ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่เตรียมขึ้นจากซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ในการป้องกันการติดเชื้อของอวัยวะภายในและการแพร่เชื้อผ่านไข่ในไก่ไข่

นางสาวสุรีรัตน์ หนูมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์
ปีการศึกษา 2547
ISBN: 974-17-7084-7
ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICACY OF THE EXPERIMENTAL *Salmonella* Enteritidis OIL-EMULSION BACTERIN IN PREVENTING SYSTEMIC INFECTION AND VERTICAL TRANSMISSION IN LAYING HENS

Miss Sureerat Numee

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Avian Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic year 2004

ISBN: 974-17-7084-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่เตรียมขึ้นจาก ซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ในการป้องกันการติดเชื้อของอวัยวะภายใน และการแพร่เชื้อผ่านไข่ในไก่ไข่
โดย	นางสาวสุรีรัตน์ หนูมี
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตว์ปีก
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง อินทิรา กระหม่อมทอง

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

……..คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

……..อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง อินทิรา กระหม่อมทอง)

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ)

……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรีรัตน์ หนูมี : ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่เตรียมขึ้นจากซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ในการป้องกันการติดเชื้อของอวัยวะภายใน และการแพร่เชื้อผ่านไข่ในไก่ไข่ (EFFICACY OF THE EXPERIMENTAL *Salmonella* Enteritidis OIL-EMULSION BACTERIN IN PREVENTING SYSTEMIC INFECTION AND VERTICAL TRANSMISSION IN LAYING HENS) อ.ที่ปรึกษา : ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.สพ.ญ อินทิรา กระหม่อมทอง จำนวน 77 หน้า. ISBN : 974-17-7084-7

ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมัน ที่เตรียมขึ้นจากซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส (EXBAC) ในการป้องกันการติดเชื้อของอวัยวะภายในและการแพร่เชื้อผ่านไข่ในไก่ไข่ แบ่งการทดลองออกเป็นสองการทดลอง ในการทดลองแรก เมื่อไก่อายุ 4 สัปดาห์ แบ่งไก่ออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 20 ตัว ให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ โดยไก่กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า (COMBAC) และได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น (EXBAC) ตามลำดับ เมื่อไก่อายุ 8 สัปดาห์ ป้อนเชื้อพิษทับด้วยเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในการผลิตวัคซีน แก่ไก่ทุกตัว ความเข้มข้น $1.5x10^6$ colony forming unit (cfu.) ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นกับกลุ่มควบคุม จากตัวอย่างม้ามและไส้ตัน สำหรับการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่าไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าไก่ทดลองทุกกลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่อายุ 6 และ 8 สัปดาห์ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างไก่ในกลุ่มดังกล่าวกับไก่ในกลุ่มที่ 4 ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น ในการทดลองที่สอง แบ่งไก่ทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 20 ตัว ไก่กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 และ 3 ให้วัคซีนเพื่อการค้า ที่อายุ 8 สัปดาห์ ครั้งเดียว และให้สองครั้งที่อายุ 8 กับ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 และ 5 ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้น ที่อายุ 8 สัปดาห์ ครั้งเดียว และให้สองครั้งที่อายุ 8 กับ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่ออายุ 23 สัปดาห์ ป้อนเชื้อพิษทับแก่ไก่ทดลองทุกตัว ความเข้มข้น $2x10^8$ cfu. ผลการเพาะเชื้อ *S.* Enteritidis ในไส้ตันของไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน พบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจพบเชื้อน้อยกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการเพาะเชื้อจากเปลือกไข่ และ ถุงไข่แดง ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่า ไก่ที่ได้รับวัคซีน เพื่อการค้าและไก่ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น มีระดับแอนติบอดีที่สูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีนจนสิ้นสุดการทดลอง และไม่พบความแตกต่าง ของระดับแอนติบอดีระหว่างไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าและไก่ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์ปีก	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4575576131 : MAJOR AVIAN MEDICINE

KEYWORDS : BACTERIN / *SALMONELLA* ENTERITIDIS / CHICKEN

SUREERAT NUMEE : EFFICACY OF THE EXPERIMENTAL *Salmonella* Enteritidis OIL-EMULSION BACTERIN IN PREVENTING SYSTEMIC INFECTION AND VERTICAL TRANSMISSION IN LAYING HENS. THESIS ADVISOR : PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. INTIRA GRAMOMTHONG. 77 pp. ISBN: 974-17-7084-7

An experimental *Salmonella* Enteritidis (SE) oil emulsion bacterin (EXBAC) were prepared and tested for its efficacy in preventing systemic infection and vertical transmission in laying hens. Two experiments were conducted. Bacterin was vaccinated subcutaneously at the nape of the neck. The first experiment, chickens were divided into 4 groups, 20 birds of each at 4-week-old. Groups 1 and 2 were served as controls. Groups 3 and 4 were vaccinated with commercial vaccine (COMBAC) and EXBAC, respectively. All chickens were challenged at 8-week-old with broth containing $1.5x10^6$ colony forming unit (cfu.) of nalidixic acid resistance SE (nalSE) by oral drop. The results revealed that rate of nalSE isolated from spleens and ceca of both vaccinated groups were significantly lower than the controls ($p<0.05$). Antibody against SE performed by ELISA shown that the COMVAC group had significantly higher response than other group at 6 and 8-week-old ($p<0.05$). No differences were observed on isolation rate and antibody response between vaccinated groups. In the second experiment, chickens were divided into 5 groups, 20 birds of each: group 1 served as a control, groups 2 and 3 were vaccinated with COMVAC at 8-week-old and 8 and 12-week-old, respectively, groups 4 and 5 were vaccinated with EXBAC at 8-week-old and 8 and 12-week-old, respectively. All hens were challenged with broth containing $2x10^8$ cfu of nalSE by oral drop at 23-week-old. The results revealed that rate of nalSE isolated from ceca of all vaccinated groups were lower than control group. The rate of nalSE isolated from shell and yolk membrane were very low and not significantly difference between groups. Antibody against SE of the COMVAC and EXBAC groups were significantly higher than control group 2 weeks postvaccination til the end of the experiment. There were no differences observed on antibody response among vaccinated groups.

Department Veterinary Medicine	Student's signature……..
Field of Avian Medicine	Advisor's signature……
Academic year 2004	Co- advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์และมีค่ายิ่งต่อวิทยานิพนธ์และการทำงานของข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.อินทิรา กระหม่อมทอง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในขั้นตอนของการตรวจเชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.อัจฉรา ธวัชสิน และ ผศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย ที่กรุณาในการให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์เพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ ปีการศึกษา 2547 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ ประจำหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน อีกทั้งขอขอบคุณคนงานเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชา อายุรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (ภายใต้ความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์บางส่วนในการทำการทดลองโดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.น.สพ.ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และ คุณมณฑล เลิศวรปรีชา ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือด้วยดีทุกครั้ง

ขอขอบพระคุณ ผศ.สพ.ญ.กัลยา เจือจันทร์ น.สพ.กาญจน์ เชื้อศิริ และน.สพ.จาตุรงค์ กสิพันธุ์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับข้อมูลในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนและนิสิตปริญญาโท หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณนางสาวมยุรี ศรีวิเลิศ นางสาวพจนีย์ นาคะ และนางสาวชื่นชีวัน ชนินทร์อารักษ์ เพื่อนรักที่คอยรับฟังปัญหา และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ พี่ชาย พี่สะใภ้ ที่ให้ความรักความปรารถนาดี คอยห่วงใย เป็นกำลังใจ อีกทั้งยังเป็นที่ปรึกษาและเป็นแรงผลักดันที่สำคัญให้มีความตั้งใจและความอดทนในการทำงาน จนสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

ขออุทิศความดีที่จะได้จากงานวิจัยครั้งนี้ แด่สัตว์ทดลองทั้งหมดทั้งปวง ที่ต้องสละชีวิตเพื่อเป็นวิทยาทานให้แก่ข้าพเจ้า และผู้ที่จะได้รับผลประโยชน์จากงานวิจัยนี้ในภายภาคหน้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย……..……..ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ……..จ
กิตติกรรมประกาศ……...……ฉ
สารบัญตาราง……..……ญ
สารบัญภาพ……..……ฎ
บทที่
1 บทนำ……..……..……1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา……..……1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..……...4
1.3 งานวิจัย……..……...…5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย……..……...5
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย……...……6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
เชื้อ *Salmonella* spp.
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ……...7
2.2 แหล่งที่พบเชื้อ……...7
2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อ……8
2.4 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ……...8
2.5 การแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ……9
2.6 พยาธิกำเนิดของเชื้อ……..10
2.7 การสร้างภูมิคุ้มเมื่อได้รับวัคซีน……11
2.8 การก่อโรคของเชื้อ……..15
วัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิส……16
การติดเชื้อซัลโมเนลลาในสัตว์ปีก……...18
3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..……..……25
3.1 การเตรียมวัคซีนซัลโมเนลลาเชื้อตาย……25
3.2 การให้วัคซีน……27
3.3 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ……..27
3.4 การป้อนเชื้อพิษทับแก่ไก่……27

บทที่ หน้า

3.5 การเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* spp.(ก่อนป้อนเชื้อพิษทับ)……..……28
3.6 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp……29
3.7 การเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* spp.(หลังป้อนเชื้อพิษทับ)……..……30
3.8 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis จากไข่ไก่……31
3.9 การทดสอบความหนืดของวัคซีน……33
3.10 การทดสอบความคงตัวของวัคซีน……33
3.11 การทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ……...33
3.12 การทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis……...33
3.13 แผนการทดลอง……35
3.14 การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ……..38
3.15 แนวทางในการประเมินผลการทดลอง……38
4 ผลการทดลอง
4.1 การทดลองที่ 1
ผลของวัคซีนต่อน้ำหนักตัวไก่……39
ผลของวัคซีนต่ออัตราการแลกเนื้อ……39
ผลการตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis จากการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย……41
ผลการทดสอบความหนืดของวัคซีน……42
ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน……42
ผลการทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ……...42
ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis……..……42
4.2 การทดลองที่ 2
ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียจากไข่ไก่……..46
ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียจากไส้ตันและรังไข่……....46
ผลการทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ……...46
ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis……..……47
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……..……..……50
รายการอ้างอิง……...57
ภาคผนวก……66
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงน้ำหนักตัวไก่	40
2	แสดงอัตราการแลกเนื้อ	40
3	ผลการตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis จากการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย	40
4	ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ	44
5	ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ หลังให้วัคซีน 4 สัปดาห์ 3 วัน	44
6	ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ หลังให้วัคซีน 5 สัปดาห์	44
7	ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียจากไข่ไก่	48
8	ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียจากการผ่าซากเก็บไส้ตันและรังไข่	48
9	ผลการทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ หลังให้วัคซีน 15 สัปดาห์	48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ B cell เพื่อเตรียมผลิตแอนติบอดี หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน และได้รับสัญญาณจาก helper T cell ($CD4^+$)……...…12	
2	cytotoxic T cell ($CD8^+$) ที่ผ่านการกระตุ้นแอนติเจน และได้รับสัญญาณจาก helper T cell ($CD4^+$) ทำลายเซลล์ที่มีจุลชีพอยู่……..…14	
3	วงจรของการติดเชื้อซัลโมเนลลา……...…19	
4	Preovulatory follicle……..……...…22	
5	แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Enteritidis การทดลองที่ 1.....45	
6	แสดง S/N ratio ในการทดลองที่ 1……45	
7	แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Enteritidis การทดลองที่ 2……...…49	
8	แสดง S/N ratio ในการทดลองที่ 2……49	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ในช่วงยี่สิบปีหลังของศตวรรษที่ 20 มีการสำรวจพบว่าเชื้อซัลโมเนลลา เป็นเชื้อที่สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตไก่ค่อนข้างสูง โดยสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในไก่ และปนเปื้อนในผลผลิตที่ได้จากไก่ อีกทั้งยังก่อให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค วิธีในการป้องกันการติดเชื้อซัลโมเนลลาในฝูงไก่ที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร นอกเหนือจากการปรับปรุงสุขศาสตร์ของโรงเรือน สิ่งแวดล้อม การจัดการและการเฝ้าระวังฝูงแล้ว ยังพบว่ามีวิธีในการลดอุบัติการณ์ของความรุนแรง ในการติดเชื้อและการแพร่ระบาดของเชื้อที่สำคัญ คือ การใช้ยาปฏิชีวนะ การใช้ผลิตภัณฑ์ในรูปของโปรไบโอติก และการให้วัคซีน (McIlroy et al., 1989)

เชื้อในสกุล *Salmonella* ประกอบด้วยเชื้อ 2 ชนิด (species) คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* ซึ่งเชื้อ *Salmonella enterica* ยังแบ่งย่อยได้อีก 6 subspecies คือ subspecies I (enterica), II (salamae), IIIa (arizonae), IIIb (diarizonae), IV (houtenae) และ VI (indica) พบว่า subspecies I คือ *enterica* มีมากกว่า 2,500 ซีโรวาร์ และมีบทบาทสำคัญที่สุดในการก่อผลเสียต่อสุขภาพของคนและสัตว์ (Altmeyer et al., 1993) สัตว์หลายชนิดเป็นพาหะนำโรคได้ แต่ไก่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งกักเก็บ (reservoirs) เชื้อที่สำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง (Gast, 1997b; Bangtrakulnonth et al., 2004) ทั้งนี้เพราะไก่มีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากเพื่อการบริโภคทั่วโลก ในทางการแพทย์ *Salmonella* Pullorum และ *Salmonella* Gallinarum ถูกจัดว่าเป็นพาหะและก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ไม่ก่อโรคหรือเป็นพาหะในคน แต่จะมีผลกระทบต่อคนเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาการติดเชื้อในสัตว์ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาการติดเชื้อดื้อยาในคนด้วย (ศศิปรียจันทร์, 2544) ส่วนซีโรวาร์ที่สำคัญที่พบว่าเป็นปัญหาได้ทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์อื่นๆ รวมถึงคนด้วย ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium (Gast, 1997a) เป็นต้น

การเกิดโรคในไก่พบได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ความเสียหายที่พบในลูกไก่มักเป็นแบบเฉียบพลันและมีอัตราการตายสูง ไก่ที่รอดตายจะแคระแกร็น การเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ และเป็นพาหะของโรค ส่วนไก่ใหญ่ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะของโรคจะพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ไข่ลดลง เปอร์เซ็นต์ฟักเป็นตัวลดลง และมีการแพร่เชื้อโรคผ่านไข่ โดยไข่อาจติดเชื้อโรคมาจากรังไข่โดยตรง หรือเชื้อโรคจากลำไส้ติดเปื้อนมากับเปลือกไข่ และเชื้อโรคผ่านรูของเปลือกไข่เข้าไป (จิโรจ, 2544) สำหรับการเกิดโรคในคนนั้นพบว่า จะทำให้ปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน และมีไข้ (Horrox, 1995)

หรืออาจรุนแรงจนทำให้เกิดอาการโรคกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ ภาวะมีแบคทีเรียในเลือด หรือมีการอักเสบจากการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น กระดูกอักเสบ ข้ออักเสบ หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (อำนาจ, 2543)

ในปัจจุบัน ผู้บริโภคให้ความสนใจในความปลอดภัยด้านอาหาร (food safety) กันมากขึ้น โดยเฉพาะผู้บริโภคในสหภาพยุโรป ดังจะเห็นได้ว่า สหภาพยุโรปได้มีการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะบางตัวที่เคยอนุญาตให้ใช้ผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (growth promoter) กล่าวคือ การยกเลิกการใช้อะโวพาร์ซิน (avoparcin) ในปี พ.ศ. 2540 และยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไทโลซิน (tylosin) สะไปรามัยซิน (spiramycin) แบซิตราซิน (bacitracin) และเวอร์จิเนียมัยซิน (virginiamycin) ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2541 โดยให้เหตุผลว่ายาเหล่านี้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในมนุษย์ (Wegener et al., 2000)

ดังนั้นแนวทางในการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อซัลโมเนลลาที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดปัญหาอาหารเป็นพิษในคนได้ดีที่สุดมีหลายวิธี และหนึ่งในนั้น คือ การให้วัคซีน

