การคัดเลือกแอนติเจนสำหรับตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ปลอดเชื้อเฉพาะและไก่พื้นเมือง โดยวิธี Hemagglutination Inhibition (HI)

ชลดา ทองดี[1] ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์[2] เนตรกมล ยิ้มพิรัตน์[3] สุเทพ ทางดี[2]
วิลาสินี ท้าวเพชร[3] ฐิตวัฒน์ จันทวร[3]

บทคัดย่อ

โรคนิวคาสเซิลเกิดจากเชื้อไวรัส Avian paramyxovirus ซีโรไทป์ 1 (APMV-1) ชนิดรุนแรง เป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์ปีก ในไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายสูงถึง 100% ประเทศไทยมีการใช้วัคซีนนิวคาสเซิล สเตรน LaSota ชนิดเชื้อเป็น และประเมินระดับภูมิคุ้มกันหลังสัตว์ได้รับวัคซีนโดยวิธี HI ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์แต่ละแห่งเลือกใช้สเตรนของแอนติเจนนิวคาสเซิลที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาความแตกต่างของแอนติเจนแต่ละสเตรนที่ใช้ตรวจระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี HI ในไก่ Specific pathogen free (SPF) และ ไก่พื้นเมือง ในประเทศไทยยังมีข้อมูลน้อย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและคัดเลือกแอนติเจนจากไวรัสเชื้อตายสำหรับตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF และไก่พื้นเมือง เพื่อใช้เป็นแนวทางของห้องปฏิบัติการ ทำการเตรียมแอนติเจนเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน LaSota, VG/GA และ Queensland V4 ทำให้เชื้อตายด้วย Beta-propiolactone (BPL) จากนั้นตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล โดยวิธี HI ในตัวอย่างซีรัมไก่ SPF จำนวน 100 ตัวอย่างและซีรัมไก่พื้นเมืองจำนวน 116 ตัวอย่าง เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันที่ได้จากการตรวจด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกัน 3 สเตรน ด้วย Kruskal–Wallis test และเปรียบเทียบแต่ละคู่ด้วย Dunn's test เปรียบเทียบร้อยละของผลบวก โดยใช้ค่าแคปปา (Kappa statistic) จากผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF และไก่พื้นเมือง พบว่าสามารถเลือกใช้แอนติเจนทั้ง 3 สเตรนได้แก่ LaSota, Queensland V4, และ VG/GA ในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลด้วยวิธี HI ในซีรัมไก่ SPF ได้ ซึ่งระดับภูมิคุ้มกันของซีรัมไก่ SPF ที่เกิดขึ้นจากการใช้แอนติเจนทั้ง 3 สเตรน ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันของซีรัมไก่พื้นเมือง ได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยแอนติเจนสเตรน VG/GA (ค่ากลาง=$\log_2 8$) ให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าสเตรน LaSota และ Queensland V4 4 เท่า ดังนั้นในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี HI ในซีรัมไก่พื้นเมืองควรเลือกใช้แอนติเจนสเตรน LaSota และ Queensland V4

คำสำคัญ: นิวคาสเซิล ภูมิคุ้มกัน แอนติเจน ไก่ SPF ไก่พื้นเมือง

ทะเบียนวิชาการเลขที่ 65(2)-0116(4)-063

[1]สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดมหาสารคาม ตำบลแวงน่าง อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000
[2]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900
[3]ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ ตำบลปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30130

Antigen selection for Newcastle Disease Virus antibody titer detection in Specific Pathogen Free and native chicken serum by Hemagglutination Inhibition Test

Chonlada Thongdee[1] Nutthakarn Suwankitwat[2] Natekamol Yimpirat[3] Sutep Tangdee[2]
Wilasinee Thaopech[3] Thitawat Chanthaworn[3]

Abstract

Newcastle disease is caused by virulent strains of avian paramyxovirus type 1 (APMV-1). It is an important infectious disease in poultry that causes a 100% mortality rate in unvaccinated chicken. In Thailand, live LaSota strain of Newcastle disease virus (NDV) was used for vaccination in native chickens. To evaluate antibody response after the vaccination, different strains of NDV were used in the Hemagglutination Inhibition test (HI) by official laboratories. However, there were a few studies on the difference of strain antigens in the HI test for both SPF and native chickens in Thailand. The aim of this research was to study and select an antigen from inactivated virus for NDV antibody detection in SPF and native chicken serum. This data will be a guideline for the laboratories. Prepared inactivated LaSota, VG/GA, and Queensland V4 of NDV antigens using Beta-propiolactone. Then, evaluated antibody titer by HI test in 100 samples of SPF chicken serum and 116 samples of native chicken serum. The medians of HI titer from three different strains were compared by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test as the post hoc analysis. Percentages of positives were compared by kappa coefficient value. From the ND antibody detection by HI test in SPF and native chicken serum, we found that these three antigens including LaSota, VG/GA, and Queensland V4 were applicable for SPF chicken serum. Antibody titers in vaccinated SPF chickens tested by HI with these three antigens were not significantly different ($p>0.05$). In contrast, antibody titers in vaccinated native chickens were significantly different ($p<0.05$). VG/GA antigens (Median=$\log_2 8$) provided 4 times higher antibody titer compared to LaSota and Queensland V4 antigens. Thus, LaSota and Queensland V4 should be used for NDV antibody detection by HI test in native chickens.

