด้วยวัคซีนที่ทำจากเชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดผ่านกระต่าย จากรายงานนี้เองและจากผลของงานทดลองที่แล้ว ๆ มาของเราเอง ทำให้เห็นได้ง่าย ๆ ว่า โคญี่ปุ่นเองก็ดี โคเกาหลีก็ดี และสุกรของเราก็ดี ต่างก็มีความแพ้ (Susceptibility) โรครินเดอร์เปสต์มากอยู่ในระดับพอ ๆ กัน จนแม้แต่เมื่อได้รับการฉีดเชื้อรินเดอร์เปสต์ ชนิด ผ่าน กระต่าย ที่ อ่อนตัวแล้ว ต่างก็จะแสดงปฏิกริยารุนแรงมากจนถึงตายด้วยทั้งสิ้น แต่ในเวลาเดียวกันโคญี่ปุ่นและโคเกาหลี สามารถรับ การ ฉีดเชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายผ่านไข่ซึ่งอ่อนตัวลงยิ่งขึ้นได้เป็นอย่างดี โดยไม่แสดงปฏิกริยารุนแรงแต่อย่างใด ฉะนั้นสุกรของเราก็น่าจะสามารถรับการฉีดวัคซีนนี้ได้เช่นเดียวกัน ด้วยความคาดหวังดังกล่าวนี้เอง กรมปศุสัตว์จึงได้ติดต่อกับ Dr. Junji Nakamura เพื่อขอให้ส่งเจ้าหน้าที่เทคนิคผู้เชี่ยวชาญมาช่วยดำเนินการทดลองวัคซีนรินเดอร์เปสต์ชนิดระต่ายผ่านไข่ในสุกรและโคกระบือของเรา และในเวลาเดียวกันเพื่อร่วมมือ กับ เจ้าหน้าที่ของ เรา ในการ ศึกษาค้นคว้าทางวิชาการเกี่ยวกับสภาพการต่าง ๆ ของโครินเดอร์เปสต์ อาทิ เช่น การแพ้โรค

(Susceptibility) และการต้านทานโรค (Resistibility) ในสัตว์ที่ติดโรคแต่ละชนิดของเรา และประการสุดท้าย เพื่อ ปรับปรุง วิธีการ ผลิตวัคซีนและเทคนิคของการปฏิบัติการต่าง ๆ ทางเซรัมวิทยาให้เหมาะสมยิ่งขึ้น เพื่อสนองเจตนารมย์ ดังกล่าวแล้ว Dr. Junji Nakamura จึงได้ส่ง Dr. Shigeru Kishi ซึ่งเป็นผู้ช่วยของเขาและเป็นผู้ที่เชี่ยวชาญทางรินเดอร์เปสต์ผู้หนึ่งให้ มาช่วย ดำเนินงาน การ ทดลองดังกล่าว ร่วมกับเจ้าหน้าที่ของเราที่สถานวิทยาศาสตร์ปากช่องตั้งแต่วันที่ ๑๗ เมษายน ๒๕๐๑ เป็นต้นมา

ความมุ่งหมายของการทดลอง

ความมุ่งหมาย ของการทดลอง กล่าวโดยสรุปแบ่งออกได้เป็น ๒ ประการคือ

๑. เพื่อ ทดลอง ประสิทธิภาพ ของ เชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดกระต่ายผ่านไข่ (Lapinized Avianized Rinderpest virus) ดูว่าสามารถจะใช้ เป็น วัคซีน ฉีด สร้างความคุ้มโรคในสุกรและกระบือได้ดีหรือไม่

๒. เพื่อศึกษาความรู้ในแง่ต่าง ๆ ของโรครินเดอร์เปสต์ใน สัตว์ ที่ติดโรค แต่ ละชนิด และ เพื่อทดลองปรับปรุงเทคนิค วิธีปฏิบัติ การต่าง ๆ ทางเซรัมวิทยาให้ดียิ่งขึ้น

ผู้ดำเนินงาน

๑.	DR. SHIGERU KISHI	ผู้เชี่ยวชาญ
๒.	อาจิต โชติเสน	สพ.บ. M.S., Ph. D.
๓.	วิศิษฐ์ คงรอด	สพ.บ.
๔.	พอ จินดาวณิค	สพ.บ.
๕.	ประสิทธิ์ ชนารักษ์	สพ.บ.
๖.	พินิจ ศุภวิไล	สพ.บ.

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ในการทดลองประสิทธิภาพของเชื้อ LA virus โดยการฉีดเข้าสุกรและกระบือคราวนั้น เพื่อให้สามารถสรุปผลของทดลองในขั้นสุดท้ายได้ถูกต้องแน่นอนขึ้น และในเวลาเดียวกันเพื่อเป็นการทดสอบดูว่าเครื่องอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีดขึ้นนี้เท่าที่เรามีอยู่แล้วจะสามารถใช้ได้ดีเพียงพอหรือไม่ จึงได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองครั้งด้วยกัน คือ

การทดลองครั้งที่หนึ่ง คือครั้งนี้เป็นการทดลองฉีด LA virus ซึ่งได้เตรียมมาเสร็จเรียบร้อยแล้ว จากประเทศญี่ปุ่น ในสุกรพันธุ์ผสม สุกรพันธุ์พื้นเมือง (หมูกะโดน) และกระบือ

การทดลองครั้งที่สอง ซึ่งขณะนี้ได้เริ่มลงมือดำเนินการไปบ้างแล้ว เป็นการทดลองแบบเดียวกับการทดลองครั้งที่หนึ่ง เป็นแต่ใช้เชื้อ LA virus ที่ได้ผลิตขึ้นเองที่สถานวิทยาศาสตร์ปากช่อง ทดลองและใช้โคเป็นสัตว์ทดลองสมทบเพิ่มขึ้นอีกอย่างหนึ่ง

สัตว์ทดลอง สุกรได้ใช้สุกรในการทดลองทั้งหมด ๓๒ ตัว เป็นสุกรพันธุ์ผสม ๑๖ ตัว และสุกรพันธุ์พื้นเมือง ๑๖ ตัว สุกรพันธุ์ผสมหาซื้อจากท้องที่บางแห่งในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา และสุกรพันธุ์พื้นเมืองจากจากท้องที่จังหวัดนครราชสีมา

กระบือได้จัดซื้อมาจำนวน ๑๑ ตัว จากจังหวัดชุมพร ซึ่งเป็นจังหวัดที่จัดว่าปราศจากโรครินเดอร์เปสต์มาก่อน ทั้งนี้เพื่อให้ได้สัตว์ทดลองที่เหมาะสมในทางหลักวิชาจริง ๆ

สัตว์ทดลอง คือสุกรและกระบือทั้งหมดได้จัดส่งมาไว้ที่ปากช่อง เพื่อสังเกตอาการก่อนทำการฉีด LA virus ทดลองประมาณ ๑ สัปดาห์ และเพื่อเจาะโลหิตของสัตว์ทุกตัวแยกเซรัมเก็บไว้ในตู้เย็นจัด (Deep freezer) อุณหภูมิประมาณ —๒๐° ซ ทั้งนี้เพื่อไว้สำหรับพิศูจน์หาความคุ้มโรคซึ่งสัตว์บางตัวอาจจะมีอยู่ก่อนได้ เพื่อเป็นหลักฐานประกอบให้การทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เชื้อ LA virus ที่ใช้ฉีดทดลอง เชื้อ LA virus หรือในรูปของวัคซีน LA ที่ใช้ฉีดทดลองในการทดลองครั้งที่หนึ่งนี้ เป็น LA virus ชุดที่ ๕๘๗ ผลิตขึ้นเมื่อวันที่ ๓ เมษายน ๒๕๐๑ โดย NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE ในประเทศญี่ปุ่น ทำแห้งบรรจุในหลอดแก้ว (Ampoule) ขนาดหลอดละ ๐.๒ กรัม วิธีการเตรียมวัคซีน LA นั้น ในขั้นแรกเราใช้ Seed ของ LA virus