Timms และคณะ (1990) ได้ทำการทดลองเพื่อพัฒนาการใช้วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S.* Enteritidis 'phage type'(PT4) ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{11} cfu/ml. ใน 50% oil adjuvant โดยการให้เข้ากล้ามในไก่อายุ 3 สัปดาห์ พบว่าให้ผลดีในการป้องกันการติดเชื้อชนิดเดียวกันเมื่อมีการให้เชื้อเข้ากล้ามเนื้อและเข้าเส้นเลือดดำ ในขนาด 10^{8} cfu/ml. ที่ 5 และ 8 สัปดาห์ หลังการให้วัคซีน และในการทดลองครั้งต่อมา Timms และคณะ (1994) ได้พัฒนาการใช้วัคซีนเชื้อตายในการควบคุม *S.* Enteritidis และนำไปทดลองใช้กับไก่ในพื้นที่จริงและได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ *S.* Enteritidis อีกเป็นจำนวนมาก และพบว่าวัคซีนให้ผลในการควบคุมการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในฝูงไก่ได้เป็นอย่างดี (Gast et al.,1992; Gast et al.,1993; Nakamura et al.,1994)

S. Enteritidis ถือได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในด้านสาธารณสุขมาก คือ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในไก่ ปนเปื้อนในผลผลิตที่ได้จากไก่ และมีผลกระทบถึงผู้บริโภค โดยเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากการบริโภคอาหาร

Bangtrakulnonth และคณะ (2004) ได้ทำการสำรวจและรวบรวมซีโรวาร์ (serovars) ของซัลโมเนลลาที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากการบริโภคอาหารดังกล่าวข้างต้น โดยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะอาหารเป็นพิษในคนและแยกเชื้อจากสัตว์ที่เป็นแหล่งกักเก็บโรคที่สำคัญในประเทศไทย ระหว่างปี 2536 – 2545 โดยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของภาวะอาหารเป็นพิษในคนได้ถึง 44,087 isolates และในจำนวนนี้มีเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ถึง 118 ซีโรวาร์ โดยซีโรวาร์ที่พบได้มาก 5 อันดับแรก ได้แก่ *S.* Weltevreden, *S.* Enteritidis, *S.* Anatum, *S.* Derby, *S.* 1,4,5,12:I และโอกาสในการพบ *S.* Enteritidis มีแนวโน้มลดลงในปี 2544 จาก 14% เหลือ 9% แต่มีการเพิ่ม

ขึ้นอีกครั้งในปี 2545 เป็น 12.6% ในการเก็บข้อมูลจากการแยกเชื้อ จากสัตว์ที่เป็นแหล่งกักเก็บโรคนั้น พบว่า ไก่ มีเปอร์เซ็นต์การพบ *S.* Enteritidis ได้สูงที่สุดคิดเป็น 19.9% และในอาหารทะเล พบว่า *S.* Weltevreden เป็นซีโรวาร์ที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็น 26%

การพบ *S.* Enteritidis ในเนื้อไก่ ทำให้มีการตระหนักถึงความสำคัญของสัตว์ที่เป็นแหล่งกักเก็บโรค ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคติดเชื้อจากการบริโภค และมีการศึกษาถึงแนวทางการ แก้ปัญหาและการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคกันอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ (Guard, 2001) อย่างไรก็ตาม จากการรวบรวมข้อมูลของ Bangtrakulnonth และคณะ (2004) ในปี 2545 พบว่า *S.* Enteritidis ยังคงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะอาหารเป็นพิษในคน นอกจาก *S.* Enteritidis จะก่อปัญหาในการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อไก่แล้ว ยังพบว่า ไข่ ก็เป็นผลิตภัณฑ์จากไก่อีกประเภทหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารในหลายๆประเทศ (Rodrigue et al., 1990) พบว่าในสหรัฐอเมริกาเกิดโรคระบาดจากการบริโภคอาหาร 46 ครั้ง ในช่วงปี 2530 - 2535 ปรากฏว่า ไก่ ไก่งวง และไข่ เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ 8.6%, 4.7% และ 4.3% ตามลำดับและพบว่า *S.* Enteritidis เป็นสาเหตุให้เกิดโรคระบาด และมีผู้ป่วยเสียชีวิตบ่อยครั้งมากที่สุด (Bean et al., 1997) โดยมูลเหตุสำคัญในการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาดังกล่าว มาจากการแพร่เชื้อผ่านไข่ (vertical transmission) จากแม่ไก่ที่ได้รับเชื้อ และการปนเปื้อนของเชื้อจากแม่ไก่มากับมูลไก่ที่เปรอะเปื้อนเปลือกไข่ (Borland, 1975; Timoney et al., 1989) โดยเชื้อสามารถที่จะแทรกผ่านรู (pores) ของเปลือกไข่ปกติ (Williams and Whittemore, 1967; Williams et al., 1968) หรือไข่ที่มีการแตกร้าวในระหว่างกระบวนการผลิต (Borland, 1975) จากการศึกษาของ Keller และคณะ (1995) พบว่าปริมาณของเชื้อ *S.* Enteritidis ในมูลไก่ที่มาจากแม่ไก่ที่ติดเชื้อดังกล่าว มีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรียที่ได้จากเปลือกไข่ของแม่ไก่นั้น โดยหากมูลไก่หรือ cloacal tissue พบปริมาณเชื้อมาก การปนเปื้อนของเชื้อมายังเปลือกไข่ ก็จะให้ผลเป็นบวก และหากการตรวจทางแบคทีเรียจากมูลไก่หรือ cloacal tissue พบเชื้อในปริมาณน้อยมาก การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจากเปลือกไข่ก็จะให้ผลเป็นลบ

แนวทางในการลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับไก่และไข่ไก่ ดังกล่าว คือการพยายามพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิส โดยเฉพาะซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ในปัจจุบัน ประเทศไทย ได้มีการวางแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อซัลโมเนลลาในไก่ที่เลี้ยงเป็นอุตสาหกรรม โดยนิยมให้วัคซีนป้องกันในไก่พ่อแม่พันธุ์ ทั้งพ่อแม่พันธุ์ไก่เนื้อ และพ่อแม่พันธุ์ไก่ไข่ที่จะมีการส่งออกขายในสหภาพยุโรป หรือ EU และเนื่องจากเงื่อนไขการนำเข้าของสหภาพยุโรป ระบุไว้ว่าไก่หรือไข่ที่จะนำเข้านั้น จะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา โดยมีรายละเอียดในส่วนของเนื้อสัตว์ปีก แช่แข็ง จะต้องไม่พบ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ในตัวอย่างที่สุ่มตรวจ 25 กรัม (ศศิธรและสุ

ปราณี, 2546) ดังนั้น หากประเทศไทยยังต้องการเป็นหนึ่งในประเทศผู้ผลิตและ ผู้ส่งออกรายใหญ่ของโลก และโดยเฉพาะมีสหภาพยุโรปเป็นตลาดส่งออกที่สำคัญ จำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนกลยุทธ์ในการผลิต เพื่อให้ได้สินค้าตรงตามความต้องการของตลาด ซึ่งนอกจากจะก่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศแล้ว ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่สินค้าอีกด้วย

ปัจจุบัน วัคซีนที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อซัลโมเนลโลซิสในประเทศไทยนั้น ยังคงเป็นวัคซีนที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ โดยวัคซีนที่ใช้มีทั้งวัคซีนเชื้อเป็นและเชื้อตาย ซึ่งการเลือกใช้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆประการ อาทิ ความรุนแรงของโรคในพื้นที่ ความชุกของการเกิดโรค และเพื่อการส่งออก เป็นต้น

การคิดค้นนำเชื้อซัลโมเนลลา ซีโรวาร์ที่มักพบว่าเป็นปัญหาและก่อความรุนแรงมาผลิตเป็นวัคซีน จึงเป็นการวางแนวทางในการป้องกันการระบาดและลดความรุนแรงของการเกิดโรคซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ ลดปัญหาสารเคมีตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสัตว์ที่สามารถส่งผลให้เกิดการดื้อยาในคน อีกทั้งยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตวัคซีนขึ้นใช้เองภายในประเทศเพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เตรียมวัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิสเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่เตรียมจาก *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (inactivated oil-adjuvant bacterin)

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิส ที่ผลิตขึ้นต่อการป้องกันการติดเชื้อของอวัยวะภายใน (systemic infection) ของไก่ไข่ ที่ได้รับวัคซีนเมื่ออายุ 4 สัปดาห์

1.2.3 เปรียบเทียบวัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิสที่ผลิตขึ้น กับวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้า เกี่ยวกับคุณสมบัติเบื้องต้นของวัคซีน คือ ความหนืด ความคงตัว และปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ และระดับแอนติบอดีในไก่ระยะก่อนไข่

1.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนต่อการป้องกันการแพร่เชื้อผ่านไข่ และการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่ โดยทำการศึกษาในไก่ไข่ อายุ 22 สัปดาห์

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

1.3.1 เมื่อทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของวัคซีน ระหว่างวัคซีนชนิดเชื้อตายที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตเพื่อการค้า ไม่ควรมีความแตกต่างกัน

1.3.2 วัคซีนสามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ของอวัยวะภายใน

1.3.3 วัคซีนสามารถป้องกันการการติดเชื้อในรังไข่ โดยส่งผลต่อการลดการแพร่เชื้อผ่านไข่ ลดการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่

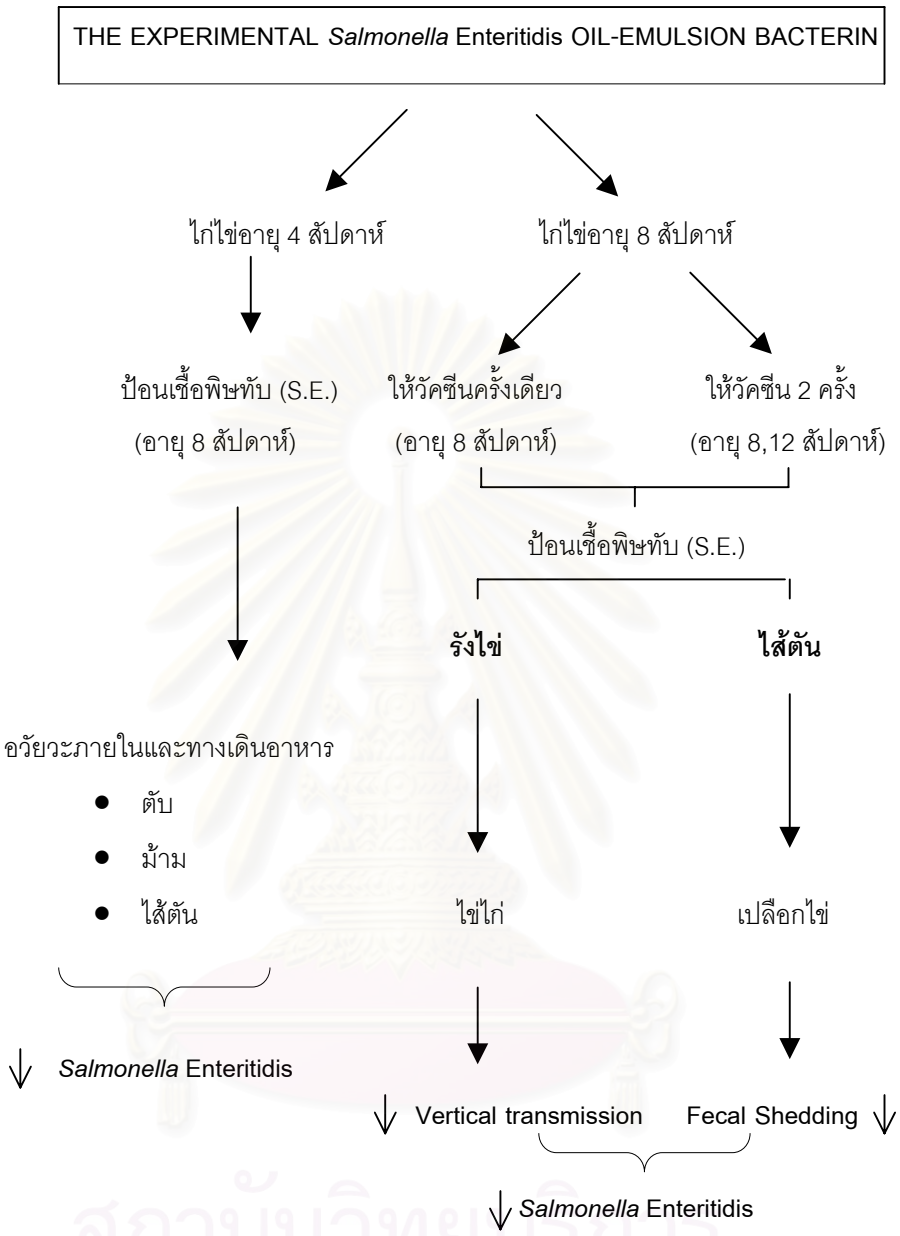
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 สามารถผลิตวัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิสชนิดเชื้อตายที่เตรียมขึ้นจากซีโรวาร์เอนเทอริติดิส ที่มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้า สามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ของอวัยวะภายใน ลดการแพร่เชื้อผ่านไข่ และลดการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่

1.4.2 เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตวัคซีนขึ้นใช้เองภายในประเทศ ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 **กรอบแนวคิดงานวิจัย** (Conceptual framework)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดที่สำคัญ โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็น pathogen ที่พบได้ทั่วโลก นอกจากนี้ยังเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคนและสัตว์เลี้ยงเท่านั้น หากยังสามารถพบได้ในสัตว์ทั่วๆไป เช่น สัตว์เลื้อยคลาน นก และแมลงต่างๆ โดยจะพบได้ว่า เชื้อซัลโมเนลลา เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียในคนและสัตว์ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในอุจจาระของผู้ป่วย โดยการติดเชื้อจะเป็นในลักษณะของการกินอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงให้สุก หรืออาหาร น้ำ มีการปนเปื้อนเชื้อ ดังนั้นการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่อาหารและสิ่งแวดล้อม จึงถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมาก

เชื้อ *Salmonella* spp.

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ยกเว้น *S.* Pullorum, *S.* Gallinarum และบางสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา (*S.* Paratyphi A, *S.* Choleraesuis) สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สร้างกรดและก๊าซจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เจริญได้ คือ 37-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีแม้ในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไว้เท่านั้นและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อจะไม่ทนความร้อน โดยพบว่าถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงหรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ยกเว้น *S.* Senftenberg ที่ทนความร้อนได้ดีกว่าซีโรวาร์อื่นๆ 10-20 เท่า โดยต้องให้ความร้อนถึง 62 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จึงจะสามารถทำลายเชื้อได้ (Bangtrakulnonth, 2002)

2.2 แหล่งที่พบเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. จัดเป็นเชื้อโรคที่พบได้ทั่วโลก สามารถแยกเชื้อได้จากทางเดินอาหารของคนและสัตว์อีกหลายชนิด ทั้งสัตว์เลือดอุ่นและสัตว์เลือดเย็น (Hirsh, 1999) โดยเฉพาะ

จิ้งจกและงูพบว่าเป็นสัตว์ที่มีการติดเชื้อได้เสมอๆ โดยมักจะไม่แสดงอาการป่วยแต่สามารถแยกเชื้อได้ และบางครั้งอาจพบได้หลายซีโรวาร์ในสัตว์ตัวเดียวกัน

นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานถึง 9 เดือนหรือมากกว่านั้น เมื่อปนเปื้อนอยู่ในดินที่ชื้นแฉะ น้ำ มูลสัตว์ หรืออาหารสัตว์ โดยเฉพาะส่วนประกอบที่ทำมาจากเลือด ปน กระดูกป่น หรือปลาป่น (Hirsh, 1999)

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อ

เชื้อในสกุล *Salmonella* ปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 2 species ตามที่ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ในสหรัฐอเมริกาได้แบ่งไว้ ดังนี้ คือ

1) *Salmonella enterica* ประกอบด้วย 6 subspecies (subsp.) ได้แก่ subspecies I (enterica), II (salamae), IIIa (arizonae), IIIb (diarizonae), IV (houtenae) และ VI (indica)
2) *Salmonella bongori* มี 1 subspecies คือ subspecies V

ซึ่งการแบ่ง species และ subspecies จะใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) (Bangtrakulnonth, 2002)

2.4 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ

โครงสร้างทางแอนติเจนที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella* spp. มี 3 ชนิดด้วยกัน คือ