Keywords: Newcastle disease, Antibody, Antigen, SPF chicken, Native chicken

---

Registered No.: 65(2)-0116(4)-063

[1]Mahasarakam Provincial Livestock Office, Wang Nang, Maeung, Maha Sarakham 44000

[2]National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

[3]Veterinary Biologics Assay and Research Center, Pakchong, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130

บทนำ

โรคนิวคาสเซิลเกิดจากเชื้อไวรัส Avian paramyxovirus ซีโรไทป์ 1 (APMV-1) ชนิดรุนแรง เป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์ปีก ทำให้มีอาการทางระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาทในไก่ โดยไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน มีอัตราการตายสูงถึง 100% (Getabalew et al., 2019) จึงสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก การป้องกันโรคสามารถทำได้โดยการใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่ได้รับวัคซีนโดยวิธี HI สามารถประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนได้

ประเทศไทยมีการใช้วัคซีนนิวคาสเซิล สเตรน LaSota ชนิดเชื้อเป็น และประเมินระดับภูมิคุ้มกันหลังสัตว์ได้รับวัคซีนโดยวิธี HI ทั้งนี้ ภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างสเตรนได้ (World Organization for Animal Health (OIE), 2021) ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจึงสามารถเลือกใช้แอนติเจนที่ต่างกันในการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน เช่น LaSota, Queensland V4, VG/GA และ Ishii (Bello et al., 2020; Olabode et al., 2010; Perozo et al., 2008; จำละครและคณะ 2004) เป็นต้น ซึ่งการเลือกไวรัสที่จะนำมาเป็นแอนติเจนต้องเป็นสเตรนที่ไม่รุนแรง (Getabalew et al., 2019) โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ใช้แอนติเจนนิวคาสเซิลสเตรน Queensland V4 เชื้อตาย ในการตรวจซีรัมไก่พื้นเมืองหลังได้รับวัคซีน ในขณะที่ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ (ศทวช.) ใช้แอนติเจนนิวคาสเซิลสเตรน VG/GA เชื้อเป็น ในการตรวจซีรัมไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ (Specific pathogen Free, SPF) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน โดยวัคซีนของกรมปศุสัตว์เป็นวัคซีนรวมนิวคาสเซิลสเตรน LaSota และหลอดลมอักเสบติดต่อ (ND/IB) ชนิดเชื้อเป็น จึงสามารถเตรียมแอนติเจนจากวัคซีนของกรมปศุสัตว์ได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการใช้แอนติเจนนิวคาสเซิลสเตรน LaSota ซึ่งเป็นสเตรนเดียวกับวัคซีน ทำให้ได้ระดับภูมิคุ้มกันที่สูงเกินความเป็นจริง (Maas et al., 1998) โดยงานวิจัยดังกล่าวใช้ไก่ทดลองเพียง 13 ตัวอย่าง และยังไม่มีการศึกษาเพิ่มเติม อีกทั้งการปฏิบัติงานกับไวรัสเชื้อเป็นมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะในการครอบครองเชื้อ นอกจากนี้ไวรัสเชื้อเป็นสเตรน VG/GA ที่ทางศทวช. ใช้อยู่ เป็นเชื้อที่ได้มาจากหน่วยงานเอกชนอย่างไม่เป็นทางการ จึงไม่ทราบแหล่งที่มาอย่างชัดเจน และไม่สามารถจัดส่งเชื้อให้แก่หน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นหากสามารถใช้ไวรัสเชื้อตาย จะช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวและสะดวกในทางปฏิบัติมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแอนติเจนสำหรับตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ SPF และไก่พื้นเมือง เพื่อใช้เป็นแนวทางของห้องปฏิบัติการต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แอนติเจน

เตรียมเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลชนิดเชื้อเป็นจำนวน 3 สเตรนได้แก่ 1. LaSota ซึ่งเป็นวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) 2. VG/GA ซึ่งเป็นวัคซีนของบริษัทเอกชน 3. Queensland V4 ที่สสช.ผลิตเองโดยมีแหล่งที่มาจาก Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) ประเทศออสเตรเลีย ปริมาตร 1 mL ต่อสเตรน เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C จากนั้นเพิ่มจำนวนไวรัสทั้ง 3 สเตรน

ในไข่ไก่ฟัก SPF อายุ 9-11 วัน จำนวน 5 ฟองต่อสเตรน โดยฉีดเชื้อ 0.1 mL ลงไปใน chorioallantoic cavity และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 วันจึงเก็บ chorioallantoic fluid (CAF) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน เตรียมแอนติเจนนิวคาสเซิลชนิดเชื้อตายด้วย BPL โดยผสมกับเชื้อไวรัสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1% จากนั้นใช้ magnetic stirrer ในการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจากวิธีของ Prescott DM 1975) จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อ โดยนำแอนติเจนเชื้อตายทั้ง 3 สเตรนฉีดลงไข่ไก่ฟักจำนวน 3 passages และตรวจหาปริมาณไวรัสนิวคาสเซิลโดยวิธี Hemagglutination test (HA test)

ตัวอย่างซีรัมไก่

กลุ่มทดลองที่ 1 คือ ซีรัมไก่ SPF ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศทวช. แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ 1.1 ไก่ที่ได้รับวัคซีนรวมND/IB ของกรมปศุสัตว์ จำนวน 70 ตัวอย่าง และ 1.2 ไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน จำนวน 30 ตัวอย่าง

กลุ่มทดลองที่ 2 คือ ซีรัมไก่พื้นเมือง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ 2.1 ไก่ที่ได้รับวัคซีนรวม ND/IB ของกรมปศุสัตว์ จำนวน 96 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการติดตามประสิทธิภาพการใช้วัคซีนรวมนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรน LaSota และหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก สสช. และ 2.2 ไก่พื้นเมืองที่ไม่ได้รับวัคซีน จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานปศุสัตว์อำเภอโกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

โดยซีรัมไก่ที่ใช้สำหรับการทดสอบมีปริมาตร 400 µl ต่อตัวอย่าง และทุกการทดสอบมีซีรัมควบคุมบวกที่มีค่า HI titer เท่ากับ $\log_2 7$ (1:128) และซีรัมควบคุมลบ ที่มีค่า HI titer น้อยกว่าหรือเท่ากับ $\log_2 2$ (1:4) การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติให้ใช้สัตว์ทดลองโดย คณะกรรมการบริหารจัดการการใช้สัตว์ทดลอง ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ เลขที่ ศวทช. 1/64

Hemagglutination (HA) test

ตรวจตามวิธีมาตรฐานของ OIE (2021) โดยเจือจางแอนติเจนทั้ง 3 สเตรนด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ครั้งละ 2 เท่าเป็นลำดับในไมโครเพลท เริ่มจาก 2^{-1} ถึง 2^{-11} จากนั้นนำมาทดสอบ HA test โดยใช้เม็ดเลือดแดงของไก่ SPF (cRBC) ความเข้มข้น 1% เมื่อได้ปริมาณแอนติเจนแล้ว จึงทดสอบ back titration และ เตรียม working antigen ที่ 4HA Unit

Hemagglutination inhibition test (HI test)

ตรวจตามวิธีมาตรฐานของ OIE (2021) โดยเจือจางซีรัมด้วย PBS ครั้งละ 2 เท่าเป็นลำดับในไมโครเพลท เริ่มจาก 2^{-1} ถึง 2^{-11} ให้ได้ปริมาตรหลุมละ 25 µl เว้นหลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุมเติม PBS ปริมาตร 50 µl จากนั้นเติม working antigen ปริมาตร 25 µl ยกเว้นหลุมควบคุม และบ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเติม 1% cRBC ปริมาตร 25 µl ทุกหลุม และบ่มอีก 40 นาที และอ่านผลการทดสอบ โดยถ้าค่าระดับภูมิคุ้มกันที่มากกว่าหรือเท่ากับ $\log_2 4$ (1:16) ถือว่ามีค่าเป็นบวก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ระดับภูมิคุ้มกันที่ได้จะถูกแปลงให้อยู่ในรูป $\log_2$ จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณาด้วยค่ามัธยฐาน และ Interquartile range (IQR) ทำการเปรียบเทียบค่ากลางของระดับภูมิคุ้มกันต่อ

เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ที่เกิดขึ้นจากการใช้แอนติเจน 3 สเตรน ได้แก่ LaSota, Queensland V4, และ VG/GA โดยใช้วิธี Kruskal–Wallis test (Kruskal and Wallis, 1952) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แล้วทำการทดสอบหาค่าความแตกต่างแต่ละคู่ด้วย Dunn's test (Dinno, 2015) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel (Real Statistic) และสร้างกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 9.3.1 หาสัดส่วนของซีรัมที่มีค่าระดับภูมิคุ้มกันเป็นผลบวกต่อจำนวนซีรัมทั้งหมด โดยค่าระดับภูมิคุ้มกันที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1:16 คือผลบวก และหาความสอดคล้องของการแปรผลบวกจากการใช้แอนติเจนทั้ง 3 สเตรน ด้วยสถิติแคปปา โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23 แปรผลขนาดความสอดคล้อง (Strength of agreement) ดังนี้ ค่าแคปปา <0.00 คือ แย่, 0.00-0.20 คือ น้อย, 0.21-0.40 คือ พอใช้, 0.41-0.60 คือ ปานกลาง, 0.61-0.80 คือ ดี, 0.81-1.00 คือ ดีมาก

ผลการศึกษา

ระดับไตเตอร์ของแอนติเจน (HA titer)

เชื้อไวรัสนิวคาสเซิลชนิดเชื้อเป็น สเตรน LaSota, VG/GA, และ Queensland V4 มี HA titer ตั้งต้นเท่ากับ 8, 9, และ 8 ตามลำดับ เมื่อนำมาเชื้อไวรัสดังกล่าวมาทำให้หมดฤทธิ์ด้วย BPL ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% พบว่าผลการตรวจ HA titer ของแอนติเจนทั้ง 3 สเตรน มีระดับลดลง 1 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งนำมาเตรียมให้ได้ 4 HA Units เพื่อใช้ในการทดสอบโดยวิธี HI ต่อไป

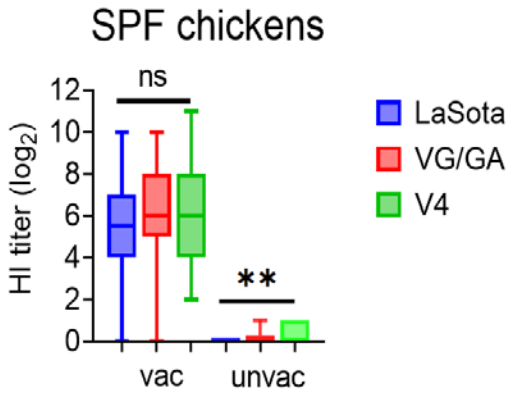
ตารางที่ 1 ค่า HA titer ของ แอนติเจนเชื้อตายของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล สเตรน LaSota VG/GA และ Queensland V4

สเตรนของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล	ระดับไตเตอร์ของแอนติเจน (log_2)	
	เชื้อเป็น	เชื้อตาย
LaSota	8	7
VG/GA	9	8
Queensland V4	8	7

ระดับภูมิคุ้มกัน

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF ที่ได้รับวัคซีน จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยใช้แอนติเจน LaSota, VG/GA, และ Queensland V4 ได้ค่ามัธยฐาน (IQR) เท่ากับ 6(3), 6(2.75), และ 6(2.75) ตามลำดับ และจากสถิติ Dunn’s test ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันในไก่ SPF ที่ไม่ได้รับวัคซีน ได้ค่ามัธยฐานเท่ากับ 0 ทั้งสามกลุ่ม และจากสถิติ Dunn’s test พบว่าระดับภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการใช้แอนติเจนสเตรน LaSota มีความแตกต่างจากการใช้แอนติเจนสเตรน VG/GA และ Queensland V4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 1 และตารางที่ 2) ซึ่งเกิดจากระดับภูมิคุ้มกันจากการใช้แอนติเจนสเตรน LaSota เป็น 0 ทุกตัวอย่าง ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันจากกลุ่ม VG/GA และ Queensland V4 อยู่ระหว่าง 0-1 เมื่อวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันเชิงคุณภาพของซีรัมไก่ SPF กลุ่มที่ได้รับวัคซีน พบว่าให้ผลบวกระหว่าง 80-88.57% โดยมีค่าแคปปา ระหว่าง LaSota กับ VG/GA

เท่ากับ 0.68, ระหว่าง LaSota กับ Queensland V4 เท่ากับ 0.74 และระหว่าง VG/GA กับ Queensland V4 เท่ากับ 0.93 ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันเชิงคุณภาพของไก่ SPF กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนให้ผลลบทั้งหมด