ซึ่งได้จากม้ามของ ลูกไก่ฟัก และ ละลายน้ำเนื้อ (Broth) หรือ ๖% กลูโคสในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น ๑:๕๐๐ ฉีด เข้าหลอดโลหิตของลูกไก่ฟักอายุ ๑๒ หรือ ๑๓ วัน ฟองละ ๐.๐๕ ซี.ซี. แล้วฟักต่อไปอีก ๕ หรือ ๖ วัน จึงคัดเอาเฉพาะลูกไก่ฟักที่ยังไม่ตายมาทำเป็น วัคซีน โดยใช้ลูกไก่ฟักนั้นทั้งตัว (ทั้งส่วน หัว ปีก และขา) ๑ ส่วนโดยน้ำหนักผสมกับ ๑ % กลูโคส (Glucose) ๑ ส่วนโดยบริบาตรบดให้ละเอียด แล้วปั่นให้หนืดก้น (Centrifuge) เพื่อดูดเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำ (Supernatant) บรรจุลงในหลอดแก้ว หลอดละ ๐.๕ ซีซี หรือเท่ากับ ๐.๒ กรัม ของเนื้อลูกไก่ฟักสด แล้วทำการดูดแห้ง (Freeze dry) ใช้เป็นวัคซีนต่อไป

การฉีดเชื้อใน LA virus ลูกไก่ฟัก ในวันที่ ๒๙ เมษายน ๒๕๐๑ ซึ่งเป็นวันทำการฉีดวัคซีน LA๕๘๗ ทดลอง นั้นได้เปิดหลอดบรรจุวัคซีนรวมทั้งหมด ๕ หลอด(๑กรัม) ละลายด้วยน้ำเกลือ (0.85% Buffer saline) จำนวน ๑๐ ซี.ซี. เพื่อทำให้เป็นน้ำยาเจือจาง (Dilution) ของวัคซีน ๑:๑๐ ก่อน แล้วแบ่งมาส่วนหนึ่งเพื่อใช้เป็นน้ำยาเจือจางหลัก สำหรับทำน้ำยาเจือจางลงไปอีกเป็น ๑:๑๐๐, ๑:๑,๐๐๐, ๑:๑๐,๐๐๐, ๑:๑๐๐,๐๐๐ และ ๑:๑,๐๐๐,๐๐๐ สำหรับฉีดลูกไก่ฟักซึ่งมีอายุ ๑๒ วัน โดยฉีดเข้าหลอดโลหิต ฟองละ ๐.๐๕ ซี.ซี. ใช้ไข่ไก่ฟัก ๗ ฟอง ต่อน้ำยาเจือจางของวัคซีนที่ได้ละลายไว้(น้ำยาเจือจางของวัคซีนที่ละลาย ๑:๑๐ และ ๑:๑๐๐ ไม่จำเป็นต้องฉีด) ความมุ่งหมายของการทำ Titration วัคซีนในลูกไก่ฟักนั้นก็เพื่อต้องการหา ขนาดที่น้อยที่สุด ของ วัคซีน ซึ่งสามารถทำให้ลูกไก่ฟักเป็นโรค (Minimal infective dose) ซึ่งเราเรียกว่า "หนึ่งยูนิทของวัคซีนสำหรับลูกไก่ฟัก"

วิจัยวิเคราะห์ ดู ว่า ลูกไก่ฟัก นั้น เป็นโรค (Infected) โดยวัคซีนจริงหรือไม่ก็โดยดูสภาพวิการหรือลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ทางพยาธิที่เกิดขึ้นแก่ม้ามของลูกไก่ แล้วยืนยันด้วย ผล ของ การ ตรวจ ทาง Complement fixation test อีกทางหนึ่ง (ตารางหมายเลข ๑)

การฉีดเชื้อ LA virus ในสุกรและกระบือ จากน้ำยาเจือจางหลักของวัคซีน ๑:๑๐ ส่วนที่ยังเหลืออยู่ ทำให้เป็นน้ำยาเจือจางลงไปอีกเป็น ๑:๕๐, ๑:๕๐๐, ๑:๕,๐๐๐, ๑:๕๐,๐๐๐ และ ๑:๕๐๐,๐๐๐ แล้วใช้น้ำยาเจือจางของวัคซีนขนาดต่างๆ เหล่านี้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของสุกรและกระบือทดลอง ตัวละ ๒ ซี.ซี. ทั้งนี้เพื่อต้องการหา ขนาดที่น้อยที่สุด ของ วัคซีน ซึ่ง

สามารถสร้างความคุ้มโรค (Minimal immunizing dose) ให้แก่สุกรและกระบือได้ ขนาดน้อยที่สุดอันนั้นเราเรียกว่า "หนึ่งยูนิต ของวัคซีนสำหรับสุกรและสำหรับกระบือ

สัตว์ทดลองทั้งหมด ภายหลังได้รับการฉีด LA virus ตามขนาดต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว ได้จัดการให้ยืนคอกอยู่ ๑๐ วันติดต่อกัน โดยได้รับการเลี้ยงดูตามธรรมดา คือให้หญ้าและน้ำวันละ ๒ ครั้ง เช้าและบ่าย ภายหลัง ๑๐ วันแล้วปล่อยให้หาหญ้ากินเองตามบริเวณใกล้ๆ คอก ได้ทำการสังเกตอาการของสัตว์โดยละเอียดและวัดปรอทดูอุณหภูมิของร่างกายทุกวัน วันละ ๒ ครั้งเช้าและเย็น เป็นเวลา ๓๐ วันติดต่อกัน

การเจาะโลหิตเพื่อแยกเซรัมตรวจหาความคุ้มโรค ภายหลังทำการฉีดเชื้อ LA virus ทดลองแล้ว ได้ทำการเจาะโลหิตของสัตว์ทดลองทุกตัวเป็นระยะ ๆ เพื่อแยกเอาเซรัมเก็บไว้ในตู้เย็นจัด สำหรับทำการตรวจทางเซรัมวิทยาเพื่อหาความคุ้มโรค ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากเชื้อที่ได้ฉีดเข้าไป

สำหรับกระบือ ภายหลังวันทำการฉีดเชื้อทดลองแล้ว ๗, ๑๔, ๒๑ และ ๓๐ วัน ตามลำดับได้ทำการเจาะโลหิตรวม ๔ ครั้ง และรวมกับที่ได้เจาะไว้ก่อน ทำการฉีดเชื้อทดลองอีก ๑ ครั้งรวมทั้งหมดเป็น ๕ ครั้ง

สำหรับสุกร ภายหลังวันทำการฉีดเชื้อทดลองแล้ว ๓๐ วัน เจาะโลหิต ๑ ครั้ง และรวมกับที่ได้เจาะไว้ก่อนวันทำการฉีดเชื้อทดลองอีก ๑ ครั้ง รวมทั้งหมดเป็น ๒ ครั้ง

วิธีการตรวจหาความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา ได้กระทำแตกต่างกันไปเป็น ๒ วิธี กล่าวคือ