2.4.1 โอแอนติเจน หรือ โซมาติก แอนติเจน (O antigen หรือ somatic antigen) เป็นส่วนหนึ่งของเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ประกอบด้วยน้ำตาลต่างชนิดเชื่อมต่อกัน แล้วยึดติดกับส่วนที่เป็นโพลิแซกคาไรด์ คอร์ (polysaccharide core หรือ region core) และ ลิพิดเอ (lipid A) ตามลำดับ โดยชนิดและจำนวนของน้ำตาล รวมทั้งรูปแบบการเชื่อมต่อกันระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด (alpha หรือ beta glycosidic linkage) ทำให้มีโอแอนติเจนแตกต่างกันได้หลายแบบ (นันทนา, 2537; Hirsh,1999) โดยอาศัยคุณสมบัติของโอแอนติเจนนี้สามารถแบ่งเชื้อออกเป็นซีโรกรุ๊ป (serogroup) ต่างๆ แต่ละกรุ๊ปมีโอแอนติเจนให้ชื่อเป็นเลขอารบิค ทั้งนี้จะเริ่มจาก กรุ๊ป A มีโอแอนติเจน 1,2,12 ไปจนถึง กรุ๊ป Z ซึ่งตรงกับ โอกรุ๊ป 50 (O group 50) ต่อจากนั้นจะเป็นโอกรุ๊ป 51 เรื่อยไป จนถึง โอกรุ๊ป 67 (Bangtrakulnonth, 2002) และเนื่องจาก โอแอนติเจนอยู่รวมกับสารประกอบอื่นในรูปของไลโปโพลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide) จึงทำให้สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานถึง 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอ่อนๆ ได้ดี (นันทนา, 2537; Bangtrakulnonth, 2002)

2.4.2 เอช หรือ แฟลกเจลลา แอนติเจน (H antigen หรือ flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากจะมีเอชแอนติเจน 2 เฟส (phase) คือ เฟส 1 เรียกว่า เฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 เรียกว่า เฟสไม่จำเพาะ (non-specific phase) ซึ่งแอนติเจนของเฟส 1 จะให้ชื่อเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก โดยเริ่มจาก a ถึง z แต่เนื่องจากในปัจจุบันนี้ ได้พบแอนติเจนมีอยู่มากกว่าจำนวนตัวอักษร แอนติเจนที่พบระยะหลังจึงให้ชื่อเป็น z_1 ถึง z_{59} (Bangtrakulnonth, 2002) ส่วนแอนติเจนเฟส 2 มีอยู่หลายชนิด กำหนดด้วยตัวเลข โดยอาศัยคุณสมบัติของเอชแอนติเจน ทำให้แบ่งเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นซีโรวาร์ต่างๆได้ (นงลักษณ์, 2544) ซึ่งเชื้อซีโรวาร์หนึ่งๆ อาจมีเอชแอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด แอนติเจนอาจอยู่ในเฟส 1 หรือ ในเฟส 2 หรือในทั้ง 2 เฟส (นันทนา, 2537) ตัวอย่างซีโรวาร์ที่มีแอนติเจนเฟสเดียว เช่น *S.* Paratyphi A, *S.* Typhi, *S.* Derby, *S.* Enteritidis และ *S.* Dublin เป็นต้น และซีโรวาร์ที่ไม่มีเอชแอนติเจน เช่น *Salmonella* Gallinarum เป็นต้น (Bangtrakulnonth, 2002) โดยจะพบว่าเอชแอนติเจนสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) แอลกอฮอล์ และกรดต่างๆ (นันทนา, 2537)

2.4.3 วีไอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นแอนติเจนที่อยู่รอบนอกของโอแอนติเจน เป็นสารประกอบพอลิแซกคาไรด์ ที่ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน กรด และ ฟีนอล โดยความร้อนที่จะสามารถทำลายวีไอ แอนติเจน ได้ คือ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 ชั่วโมง (นันทนา, 2537) ซีโรวาร์ที่มีวีไอแอนติเจน ได้แก่ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C และ *S.* Dublin ซึ่งจะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่า ซีโรวาร์ที่ไม่มีวีไอแอนติเจน (Bangtrakulnonth, 2002) วีไอแอนติเจนอาจบดบังโอแอนติเจน ทำให้เชื้อไม่จับกลุ่ม (agglutinate) กับโอแอนติซีรัมในตอนแรก หลังทราบผลทดสอบด้วยวีไอแอนติซีรัมแล้ว จึงต้องละลายเชื้อในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อทำลายวีไอแอนติเจน แล้วจึงนำเอาตะกอนเชื้อทดสอบกับโอแอนติซีรัมต่อไป (Bangtrakulnonth, 2002)

2.5 การแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ

ในการแยกซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จะใช้วิธีทดสอบทางซีรัมวิทยา (serological test) โดยอาศัยคุณสมบัติในการจับกลุ่ม ระหว่างแอนติเจนที่ผิวเซลล์กับแอนติซีรัมจำเพาะ ซึ่งจะทำหลังจากที่เชื้อผ่านการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นแล้ว ในกรณีที่ต้องการระบุถึงระดับซีโรวาร์ของเชื้อ ต้องใช้แอนติซีรัมจำนวนมากและมีขั้นตอนมากมาย ห้องปฏิบัติการทั่วไปจึงมักรายงานถึงระดับซีโรกรุ๊ปของเชื้อ ซึ่ง Bangtrakulnonth (2002) ได้แนะนำวิธีการและขั้นตอนในการตรวจไว้ดังนี้

2.5.1 หยดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก Triple sugar iron (TSI) agar slant มาละลายในน้ำเกลือ คนให้เข้ากัน แล้วสังเกตว่าเกิดการจับกลุ่มภายใน 30 วินาทีหรือไม่ หากเกิดการจับกลุ่มแสดงว่า เชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรวาร์ได้ เนื่องจากเชื้อเกิดการผ่าเหล่า (mutation) ทำให้สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์โอแอนติเจนหรือทำให้ตำแหน่งที่สัมผัสกันระหว่างโอแอนติเจนกับพอลิแซกคาไรด์ คอร์ ขาดหายไป (นันทนา, 2537) เป็นผลให้เชื้อจับกลุ่มกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์และจับกลุ่มกับแอนติซีรั่มทุกชนิด ดังนั้นจะไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นซีโรวาร์ใด ถ้าไม่ตกตะกอนกับน้ำเกลือจึงทดสอบต่อได้

2.5.2 หยดแอนติซีรัม *Salmonella* polyvalent A-67 และ *Salmonella* polyvalent A-I บนแผ่นสไลด์อย่างละ 1 หยด และเขี่ยเชื้อจาก TSI agar slant มาทดสอบกับแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด คนให้เข้ากันดีกับแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด สังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเห็นภายใน 30-60 วินาที ถ้าจับกลุ่มกับแอนติซีรัมชนิดใดแสดงว่าเชื้อมีแอนติเจนชนิดนั้น แต่เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้แอนติซีรัมรวมหลายชนิด จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นกรุ๊ปใด อาจเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Salmonella* group A ถึง *Salmonella* group I ในกรณีที่ให้ผลบวกต่อ *Salmonella* polyvalent A-I แต่ถ้าให้ผลลบต่อ *Salmonella* polyvalent A-I แล้วให้ผลบวกต่อ *Salmonella* polyvalent A- 67 แสดงว่าเชื้อนี้อยู่ระหว่างช่วง *Salmonella* group J ถึง *Salmonella* group O:67

2.5.3 หลังจากนั้นให้ทดสอบกับแอนติซีรัมเดี่ยวแต่ละกรุ๊ป คือ *Salmonella* group A, B, C, D, E ถึง I ถ้าให้ผลบวกต่อกรุ๊ปใดให้รายงานว่าเป็น *Salmonella* group นั้น

2.6 พยาธิกำเนิดของเชื้อ

ตำแหน่งแรกในการติดเชื้อ พบได้ที่ลำไส้ โดยเฉพาะลำไส้เล็ก หลังจากเชื้อมีการเกาะแนบ (adhered) กับเยื่อบุลำไส้ เชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียงเกิดกระบวนการอักเสบของลำไส้ จากนั้นเชื้อจะแพร่เข้าไปที่ชั้นในของผนังลำไส้และเข้าไปฝังตัวอยู่ในต่อมน้ำเหลืองขนาดเล็ก (lymphoid organ) และอาจแพร่ต่อไปยังต่อมน้ำเหลืองของเยื่อยึด (mesentery lymphnodes) ทำให้เกิดจุดเนื้อตายหรือฝีขนาดเล็กๆ ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้ไก่เกิดโรคแบบเรื้อรังและแพร่เชื้อตลอดเวลา ขณะเดียวกันเชื้อจะทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังลำไส้และแพร่เข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆได้แก่ ตับ ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น รังไข่ ท่อนำไข่และมดลูก ซึ่งอวัยวะดังกล่าวจะเป็นแหล่งสำคัญที่เชื้อจะแพร่สู่ไข่ต่อไป

2.7 การสร้างภูมิคุ้มเมื่อได้รับวัคซีน

ภูมิคุ้มหรือภูมิคุ้มป้องกันโรค (immunity) ในสัตว์ปีกอยู่ในรูปเซลล์น้ำเหลือง (lymphocytes) โดยการสร้างเซลล์น้ำเหลืองในสัตว์ปีกนั้น แบ่งออกเป็นสองระบบ คือ

2.7.1 ระบบต่อมน้ำเหลืองปฐมภูมิ (primary lymphoid system) ประกอบด้วยต่อมเบอร์ซ่า (bursa of fabricious) เป็นอวัยวะที่มีตำแหน่งเกาะติดบนผนังด้านนอกของทวารรวม และต่อมไธมัส (thymus glands) มีหลายต่อม เรียงรายอยู่บริเวณใต้ผิวหนังบริเวณคอ

2.7.2 ระบบต่อมน้ำเหลืองทุติยภูมิ (secondary lymphoid system) ประกอบด้วย ตับม้าม ต่อมฮาร์เดอเรียน (Harderian's glands) ที่บริเวณตาของสัตว์ปีก ต่อมทอนซิลบริเวณไส้ตัน (cecal tonsils) และต่อมน้ำเหลือง (Peyer's patches) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในผนังลำไส้ (เกรียงศักดิ์, 2544)

ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immunity หรือ innate immunity)

ธรรมชาติของการติดเชื้อ S. Enteritidis จะผ่านช่องทางหลัก คือ ระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในบริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมีบทบาทแรกในการต่อต้านการติดเชื้อ ถึงแม้ภูมิคุ้มกันชนิดนี้ไม่มีความสามารถในการจดจำ หรือความจำเพาะต่อแอนติเจน แต่ก็สามารถจำกัดการเพิ่มปริมาณ และการแพร่กระจายของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีบทบาทกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะประกอบไปด้วย กลไกทางฟิสิกส์ เช่น การลอกหลุดของเนื้อเยื่อที่มีจุลชีพเกาะอยู่ การเคลื่อนไหวของลำไส้เพื่อขับอุจจาระในภาวะปกติ การเคลื่อนไหวของลำไส้ที่มากกว่าปรกติเมื่อเกิดการติดเชื้อในลำไส้ กลไกทางเคมี เช่น กรด HCl fibronectin glycolipid lactoferrin lysozyme mucus เป็นสารเคมีที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหาร มีบทบาทในการป้องกันการจับตัวของแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อ หรือ ทำลายแบคทีเรียโดยตรง กลไกทางชีวะ เช่น จุลชีพประจำถิ่น (normal flora) ที่สามารถขัดขวางการจับตัวของแบคทีเรียก่อโรคกับเนื้อเยื่อ หรือ สร้างสารจำพวกกรด HCl glycolipid lactoferrin lysozyme mucus ที่สามารถขัดขวางการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค หากแบคทีเรียสามารถผ่านสิ่งกีดขวางดังกล่าวเข้ามาได้จะพบกับสิ่งกีดขวางอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อ เช่น phagocytic cells natural killer cells (NK) complement หรือ natural antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนนั้นๆ แต่ binding site ของแอนติบอดีนั้นมีความใกล้เคียงหรือจำเพาะกับแอนติเจน ทำให้แอนติบอดีสามารถจับแอนติเจนนั้นได้ (Abbas et al., 2000; Janeway and Travers, 1994)

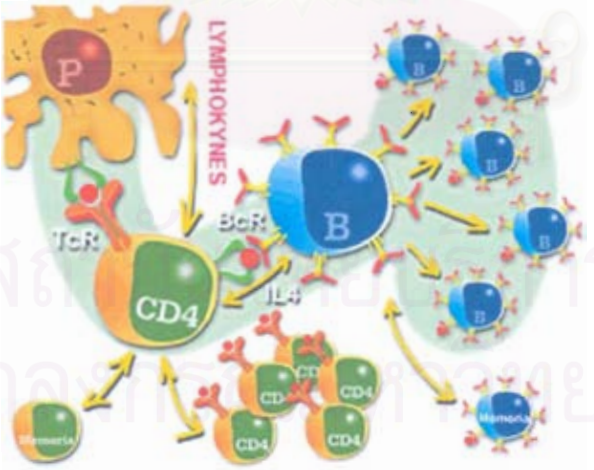
ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ(specific immunity หรือ adaptive immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันที่คาดหวังให้เกิดขึ้นหลังจากมีการทำวัคซีน มีความจำเพาะ ความทรงจำ และมีประสิทธิภาพสูงกว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เก็บ

กินได้ดีกว่า และสามารถจับกับแอนติเจนได้หนาแน่นกว่า) ประกอบไปด้วย ภูมิคุ้มกันแบบใช้แอนติบอดี (antibody-mediated immunity หรือ humoral immunity : HMI) ซึ่งจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยใช้แอนติบอดีที่สร้างจาก B lymphocyte หรือ plasma cell และภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity หรือ cellular immunity : CMI) ซึ่งจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยใช้ cytotoxic T lymphocyte NK cell และ phagocytic cell (macrophage heterophil) (Abbas et al., 2000; Janeway and Travers, 1994)

ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity)

เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อแอนติเจนแปลกปลอม โดยเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย สิ่งแปลกปลอมจะถูกเก็บกินโดย phagocytic cell หลังจากนั้น phagocytic cell จะทำการนำเสนอชิ้นส่วนของแอนติเจนที่ถูกตัดเป็น peptide สั้นๆ โดยมีโปรตีนบนผิวเซลล์คือ MHC class II ให้กับ helper T lymphocyte ($CD4^+$) ทำให้ helper T lymphocyte มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และหลั่งไซโตคายน์ให้กับ B lymphocyte ซึ่งในขณะนั้น B lymphocyte ได้มีการรับรู้แอนติเจนผ่าน surface Immunoglobulin (sIg) แล้ว ส่งผลให้ B lymphocyte มีการตอบสนองด้วยการแบ่งตัว และเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น plasma cell เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน โดยปกติการตอบสนองต่อแอนติเจนทั่ว ๆ ไปจะเกิดแอนติบอดีจำเพาะขึ้นทุก class คือ IgM IgG และ IgA ซึ่งแอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อในกระแสเลือดคือ IgM และ IgG



ภาพที่ 1 การเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ B cell เพื่อเตรียมผลิตแอนติบอดี หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน และได้รับสัญญาณจาก helper T cell ($CD4^+$) (Abbas et al., 2000)

ภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก (mucosal immunity)

บริเวณเยื่อเมือกลำไส้ซึ่งเป็นช่องทางในการติดเชื้อ S. Enteritidis จะปกคลุมด้วยสารคัดหลั่งที่มีแอนติบอดีอยู่ โดยแอนติบอดีส่วนหนึ่งมาจากกระแสเลือด อีกส่วนหนึ่งเป็น secretory antibody ที่สร้างจากพลาสมาเซลล์ใต้เยื่อเมือกนั้น ๆ แต่เนื่องจากแอนติบอดีจากกระแสเลือดไม่มี secretory piece จึงถูกทำลายโดยเอนไซม์บนเยื่อเมือก ดังนั้นแอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณดังกล่าวจึงเป็นเฉพาะ secretory IgA และส่วนน้อยเป็น IgM ทั้งนี้กลไกการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะที่ จะเกี่ยวข้องกับเซลล์ชนิดพิเศษ คือ M cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะพื้นผิวค่อนข้างเรียบ แทรกตัวอยู่ระหว่าง epithelial cell ที่บุในลำไส้ ด้านล่างของเซลล์ชนิดนี้จะเป็นบริเวณที่มี lymphocyte อยู่ เมื่อมีแอนติเจนผ่านมาในทางเดินอาหารจะถูก endocytosis โดย M cell แล้วนำเสนอต่อ B lymphocyte ที่อยู่ข้างใต้ และเมื่อได้สัญญาณจาก helper T cell ที่อยู่ข้างเคียง B lymphocyte ก็จะกลายเป็น plasma cell และผลิต secretory IgA ที่มี J-chain ไปเกาะกับ secretory component ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณ mucosal เท่านั้น หลังจากนั้น sIgA จะถูกส่งผ่าน mucosal epithelial cell หลั่งสู่บริเวณ lumen ของลำไส้ (สันนิภา, 2545)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell- mediated immunity)

เกิดจากการกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte ($CD8^+$) ด้วย peptide ของแอนติเจน ที่ตำแหน่ง T cell receptor ซึ่งต้องนำเสนอผ่าน MHC class I ของเซลล์ที่ได้รับเชื้อจากแบคทีเรียที่มีชีวิต และจะต้องได้รับไซโตคายน์ ซึ่งเป็นสัญญาณจาก helper T lymphocyte จึงจะทำงานได้สมบูรณ์ เช่นเดียวกับ B lymphocyte นอกจากนี้แบคทีเรียที่สามารถเข้าเซลล์ได้ เช่น เชื้อซัลโมเนลลา ซึ่งถือเป็น endogenous antigen ก็สามารถกลายเป็น exogenous antigen ที่ถูก phagocytic cell เก็บกิน และนำเสนอผ่าน MHC class II ทำให้เกิดการกระตุ้น helper T lymphocyte ซึ่งการทำงานของ helper T lymphocyte หลังได้รับการกระตุ้น ถือเป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ด้วย (สันนิภา, 2545)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 cytotoxic T cell ($CD8^+$) ที่ผ่านการกระตุ้นแอนติเจน และได้รับสัญญาณจาก helper T cell ($CD4^+$) ทำลายเซลล์ที่มีจุลชีพอยู่ (Abbas et al., 2000)

ภาพรวมของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คือ เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายจะถูกเก็บกินโดยกระบวนการ phagocytosis แบบ exogenous antigen โดย phagocytic cell เช่น มาโครฟาจ หลังจากนั้นมาโครฟาจจะทำการนำเสนอ peptide ของแอนติเจนด้วยโปรตีนบนผิวเซลล์คือ MHC class II ให้กับ helper T lymphocyte ทำให้ helper T lymphocyte มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และหลั่งไซโตคายน์ให้กับ B lymphocyte และ cytotoxic T lymphocyte โดยที่เซลล์ทั้งสองได้มีการรับรู้แอนติเจนผ่าน receptor ของแต่ละเซลล์ก่อนหน้านี้แล้ว ทำให้เกิดการตอบสนองทาง HMI ในรูปของแอนติบอดี และ CMI ในรูปของ cytotoxic T lymphocyte ซึ่งการตอบสนองจะเด่นชัดในทางใดขึ้นอยู่กับรูปแบบของแอนติเจนว่าเป็นแอนติเจนชนิด exogenous หรือ endogenous (Abbas et al., 2000; Janeway and Travers, 1994; Sheela et al., 2003)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ซึ่งเป็น facultatively intracellular bacteria ที่สามารถเข้าเซลล์ได้ โดยมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไซโตคายน์จาก helper T lymphocyte จะมีความสามารถในการกลืนกิน และฆ่าแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ cytotoxic T lymphocyte ที่ผ่านการกระตุ้นจากแบคทีเรีย และ helper T lymphocyte ก็จะสามารถทำลายเซลล์ที่มีแบคทีเรียอยู่ ทำให้แบคทีเรียออกมาอยู่นอกเซลล์แล้วถูกจับกินต่อ รวมทั้ง NK cell ก็สามารถทำลายเซลล์ที่มีแบคทีเรียอยู่ภายในได้เช่นกัน (Abbas et al., 2000; Janeway and Travers, 1994)

อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันแบบใช้แอนติบอดี ก็มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ เนื่องจากว่า ในบางช่วงของวงจรชีวิต *S.* Enteritidis จำเป็นจะต้องออกมาในบริเวณนอกเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถถูกทำลายด้วยแอนติบอดีได้ (Corrier et al., 1991)

2.8 การก่อโรคของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. บางซีโรวาร์ค่อนข้างมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (relatively host-specific) เช่น *S.* Typhi, *S.* Abortusequi, *S.* Dublin, *S.* Abortusovis, *S.* Typhisuis และ *S.* Pullorum, *S.* Gallinarum ที่มักก่อโรคเฉพาะในคน ม้า โค แกะ สุกร และสัตว์ปีก ตามลำดับ (Gast, 1997a; Hirsh, 1999) เป็นต้น ส่วนซีโรวาร์อื่นๆ พบว่าเป็นปัญหาได้ในสัตว์หลายชนิด รวมถึงคนด้วย

โรคที่พบในคน

สาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อในคน เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป สัตว์หลายชนิดเป็นพาหะนำเชื้อมาสู่คนได้ แต่ไก่และไข่ไก่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งของเชื้อที่สำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง (Gast, 1997a, 1997b; Hirsh, 1999) ทั้งนี้เพราะไก่มีความชุกในการติดเชื้อสูง และมีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากเพื่อการบริโภคทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่ทุกคนที่ได้รับเชื้อแล้วจะแสดงอาการของโรค (Horrox et al.,1995) ทั้งนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น ซีโรวาร์ของเชื้อ ปริมาณของเชื้อ และความต้านทานของแต่ละคน เป็นต้น (Hirsh, 1999)

โดยอาการของโรคที่พบในคนนั้น นงลักษณ์ (2544) และ Bangtrakulnonth (2002) ได้ทำการรวบรวม และสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

<u>*อาการไข้ไทฟอยด์*</u> (enteric fevers) ประกอบด้วย โรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid) และ พาราไทฟอยด์ (paratyphoid) โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์คือ *S.* Typhi ส่วนพาราไทฟอยด์นั้นมีสาเหตุมาจากเชื้อ *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B และ *S.* Paratyphi C ซึ่งพบว่าทั้ง 2 โรคนี้มีอาการคล้ายคลึงกัน แต่พาราไทฟอยด์หรือไข้รากสาดเทียมนั้น มีความรุนแรงน้อยกว่า การติดต่อที่สำคัญคือการได้รับอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เมื่อเชื้อไปถึงลำไส้เชื้อจะมีการแทรกผ่านชั้นเยื่อเมือกของลำไส้ทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ จากนั้นเชื้อจะแพร่เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองของลำไส้ก่อนผ่านเข้าสู่กระแสเลือดแล้วกระจายไปยังตับ ถุงน้ำดี ม้าม ไต ไขกระดูก รวมทั้งเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissue) ของอวัยวะต่างๆ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ท้องอืดหรือท้องผูก ตับและม้ามโต นอกจากนี้ยังสามารถพบอาการอุจจาระร่วงที่อาจมีเลือดปนออกมาด้วย ถ้าผนังลำไส้ถูกทำลายมากอาจทำให้ลำไส้ทะลุได้ เชื้อที่เข้าสู่อวัยวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ เช่น เยื่อหุ้มกระดูกอักเสบเป็นหนอง กระดูกอักเสบ ถุงน้ำดีอักเสบแบบเฉียบพลัน เป็นต้น

<u>*อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต*</u> (bacteremia/septicemia) มีสาเหตุจาก *S.* Choleraesuis โดยเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะไปเจริญและเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด ดังนั้นผู้ป่วยจะไม่มีอาการอุจจาระร่วง แต่จะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น น้ำหนักลด การแยกเชื้อจะสามารถพบเชื้อในกระแส

เลือดเท่านั้น แต่เชื้อสามารถกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย และทำให้ปอดอักเสบ ไตอักเสบ ไขกระดูกอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้

อาการของระบบทางเดินอาหาร (enterocolitis, gastroenteritis) สาเหตุเกิดจากเชื้อหลายซีโรวาร์ด้วยกัน ซึ่งเชื้อปนเปื้อนมากับอาหาร โดยเฉพาะอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ และนม เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะแทรกผ่านชั้นเยื่อเมือกของลำไส้อย่างรวดเร็ว เข้าไปเพิ่มจำนวนในชั้น lamina propria ของลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดการอักเสบ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียน อุจจาระร่วงรุนแรง ปวดท้องและมีไข้เล็กน้อย ซีโรวาร์ที่แยกพบได้บ่อยและก่อโรครุนแรงคือ *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium

โรคที่พบในไก่

ปัจจุบัน สามารถแยกโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ ออกได้เป็น 3 โรค (จิโรจ, 2544; Gast 1997a และ Shivaprasad, 1997) ดังนี้

โรคขี้ขาว (pullorum disease) มีสาเหตุจากเชื้อ *S.* Pullorum การเกิดโรคพบได้ทุกช่วงอายุ แต่อัตราการตายจะสูงในไก่อายุน้อย โดยเฉพาะช่วงอายุ 2-3 สัปดาห์แรก ส่วนไก่ใหญ่มักไม่แสดงอาการ ไก่ที่ป่วยจะมีอาการท้องเสีย มีมูลสีขาวติดที่ก้น หากลูกไก่หายใจเอาเชื้อเข้าไปขณะอยู่ในตู้ฟักจะแสดงอาการและมีรอยโรคในระบบหายใจ

โรคไทฟอยด์ (fowl typhoid) เกิดจากเชื้อ *S.* Gallinarum ไก่อายุน้อยกว่า 1 เดือน อาการจะเหมือนโรคขี้ขาว แต่สภาพการเกิดโรคจะเป็นแบบเรื้อรัง มีไก่ทยอยตายเรื่อยๆ ส่วนการเกิดโรคในไก่รุ่นและไก่ใหญ่มักเป็นแบบเฉียบพลัน อาการที่พบได้คือ หน้าซีด หงอนเหี่ยว ท้องเสีย และอาจถึงตายได้

โรคพาราไทฟอยด์ (paratyphoid infections) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. ซีโรวาร์อื่นๆ นอกเหนือจาก 2 ซีโรวาร์ที่กล่าวมาข้างต้น การเกิดโรคเป็นได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การตายจะพบได้ในลูกไก่อายุไม่เกิน 2 สัปดาห์ แต่ถ้าอายุมากกว่านั้นมักจะไม่แสดงอาการของโรคทั้งที่มีเชื้ออยู่ในลำไส้และมีการกระจายของเชื้อไปยังอวัยวะภายในต่างๆ ไก่ส่วนหนึ่งจึงเป็นพาหะแพร่เชื้อเข้าสู่ฝูงได้ตลอดเวลา ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของคน ได้แก่ *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium

วัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิส

การพัฒนาการใช้โปรแกรมวัคซีน ในการป้องกันการติดเชื้อซัลโมเนลลาในไก่และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไก่ เป็นแนวทางสำคัญที่นำมาใช้ในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงไก่เป็นอุตสาหกรรม การใช้วัคซีนถือว่ามีความจำเป็น เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ไม่สามารถที่จะป้องกันหรือแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างจริงจังได้ อีกทั้งยังพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมากที่มีการพัฒนาสายพันธุ์ในการดื้อยา ทำให้การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะไม่ค่อยได้ผลนักใน

พื้นที่จริง ในด้านของการสาธารณสุขและเศรษฐกิจแล้ว การใช้วัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิส เป็นอีกหนทางหนึ่งที่สะดวกและปลอดภัย และสามารถลดการขับเชื้อซัลโมเนลลาออกจากตัวสัตว์สู่สิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากการใช้วัคซีนสามารถลดการแพร่ของเชื้อได้ทั้งแบบจากตัวสัตว์สู่ตัวสัตว์ (horizontal transmission) และการแพร่เชื้อผ่านไข่ (vertical transmission) ในฝูงไก่นั้นๆได้ (Poppe, 2000)

อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงในการก่อโรคต่อตัวสัตว์ ทั้งในส่วนของการเกาะกลุ่มของเชื้อในระบบทางเดินอาหารและอวัยวะภายในและการขับเชื้อออกมากับอุจจาระจะขึ้นอยู่กับซีโรวาร์ของเชื้อด้วย (Gast and Holt, 2000a) การใช้วัคซีน เป็นวิธีที่เป็นไปได้ในการป้องกันการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก แต่ประสิทธิภาพของวัคซีนนั้นๆก็จะขึ้นอยู่กับ ขั้นตอนในการเตรียมวัคซีน ชนิดของสื่อที่ใช้ และวัคซีนที่ดี ควรจะเตรียมจากวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นนั้นๆ มีราคาถูก มีความคงตัวสูงและวิธีที่ให้เข้าสู่ตัวสัตว์ก็ต้องเป็นวิธีที่ง่ายและเหมาะสม (Nagaraja et al., 1991)

มีการทดลองมากมายเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิสทั้งแบบชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตาย ในการทดลองเกี่ยวกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคซัลโมเนลโลซิสเชื้อตาย *S.* Enteritidis 'phage type' (PT4) ได้มีการทดลองให้วัคซีนครั้งเดียวทางใต้ผิวหนังในไก่อายุ 3 สัปดาห์และให้วัคซีนสองครั้งคือที่อายุ 3 สัปดาห์และ 6 สัปดาห์ พบว่า วัคซีนให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้ดีเมื่อมีการให้เชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 10^9 cfu และ 10^8 cfu เข้าทางกล้ามเนื้อและเข้าทางเส้นเลือดตามลำดับ (Timms et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้วัคซีนเชื้อตายในน้ำมันสามารถลดการขับเชื้อทางอุจจาระของ *S.* Enteritidis ได้ดี (Gast et al., 1992, 1993)

ในการศึกษาของ Gast และคณะ (1992) ใช้ acetone ในการ inactivate เชื้อ *S.* Enteritidis PT13 โดยเตรียมเป็นวัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมัน ให้วัคซีนในไก่ไข่ครั้งแรกที่อายุ 23 สัปดาห์ ในไก่กลุ่มที่ 1 และ อายุ 45 สัปดาห์ ในไก่กลุ่มที่ 2 และในการให้วัคซีนครั้งที่สอง ไก่ในกลุ่มแรกจะได้รับตอนอายุ 29 สัปดาห์ และไก่ในกลุ่มที่สองจะให้วัคซีนครั้งที่สองเมื่ออายุ 47 สัปดาห์ หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่สองไปแล้วสามสัปดาห์จะทำการป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis PT14b ขนาด 10^9 cells ให้ไก่ทดลองทุกตัว พบว่า สามารถแยกเชื้อได้จากอวัยวะภายในและ egg content ของไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุม

ในปีต่อมา Gast และคณะ (1993) ได้มีการทำการทดลองโดยการผลิตวัคซีนเชื้อตายในน้ำมันโดยใช้เชื้อ *S.* Enteritidis ใช้ acetone เป็นตัว inactivate เชื้อ เปรียบเทียบกับวัคซีนที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนเพื่อการค้า ศึกษาถึงผลต่อการป้องกันการเกาะกลุ่มของเชื้อซัลโมเนลลาในไก่ไข่หลังการป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis เข้าทางปาก ในการศึกษานี้ แบ่งการทดลองออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ โดยไก่กลุ่มแรก ได้รับวัคซีนครั้งแรกที่อายุ 22 สัปดาห์ และไก่กลุ่มที่สองได้รับวัคซีนครั้งแรกที่อายุ 41 สัปดาห์ ไก่แต่ละกลุ่มจะแบ่งออกเป็นสามกลุ่มทดลองย่อย โดยในสามกลุ่มทดลองย่อยจะ