รูปที่ 1 ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF ที่ได้รับวัคซีน (vac) จำนวน 70 ตัวและไม่ได้รับวัคซีน (unvac) จำนวน 30 ตัว โดยเปรียบเทียบการใช้แอนติเจน 3 สเตรน (ns ; p=0.30, **p=0.0034)

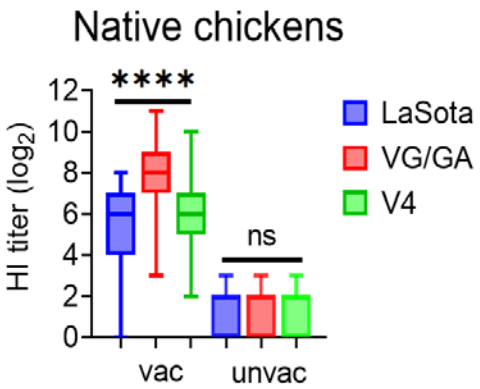
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF จากการตรวจด้วยแอนติเจน 3 สเตรน โดยวิธี HI

	ค่ามัธยฐาน (IQR) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (log_2)			ร้อยละของผลบวก (ตัวอย่างให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)		
	LaSota	VG/GA	Queensland V4	LaSota	VG/GA	Queensland V4
กลุ่มทำวัคซีน (n=70)	6 (3)[a]	6 (2.75)[a]	6 (3.75)[a]	80 (56/70)	88.57 (62/70)	87.14 (61/70)
กลุ่มไม่ทำวัคซีน (n=30)	0 (0)[ab]	0 (0)[a]	0 (1)[a]	0	0	0

ค่ามัธยฐาน (IQR) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันของตัวแปร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และค่ามัธยฐาน (IQR) มีตัวอักษรแตกต่างกันของตัวแปร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

จากการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีนจำนวน 96 ตัวอย่าง พบว่าค่ามัธยฐานของระดับภูมิคุ้มกันจากการตรวจด้วยแอนติเจน LaSota, VG/GA, และ Queensland V4 ได้ค่ามัธยฐาน (IQR) เท่ากับ 6(3), 8(2), และ 6(2) ตามลำดับ จากสถิติ Dunn's test พบว่าสเตรน VG/GA ให้ค่าระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างจากสเตรน LaSota และ Queensland V4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งสเตรน VG/GA ให้ค่าระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าสเตรน LaSota และ Queensland V4 2 log_2 หรือ 4 เท่า (รูปที่ 2 และตารางที่ 3) เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพ พบว่าในไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีน เมื่อใช้

แอนติเจนสเตรน VG/GA ในการตรวจ ให้ผลบวกสูงถึง 96.88% (93/96) ในขณะที่แอนติเจน LaSota และ Queensland V4 ให้ผลบวก 81.25% (78/96) และ 83.33% (80/96) ตามลำดับ โดยมีค่าแคปปา ระหว่าง LaSota กับ VG/GA เท่ากับ 0.24, ระหว่าง LaSota กับ Queensland V4 เท่ากับ 0.71, และระหว่าง VG/GA กับ Queensland V4 เท่ากับ 0.16 ในขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันของไก่พื้นเมือง กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ให้ผลลบทั้งหมด



รูปที่ 2 ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีน (vac) จำนวน 96 ตัว และไม่ได้รับวัคซีน (unvac) จำนวน 20 ตัว โดยเปรียบเทียบการใช้แอนติเจน 3 สเตรน (****$p<0.0001$, ns ; $p=0.083$)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันในซีรัมไก่พื้นเมือง จากการใช้แอนติเจน 3 สเตรน

	ค่ามัธยฐาน (IQR) ของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (log_2)			ร้อยละของผลบวก (ตัวอย่างให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)		
	LaSota	VG/GA	Queensland V4	LaSota	VG/GA	Queensland V4
กลุ่มทำวัคซีน (n=96)	6 (3)[a]	8 (2)[ab]	6 (2)[a]	81.25 (78/96)	96.88 (93/96)	83.33 (80/96)
กลุ่มไม่ทำวัคซีน (n=20)	2 (2)[a]	2 (2)[a]	2 (2)[a]	0	0	0

ค่ามัธยฐาน (IQR) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันของตัวแปร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และค่ามัธยฐาน (IQR) มีตัวอักษรแตกต่างกันของตัวแปร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