ก. สำหรับเซรัมของกระบือที่ได้แยกไว้ตามวันเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วทั้งหมด ได้ทำการตรวจหาความคุ้มโรค (Complement fixing antibody) โดยวิธี Complement fixation test วิธีที่เรียกว่า Complement dilution method

ข. สำหรับเซรัมทั้งของกระบือและสุกรที่ได้แยกไว้ก่อนวันทำการฉีดเชื้อทดลอง และเซรัมเฉพาะที่ได้แยกไว้ภายหลังวันทำการฉีดเชื้อทดลองแล้ว ๓๐ วัน ได้ทำการตรวจหาความคุ้มโรค (Virus neutralizing antibody) โดยใช้ลูกไก่ฟักและเชื้อ LA virus เป็นเครื่องทดลอง

เซรัมของกระบือและสุกรที่ได้แยกไว้ทั้งหมดทุกคราว สำหรับทำ Complement fixation and virus neutralization tests ก่อนลงมือตรวจไม่ต้องทำให้ร้อนเสียก่อน

การตรวจโดย Coamplement Fixation Test การตรวจหาความคุ้มโรคในเซรัมของกระบือเป็นระยะ ๆ ภายหลังการฉีด LA vtrus นั้น ใช้วิธีที่เรียกว่า Complement dilution method ซึ่งเป็นวิธีของ Nakamura, Kishi และ Kiuchi วิธีปฏิบัติการมีดังต่อไปนี้

ขั้นแรกให้ละลายเซรัมที่ต้องการตรวจด้วยน้ำเกลือ ให้มีความเข้มข้น ๑:๑๐

สำหรับแอนติเย่น (Antigens) จัดเป็น ๒ ชุด (Series) ด้วยกันคือ PA และ NA ซึ่งทำมาจากต่อมน้ำเหลืองของโคที่ได้ทำให้เกิดโรครินเดอร์เปสต์ และจากต่อมน้ำเหลืองของโคปกติตามลำดับ แอนติเย่นทั้งสองชนิดนี้โดยปกติทำเก็บไว้ในสภาพเป็นผงแห้ง ก่อนใช้สกัดด้วยด่างอ่อน ๆ แล้วละลายน้ำเกลือให้มีความเข้มข้น ๒ %

คอมปลีเมนต์ (Complement) ได้จากเซรัมของหนูตะเภา ในการทำ CF test ครั้งหนึ่ง ๆ ใช้หนูตะเภาสำหรับเจาะโลหิตแยกเอาเซรัมประมาณ ๕ ถึง ๑๐ ตัว ความเจือจาง (Dilution) หลักของคอมปรีเมนต์ใช้ ๑:๑๐ ในน้ำเกลือ แล้วทำให้เจือจาก ๔:๕ ตามลำดับไปจนครบ ๙ ถึง ๑๒ Dilutions

ซัสเพ็นชั่น (Suspension) ของเม็ดเลือดใช้ ๒.๒ % เม็ดเลือดแพะในน้ำเกลือซึ่ง Sensitized ด้วย ๔ ยูนิท ของ Immune rabbit hemolysin (hemolytic ambocepter) ในปริมาณไม่เกิน ๕ % ของซัสเพ็นชั่นทั้งหมด

น้ำเกลือที่ใช้สำหรับละลาย Reagents ต่าง ๆ และที่ใช้ผสมใน Reaction mixture ใช้ ๐.๘๕ % Buffer saline Ph ๗.๔

เวลาทำการตรวจ จัดหลอดแก้วเหมือนกันสองชุด สำหรับชุด P และชุด N แล้วใส่ Reagents ต่าง ๆ เหมือนกัน นอกจากแอนติเย่นที่ใช้คือ NA ในชุด N และ PA ในชุด P แต่ละชุดประกอบด้วยหลอดแก้วอย่างน้อย ๙ หลอด ซึ่งแต่ละหลอดเราใส่.—

๐.๒ ซี.ซี. ของคอมปลีเมนต์ ซึ่งมีความเจือจางถูกหลั่นกันดังกล่าวแล้ว

๐.๑ ซี.ซี. ของเซรัม ๑:๑๐ ที่ต้องการตรวจ

๐.๑ ซี.ซี. ของแอนติเย่น NA ในชุด N และแอนติเย่น PA ในชุด P

เมื่อผสม Reagents ต่าง ๆ เข้าด้วยกันเสร็จเรียบร้อยแล้ว เอาเข้า fix ในตู้เย็น ๑ ถึง ๔ ซ. ประมาณ ๔ ชั่วโมง แล้วจึงใส่ซัสเพ็นชั่นของเม็ดเลือดซึ่งได้ Sensitized แล้วทุกหลอด ๆ ละ ๐.๑ ซี.ซี. อบใน Water bath ๓๗ ถึง ๓๘ ซ. นาน ๓๐ นาที เสร็จแล้วเอาเข้าเก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดาหนึ่งคืน รุ่งเช้าจึงอ่าน

และคำนวณผลของการตรวจ

การอ่านผล ใช้วิธีดู Grades ของเฮโมลัยซิส (Hemolysis) ของแต่ละหลอดด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบกับเฮโมลัยซิสมาตรฐาน (Standard hemolysis) ซึ่งได้เตรียมไว้โดยมีเปอร์เซ็นต์ของ เฮโมลัยซิสต่าง ๆ กันเฮโมลัยซิสมาตรฐานจะต้องเตรียมขึ้น ใหม่ทุกคราวไปในวันที่ทำการตรวจ โดยใช้ซัสเพ็นชั่นของเม็ดเลือดอันเดียวกันกับที่ใช้ใน ในการตรวจ

Specific reaction ของผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจ เราคำนวณได้จากการเปรียบเทียบผลของเฮโมลัยซิส ในชุด N และชุด P ในขอบเขตจำกัดอันหนึ่งตั้งแต่ถึงหกหลอดติดต่อกัน ขอบเขตอันนี้ในชุด N ถือว่าเป็น ค่า ของ เฮโมลัยซิสที่เฉลี่ยแล้วใกล้เคียงกันที่สุด ๘๐ % รวมจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเฮโมลัยซิสทั้งหมด แยกเป็นของชุด N และชุด P (Hn และ HP) จากนั้นคำนวนหา Fixation titer (f.t.) ได้ตามสูตร Fixation tifer นี้ก็คือผลต่างของจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดซึ่งยังไม่ได้ถูกทำลาย อันเป็นผลมาจาก Specific fixation ของคอมปลีเม้นต์ กับจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่แตกไป (Hemolysed) ทั้งหมดในชุด N นั่นเอง

$$\text{สูตร f.t. (หรือ ๘๐ \% f.t.)} = \frac{Hn - Hp}{Hn} \times 100$$

ในการตัดสินว่าผลของการตรวจเซรัมเป็นบวก (มีความคุ้มโรค) หรือเป็นลบ (ไม่มีความคุ้ม) นั้น ถือมาตรฐานดังนี้ คือ—

ผลลัพธ์ของ f.t.	ผลของการตัดสิน
๐ ถึง ๑๐	ลบ
๑๑ ถึง ๒๐	สงสัย
๒๑ ขึ้นไป	บวก

เพื่อให้เข้าใจง่ายขึ้น ได้ยกตัวอย่างวิธีการตรวจเซรัมบางอัน โดยวิธีดังกล่าวมาแล้วมาให้เห็น ดังตารางข้างล่างนี้ (ตารางหมายเลข ๒)