ประกอบด้วย กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น (A) กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า (B) และกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับวัคซีนใด ไก่แต่ละกลุ่มจะได้รับวัคซีนสองครั้ง โดยวัคซีนที่ให้ครั้งที่สองจะห่างจากการให้วัคซีนครั้งแรก 4 สัปดาห์ สองสัปดาห์หลังการให้วัคซีนครั้งที่สองจะป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 10^8 cfu ผลการทดลองพบว่าวัคซีนสามารถลดการเกาะกลุ่มของเชื้อซัลโมเนลลาในลำไส้ลงและจำนวนของ *S.* Enteritidis ที่ตรวจพบได้จากอุจจาระหลังการป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษาของ Timms และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองผลิตวัคซีนเชื้อตายโดยใช้ formalin ในการ inactivate เชื้อ *S.* Enteritidis PT4 ขนาด 10^9 cfu ในสื่อน้ำมัน เริ่มให้วัคซีนครั้งแรกในไก่อายุ 1 วัน และครั้งที่สองที่ 4 สัปดาห์ โดยการให้เข้าใต้ผิวหนัง พบว่า วัคซีนให้ผลในการคุ้มโรคได้ดี เมื่อทำการให้เชื้อขนาด 10^8 cfu เข้าเส้นเลือดดำในไก่แต่ละกลุ่มที่ช่วงอายุต่างๆกัน คือ ที่อายุ 8 12 และ 16 สัปดาห์ แล้ววัดประสิทธิภาพของวัคซีนโดยดูจากอาการทางคลินิก อัตราการตาย การมีชีวิตรอด และรอยโรคหลังการผ่าชาก

Suphabphant และคณะ (1982) ได้มีการทดลองใช้วัคซีนสองชนิด คือ live G30 D และ Killed RW 16 ซึ่งเป็นวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S.* Typhimurium โดยศึกษาถึงผลการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่อายุ 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ พบว่าไก่ในกลุ่มควบคุม มีการขับเชื้อออกมาทางอุจจาระมากกว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งสองชนิด อีกทั้งยังมีระยะเวลาการขับเชื้อออกมาในอุจจาระนานกว่า คือ 52 วัน และในการทดลองนี้พบว่า วิธีการให้วัคซีนที่ต่างกัน คือให้วัคซีนเชื้อเป็น เชื้อตาย หรือการให้ร่วมกันระหว่างเชื้อเป็นและเชื้อตาย ไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใดต่อการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของการขับเชื้อออกทางอุจจาระ

การติดเชื้อซัลโมเนลลาในสัตว์ปีก

ในสัตว์ปีกการติดเชื้อซัลโมเนลลาเกิดได้ 2 วิธี (Poppe, 2000)

2.8.1 การแพร่เชื้อผ่านไข่

เชื้อซัลโมเนลลาบางชนิดสามารถผ่านจากผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด แล้วไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis สามารถทำให้เกิดการแพร่ของเชื้อผ่านไข่ได้ ทำให้สามารถอธิบายได้ว่า เชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคซัลโมเนลโลซิสบ่อยครั้งกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

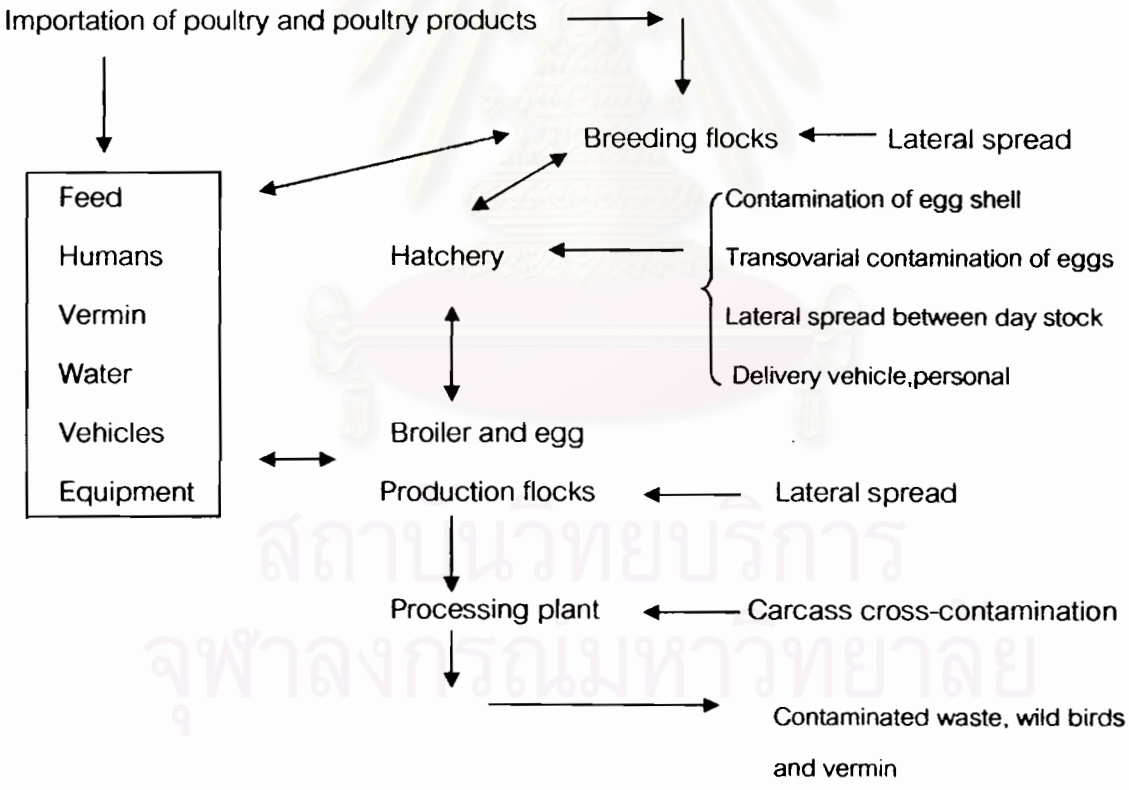
แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อซัลโมเนลลา สามารถแพร่เชื้อไปยังตัวอ่อนซึ่งยังอยู่ในไข่ได้ โดยไก่ที่ติดเชื้อซัลโมเนลลานั้น เชื้อจะก่อให้เกิดการอักเสบที่ท่อนำไข่ และมีการแพร่ของเชื้อผ่านไข่ตั้งแต่ระยะก่อนมีการสร้างเปลือกไข่ (Shivaprasad et al., 1990)

2.8.2 การติดต่อโดยผ่านสิ่งแวดล้อม

เป็นการติดเชื้อจากสัตว์ปีกตัวหนึ่งไปยังสัตว์ปีกอีกตัวหนึ่ง หรือหลายๆตัว หรือการได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่กับสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงสัตว์ปีก เช่น จากสัตว์อื่นๆที่มีเชื้อซัลโมเนลลา (หนู แมลงสาบ นก) จากน้ำและอาหารสัตว์ที่มีเชื้อปนเปื้อน จากอุจจาระและวัสดุรองพื้น

จากการศึกษาของ Cason และคณะ (1994) พบว่า การติดเชื้อจากโรงฟักไข่ เป็นอีกหนทางหนึ่งในการแพร่เชื้อ รวมถึงในระหว่างขั้นตอนการขนส่ง ขั้นตอนการเก็บรักษา ก็อาจมีการปะปนระหว่างไข่ที่มีการปนเปื้อนเชื้อมาก่อนกับไข่ที่ไม่มีการปนเปื้อนได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การติดต่อผ่านทางสิ่งแวดล้อมอาจเกิดได้ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมูลของแม่ไก่ที่มีเชื้อบริเวณเปลือกไข่ ซึ่งจะทำให้มีผลในการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาใน content ของไข่ไก่ได้ (Borland, 1975; Timoney et al., 1989)

ภาพที่ 3 แสดงวงจรของการติดเชื้อซัลโมเนลลา (ศศิธร และ สุปราณี, 2546)

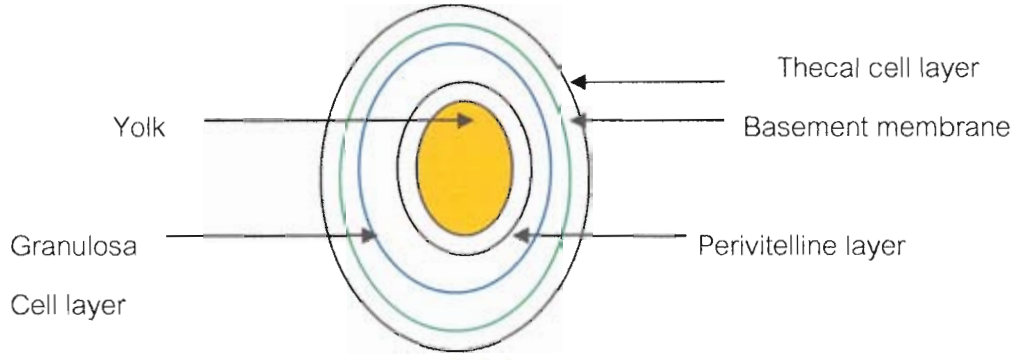


การแพร่เชื้อผ่านไข่ นับเป็นหนทางในการระบาดของเชื้อซัลโมเนลลาที่สำคัญทางหนึ่ง โดยในระยะฟักมักพบการติดต่อของเชื้อผ่านทางแม่ไก่ที่มีการติดเชื้อซัลโมเนลลา โดยเชื้อจะแทรกผ่านเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ (ovary) และท่อนำไข่ (oviduct) ซึ่งเป็นอวัยวะในการสร้างไข่ และเป็น

ทางผ่านของไข่ออกสู่ภายนอกร่างกาย และเชื้ออาจมีผลให้ไก่เกิดพยาธิสภาพแบบรุนแรง เช่น รังไข่อักเสบ (oophoritis) และ ท่อนำไข่อักเสบ (salphingitis) เชื้อจะสามารถแพร่ไปตามอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย โดยเชื้อซัลโมเนลลาที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในลักษณะดังกล่าวมีหลายซีโรวาร์รวมทั้ง *S.* Enteritidis (Cooper et al., 1989 ; Gast and Beard, 1990a,b; Hopper and Mawer, 1988 ; Timoney et al., 1989) จากการศึกษาของ Humphrey และคณะ (1989a) ยืนยันได้ว่า *S.* Enteritidis ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ได้พบว่ามีอยู่เป็นปกติในระบบสืบพันธุ์ หลังจากที่มีการทดลองให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายสัตว์นั้น กลับมีผลให้พบเชื้อในไข่ไก่ได้ โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกของการได้รับเชื้อดังกล่าวใน แม่ไก่ที่มีการป้อนเชื้อ จากนั้นจึงตรวจหาเชื้อในไข่ไก่จำนวน 1,119 ฟอง จากฝูงไก่ไข่สองฝูงๆละ 35 ตัว ผลการทดสอบพบว่า มีไข่ไก่จำนวน 11 ฟอง จากทั้งหมด พบเชื้อซัลโมเนลลาได้

ในปีเดียวกันนั้นเอง Timoney และคณะ (1989) ศึกษาถึงกลไกในการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ของอวัยวะภายใน เนื่องจากในอเมริกามีการสำรวจพบว่า ไข่ไก่เกรดเอ ที่ไม่มีการแตกร้าว และมีการผ่านระบบการฆ่าเชื้อที่ได้มาตรฐาน สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis ในไข่ไก่ได้ คณะผู้วิจัย จึงได้วางแผนการศึกษาโดยทำการป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml. เข้าทางกระเพาะพักของไก่ไข่อายุ 28 สัปดาห์ จากนั้นจะเก็บตัวอย่าง ตับ ม้าม ลำไส้ (แยกส่วน jejunum caecum colon) ovule oviduct และไข่ไก่ มาทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 4 7 12 19 และ 30 วันหลังป้อนเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาได้ 100% ของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละอวัยวะ คือ วันที่ 4 และ 7 และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง(หลังป้อนเชื้อไปแล้ว 6 สัปดาห์) ผลที่ได้จากไข่ไก่ คือพบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ในไข่แดงมากกว่าในไข่ขาว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Board (1966) ที่พบว่าในไข่ไก่นั้น albumen มีคุณสมบัติในการเป็น antibacterial และ ไข่แดง หรือ yolk นั้นเทียบได้ว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี เหมาะแก่การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และสามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด คือ วันที่ 2 และวันที่ 3 หลังป้อนเชื้อ และจะพบมากอีกครั้งในวันที่ 13 หลังการป้อนเชื้อ นอกจากนี้จากการศึกษานี้สามารถสรุปเพิ่มเติมได้ว่าเชื้อ *S.* Enteritidis มีคุณสมบัติในการแทรกผ่านเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ไก่ได้ดี และมีชีวิตอยู่ได้นานในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังสามารถแฝงตัวอยู่ตามอวัยวะนั้นๆได้ดี โดยเฉพาะภายใน content ของไข่ที่ยังไม่มีการสร้างเปลือกแข็ง หรือ Shell มาหุ้ม ส่งผลให้ไข่ไก่มีการติดเชื้อมาตั้งแต่กระบวนการการสร้างไข่ภายในร่างกายของแม่ไก่ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการทำความสะอาดภายนอกไข่เพียงอย่างเดียวนั้น จึงไม่ได้ผลในการกำจัดเชื้อ ทำให้มีการระบาดของโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารในที่สุด

แต่การที่จะทราบถึงกลไกของการเกิดการแพร่เชื้อผ่านไข่นั้น จำเป็นที่จะต้องศึกษาหรือทราบเกี่ยวกับความสามารถของเชื้อในการแทรกซึมเข้าภายในไข่ไก่ ซึ่งเป็นระยะที่ไข่ยังอยู่ในท่อนำไข่ของแม่ไก่ที่มีเชื้อ *S.* Enteritidis โดย Thiagarajan และคณะ (1994,1996) ได้ทำการศึกษาและอธิบายเกี่ยวกับกลไกการแทรกผ่าน (invasive) และการเกาะจับ (attachment) ของเชื้อดังกล่าวกับบริเวณที่เรียกว่า ovarian granulosa cells ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อสามารถที่จะแทรกผ่านเข้าไปและมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยตรวจพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ใน cytoplasm ของ granulosa cells ทั้งที่มีและไม่มีเยื่อหุ้มล้อมรอบ (surrounding membrane) ซึ่งแสดงว่า ชั้นของ granulosa cells ของไข่ไก่ในระยะแรกเริ่ม (preovulatory follicle) อาจเป็นบริเวณที่เหมาะสมที่สุดต่อการเกาะกลุ่มของเชื้อ *S.* Enteritidis ในรังไข่ และจากการศึกษาที่ผ่านมา มีการกล่าวถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเกาะจับของเชื้อก่อนที่จะมีการแทรกผ่านเข้าไปในส่วนของไข่แดง พบว่า ส่วนของ ถุงหุ้มไข่แดง (yolk membrane หรือ vitelline membrane) นั้นมีความเหมาะสมและสามารถตรวจพบเชื้อในบริเวณดังกล่าวได้มาก ดังเช่นในการศึกษาของ Gast และ Holt (2001) ที่ศึกษาถึงการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในไข่ไก่ โดยหลังมีการทดลองป้อนเชื้อเข้าปากในไก่ไข่ อายุ 24 สัปดาห์ หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงก็เริ่มเก็บไข่มาตรวจเพาะเชื้อ โดยจะเพาะเชื้อทั้งจากส่วนของไข่แดงรวมกับ vitelline membrane และจากส่วนของไข่แดงอย่างเดียว ผลการทดลองที่ได้สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งในส่วนของไข่แดงและ vitelline membrane แต่สัดส่วนของการตรวจพบนั้นพบว่า เปอร์เซนต์การพบเชื้อที่ตรวจจากส่วนของไข่แดงที่มี vitelline membrane หุ้ม พบมากถึง 4.3 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อตรวจเพาะเชื้อเฉพาะส่วนของไข่แดงอย่างเดียว พบเชื้อเพียง 0.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Fleischman และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในส่วนต่างๆของไข่ไก่ ระหว่างส่วนของถุงหุ้มไข่แดง ไข่แดง และไข่ขาว ที่อุณหภูมิต่างๆของการเก็บรักษาไข่ไก่ พบการเจริญของเชื้อ *S.* Enteritidis ในส่วนของ ถุงหุ้มไข่แดง และไข่แดง ในปริมาณใกล้เคียงกัน ในขณะที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่ไข่ขาวเลย และจากการศึกษาครั้งต่อมาของ Gast และคณะ (2005) ก็ยืนยันผลการทดลองที่ว่า vitelline membrane มีบทบาทสำคัญในการแทรกซึมของเชื้อเข้าสู่ส่วนของไข่แดง โดยตรวจพบเชื้อที่ส่วนนี้ ก่อนมีการตรวจพบเชื้อในส่วนของไข่แดง และเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Toshiyuki และคณะ (2005) ที่ศึกษาถึงการเจริญของเชื้อ *S.* Enteritidis ในไข่ไก่ โดยฉีดเชื้อดังกล่าวเข้าที่ vitelline membrane ของไข่ไก่ที่ได้จากไก่ทดลอง SPF พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่ vitelline membrane ก่อนที่จะมีการตรวจพบเชื้อในส่วนของไข่แดงโดยจะพบเชื้อที่ส่วนของไข่แดงในวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อ