วิจารณ์

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคที่สำคัญในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก และเป็นโรคที่ทำให้เกิดการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างมหาศาล (Dzogbema et al., 2021) ประเทศไทยได้รับรองสถานภาพปลอดโรคในปี พ.ศ. 2542 โดยกรมปศุสัตว์มีการรณรงค์ทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองทั่วประเทศ ซึ่งจำเป็นต้องมีการประเมินระดับภูมิคุ้มกันหลังจากไก่ได้รับวัคซีนเป็นประจำทุกปี เพื่อให้ทราบสถานะของภูมิคุ้มกันระดับฝูง ปัจจุบันการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลสามารถใช้วิธี ELISA และ HI โดย OIE แนะนำให้ใช้วิธี HI ในการตรวจซีรัมสัตว์หลังได้รับวัคซีน (OIE, 2021) และยังเหมาะในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากมีราคาถูกและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

การใช้แอนติเจนในการทดสอบ HI สามารถใช้ได้ทั้งไวรัสเชื้อเป็นและเชื้อตาย แต่การใช้ไวรัสเชื้อเป็นนั้นมีข้อเสียหลายประการ เช่น การแพร่ระบาดของเชื้อ การจัดเก็บและขนส่งเชื้อ และการปนเปื้อนไปยังงานอื่นๆ (Beard et al., 1975) ดังนั้นห้องปฏิบัติการมักเลือกใช้แอนติเจนชนิดเชื้อตายในการทดสอบ เนื่องจากสะดวกในการปฏิบัติงานและมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้แอนติเจนชนิดเชื้อเป็น โดยการศึกษานี้เลือกใช้ BPL ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์เพื่อผลิตวัคซีน เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของแอนติเจนเสียหาย ซึ่งมักใช้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.025% แต่ไม่เกิน 0.1% เนื่องจาก BPL ที่ความเข้มข้น 0.025% สามารถทำลายเชื้อใน allantoic fluid ได้ แต่ไม่เพียงพอในการทำลายเชื้อในซีรัม และหากใช้ความเข้มข้นมากกว่า 0.1% จะทำให้อนุภาคของไวรัสเกาะกลุ่มกัน ทำให้ลดการแสดงออกของ epitope จึงส่งผลต่อคุณสมบัติของแอนติเจนได้ (Gupta et al., 2021; Herrera-Rodriguez et al., 2019; King, 1991) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ แอนติเจนทั้งสามสเตรนมี HA titer ลดลง 1 $\log_2$ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการใช้ BPL 0.1% อาจส่งผลให้ HA titer ลดลงได้ (Beard et al., 1975)

สเตรนของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดสอบนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ หลายการศึกษานิยมใช้แอนติเจนสเตรนเดียวกับที่ใช้ในการทำวัคซีน (Albarrak et al., 2021; Brujeni et al., 2019; Sarker et al., 2017) อย่างไรก็ตามแม้ว่าวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลของกรมปศุสัตว์จะผลิตจากสเตรน LaSota แต่ห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ส่วนใหญ่ใช้แอนติเจนสเตรน Queensland V4 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ACDP ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่าให้ผลเทียบเท่ากับการใช้แอนติเจนสเตรน LaSota ในการตรวจซีรัมไก่ SPF และ ไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีน (ภาพที่ 1 และ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (ไม่ได้ตีพิมพ์) และจากค่าแคปปา ของทั้งสามคู่ทดสอบในซีรัมไก่ SPF มีค่ามากกว่า 0.6 ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันมาก (Landis and Koch, 1977) อย่างไรก็ตามซีรัมของไก่ SPF ที่ไม่ได้รับวัคซีนมีระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างกันเมื่อใช้แอนติเจนที่ต่างกันในการทดสอบ ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยของแอนติเจน เช่น ความบริสุทธิ์ไม่มากพอ ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (non-specific reaction) ก่อให้เกิดผลบวกลวง หรืออาจเกิดจากความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ (uncertainty) ซึ่งโดยทั่วไปผลการทดสอบอาจคลาดเคลื่อนได้ 2SD (OIE, 2014) หรือเทียบเท่ากับ 1$\log_2$ โดยความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อข้อมูลเชิงคุณภาพที่ได้ผลเป็นลบทั้งหมด สำหรับผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันในไก่พื้นเมืองที่ได้รับวัคซีนด้วยแอนติเจนสเตรน VG/GA ได้ค่าสูงกว่าการตรวจด้วยแอนติเจนสเตรน LaSota และ