การตรวจโดย Virus Neutralization Test ในการตรวจหาความคุ้มโรค (Virus neutralizing antibody) ในเซรัมของสุกรเท่าที่ได้ศึกษากันอยู่จนถึงในปัจจุบัน ปรากฏว่าจะตรวจโดยใช้วิธี Complement fixation test ยังไม่ได้ผลแน่นอนเป็นที่พอใจ ฉะนั้นจึงต้องใช้วิธีตรวจโดย Virus neutralization test ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปเป็นวิธีที่ให้ผลละเอียดแน่นอนดีกว่า การตรวจโดยวิธีดังกล่าวนี้ทำได้โดยอาศัยหลักที่ว่า เซรัมของสัตว์ใดที่มีความคุ้มโรครินเดอร์เปสต์อยู่ ควรจะต้องมี Virus neutralizing antibody ซึ่งสามารถทำให้เชื้อโรครินเดอร์เปสต์หมดความเป็นพิษ (Neutralize) ไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้อีก ในการนี้ได้ทำการทดลองความเป็นพิษของเชื้อรินเดอร์เปสต์ในไข่ไก่ฟัก ฉะนั้นจึงใช้เชื้อรินเดอร์เปสต์ชนิดผ่านไข่ (LA virus) เป็นเชื้อทดลอง

เอาเชื้อ LA virus จากม้ามของลูกไก่ฟักมาบดผสมกับน้ำสกัดเนื้อ (Broth, Ph ๗.๒-๗.๔) ให้มีความเข้มข้น ๑.๕๐ ภายหลังปั่นให้หนืดก้น (Centrifuge) เบา ๆ แล้ว ใช้ส่วนที่เป็นน้ำ (Supernatant) เป็นน้ำยาเจือจางหลักของไวรัส เพื่อทำเป็นน้ำยาเจือจางลงไปอีกตามลำดับครั้งละสิบเท่าตั้งแต่ $\frac{1}{5}10^{-2}$ จนถึง $\frac{1}{5}10^{-6}$

ละลายเซรัมที่ต้องการจะตรวจให้เป็น ๑:๕ ในน้ำสะกัดเนื้อ แล้วเอาผสมกับน้ำยาเจือยางแต่ละหลอดของไวรัส ในหลอดแก้ว ในจำนวนเท่ากัน อย่างละ ๐.๕ ซี.ซี. สำหรับหลอดยืน (Virusbroth control) เราใช้น้ำสกัดเนื้อจำนวน ๐.๕ ซี.ซี. เช่นเดียวกัน แทนเซรัมที่ต้องการตรวจนั้น ผสมกับน้ำยาเจือจางแต่ละขนาดของไวรัส จำนวน ๐.๕ ซี.ซี. เช่นเดียวกัน Virusbroth control จะแสดงให้ทราบว่า ความเจือจางของไวรัสที่สูงที่สุด ซึ่งสามารถทำให้ลูกไก่ฟักเป็นโรคได้นั้น (Maximal ingecttve dilution of virus suspension) เป็นเท่าใด

เก็บส่วนผสมของไวรัสกับเซรัมแต่ละหลอดไว้ในตู้เย็น ๑—๔ ซ. เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกริยาของเซรัมในการทำลายพิษในส่วนผสมนี้ จะเห็นได้ว่าความเจือจางของเซรัมเพิ่มขึ้นจาก ๑:๕ เป็น ๑:๑๐ และความเจือจางของไวรัสจาก $\frac{1}{5}10^{-X}$ ถึง $\frac{1}{5}10^{-(X+1)}$

เอาส่วนผสมของไวรัสกับเซรัม และส่วนผสมของไวรัสกับน้ำสกัดเนื้อ แต่ละหลอดฉีดเข้าหลอดโลหิตของไข่ไก่ฟักอายุ ๑๒ วัน ฟองละ ๐.๐๕ ซี.ซี. ใช้ไข่ฟัก ๗ ฟอง ต่อส่วนผสมของแต่ละหลอด

เอาไข่ไก่ฟักทั้งหมดที่ได้รับการฉีดส่วนผสมของไวรัสกับเซรัม และส่วนผสมของไวรัสกับน้ำสกัดเนื้อแล้วเข้าฟักในตู้ฟักไข่ (๑๐๐°ฟ) ต่ออีกประมาณ ๕ หรือ ๖ วัน จึงเคาะเปลือกให้แตก หยิบลูกไก่ฟักที่ยังไม่ตายออกมาผ่าเก็บม้ามมาตรวจดูสภาพวิการต่าง ๆ เช่นขนาดของการขยายใหญ่ การอักเสบแดงของมัน และชั่งน้ำหนักให้ทราบไว้ด้วย สิ่งเหล่านี้จะเป็นหลักฐานเพื่อช่วยในการวินิจฉัยในเมื่อการพิศูจน์ตรวจหา c.f. antigen ซึ่งจะต้องทำต่อไปให้ผลคลุมเครือ

วิธีตรวจหา c.f. antigen ในม้ามของลูกไก่ฟัก ม้ามของลูกไก่ฟักที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้เรียบร้อยแล้วนั้น จะต้องเอาไปพิศูจน์หา c.f. antigen ว่ามีอยู่จริงหรือไม่ โดยการทำ Complement fixation test ด้วยวิธีพิเศษซึ่งให้กำเนิดโดย Nakamura และ Kishi เรียกว่า The miniature postdilution method หรือ Titration of residual complement หรือเรียกย่อ ๆ ว่า TRC method ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซรัมที่ตรวจได้ทำให้ไวรัสหมดพิษแล้วจริงหรือไม่ การตรวจโดยวิธีดังกล่าวนี้ดำเนินการโดยเอาม้ามของลูกไก่ที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้เรียบร้อยแล้วนั้น บดร่วมกับน้ำเกลือในอัตรา ๑:๒๐ แล้วต้มใน Water bath ๑๐๐° ซ. นาน ๓๐ นาที ปั่นให้นอนก้นเบา ๆ เอาส่วนที่เป็นน้ำใช้เป็นแอนติเย่น

เตรียมส่วนผสม (Test mixture) ของแอนติเย่น แอนติบอดี้ (ใช้ไฮเปอร์อิมมูน-เซรัมของโคหรือกระบือ ๑:๑๐ ในน้ำเกลือ) และคอมปลีเม้นต์ เข้าด้วยกันในจำนวนจำกัดในหลอดทดลอง แล้วทิ้งไว้ให้ทำปฏิกริยากันในตู้เย็นธรรมดาคืนหนึ่ง (๒๐ ช.ม.) รุ่งขึ้นเอาส่วนผสมนั้นมาทำให้เจือจางลงไปเป็นลำดับ (Serial dilutions) แล้วใส่ซัสเพ็นชั่นของเม็ดเลือดแพะที่ Sensitized แล้วลงไป โดยวิธีนี้คอมปลีเม้นต์ที่ยังเหลืออยู่ โดยไม่ได้ถูกใช้ไปในการร่วมทำปฏิกริยากับแอนติเย่นและแอนติบอดี้ก็ถูก Titrated แล้วจึงร่วมทำปฏิกริยากับเม็ดเลือดที่ Sensitized แล้วนั้น ทำให้เกิดเฮโมลัยซิส มากน้อยต่าง ๆ กันตามลำดับที่คอมปลีเม้นต์ยังเหลืออยู่ จากนี้เราก็

คำนวณหา Fixation titer และวินิจฉัยผลของการตรวจได้โดยนัยเดียวกับวิธีที่กล่าวมาแล้วใน Complement dilution method

Grade ของ Virus neutralization (VN) เราคำนวณได้จากผลต่างของ Log ระหว่างความเจือจางที่สูงสุดของไวรัสอย่างเดียวไม่มีเซรัมผสม (มีน้ำสกัดเนื้อแทน) ซึ่งสามารถทำให้ลูกไก่ฟักเป็นโรคได้กับความเจือจางที่สูงที่สุดของไวรัสผสมกับเซรัม (ตารางหมายเลข ๔) ในการบอก Grade ดังกล่าวนี้เราใช้เครื่องหมาย –, +, + + หรือ + + + ซึ่งมีความหมายดังต่อไปนี้.