ภาพที่ 4 แสดง Preovulatory follicle (Thiagarajan et al., 1994)

ในด้านสาธารณสุข การติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในคน สาเหตุสำคัญประการหนึ่งเกิดจากการได้รับเชื้อจากอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาหารประเภทไข่ (Altekruse et al., 1993) การปนเปื้อนเชื้อในไข่ เกิดขึ้นจากระดับฟาร์ม โดยไข่มีการติดเชื้อจากแม่ไก่ หรือ ได้รับการปนเปื้อนในกระบวนการขนส่งจากฟาร์มสู่ผู้บริโภค ไข่มีการแตกร้าวในช่วงขนส่ง หรือไข่ที่ไม่ได้รับการปรุงให้สุก เช่น ไข่ลวก การนำไข่มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น มายองเนส (mayonnaise), milk shakes, แซนวิชไข่ ที่ไข่ขาวดิบ, ไอศครีมไข่ ที่มักใช้ไข่ดิบในการประกอบการทำ จะพบว่าล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S.* Enteritidis ทั้งสิ้น (Humphrey et al., 1988; Cowden et al., 1989)

อย่างไรก็ตาม ควรหลีกเลี่ยงการติดเชื้อดังกล่าว โดยการปรุงอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไก่ โดยเฉพาะเนื้อไก่และไข่ ให้สุกก่อนรับประทาน โดยจากการศึกษาของ Humphrey และคณะ (1989a) พบว่า เชื้อซัลโมเนลลา ทั้ง *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium และ *S.* Senftenberg ยังสามารถตรวจพบได้จากส่วนของไข่แดงที่ยังไม่สุก โดยยังมีลักษณะเป็นของเหลวหรือยางมะตูม ในการปรุงสุกจะต้องอาศัยทั้งระดับความร้อนและระยะเวลาที่เหมาะสม จึงจะสามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวได้ เช่น ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Typhimurium ในไข่ไก่ต้ม จะต้องต้มไข่นาน 7-8 นาที หรือในการทอดไข่ จะต้องใช้อุณหภูมิในการทอด 64 องศาเซลเซียส และต้องใช้เวลานาน 3 นาที ในการทำให้แต่ละด้านของไข่สุก จึงจะสามารถทำลายเชื้อดังกล่าวได้ (Humphrey et al., 1989b) นอกจากอุณหภูมิที่สูงจะสามารถทำลายเชื้อได้แล้ว อุณหภูมิที่ต่ำ เช่น การแช่เย็นไข่ ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยในอุณหภูมิดังกล่าวเชื้อจะไม่เจริญในส่วนของไข่แดง ทั้ง *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium (Kim et al., 1989; Humphrey, 1990) และเชื้อซัลโมเนลลาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -30 องศาเซลเซียส จะยังคงสามารถนำมานับจำนวนเชื้อได้ (viable) แต่ไม่สามารถเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (multiply) ได้ในส่วนของไข่ขาว และพบการเก็บไข่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อส่วนหนึ่งตายได้ (Lock and Board, 1992)

วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อซัลโมเนลลาในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปีกที่ปฏิบัติกันมานาน โดยทั่วไปจะใช้วิธีแอกกลูติเนชั่น (agglutination) โดยการใช้น้ำยาทดสอบแอนติเจน ซึ่งใช้ส่วนที่เป็น surface antigen ที่ผนังเซลล์ หรือที่เรียกว่า โซมาติกโอ แอนติเจน (somatic o antigen) ย้อมสีแล้วทดสอบกับหยดเลือดหรือซีรั่ม กวนให้เข้ากันบนสไลด์ ถ้าในเลือดหรือซีรั่ม มีแอนติบอดีมากพอ ก็จะจับกับแอนติเจนในน้ำยา ทำให้เกิดตะกอน ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว และเห็นผลได้ชัด และจะใช้ได้ผลดีที่สุดกับ *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum และมักพบว่าให้ผลไม่น่าเชื่อถือกับเชื้อซัลโมเนลลาซีโรวาร์อื่นๆ (Nagaraja et al., 1991) รวมทั้ง *S.* Enteritidis ในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีที่ใช้ในการทดสอบแอนติเจนกับซีรั่ม มักทำในหลอดทดลอง (serum agglutination test - SAT) หรือในไมโครเพลท (microagglutination test - MT) ในการยืนยันผลจากการทดสอบในภาคสนาม และเนื่องจากการใช้วิธีทดสอบดังกล่าว ให้ผลไม่ดีนักในการตรวจ *S.* Enteritidis จึงได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบแอนติบอดีที่มีความไว ความสะดวก ความจำเพาะ และรวดเร็วกว่าการทดสอบวิธีเดิม นั่นคือ วิธี ELISA ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อซัลโมเนลลา ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการทดสอบดังกล่าวในการตรวจวัดประสิทธิภาพ ของวัคซีนในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของไก่ทดลองหลังจากได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเอง เปรียบเทียบกับไก่ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า และไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนใดๆเลย

Cooper และคณะ (1989) ได้พัฒนาวิธีทดสอบ ELISA โดยการใช้แอนติเจนที่สกัดจากผนังเซลล์ของ *S.* Enteritidis โดยใช้ส่วนของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide - LPS) เนื่องจากประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอนติเจนจำเพาะต่อซัลโมเนลลากรุ๊ปดี โดยได้มีการทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธีแอกกลูติเนชั่น อันได้แก่วิธี RST (rapid slide test) SATและ MT ตลอดจนวิธีการเพาะแยกเชื้อในฝูงไก่ที่ติดเชื้อ *S.* Typhimurium โดยธรรมชาติ ผลที่ได้พบว่า การใช้ ELISA มีความไวในการทดสอบมากกว่า และสามารถตรวจพบจำนวนไก่ที่ติดเชื้อได้มากกว่าวิธีอื่นๆ โดยการทดลองนี้ พบว่า การเพาะแยกเชื้อทั้งจากสวอปอุจจาระไก่หรือจากการผ่าชาก ไม่สามารถบอกความชุกของการติดเชื้อในตัวอย่างที่นำมาตรวจได้ และผลการแยกเชื้อ ไม่มีความสัมพันธ์กับผลการตรวจทาง ซีรั่มวิทยา อีกทั้งยังพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่าง *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นเชื้อ ซัลโมเนลลาในซีโรกรุ๊ปบี ในการตรวจด้วยวิธี MT Nicholas และ Cullen (1991) ได้ทำการทดสอบวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนจาก LPS และแอนติเจนที่สกัดจากความร้อน (heat extract - HE) เปรียบเทียบกับวิธี RST MT ในฝูงที่ติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในธรรมชาติ พบว่า HE – ELISA สามารถตรวจแอนติบอดีได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ LPS – ELISA ตรวจได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และวิธีเพาะแยกเชื้อตรวจได้เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ Minga (1992) รายงานผลการตรวจ LPS – ELISA จาก *S.* Gallinarum ที่ก่อโรคไทฟอยด์ในไก่ และ LPS – ELISA จาก *S.* Enteritidis สามารถตรวจแอนติบอดีได้ทั้งไก่ที่เกิดโรค

ไทฟอยด์ และไก่ที่ถูกทำให้มีภูมิคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อ *S.* Enteritidis และยังสัมพันธ์กับการตรวจด้วยวิธี SAT และ RST อีกทั้งพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเพียงเล็กน้อย เมื่อทดสอบกับซีรั่มที่มาจากไก่ที่ติดเชื้อ *S.* Typhimurium

จากเอกสารอ้างอิงข้างต้น มีความเป็นไปได้ที่จะนำวิธี ELISA มาใช้ในการตรวจทางซีรั่มวิทยา เพื่อตรวจสภาวะการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ซึ่งเป็นซีโรวาร์ชนิดแทรกซึมเนื้อเยื่อ (invasive serovar) แทนวิธีแอกกลูติเนชั่นที่ใช้อยู่เดิม เนื่องจากมีความไว และมีความจำเพาะมากกว่า อีกทั้งยังสะดวกและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยสภาวะการติดเชื้อซัลโมเนลลาในการเลี้ยงสัตว์ปีกที่เป็นอุตสาหกรรมอย่างมาก

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (nalidixic-acid-resistant strain) เชื้อตายในสื่อน้ำมันในการป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวในอวัยวะภายในของไก่ไข่ที่ได้รับวัคซีนเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ และศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนต่อการป้องกันการแพร่เชื้อผ่านไข่ และการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ไก่ทดลอง

การทดลองที่ 1 ใช้ไก่ไข่เพศเมีย อายุ 1 วัน จำนวน 80 ตัว เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ สุ่มแบ่งไก่ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว (sampling randomization) ให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่ (*ad libitum*) ใช้เวลาเลี้ยงทั้งหมด 9 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในกรงตาข่ายยกพื้น พื้นที่การเลี้ยงคิดเป็น 8 ตัวต่อ 0.6 ตารางเมตร

การทดลองที่ 2 ใช้ไก่ไข่เพศเมีย อายุ 1 วัน จำนวน 100 ตัว เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ สุ่มแบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่ ใช้เวลาเลี้ยงทั้งหมด 26 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในกรงตาข่ายยกพื้น พื้นที่การเลี้ยงคิดเป็น 8 ตัวต่อ 0.6 ตารางเมตร และเมื่อไก่อายุ 18 สัปดาห์ นำขึ้นเลี้ยงบนกรงตับ จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

อาหาร

ใช้อาหารไก่ไข่สำเร็จรูปของบริษัท ตามช่วงอายุของไก่

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัคซีนซัลโมเนลลาเชื้อตาย ดัดแปลงจากวิธีของ Stone และคณะ (1978)

1.1 *การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย*

1.1.1 ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) ที่เก็บเป็น stock agar ในภาควิชาอายุรศาสตร์ นำมาเพิ่มจำนวนใน blood agar จำนวน 5 plates นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นกวาดเชื้อที่ขึ้นบน agar ให้มากที่สุดใส่ลงใน tryptone soya broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วดูดของเหลวใน TSB นั้นมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อทำ ten fold dilution โดยทำการเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-11}

1.1.2 นำ dilution ดังกล่าวมาเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำความเข้มข้นที่ 10^{-5}-10^{-11} มาทดสอบโดยดูดของเหลวในหลอด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน XLT4 agar แล้วทำการ spread plate จากนั้นนำ plate ไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

1.1.3 ตรวจนับปริมาณโคโลนีที่ขึ้นใน plate แล้วคำนวณกลับไป จะได้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น หน่วยเป็น cfu/ml. โดยปริมาณเชื้อตั้งต้นที่จะนำมาใช้ในการทดลองจะปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{11} cfu/ml.

1.1.4 ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{11} cfu/ml. ใน TSB แบ่งออกเป็น aliquots ขนาด 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกของเหลว (centrifuge) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 g นาน 2 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเป็นลักษณะแบบ pellet

1.1.5 นำแต่ละ pellet ที่ได้มาทำการล้าง 2 ครั้งใน phosphate buffered saline (PBS)

1.1.6 นำ pellet ของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายใน PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาทำการ inactivate โดยการเติม 40% formalin ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไป นำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน

1.1.7 นำเชื้อแบคทีเรียที่ inactivate แล้วดังกล่าวมาทำการปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย PBS

1.1.8 เก็บไว้ในลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เป็น stock solution ในขั้นตอนต่อไปของการผลิตวัคซีน (แต่หากต้องการเก็บไว้เป็นเวลานาน ให้เก็บในไว้ในรูปแบบ pellet)

1.1.9 ในการทดสอบความ sterile ของเชื้อ จะนำ aliquots ดังกล่าวมา incubate ใน TSB

1.2 การเตรียม oil emulsion bacterin (aqueous:oil, ,1:4) ปริมาตร 50 ml.

1.2.1 ผสม stock solution ปริมาตร 9.6 มิลลิลิตร กับ Tween 80 (polysorbate 80) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จะได้ส่วนของ aqueous phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.2.2 ผสม mineral oil (Ondina oil,Shell®) ปริมาตร 36 มิลลิลิตร กับ arlacel 80 (sorbitan monooleate) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask แล้วปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็น oil phase ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

1.2.2 ค่อยๆผสม aqueous phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ oil phase ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

1.2.3 จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งใน beaker โดยการใช้แรงดันจากการอัดฉีดส่วนผสม ดูดขึ้น-ลงในกระบอกฉีดยา ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนนี้ใช้เวลา 90 นาที จึงจะสามารถทำให้ส่วนผสมทั้งหมดเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2.4 เก็บวัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.2 การให้วัคซีน (bacterin administration)

การทดลองที่ 1 ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้น ด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ให้ในไก่อายุ 4 สัปดาห์ ครั้งเดียว โดยวัคซีนมีความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) เท่ากับ 10^9 cfu/ml.

การทดลองที่ 2 ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เริ่มให้วัคซีนครั้งแรก เมื่อไก่ทดลองอายุ 8 สัปดาห์ และให้วัคซีนเดียวกันซ้ำอีกครั้งในไก่กลุ่มที่ให้วัคซีน 2 ครั้ง เมื่อไก่อายุ 12 สัปดาห์ ปริมาตรที่ให้คือ 0.5 มิลลิลิตร และวัคซีนที่ให้ในแต่ละครั้งมีความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) เท่ากับ 10^9 cfu/ml.

3.3 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ

เตรียมสารละลายเชื้อ (PBS) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 ซึ่งมีเชื้อโดยประมาณเท่ากับ 10^8 cfu/ml. จากนั้นนำมาเจือจางด้วย PBS ได้เชื้อความเข้มข้น $3x10^6$ cfu/ml. เพื่อใช้ในการทดลองที่ 1 และใช้ความเข้มข้น $2x10^8$ cfu/ml. เพื่อใช้ในการทดลองที่ 2 นำไปทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในตัวไก่

3.4 การป้อนเชื้อพิษทับแก่ไก่ (*Salmonella* Enteritidis challenge)

การทดลองที่ 1 เมื่อไก่อายุ 8 สัปดาห์ ให้เชื้อ *S.* Enteritidis (nalidixic-acid- resistance) ด้วยวิธีป้อนปาก ขนาด 10^6 cfu/ml. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแก่ไก่ทุกตัว

การทดลองที่ 2 เมื่อไก่อายุ 23 สัปดาห์ ให้เชื้อ *S.* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) ด้วยวิธีป้อนปาก ขนาด 10^8 cfu/ml. ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแก่ไก่ทุกตัว (Shivaprasad et al., 1990)

3.5 การเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* (ก่อนทำการป้อนเชื้อพิษทับ)

ตัวอย่างที่เก็บในช่วงก่อนการป้อนเชื้อพิษทับ ซึ่งได้แก่ cloacal swab และ อุจจาระ นำมาตรวจการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis โดยขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อ มีดังนี้

ขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อนั้น เบื้องต้นได้ดัดแปลงวิธีของ Corrier และคณะ (1994) โดยนำ cloacal swab และ อุจจาระ เติม buffered peptone water (BPW) pH 7.5 ในอัตราส่วน 1 : 10 (ตัวอย่าง(g) : BPW(ml)) นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

สำหรับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อ *S.* Enteritidis ในลำดับต่อไป ได้ดัดแปลงจากวิธีที่แนะนำไว้โดย Bangtrakulnonth และคณะ (1995); Suthienkul และคณะ (1995) และ Bangtrakulnonth และคณะ (2002)

นำตัวอย่างออกมาจากตู้บ่มเพาะเชื้อ ใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน modified semi-solid rappaport-vassiliadis (MSRV) medium แล้วกลิ้งของเหลวรอบจาน และ อีก 1000 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มี tetrathionate broth (TTB) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดเข้าบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV ใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ให้ผลบวก จะทำให้สีของ MSRV medium เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นรอบๆจุดที่หยดเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *S.* Enteritidis ที่มีแฟลกเจลลาจะสามารถเคลื่อนที่ไปรอบๆจุดที่หยดเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ย (straight wire) แตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุด นำไป streak ลงบน brilliant green agar (BGA) ที่เติม novobiocin (Difco™, France) ขนาด 0.01 mg./ml. และ xylose lysine tergitol 4 (XLT4) ที่เติม nalidixic acid (Difco™, France) ขนาด 0.025 mg./ml. โดยควร streak เชื้อให้กระจาย เพื่อให้เชื้อสามารถขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้น นำ BGA และ XLT4 agar เข้าตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