Queensland V4 นั้น (ภาพที่ 2 และ ตารางที่ 3) เป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่ไก่ได้รับวัคซีนสเตรน VG/GA ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maas et al. (1998) ที่พบว่าการใช้แอนติเจนสเตรนเดียวกับวัคซีนจะให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงเกินความเป็นจริง และการศึกษาของ Glisson et al. (1990) ที่พบว่าการใช้วัคซีนสเตรน VG/GA จะให้ค่าระดับภูมิคุ้มกันที่สูง นอกจากนี้เชื้อไวรัสสเตรน VG/GA มีความแตกต่างกับสเตรน LaSota ในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (Perozo et al., 2008) รวมถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสัตว์สามารถส่งผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับวัคซีนแตกต่างกันได้ (Peleg et al., 1976) จากการคำนวณค่าแคปปาของการแปรผลผลบวกจากการใช้แอนติเจน LaSota เปรียบเทียบกับ Queensland V4 พบว่ามีค่าสูงถึง 0.714 ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันมาก ในทางตรงข้าม เมื่อเปรียบเทียบผลบวกจากการใช้แอนติเจน 2 สเตรนดังกล่าวกับ VG/GA พบว่าได้ค่าน้อยกว่า 0.4 ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันเพียงเล็กน้อย (Landis and Koch, 1977) ส่วนไก่พื้นเมืองที่ไม่ได้รับวัคซีนมีค่าระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ยเท่ากับ 2 อาจเกิดจากการได้รับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่บางส่วน (Pitcovski et al., 2017)

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเตรียมแอนติเจนของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลสเตรน LaSota, VG/GA, และ Queensland V4 สามารถใช้ BPL เข้มข้น 0.1% ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์อย่างสมบูรณ์ โดยที่ระดับแอนติเจนยังคงสูงมากพอสำหรับนำไปทดสอบต่อด้วยวิธี HI การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลในซีรัมไก่ SPF และไก่พื้นเมือง สามารถเลือกใช้แอนติเจนทั้ง 3 สเตรนได้แก่ LaSota, Queensland V4, และ VG/GA ในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลด้วยวิธี HI ในซีรัมไก่ SPF ได้ และในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี HI ในซีรัมไก่พื้นเมืองควรเลือกใช้แอนติเจนสเตรน LaSota และ Queensland V4 เมื่อคำนึงถึงปัจจัยด้านอื่นๆ เช่น แหล่งที่มาของเชื้อ ความสะดวกในทางปฏิบัติ และการทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการ พบว่าแอนติเจน Queensland V4 มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสสช.มีการผลิตเป็นแอนติเจนอ้างอิงสำหรับแจกจ่ายหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ทั่วประเทศ และสามารถช่วยลดข้อจำกัดด้านการครอบครองเชื้อ และการจัดส่งเชื้อให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการได้ ทั้งนี้ ในการแปลผลระดับภูมิคุ้มกันของไก่พื้นเมือง ควรทราบประวัติการใช้วัคซีนในพื้นที่ร่วมด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายไวรัสและฝ่ายสัตว์ทดลองของศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ สำหรับการให้ความช่วยเหลือในการทดสอบตัวอย่าง ปศุสัตว์อำเภอโกสุมพิสัย สำหรับตัวอย่างซีรัมไก่พื้นเมืองกลุ่มควบคุม สัตวแพทย์หญิง ดร. อรพรรณ อาจคำภา นายสัตวแพทย์ชำนาญการ สำหรับคำแนะนำด้านการเขียนงานวิจัย นอกจากนี้ ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์บัณฑิต นวลศรีฉาย นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ นายสัตวแพทย์ฐปณัฐ สงคสุภา นายสัตวแพทย์ชำนาญการ สัตวแพทย์หญิงใกล้รุ่ง ทนสระน้อย นายสัตวแพทย์ชำนาญการ และนางสาวละมูล โม้ลี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ สำหรับคำแนะนำเรื่องการแปลผลและวิเคราะห์ผลการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

วัฒนศักดิ์ จำละคร อนิรุธ เนื่องเม็ก อัจจิมา คล้ายหงษ์. (2004). การเปรียบเทียบผลการตรวจแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิลในนกกระจอกเทศโดยวิธีบล็อกกิ้ง อีไลซ่า และฮีแมกกลูติเนชั่น อินฮิบิชั่น. *ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตว์ภาคเหนือตอนล่าง*, *2*(5), 1–8.

Albarrak, S. M., Alharbi, Y. M., Abo-aziza, F. A. M., Almundarij, T. I., & Zaki, A. K. A. (2021). *Evaluation of Two Routes of Delivery 0f Live Lasota and Avinew (VG / GA) Newcastle Disease Virus Vaccines on Immune Response of Ross Broilers Chicken*. *12*(3), 852–864.

Beard, C. W., Hopkin, S. R., & Hammond, J. (1975). Preparation of Newcastle Disease Virus Hemagglutination-Inhibition Test Antigen. *Avian Diseases*, *19*(4), 692–699.