ผลต่างของล็อก (Log difference)	Grade ของ V.N.
๐	– ลบ
๑	+ บวกอย่างอ่อน
๒	+ + บวกปานกลาง
๓ หรือมากกว่า	+ + + บวกอย่างแรง

การพิสูจน์ความคุ้มโรคโดยการฉีดพิษทับ ภายหลังวันทำการฉีด LA virus แล้ว ๓๐ วัน ได้ทำการฉีดพิษทับสัตว์ทดลองทุกตัวเพื่อพิสูจน์ดูความคุ้มโรคโดยตรง โดยใช้เชื้อรินเดอร์เปสต์ทีมพิษรุนแรงเต็มที่ ชุดที่อาร์ ๑๑๘ ซึ่งกองวิชาการได้ผ่านเข้ากระบือไว้ที่เกาะเสม็ด แล้วฆ่าเก็บม้ามเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเมื่อวันที่ ๒๖ เมษายน ๒๕๐๑ ปริมาณของเชื้อพิษที่ใช้ฉีดเตรียมจากม้ามกระบือโดยละลายในน้ำเกลือ ให้มีความเข้มข้น ๕% แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลองทุกตัว ๆ ละ ๕ ซี.ซี. และในเวลาเดียวกันฉีดเข้ากระบือซึ่งไม่ได้รับการฉีด LA virus ไว้ก่อนอีก ๒ ตัว และฉีดสุกรพันธุ์ผสมและสุกรพันธุ์พื้นเมืองอีกอย่างละ ๓ ตัว ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นวัคซีน (ตารางหมายเลข ๕ และแผ่นปรอทแนบ)

ผลของการทดลอง

ผลของการ Titration of LA virus ชุดที่ ๕๘๗ ซึ่งเตรียมมาจากประเทศญี่ปุ่น ในลูกไก่ฟัก สำหรับใช้ในการทดลองครั้งที่หนึ่งนั้น ปรากฏว่าขนาดน้อยที่สุด ซึ่งสามารถทำให้ลูกไก่ฟักเป็นโรค หรืออีกนัยหนึ่งเราเรียกว่า Egginfective unit เท่ากับ ๐.๐๕ ซี.ซี. ของ ๑ ๑๐,๐๐๐ หรือเท่ากับ ๐.๐๐๐๐๐๕ กรัม ของเนื้อตัวอ่อนหรือ LA virus แท้ ๆ ก่อนทำแห้ง (Wet infected embryo tissue)

Complement fixation test เท่าที่ได้ตรวจหา CF antibody ในเซรัมของกระบือที่ได้แยกไว้ทั้งหมดคือ ๑๑ Semples ก่อนฉีด LA virus และ ๗ Samples ภายหลังฉีดแล้ว ผลดังแสดงอยู่ในตารางหมายเลข ๓

ในจำนวนเซรัมที่ได้ตรวจก่อนทำการฉีด LA virus ๑๑ Samples เป็นลบ (ไม่มีความคุ้ม) ๑๐ Samples (๙๐.๙ %) และเป็นบวก (มีความคุ้ม) ๑ Sample (๙.๑ %) กระบือตัวที่มีเซรัมเป็นบวกนี้ (บ. ๑๐) ได้ใช้เป็นตัวยืนตัวหนึ่งในในสองตัวไปก่อนทราบผลของการตรวจตรงกันข้ามเซรัมเหล่านั้น (๗ Samples) เมื่อตรวจภายหลังการฉีด LA virus ปรากฏว่าเป็นบวก ๖ Samples (๘๕.๗ %) เป็นลบเสีย ๑ Sample (๑๔.๓%) เซรัมอันที่เป็นลบนั้น คือเซรัมของกระบือหมายเลข ๘ ผลของการตรวจโดย VN ก็เป็นลบ ด้วยและ เมื่อได้ฉีดพิษทับแล้วได้ผลสัมพันธ์กันคือตาย

Virus neutralization test ได้ตรวจหาVN antibody ในเซรัมของกระบือ เซรัมของสุกรพันธุ์ผสม และสุกรพันธุ์พื้นเมือง ก่อนทำการฉีด LA virus และภายหลังฉีดแล้ว ๓๐ วัน ผลดังแสดงอยู่ในตารางหมายเลข ๕

เซรัมของ กระบือ ที่ได้ตรวจก่อนการฉีด LA virus ๑๑ Samples เป็นลบ ๑๐ Samples และเป็นบวก ๑ Sample สำหรับเซรัม ๗ Samples ที่ได้ตรวจภายหลังการฉีด LA virus แล้ว ปรากฏว่าเป็นบวก ๔ Samples เป็นลบ๓ Samples

เซรัมของสุกรพันธุ์ผสม (ส.—๑ ถึง ส.—๑๖) และเซรัมของสุกรพันธุ์พื้นเมือง ส.—๑๗ ถึง ส.—๓๒) ที่ได้ตรวจก่อนการฉีด LA virus ทั้ง ๓๒ Samples ปรากฏว่าเป็นลบทั้งหมด ในทางตรงข้ามผลการตรวจเซรัมของสุกรพันธุ์ผสมในจำนวน ๑๓ Samples (ไม่นับเซรัมของสุกรตัวยืน ๓ ตัว) ภายหลังการฉีด LA virus ปรากฏว่าเป็นบวกทั้งหมด (๑๐๐%) และเซรัมของสุกรพันธุ์พื้นเมือง ในจำนวน ๑๓

Samples ปรากฏเป็นบวกเพียง ๖ Samples เป็นลบเลย ๗ Samples (๕๓.๘๕%) แต่ภายหลังการฉีดพิษทับแล้ว ในจำนวนสุกรทั้ง ๗ ตัวนั้นมีตายเพียงตัวเดียว (ส.—๒๕)

การพิสูจน์ความคุ้มโรคทรงตรง โดยการฉีดพิษทับ ปรากฏผลว่ากระบือที่ได้รับการฉีด LA virus ในขนาดต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ ๑:๕๐ ถึง ๑:๕๐,๐๐๐ (๒ ซี.ซี.) มีความคุ้มโรคทุกตัวส่วน ๑:๕๐๐,๐๐๐ ในจำนวน กระบือ ๒ ตัว ที่ทดลองมีความคุ้มตัวหนึ่งไม่คุ้มตัวหนึ่ง (ตาย) กระบือตัวอื่น ๒ ตัว ตายตัวหนึ่ง ไม่ตายตัวหนึ่ง (เพราะมีความคุ้มโรคมาก่อน)

สุกรพันธุ์ผสมและสุกรพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับการฉีด LA virus ในขนาดต่าง ๆ เท่ากับที่ฉีดในกระบือ มีความคุ้มโรคจนถึง ๑:๕๐๐,๐๐๐ และ ๑:๕,๐๐๐ ตามลำดับ สุกรตัวอื่นใน พวกสุกรพันธุ์พื้นเมือง จำนวน ๓ ตัว ตาย ๒ ตัว มีไข้สูงแล้วหาย ๑ ตัว