ของเหลวจาก TTB หลังจากนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส18-24 ชั่วโมง ให้นำลูป (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มของเหลวจาก TTB แล้ว streak ลงบน BGA ที่เติม novobiocin ขนาด 0.01 mg./ml. และ XLT4 ที่เติม nalidixic acid ขนาด 0.025 mg./ml. โดยจะ streak เชื้อให้กระจาย เพื่อให้เชื้อสามารถขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำ BGA และ XLT4 agar เข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง โคโลนีของเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ได้ส่วนใหญ่ 91.6% ที่ขึ้นบน XLT4 agar มีรูปร่างกลม สีออกชมพูแดง ขนาดปานกลาง ตรงกลางมีสีดำเนื่องจากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Ewing and Ball, 1996 cited in Bangtrakulnonth, 2002) โคโลนีของเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ขึ้นบน BGA มีสีลักษณะกลม สีชมพูแดง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสีออกแดง เลือกลักษณะโคโลนีดังกล่าวนำไปเพาะยืนยันใน triple sugar iron agar slant (TSI) และ motility indole lysine medium (MIL) (37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง)

ขั้นตอนต่อไปจะนำ TSI และ MIL ไปตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาและหาซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ตรวจพบ ตามวิธีของ Bangtrakulnonth (2002) โดยลักษณะของ TSI และ MIL ที่จะนำไปตรวจต่อจะพิจารณาดังนี้

คุณสมบัติเฉพาะของ *S.* Enteritidis คือ เปลี่ยนสีของ TSI agar ให้สีเหลืองที่ก้นหลอด (acid butt) และมีสีแดงที่ผิวหน้า slant (alkaline slant) มีการสร้างก๊าซไฮโดรเจน ซัลไฟด์ที่บริเวณก้นหลอด และ ใน MIL ตัวอย่างที่ให้สีม่วงขุ่นจากการที่เชื้อสามารถใช้ glucose กับ amino acid (lysine decarboxylation) และเชื้อมีการเคลื่อนที่ออกจากแนว stap (motile)รวมทั้งเมื่อใช้ Kovac's reagent หยดลงใน MIL เพื่อทดสอบการสร้าง indole ของเชื้อ แล้วปรากฏสีเหลืองของ reagent บนผิวด้านหน้าของ media แสดงถึงเชื้อไม่สามารถใช้ tryptophan ได้ ผลสรุปปรากฏดังตารางการแปลผลการทดสอบทางชีวเคมี

การแปลผลการทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบ	*Salmonella* Enteritidis
TSI acid from glucose	+
TSI gas from glucose	+
TSI acid from lactose	-
TSI acid from sucrose	-
TSI hydrogen sulfide produced	+
lysine decarboxylation	+
production of indole	-
motile	+

ข้อมูลจาก คู่มือวิธีมาตรฐานสำหรับการทดสอบเชื้อซัลโมเนลลา International standard ISO 6579:2002(E) เรียบเรียงโดย น.สพ. วิษณุ วรรณแสวง บริษัทสหฟาร์ม จำกัด

3.6 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis

นำตัวอย่างมาทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *S.* Enteritidis ซึ่งได้ดัดแปลงวิธีการตรวจนับมาจาก Gast และคณะ (1993) โดยขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจะเก็บด้วยวิธีปราศจากเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจนับจำนวนโคโลนีมาชั่งน้ำหนัก แยกรายตัวใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดย่อยตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือนำตัวอย่างไปบดด้วยแท่งบด (homoginizer) เติม PBS ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักตัวอย่าง (g.) : PBS (ml.)) นำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการเจือจาง 10 เท่า (ten fold dilution) ดูดของเหลวปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากแต่ละ dilution ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLT4 ที่เติม nalidixic acid ขนาด 0.025

mg./ml. แล้วทำการ spread เชื้อให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเข้าตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

นำจานเลี้ยงเชื้อที่มาจากแต่ละความเข้มข้น (dilution) มาทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลา โดยในการคำนวณจำนวนโคโลนี จะคิดเป็นหน่วย cfu (colony forming unit)

3.7 การเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (หลังทำการป้อนเชื้อพิษทับ)

ตัวอย่างอวัยวะที่เก็บในช่วงหลังทำการป้อนเชื้อพิษทับของในแต่ละการทดลองได้แก่ ไส้ตันตับ ม้าม และรังไข่ นำมาทำการเพาะแยกเชื้อ *S.* Enteritidis โดยขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อนั้นเบื้องต้นได้ดัดแปลงวิธีของ Corrier และคณะ (1994) โดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดย่อยไส้ตันให้เป็นชิ้นเล็กๆ เติม BPW pH 7.5 ในอัตราส่วน 1:9 (ตัวอย่าง:BPW) ปิดผนึกปากถุงพลาสติกด้วยความร้อนโดยใช้ plastic sealer จากนั้นนำถุงตัวอย่างเข้าเครื่อง masticator (IUL instruments, Barcelona, Spain) เปิดให้เครื่องทำงานนาน 20 วินาทีต่อถุง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Wooley และคณะ (1999) ; Corrier และคณะ (1991) ใช้กรรไกรตัดปากถุงก่อนนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

สำหรับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อ *S.* Enteritidis ในลำดับต่อไป ได้ดัดแปลงจากวิธีที่แนะนำไว้โดย Bangtrakulnonth และคณะ (1995); Suthienkul และคณะ (1995) และ Bangtrakulnonth และคณะ (2002)

นำถุงตัวอย่างออกมาจากตู้บ่มเพาะเชื้อ ใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตรหยดลงบน MSRV medium จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ให้ผลบวก จะทำให้สีของ MSRV medium เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นรอบๆจุดที่หยดเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *S.* Enteritidis ที่มีแฟลกเจลลาสามารถเคลื่อนที่ไปรอบๆจุดที่หยดเชื้อ ใช้เข็มเขี่ย (straight wire) แตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุดนำไป streak ลงบน BGA ที่เติม novobiocin ขนาด 0.01 mg./ml. และ XLT4 ที่เติม nalidixic acid ขนาด 0.025 mg./ml. โดยควร streak เชื้อให้กระจาย เพื่อให้เชื้อสามารถขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำ BGA และ XLT4 agar เข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

นำโคโลนีของเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ได้ บน XLT4 agar และ BGA ไปเพาะยืนยันใน TSI agar slant และ MIL (37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง)

ตัวอย่างที่ได้จาก TSI agar slant และตัวอย่างที่ได้ใน MIL เช่นเดียวกันกับการเพาะแยกเชื้อในช่วงก่อนการป้อนเชื้อพิษทับ นำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาและหาซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ตรวจพบ ตามวิธีของ Bangtrakulnonth (2002)

3.8 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis จากไข่ไก่

3.8.1 *<u>การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อภายนอกไข่</u> (Egg shell contamination)*

ดัดแปลงจากวิธีของ Shivaprasad และคณะ (1990)

เมื่อเก็บไข่มาแล้ว นำไข่ทั้งฟอง ใส่ลงใน 10 ml. ของ BPW ที่บรรจุอยู่ในภาชนะ หรือถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วแช่ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบไข่ออกจากถุง

↓

นำ BPW ที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติก ไปเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°c ,overnight

↓

ใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน MSRV medium นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 42°c , 18-24 ชั่วโมง

↓

ใช้เข็มเขี่ย (straight wire) แตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุด streak ลงบน BGA ที่เติม novobiocin ขนาด 0.01 mg./ml. และ XLT4 ที่เติม nalidixic acid ขนาด 0.025 mg./ml. นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°c ,18-24 ชั่วโมง

↓

นำ Salmonella like colony นำไปเพาะยืนยันใน TSI agar slant และ MIL (37°c, 24 ชั่วโมง)

↓

ตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาและหาซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ตรวจพบ ตามวิธีของ Bangtrakulnonth (2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.2 *<u>การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อภายในไข่</u>*

ดัดแปลงจากวิธีของ Thiagarajan และคณะ (1994)

นำไข่ที่เก็บมาล้างทำความสะอาดเปลือกไข่ โดยใช้ betadine และ 70% ethanol ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะเปิดฝาไข่ด้านป้าน แล้วปล่อยให้ content ภายในตกลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

↓

ใช้ cotton swab เขี่ยม้วนเฉพาะ membrane ที่อยู่ล้อมรอบ content ออกมา โดยก่อนนำ membrane ดังกล่าวไปเพาะเชื้อในขั้นตอนต่อไป ควรใช้ BPW ที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไปล้างทำความสะอาด membrane เพื่อล้างส่วนของไข่แดงที่อาจติดมากับ membrane นั้นก่อน จากนั้นนำ membrane ดังกล่าวใส่ลงใน BPW ปริมาตร 20 ml.

↓

ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดย่อย membrane ให้ละเอียด นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°c ,18-24 ชั่วโมง

↓

ใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน MSRV medium นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 42°c , 18-24 ชั่วโมง

↓

ใช้เข็มเขี่ย (straight wire) แตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุด streak ลงบน BGA ที่เติม novobiocin 0.01 mg./ml. และ XLT4 ที่เติม nalidixic acid ขนาด 0.025 mg./ml. นำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°c ,18-24 ชั่วโมง

↓

นำ Salmonella like colony นำไปเพาะยืนยันใน TSI agar slant และ MIL (37°c, 24 ชั่วโมง)

↓

ตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาและหาซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ตรวจพบ ตามวิธีของ Bangtrakulnonth (2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9 การทดสอบความหนืดของวัคซีน

ตามวิธีของ Stone และคณะ (1978) ; Stone และ Xie (1990) โดยการดูดวัคซีนเชื้อตายที่ทดสอบความหนืดด้วยปิเปตพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร และจับเวลาเป็นวินาที นับตั้งแต่ปล่อยวัคซีนมาในแนวตั้ง จากระดับ 0 มิลลิลิตรถึง 0.4 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้งต่อการทดสอบ โดยใช้นาฬิกาจับเวลา

3.10 การทดสอบความคงตัวของวัคซีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1991) คือ ระยะเวลา (สัปดาห์) ที่วัคซีนสามารถรักษาสถานะอิมัลชั่นไว้ได้ จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจนของส่วนที่เป็นน้ำอยู่ใต้ชั้นของอิมัลชั่นในหลอดแก้วปิดสนิท ภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ดูผลทุกวันเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

3.11 การทดสอบปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ

ภายหลังการให้วัคซีนเป็นเวลา 7 วัน ตรวจปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อของวัคซีนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Stone (1997) ตรวจดูรอยโรคที่ผิวหนังบริเวณคอในตำแหน่งที่ฉีดวัคซีน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ได้แก่ การเปลี่ยนสี การอักเสบ การบวมน้ำ การเกิดก้อน granuloma การมีปลอกแคปซูลหุ้มล้อมรอบ บริเวณที่ฉีดวัคซีน หรือพบวัคซีนกระจายทั่วไป
โดยการให้คะแนนรอยโรคแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับอ่อน บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีซีดลง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 เซนติเมตร ไม่มีวัคซีนเหลืออยู่

ระดับปานกลาง บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีซีดถึงแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 เซนติเมตร พบวัคซีนเหลืออยู่เป็นเม็ดเล็กๆในชั้น superficial muscle เท่านั้น

ระดับรุนแรง บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร พบวัคซีนเหลืออยู่เป็นเม็ดขนาดใหญ่ เมื่อผ่าออกจะมีของเหลวไหลออกมา

3.12 การทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S.Enteritidis

เก็บตัวอย่างเลือด แล้วทำการแยกซีรั่ม โดยเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดบรรจุเลือด แล้วปั่นแยกซีรั่มด้วยเครื่องปั่นแยกของเหลว ที่ความเร็ว 3000 g นาน 5 นาที แยกซีรั่มใส่ลงในหลอดบรรจุเลือดแล้วเก็บในถุงพลาสติก แช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นำไปตรวจแอนติบอดีต่อวัคซีน *S.* Enteritidis ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป FLOCKCHECK*SE® (IDEXX, UK.) ซึ่งเป็น competitive ELISA วิธีการทดสอบเริ่มด้วยใช้ ELISA plate ที่เคลือบด้วยแอนติเจนของ *S.* Enteritidis เติมซีรั่มไก่ที่ต้องการทดสอบโดย

เจือจางเป็น 1:250 ในตัวทำละลาย (serum diluent) จากนั้นดูดมาใส่ใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้าง 3 ครั้งด้วย washing solution เติม anti-SE conjugate (horseradish peroxidase-HRPO) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นล้าง 3 ครั้ง เติม substrate (TMB) จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที จากนั้นจึงเติมน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มของสี อ่านเป็นค่า optical density (OD) จากเครื่องอ่าน ELISA multiscan ที่มีความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร บันทึกผล เปรียบเทียบกับค่าซีรั่มบวกควบคุมและซีรั่มลบควบคุม

การกำหนดค่าบวกและค่าลบ (positive/negative cut off value)

การคำนวณค่า negative control จะมาจาก $\frac{\text{หลุม A1 + หลุม A2}}{2} = \geq 0.8$

การคำนวณค่า positive control จะมาจาก $\frac{\text{หลุม A3 + หลุม A4}}{2} = \leq 0.5$

การแปลผล

ค่าที่ได้จากการทดสอบ แสดงผลเป็น S/N ratio คือการนำค่า OD ของแต่ละตัวอย่างที่ทดสอบหารด้วย ค่า OD ของ negative control

1. ค่า S/N ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 0.75 ตัดสินเป็น ผลลบ
2. ค่า S/N ratio อยู่ระหว่าง 0.6-0.74 ตัดสินเป็น ต้องทดสอบใหม่
3. ค่า S/N ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.59 ตัดสินเป็น ผลบวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

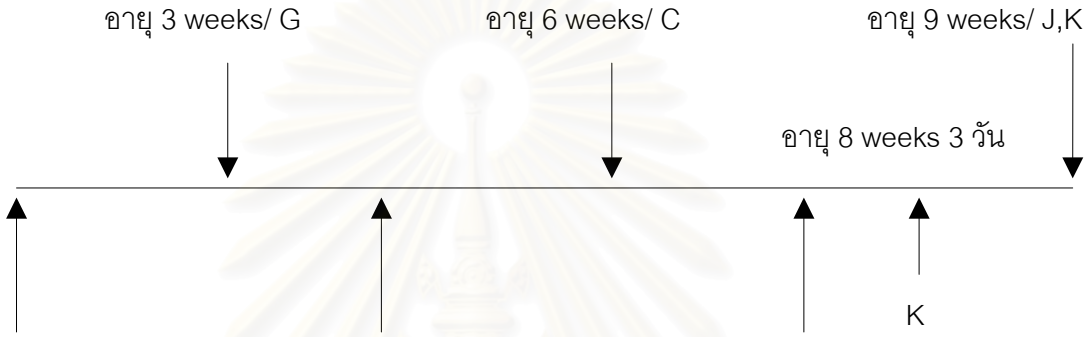
3.13 แผนการทดลอง

<u>แผนการทดลองที่ 1</u>

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมขึ้นต่อการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ของอวัยวะภายใน

- ไก่ทดลองพันธุ์ไข่ ปราศจากเชื้อ *S.* Enteritidis เลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน จำนวน 100 ตัว

แผนผังแสดงการปฏิบัติงาน



A เก็บ cloacal swab และนำกระดาษรองอุจจาระ ไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในไก่ก่อนเริ่มการทดลอง

B เจาะเลือดไก่ เพื่อนำไปตรวจแอนติบอดีก่อนการทำวัคซีน

C เจาะเลือดไก่ เพื่อนำไปตรวจแอนติบอดีหลังการทำวัคซีน

D สุ่มแบ่งกลุ่มไก่ด้วยวิธี sampling randomization ออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 25 ตัว

กลุ่มที่ 1A กลุ่มควบคุมให้ PBS ขนาด 0.5 ml. /ตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

กลุ่มที่ 2A กลุ่มควบคุมให้ Oil adjuvant ขนาด 0.5 ml. /ตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

กลุ่มที่ 3A วัคซีนเชื้อตายเชิงพาณิชย์สายเชื้อ *S.* Enteritidis (commercial vaccine) ขนาด 0.3 ml. /ตัว ฉีด เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