Bello, M. B., Nor, S., Mahamud, A., Yuso, K., & Ideris, A. (2020). *Development of an Effective and Stable Genotype-Matched Live Attenuated Newcastle Disease Virus Vaccine Based on a Novel Naturally Recombinant Malaysian Isolate Using Reverse Genetics*. *8*(2), 1–17.

Brujeni, G. N., Hassanzadeh, M., Al-Karagoly, H., Tolouei, T., & Esmailnejad, A. (2019). Evaluation of humoral immune responses to enterotropic lentogenic VG/GA vaccine of Newcastle disease in commercial turkey poults (Meleagris gallopavo). *Acta Veterinaria Scandinavica*, *61*(1), 1–6.

Dinno, A. (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *Stata Journal*, *15*(1), 292–300.

Dzogbema, K. F.-X., Talaki, E., Batawui, K. B., & Dao, B. B. (2021). Review on Newcastle disease in poultry. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *15*(2), 773–789.

Getabalew, M., Alemneh, T., Akeberegn, D., Getahun, D., & Zewdie, D. (2019). Epidemiology, Diagnosis & Prevention of Newcastle Disease in Poultry. *American Journal of Biomedical Science & Research*, *3*(1), 50–59.

Glisson, J., Villegas, P., Dufour, L., Christensen, L., & Page, D. (1990). Characterization pf VG/GA Newcastle Disease virus as a vaccine candidate. *In Proceedings of the 25th National Meeting on Poultry Health and Condemnations*, 59.

Gupta, D., Parthasarathy, H., Sah, V., Tandel, D., Vedagiri, D., Reddy, S., & Harshan, K. H. (2021). Inactivation of SARS-CoV-2 by β-propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential. *Virus Research*, *305*(September), 1–8.

Herrera-Rodriguez, J., Signorazzi, A., Holtrop, M., de Vries-Idema, J., & Huckriede, A. (2019). Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza

virions to optimize vaccine production. *Vaccine*, *37*(12), 1630–1637.

Jagt, H. J. M., Bekkers, M. L. E., van Bommel, S. A. J. T., van der Marel, P., & Schrier, C. C. (2010). The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals*, *38*(1), 128–134.

King, D. J. (1991). Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases*, *35*(3), 505–514.

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, *47*(260), 583–621.

Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement fot Categorical Data. *Biometrics*, *33*(1), 159–174.

Maas, R. A., Oei, H. L., Kemper, S., Koch, G., & Visser, L. (1998). The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or Clone30 leads to an over estimation of protective serum antibody titres. *Avian Pathology*, *27*(6), 625–631.

Olabode, A. O., Ndako, J. A., Echeonwu, G. O. N., Nwankiti, O. O., & Chukwuedo, A. A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV 4 vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virology Journal*, *67*(7), 1–5.

Peleg, B. A., Soller, M., Ron, N., Hornstein, K., Brody, T., & Kalmar, E. (1976). Familial differences in antibody response of broiler chickens to vaccination with attenuated and inactivated Newcastle disease virus vaccine. *Avian Diseases*, *20*(4), 661–668.

Perozo, F., Villegas, P., Dolz, R., Afonso, C. L., & Purvis, L. B. (2008). The VG/GA strain of Newcastle disease virus: Mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathology*, *37*(3), 237–245.

Pitcovski, J., Pitcovski, E., Goldenberg, D., & Shahar, E. (2017). Pair-epitopes vaccination: enabling offspring vaccination in the presence of maternal antibodies. *Avian Pathology*, *46*(6), 581–584.

Prescott, D. (1975). *Methods in cell biology*. Academic Press.

Sarker, R. D., Giasuddin, M., Chowdhury, E. H., & Islam, M. R. (2017). Serological and virological surveillance of avian influenza virus in domestic ducks of the north-east region of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 1–10.

Sprabrow, P., & Samuel, J. (1991). Oral Newcastle disease vaccination with V4 virus in chickens : comparison with other routes The determination of the level of

Eperythrozoon ovis parasitaemia in chronically infected sheep and its significance to the spread of infection. *Australian Veterinary Journal*, *68*(3), 114–115.

World Organization for Animal Health (OIE). (2014). *Measurement Uncertainty*. Available online : https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00324-X, Accessed on 10 December 2021.

World Organization for Animal Health (OIE). (2021). *Chapter 3.3.14. Newcastle disease (Infection with Newcastle disease virus), version adopted in May 2021.* Available online : https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf, Accessed on 2 June 2021.

Zhao, F., Liu, L., Xu, M., Shu, X., Zheng, L., & Wei, Z. (2020). Assessments of different inactivating reagents in formulating transmissible gastroenteritis virus vaccine. *Virology Journal*, *17*(1), 1–9.