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการทดลองฉีด LA virus ในกระบือจำนวน ๙ ตัว (ตายในระหว่างการทดลองเลย ๒ ตัว คงเหลือ ๗ ตัว) และสุกรพันธุ์ผสมกับสุกรพันธุ์พื้นเมือง อย่างละ ๑๓ ตัว แล้วทำการพิสูจน์ ตรวจหา ความคุ้มโรคที่เกิดขึ้น (Antibody response) โดย Complement fixation test, Virus neutralization test และโดยการฉีดพิษทับ ในที่สุด ปรากฏผลสรุปได้ดังต่อไปนี้

ในจำนวนกระบือที่ได้รับการฉีด LA virus ๗ ตัว มี CF antibody เกิดขึ้น ๖ ตัว (๘๕.๗%) และมี VN antibody เกิดขึ้น ๔ ตัว (๕๗.๑%)

ส่วนในสุกรพันธุ์ผสมจำนวน ๑๓ ตัว มี VN antibody เกิดขึ้น ๑๐๐% และสุกรพันธุ์พื้นเมืองจำนวน ๑๓ ตัว มี VN antibody เกิดขึ้นเพียง ๔๖.๑๕%

ปริมาณน้อยที่สุดของ LA virus ซึ่งสามารถทำให้เกิดความคุ้มโรคในกระบือ (Buffalo immuinzing unit or BU) เท่ากับ ๐.๐๐๐๐๕ กรัม ของเนื้อวัคซีนสดแท้ ๆ (Wet infected embryo tissue) ในสุกรพันธุ์ผสม (Mixed breed pig or Pm) เท่ากับ ๐.๐๐๐๐๐๕ กรัม ในสุกรพันธุ์พื้นเมือง (Native pig or Pn) เท่ากับ ๐.๐๐๐๕ กรัม ปริมาณน้อยที่สุดของ LA virus อันเดียวกันนั้น ซึ่งสามารถทำให้ลูกไก่ฟักเป็นโรค (Egg infective unit or EU) เท่ากับ ๐.๐๐๐๐๐๕ กรัม

	BU	=	0.00005 (Gram)
	PmU	=	0.000005 ,,
	PnU	=	0.0005 ,,
และ	EU	=	0.000005 ,,
ดังนั้น	1 EU	=	1 PmU
	10 EU	=	1 BU
และ	100 EU	=	1 PnU

ความสัมพันธ์ของยูนิทของวัคซีนในสัตว์ทดลองต่าง ๆ นี้จะยังสรุปแน่นอนลงไปไม่ได้ จนกว่าอย่างน้อยที่สุด จะได้ทำการทดลองครั้งที่สองซ้ำดูเสียก่อน

อย่างไรก็ดี สรุปแล้วการทดลองประสิทธิภาพของ LA virus ในกระบือ ในสุกรพันธุ์ผสม และในสุกรพันธุ์พื้นเมือง ครั้งนี้ปรากฏว่า LA virus ที่ฉีดเข้าไปสามารถสร้างความคุ้มโรคใน สัตว์ทดลองต่าง ๆ เหล่านั้นได้ดีเป็นที่น่าพอใจ.

ตารางหมายเลข ๑ แสดงการฉีดเชื้อ LA virus ชุดที่ ๕๘๗ ในลูกไก่พัก

วันที่ทำการฉีด	ขนาดน้ำยาเจือจางของ LA virus	จำนวนไข่ที่ใช้ฉีด	ลูกไก่พักที่ตายหลังฉีดระหว่าง ๑–๕ วัน					วันที่ตาย	วิการที่เกิดขึ้นแก่ม้วมของลูกไก่พัก		ผลของการพิสูจน์ยืนยันโดย CF test (f.t.)
			๑	๒	๓	๔	๕		ขยายใหญ่และอักเสบแดง	น้ำหนักเฉลี่ย (Mg)	
๒๕เม.ย.๐๑		๑							+++		
		๒							+++	๑๘.๕	+(100%)
		๓							+		
	๑:๑,๐๐๐	๔							+		
		๕		ต				๑/๕/๒๕๐๑			
		๖		ต				๑/๕/๒๕๐๑			
		๗		ต				๑/๕/๒๕๐๑			
		๑							++		
		๒							+		
		๓							+	๑๔๐	+ (97%)
	๑:๑๐,๐๐๐	๔							+		
		๕							+		
		๖							–		
		๗					ต	๔/๕/๒๕๐๑			
		๑							–		
		๒							–		
		๓							–		
	๑:๑๐๐,๐๐๐	๔							–	๘.๓	– (0%)
		๕							–		
		๖							–		
		๗					ต	๔/๕/๒๕๐๑			
		๑							–		
		๒							–		
		๓							–	๘.๓	– (0%)
	๑:๑,๐๐๐,๐๐๐	๔							–		
		๕							–		
		๖							–		
		๗		ต				๑/๕/๑๕๐๑			

ตารางหมายเลข ๒ แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณหา Fixation titer

เปอร์เซนต์ของเฮโมลัยซิสที่ความ

เจือจางของคอมปลีเม้นต์ $\frac{1}{10} \times (\frac{5}{5})^n$

เซรัม	แอนติเย่น	n ๑๒	๑๑	๑๐	๙	๘	๗	๖	๕	๔	Hn Hp	80% f.t.
น้ำเกลือ	น้ำเกลือ	๙๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐		
น้ำเกลือ		๕๐ ๖๐	๘๐ ๘๐	๙๐ ๙๕	๙๕ ๙๕	๑๐๐ ๑๐๐	๑๐๐ ๑๐๐	๑๐๐ ๑๐๐	๑๐๐ ๑๐๐	๑๐๐ ๑๐๐	๓๑๕ ๓๔๐	−๘
ก่อนฉีดวัคซีน บ.−๑	NA	๑๐	๒๐	๔๐	๖๐	๗๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๗๐	−๖
	PA	๕	๒๐	๔๐	๖๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๙๕	
ก่อนฉีดวัคซีน บ.−๗	NA	๑๐	๒๐	๒๐	๓๐	๕๐	๗๐	๙๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๓๐	๐
	PA	๑๐	๒๐	๒๐	๔๐	๖๐	๘๐	๙๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๓๐	
ก่อนฉีดวัคซีน บ.−๘	NA	๑๐	๒๐	๔๐	๖๐	๙๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๙๐	−๓
	PA	๑๐	๒๐	๓๐	๖๐	๘๐	๙๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๘๐	
หลังฉีดวัคซีน บ.−๑, ๗ วัน	NA	๑๐	๑๐	๒๐	๓๐	๕๐	๗๐	๙๐	๙๕	๑๐๐	๔๐๕	๐
	PA	๑๐	๑๐	๒๐	๓๐	๕๐	๗๐	๙๐	๙๕	๑๐๐	๔๐๕	
หลังฉีดวัคซีน บ.−๑, ๑๔ วัน	NA	๓๐	๕๐	๗๐	๙๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๔๐๕	๕
	PA	๓๐	๔๐	๖๐	๙๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๓๘๕	
หลังฉีดวัคซีน บ.−๑, ๒๑ วัน	NA	๔๐	๖๐	๘๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๔๗๕	๘๕
	PA	๐	๐	๐	๑๐	๑๐	๓๐	๕๐	๙๐	๑๐๐	๕๐	
หลังฉีดวัคซีน บ.−๑, ๓๐ วัน	NA	๑๐	๑๐	๒๐	๒๐	๕๐	๘๐	๙๕	๑๐๐	๑๐๐	๓๒๕	๖๖
	PA	๐	๐	๕	๑๐	๑๐	๒๐	๓๐	๕๐	๘๐	๑๑๐	

เลขที่ขีดเส้นใต้ไว้ คือขอบเขตของการคิดเปอร์เซนต์ของเฮโมลัยซิส

NA คือแอนติเย่นยืน ทำจากต่อมน้ำเหลืองของโคปกติ

PA คือแอนติเย่น ทำจากต่อมน้ำเหลืองของโคที่เป็นโรครินเดอร์เปส์ต

บ. หมายถึงกระบือ

ตารางหมายเลข ๓ แสดงผลของการตรวจเซรัมของกระบือ

Complement Fixation Tests (CF)

เซรัมที่ตรวจ	จำนวนกระบือที่ได้รับการฉีด LA virus ในขนาดต่าง ๆ กัน		ลบ f.t.	สงสัย f.t.	บวก f.t.			รวม
			๒๖ ถึง ๑๐	๑๑ ถึง ๒๐	๒๑ ถึง ๔๐	๔๑ ถึง ๗๐	๗๑ถึง ๑๐๐	
ก่อนวันฉีด	๑:๔๐	๓	๓	๐	๐	๐	๐	๓
	๑:๔,๐๐๐	๒	๒	๐	๐	๐	๐	๒
	๑:๔๐,๐๐๐	๒	๒	๐	๐	๐	๐	๒
	๑:๔๐๐,๐๐๐	๒	๒	๐	๐	๐	๐	๒
	ตัวยืน	๒	๑	๐	๐	๐	๑	
	รวม	๑๑	๑๐ (๙๐.๙%)				๑ (๙.๑%)	๑๑
หลังวันฉีด	๑:๔๐	๒	๐	๐	๐	๑	๑	
	๑:๔,๐๐๐	๑	๐	๐	๑	๐	๐	
	๑:๔๐,๐๐๐	๒	๐	๐	๐	๐	๒	
	๑:๔๐๐,๐๐๐	๒	๑	๐	๐	๑	๐	
			๑	๐	๐	๑	๐	
	รวม		๑ (๑๔.๓%)			๖ (๘๕.๗%)		

กระบือที่ได้รับการฉีด LA virus ๑:๔๐ และ ๑:๔,๐๐๐ อย่างละตัว ตายไปก่อนการทดลองสิ้นสุดลงด้วยสาเหตุอื่น

ตารางหมายเลข ๔ แสดงตัวอย่างการทำ Virus Neutralization Test (VN Test)

เซรัมที่ตรวจ		CF Antibody (f.t.)	ผลของ VN Test				Gader ของ VN
			ความเจือจางของไวรัสในส่วนผสม				
หมายเลข	ก่อน และ หลังวันฉีด LA virus		๑๐–๓	๑๐–๔	๑๐–๕	๑๐–๖	
Virus broth control	.....	.....		๑๐๐	๘๕	๐	.....
บ.–๑	ก่อนฉีด	๐	๑๐๐	๘๖	๘๕		–
บ.–๗	ก่อนฉีด	๐		๘๐	๕๖		–
บ.–๘	ก่อนฉีด	–๓	๑๐๐	๘๖	๘๘		–
ส.–๑	ก่อนฉีด	.....		๘๐	๖๔		–
ส.–๘	ก่อนฉีด	.....		๓๐	๒๓		–
ส.–๑๗	ก่อนฉีด	.....	๗๗	๗๘	๖๕		–
ส.–๒๒	ก่อนฉีด	.....	๘๕	๘๕	๕๗		–
บ.–๑	หลังฉีด	๖๖	๔๗	๐	๐		+ +
บ.–๗	หลังฉีด	๘๗	๓๒	๐	–๒		+ +
บ.–๘	หลังฉีด	๐		๖๐	๓๐		–
ส.–๑	หลังฉีด			๕	๐		+ +
ส.–๘	หลังฉีด		๘๗	๐	๐		+ +
ส.–๑๗	หลังฉีด		๓๖	๒๘	๐		+

ตัวเลขซึ่งแสดงผลของ VN Test คือ Titer ของ c.f. antigen ในลูกไก่ฟัก (หาได้โดย TRC) ซึ่งได้รับการฉีดด้วยส่วนผสมของไวรัส–เซรัม (Virus broth เป็นตัวยืน) เซรัมที่ตรวจหลังฉีด คือเซรัมหลังวันฉีด LA virus แล้ว ๓๐ วัน

ตารางหมายเลข ๕ แสดงผลของการฉีดพิษทับ และผลของ CF และ VN Tests ในสัตว์ทดลอง

ความเข้มข้นของ LA virus (๒ซี.ซี. ใต้ผิวหนัง)	สัตว์ทดลอง (สุกร)	น้ำหนักตัว (กก.)	ปฏิกริยาหลังฉีด LA virus	ผลของการตรวจความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา							ปฏิกริยาหลังฉีดพิษทับ
				CF antibody หลังฉีด					VN antibody		
				ก่อนฉีด	๗ วัน	๑๔ วัน	๒๑ วัน	๓๐ วัน	ก่อนฉีด	หลังฉีด	
๑:๔๐	ป.–๑	๒๓๐	ไม่มีอุณฯ สูงสุด ๑๐๓.๐° ฟ.	–๖	๐	๕	๘๘	๖๖	–	+ +	ไม่มี, อุณหฯ สูงสุด ๑๐๑.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ป.–๒	๒๐๔	...	๗	๒	...	...	...	–	...	
๑:๔๐	ป.–๓	๑๖๑	ไม่มี สูงสุด ๑๐๒.๘° ฟ.	–๕	๐	๕๘	๘๕	๗๔	–	+ +	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๒.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔,๐๐๐	ป.–๔	๑๐๐	ไข้สูงสุด ๑๐๒.๖° ฟ.	๐	๐	๓๗			–		
๑:๔,๐๐๐	ป.–๕	๑๘๖	ไม่มี สูงสุด ๑๐๒.๖° ฟ.	–๖	๕๓	๗๑	๘๗	๒๘	–	–	ไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ สูงสุด ๑๐๓.๖° ฟ.
๑.๔๐,๐๐๐	ป.–๖	๘๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๒.๘° ฟ.	–๑๑	๐	๗๒	๒	๐	–	–	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๔° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ป.–๗	๑๐๒	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๔° ฟ.	๐	๐	๐	๘๒	๘๗	–	+ +	ไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ สูงสุด ๑๐๓.๐° ฟ.
๑:๔๐๐,๐๐๐	ป.–๘	๒๔๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๖° ฟ.	–๓	–๖	๐	–๑๔	๐	–	–	เบี้นรินเดอร์-เปสต์อย่างเฉียบพลัน ตาย

ความเข้มข้นของ LA virus (๒ซี.ซี. ใต้ผิวหนัง)	สัตว์ทดลอง (กระบือ–สุกร)	น้ำหนักตัว (กก.)	ปฏิกริยาหลังฉีด	ผลของการตรวจความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา							ปฏิกริยาหลังฉีดพิษทับ
				CF antibody หลังฉีด					VN antibody		
				ก่อนฉีด	๗ วัน	๑๔ วัน	๒๑ วัน	๓๐ วัน	ก่อนฉีด	หลังฉีด	
๑:๔๐๐,๐๐๐	บ.–๙	๑๘๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๒.๘° ฟ.	๑	–๒๖	–๒๐	๕๕	–๑๓	–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๒.๖° ฟ. ไม่ตาย
ตัวยืน	บ.–๑๐	๑๕๖	...	๘๘	๖๘	๗๙	๘๙	๘๐	±	+	ไม่มี, ไข้สูงสุด ๑๐๒.๘° ฟ. ไม่ตาย
ตัวยืน	บ.–๑๑	๑๙๐	...	–๙	๕	๐	๐	๐	–	–	เบ็นรินเดอร์-เปสต์อย่างเฉียบพลัน ตาย
๑:๔๐	ส.–๑	๔๙.๐	มีไข้, สูงสุด ๑๐๕.๐° ฟ.						–	+ +	ไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ สูงสุด ๑๐๖.๒° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๒	๓๕.๐	มีไข้, สูงสุด ๑๐๕.๒° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๔.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๓	๒๘.๗	มีไข้, สูงสุด ๑๐๕.๘° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๔.๖° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๔	๓๖.๑	มีไข้, สูงสุด ๑๐๕.๖° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๕.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔,๐๐๐	ส.–๕	๓๔.๑	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๖° ฟ.						–	+ +	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๖° ฟ. ไม่ตาย

ความเข้มข้นของ LA virus (๒ซี.ซี. ใต้ผิวหนัง)	สัตว์ทดลอง (สุกร)	น้ำหนักตัว (กก.)	ปฏิกริยาหลังฉีด	ผลของการตรวจความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา							ปฏิกริยาหลังฉีดพิษทับ
				CF antibody หลังฉีด					VN antibody		
				ก่อนฉีด	๗ วัน	๑๔ วัน	๒๑ วัน	๓๐ วัน	ก่อนฉีด	หลังฉีด	
๑:๔,๐๐๐	ส.–๖	๒๒.๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๕.๒° ฟ.						–	+	มีไข้ขึ้นๆลงๆ สูงสุด ๑๐๕.๖° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔,๐๐๐	ส.–๗	๓๒.๗	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๘	๓๒.๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๐° ฟ.						–	+	ตายในวันฉีดพิษทับ
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๙	๓๖.๙	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๖° ฟ.						–	+ +	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๑๑	๔๗.๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๒° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๑๒	๕๒.๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๘° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๔° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๑๓	๓๘.๒	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๔° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๓.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๑๔	๔๔.๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๔.๔° ฟ. ไม่ตาย

ความเข้มข้นของ LA virus (๒ ซี.ซี. ใต้ผิวหนัง)	สัตว์ทดลอง (สุกร)	น้ำหนักตัว (กก.)	ปฏิกริยาหลังฉีด	ผลของการตรวจความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา							ปฏิกริยาหลังฉีดพิษทับ
				CF antibody หลังฉีด					VN antibody		
				ก่อนฉีด	๗ วัน	๑๔ วัน	๒๑ วัน	๓๐ วัน	ก่อนฉีด	หลังฉีด	
ตัวยืน	ส.–๑๐	๓๕.๕	...						–	+	เบ็นรินเดอร์-เปสต์ตาย
ตัวยืน	ส.–๑๕	๒๖.๗	...						–	–	มีไข้ ๑๐๖.๒° ฟ. หาย
ตัวยืน	ส.–๑๖	๓๘.๔	...						–	+	๑๐๕.๔° ฟ. หาย
๑:๔๐	ส.–๑๗	๒๗.๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ.						–	+	ไม่มี, สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๑๘	๓๘.๕	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๖° ฟ.						–	–	ไม่มี ๑๐๓.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๑๙	๓๓.๓	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๐° ฟ.						–	–	ไม่มี ๑๐๒.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐	ส.–๒๐	๔๒.๗	มีไข้เล็กน้อย ๑๐๔.๒° ฟ.						–	–	ไม่มี ๑๐๒.๘° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔,๐๐๐	ส.–๒๑	๖๗.๐	ไม่มี ๑๐๓.๔° ฟ.						–	–	ไม่มี ๑๐๓.๖° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔,๐๐๐	ส.–๒๒	๕๘.๔	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๒° ฟ.						–	+	ไม่มี ๑๐๓.๐° ฟ. ไม่ตาย

ความเข้มข้นของ LA virus (๒ ซี.ซี. ใต้ผิวหนัง)	สัตว์ทดลอง (สุกร)	น้ำหนักตัว (กก.)	ปฏิกริยาหลังฉีด	ผลของการตรวจความคุ้มโรคทางเซรัมวิทยา							ปฏิกริยาหลังฉีดพิษทับ
				CF antibody หลังฉีด					VN antibody		
				ก่อนฉีด	๗ วัน	๑๔ วัน	๒๑ วัน	๓๐ วัน	ก่อนฉีด	หลังฉีด	
๑:๔,๐๐๐	ส.–๒๓	๔๒.๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๔° ฟ.						–	+	ไม่มี ๑๐๓.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๒๔	๔๓.๑	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๒° ฟ.						–	–	เบื่ออาหาร หอบ ถ่ายเป็นเลือด ๑๐๕.๔° ฟ. ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๒๕	๓๗.๒	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๐° ฟ.						–	+	เบื่ออาหาร ๑๐๔.๐° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐,๐๐๐	ส.–๒๖	๓.๘๐	ไม่มี สูงสุด ๑๐๔.๐° ฟ.						–	–	ไม่มี ๑๐๓.๒° ฟ. ไม่ตาย
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๒๗	๓๗.๖	ไม่มี สูงสุด ๑๐๓.๖° ฟ.						–	+	มีไข้ขึ้นๆลงๆ เบื่ออาหาร หอบ ๑๐๔.๔° ฟ.
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๒๘	๔๐.๗	ไม่มี						–	+	เบื่ออาหาร ไม่ตาย
๑:๔๐๐,๐๐๐	ส.–๒๙	๓๘.๐	ไม่มี						–	–	ไม่ตาย
ตัวยืน	ส.–๓๐	๓๘.๒	...						–	–	ไม่ตาย
ตัวยืน	ส.–๓๑	๓๔.๖	...						–	–	ตาย
ตัวยืน	ส.–๓๒	๕๐.๐	...						–	–	ตาย

ตารางหมายเลข ๖ สรุปผลของการฉีด LA virus ในสัตว์ทดลองต่าง ๆ ภายหลังการฉีดพิษทับ

ขนาดต่าง ๆ ของ LA virus ที่ใช้ฉีด	ผลภายหลังการฉีดพิษทับในสัตว์ทดลองต่าง ๆ			
	ลูกไก่ฟัก	กระบือ	สุกรพันธุ์ผสม	สุกรพันธุ์พื้นเมือง
0.05 กรัมหรือเท่ากับ 2 cc. 1:40	ไม่ได้ฉีด	+ + ๐	+ + + +	+ + + +
0.05 cc. 1:10 = 2 cc. 1:400	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด
0.05 cc. 1:100 = 2 cc. 1:4,000	ไม่ได้ฉีด	+ ๐	+ + +	+ + +
0.05 cc. 1:1000 = 2 cc. 1:40,000	+	+ +	+ + ๐	+ + -
0.05 cc. 1:10,000=2 cc. 1:400,000	+	+ -	+ + +	+ + +
0.05cc.1:1,00,000=2cc.1:4,000,000	-	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด
0.05 cc. 1:1,000,000 หรือเท่ากับ 2 cc. 1:40,000,000	-	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด	ไม่ได้ฉีด

เครื่องหมาย + แทนจำนวนตัวสัตว์ทดลอง ซึ่งหมายความว่าเป็นโรค (ลูกไก่ฟัก) หรือมีความคุ้มโรค (กระบือ, สุกร)

— แทนจำนวนตัวสัตว์ทดลอง ซึ่งหมายความว่าไม่เป็นโรค หรือไม่มีความคุ้มโรค

๐ แทนจำนวนตัวสัตว์ทดลอง ซึ่งตายไปก่อนการทดลองสิ้นสุดลงด้วยสาเหตุอื่น