กลุ่มที่ 4A วัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่มี เชื้อ *S.* Enteritidis ขนาดความเข้มข้น10^9 cfu/ml ขนาด 0.5 ml. /ตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

E ติดเลขประจำตัวไก่ จำนวน 10 ตัว ต่อกลุ่มที่จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดในแต่ละครั้ง

F ให้วัคซีนป้องกัน *S.* Enteritidis ตามกลุ่มที่ได้แบ่งไว้

G เก็บ cloacal swab และ อุจจาระบนกระดาษรองพื้นกรง จำนวนอย่างละ 10 ตัวอย่าง/กลุ่ม นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการปนเปื้อนของ *S.* Entritidis

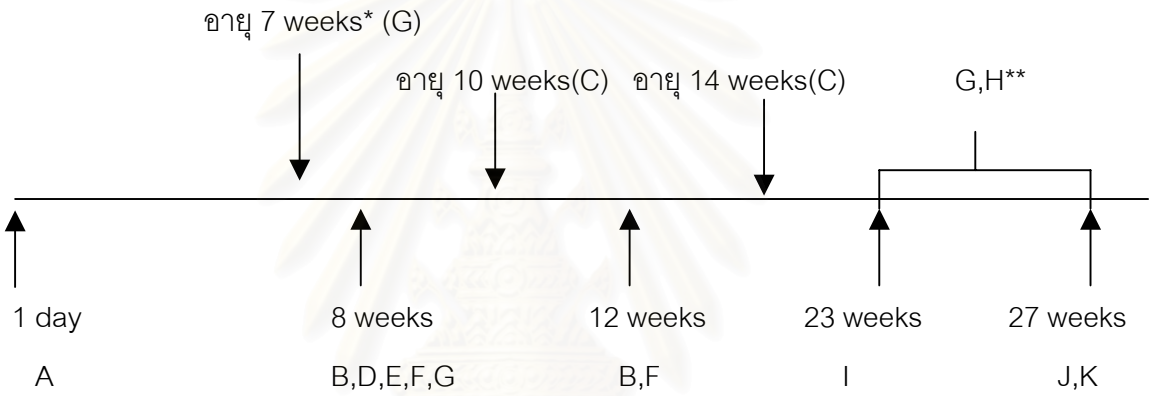
I ป้อนเชื้อพิษทับ โดยใช้เชื้อ *S.* Enteritidis (nalidixic-acid-resistance) ขนาด 10^6 cfu/ml. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแก่ไก่ทุกตัว

J ปิดการทดลอง โดย ทำการ euthanasia ไก่ทุกตัว

K เก็บตัวอย่างอวัยวะ คือ ไส้ตัน ตับ ม้าม นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการติดเชื้อของ *S.* Entritidis

<u>แผนการทดลองที่ 2</u>

ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ที่ผลิตขึ้นต่อการป้องกันการแพร่เชื้อผ่านไข่ และการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่



<u>หมายเหตุ</u>

* ก่อนให้วัคซีน 1 สัปดาห์ ให้ยาปฏิชีวนะ ในขนาดป้องกัน แก่ไก่ทดลองทุกตัว

** 2 สัปดาห์แรกหลังป้อนเชื้อพิษทับ เก็บตัวอย่างวันเว้นวัน

เนื่องจากในการศึกษาของ Shivaprasad และคณะ (1990) และ Gast และ Beard (1990a,b,c) พบว่าระยะเวลา ที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis ในความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยการป้อนเข้าปาก ในไก่อายุใกล้เคียงกันกับการทดลองนี้ คืออยู่ในช่วงอายุ 20-88 สัปดาห์นั้น สามารถตรวจพบเชื้อได้มากในช่วงหลังจากป้อนเชื้อพิษทับไปแล้วประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นการตรวจพบจะลดลง โดยในการทดลองนี้จะเริ่มเก็บตัวอย่างไข่ และ cloacal swab ครั้งแรกหลังจากป้อนเชื้อพิษทับไปแล้ว 24 ชั่วโมง

เริ่มนำไก่ไข่ อายุ 1 วัน เข้าเลี้ยงในห้องทดลอง โดยในระยะแรกจะเลี้ยงไก่ในกรงลวดตาข่ายยกพื้น จำนวนไก่ 8 ตัว ต่อพื้นที่กรง 0.6 ตารางเมตร โดยตารางการปฏิบัติการทดลองเป็นไปตามแผนภาพ ตัวอักษรกำกับอธิบายตามลำดับ ดังนี้

A เก็บ cloacal swab และนำกระดาษรองอุจจาระ นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในไก่ก่อนเริ่มการทดลอง

B เจาะเลือดไก่ เพื่อนำไปตรวจแอนติบอดีก่อนการทำวัคซีน

C เจาะเลือดไก่ เพื่อนำไปตรวจแอนติบอดีหลังการทำวัคซีน

D แบ่งไก่ทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 2.1 กลุ่มควบคุมให้ PBS ขนาด 0.5 ml. เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

กลุ่มที่ 2.2 วัคซีนเชื้อตายเชิงพาณิชย์สายเชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 0.3 ml. /ตัว ฉีด เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ ให้วัคซีนครั้งเดียวที่อายุ 8 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2.3 วัคซีนเชื้อตายเชิงพาณิชย์สายเชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 0.3 ml. /ตัว ฉีด เข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ ให้วัคซีนสองครั้ง ที่อายุ 8 และ 12 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2.4 วัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่ผลิตเอง สายเชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 0.5 ml. /ตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอ ให้วัคซีนครั้งเดียวที่อายุ 8 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2.5 วัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่ผลิตเอง สายเชื้อ *S.* Enteritidis ขนาด 0.5 ml. /ตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอ ให้วัคซีนสองครั้งที่อายุ 8 และ 12 สัปดาห์

E ติดเลขประจำตัวไก่แต่ละตัว

F ให้วัคซีนป้องกัน *S.* Enteritidis ตามกลุ่มที่ได้แบ่งไว้

G เก็บ cloacal swab และ อุจจาระบนกระดาษรองพื้นกรง จำนวนอย่างละ 10 ตัวอย่าง/กลุ่ม นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการปนเปื้อนของ *S.* Entritidis

H เก็บไข่จากไก่แต่ละกลุ่มโดยเฉลี่ย 10 ฟอง ต่อครั้งที่เก็บ พร้อมบันทึกเลขประจำตัวไก่ที่เก็บไข่ในแต่ละครั้ง นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียเพื่อดูการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา โดย แยกตรวจเป็น 2 ทาง คือ

1.ตรวจการปนเปื้อนบริเวณเปลือกไข่ โดยวิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรียจะดัดแปลงจากวิธีของ Shivaprasad และคณะ (1990)

2.ตรวจการปนเปื้อนภายในไข่ โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วน membrane ที่หุ้ม content ของไข่ โดยวิธีการเก็บจะดัดแปลงจากวิธีของ Thiagarajan และคณะ (1994)

I ป้อนเชื้อพิษทับ โดยใช้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis (Nalidixic-acid-resistance) ขนาด 10^8 cfu/ml. ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแก่ไก่ทุกตัว (Shivaprasad et al., 1990)

J ปิดการทดลอง โดย ทำการ Euthanasia ไก่ทุกตัว

K เก็บตัวอย่างอวัยวะ คือ รังไข่ และ ไส้ตัน นำไปตรวจเพาะเชื้อ *S.* Enteritidis

3.14 การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้โปรแกรม SPSS for Microsoft windows version 13.0

น้ำหนักไก่ เปรียบเทียบน้ำหนักไก่ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อัตราการแลกเนื้อ คิดจากอาหารที่ใช้ตลอดการทดลองหารด้วยผลรวมของน้ำหนักตัว

ผลการตรวจเพาะเชื้อ *Salmonella* spp. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาการไหลของวัคซีนและการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระดับแอนติบอดี ตรวจระดับแอนติบอดีต่อวัคซีน *S.* Enteritidis ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.15 แนวทางในการประเมินผลการทดลอง

ในการทดลองที่ 1 วัคซีนที่ดีและมีประสิทธิภาพ ประเมินจาก

1. จำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ในไส้ตัน ตับ และม้าม ของไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะต้องมีจำนวนน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุม
2. เมื่อทำการตรวจนับจำนวนเชื้อ *S.* Enteritidis ในไส้ตัน ตับ และม้าม ของไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะต้องมีจำนวนน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุม
3. วัคซีนที่ให้จะต้องมีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อน้อย มีความหนืดต่ำ และมีความคงตัวสูง

ในการทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของวัคซีน ประเมินจาก

1. ผลของวัคซีนต่อการกระตุ้นระดับแอนติบอดีในไก่ระยะก่อนไข่
2. วัคซีนสามารถป้องกันการการติดเชื้อของอวัยวะภายใน โดยเมื่อนำตัวอย่างของไข่ และรังไข่ มาทำการตรวจเพาะเชื้อ *S.* Enteritidis แล้วพบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุม
3. วัคซีนให้ผลในการลดการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่ โดยเมื่อนำตัวอย่างของไข่มาทำการตรวจหาเชื้อ *S.* Enteritidis บริเวณเปลือกไข่ ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนควรมีการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1

การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมขึ้นต่อการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ของอวัยวะภายใน

ผลของวัคซีนต่อน้ำหนักตัวไก่

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักตัวไก่ หลังได้รับวัคซีนที่อายุ 5 สัปดาห์ โดยไก่ในกลุ่มควบคุมที่ใช้ PBS ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ มีน้ำหนักตัวใกล้เคียงกับไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น ในขณะที่ไก่ในกลุ่มที่ได้รับ oil กับไก่กลุ่ม ที่ได้รับวัคซีนของบริษัท มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวที่น้อยกว่าไก่สองกลุ่มดังกล่าวข้างต้นลักษณะดังกล่าวนี้ คล้ายคลึงต่อเนื่องไปจนน้ำหนักในช่วงอายุ 6 สัปดาห์ ต่างกันตรงที่ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนของบริษัทมีน้ำหนักตัวที่กลับมาใกล้เคียงกับไก่ในกลุ่มอื่นๆ และยังพบว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับ oil ยังคงมีน้ำหนักตัวที่น้อยกว่าไก่กลุ่ม PBS และไก่ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น น้ำหนักตัวของไก่ที่อายุ 7 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลของวัคซีนต่ออัตราการแลกเนื้อ

เมื่อแบ่งช่วงอายุไก่ในการพิจารณาอัตราการแลกเนื้อเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงอายุ 4-6 สัปดาห์ และช่วงอายุ 6-8 สัปดาห์ พบว่า ช่วงอายุ 6-8 สัปดาห์นั้น ไก่มีอัตราการแลกเนื้อที่ดีกว่าไก่ในช่วงอายุแรก โดยช่วงอายุ 4-6 สัปดาห์ ไก่จะมีอัตราการแลกเนื้อเฉลี่ยอยู่ที่ 2.3 ในขณะที่ไก่ช่วงอายุ 6-8 สัปดาห์ มีอัตราการแลกเนื้อเฉลี่ย เท่ากับ 2.1 ดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักตัวไก่

กลุ่ม	อายุ 4 สัปดาห์	อายุ 5 สัปดาห์	อายุ 6 สัปดาห์	อายุ 7 สัปดาห์	อายุ 8 สัปดาห์
1		380.50 ± 50.61[b]	465.50 ± 66.79[b]	649.50 ± 72.74	725.50 ± 80.55
2		369.50 ± 59.76[a]	458.50 ± 54.56[a]	652.00 ± 69.81	731.50 ± 94.53
3	265.50 ± 29.37	367.50 ± 60.47[a]	464.50 ± 72.57[ab]	651.50 ± 78.66	728.50 ± 81.60
4		377.00 ± 62.81[b]	468.50 ± 68.89[b]	655.00 ± 75.78	730.00 ± 92.93

[a-b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในช่วงอายุเดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการแลกเนื้อ

กลุ่ม	อายุ 4-6 สัปดาห์	อายุ 6-8 สัปดาห์
1	2.25	2.15
2	2.28	2.11
3	2.33	2.02
4	2.35	2.14

ตารางที่ 3 ผลการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* Enteritidis **จากการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย**

กลุ่ม	อายุที่ทำการเก็บตัวอย่างและจำนวนตัวที่ตรวจพบ													
	อายุ 1 วัน 3,4,8 สัปดาห์		อายุ 8 สัปดาห์ 3 วัน						อายุ 9 สัปดาห์					
	cloacal swab		liver		spleen		caecum		liver		spleen		caecum	
	n*	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1			5/10	50[ab]	6/10	60[b]	8/10	80[b]	7/10	70[ab]	6/10	60[b]	10/10	100[b]
2	0/20	0	6/10	60[b]	7/10	70[b]	10/10	100[b]	8/10	80[b]	7/10	70[b]	10/10	100[b]
3			1/10	10[a]	2/10	20[a]	3/10	30[a]	3/10	30[a]	2/10	20[a]	4/10	40[a]
4			2/10	20[ab]	1/10	10[a]	4/10	40[a]	4/10	40[ab]	1/10	10[a]	5/10	50[a]

* n = จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ / ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บ

[a-b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในช่วงอายุเดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ผลการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* Enteritidis **จากการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย**

ในช่วง 8 สัปดาห์แรกของการทดลอง สุ่มตรวจการปนเปื้อนเชื้อ *S.* Enteritidis อย่างสม่ำเสมอ คือตั้งแต่วันแรกที่ลูกไก่มาถึง อายุ 3 สัปดาห์ อายุ 4 สัปดาห์ และอายุ 8 สัปดาห์ โดยการ swab ก้นไก่ นำไปตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย ผลที่ได้ ปรากฏดังตารางที่ 3 คือไม่พบเชื้อ *S.* Enteritidis ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง

เมื่อไก่อายุครบ 8 สัปดาห์ ทำการป้อนเชื้อพิษทับ ความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis เท่ากับ 10^6 cfu/ml. ป้อนทางปาก ตัวละ 1 มิลลิลิตร สามวันหลังการป้อนเชื้อพิษทับ euthanasia ไก่จำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มเก็บตัวอย่าง ไส้ตัน ตับ และม้าม นำมาตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย ผลที่ได้พบว่า ไส้ตัน เป็นอวัยวะที่มีการตรวจพบเชื้อได้มากที่สุด โดยเฉพาะไก่กลุ่มควบคุมที่ให้ PBS และ oil คือ 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่ม คือกลุ่มที่สาม ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า และกลุ่มที่สี่ ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองนั้น มีการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis น้อยและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับไก่ในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม โดยพบเพียง 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนป้องกันกับไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีนป้องกัน ตัวอย่างของอวัยวะ คือ ม้าม และไส้ตันของไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนป้องกัน มีการตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของตับ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า มีการตรวจพบเชื้อน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไก่กลุ่มควบคุมที่ให้ oil ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นให้ผลในการตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกับไก่กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม

หนึ่งสัปดาห์หลังการป้อนเชื้อพิษทับ ทำการเก็บตัวอย่างอีกครั้ง โดยนำไก่ที่เหลือของทุกกลุ่มมาทำการ euthanasia แล้วเก็บตัวอย่าง ไส้ตัน ตับ และม้าม นำมาทำการตรวจเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย สามารถตรวจพบเชื้อในจำนวนตัวอย่างที่มากกว่าช่วงอายุ 8 สัปดาห์ 3 วัน ในเกือบทุกอวัยวะ ยกเว้น ม้าม ที่ตรวจพบในเปอร์เซ็นต์ที่เท่าเดิม ในขณะที่ ตับและไส้ตัน มีการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis ในเปอร์เซ็นต์ที่มากขึ้น โดยไส้ตันของไก่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนใดๆ ตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น พบการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis เพียง 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในตัวอย่างของม้าม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่คล้ายคลึงกับตัวอย่างของไส้ตัน คือ กลุ่มที่ได้รับ PBS พบเชื้อ 60 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ได้รับ oil พบเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า พบเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น พบเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างตับที่เก็บที่อายุ 9 สัปดาห์ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน กับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า โดยพบว่า ไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับ PBS และ oil ตรวจพบเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า ตรวจพบ

30 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่มีความแตกต่างกับไก่กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า โดยพบเชื้อคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบความหนืดของวัคซีน

ตารางที่ 4 แสดงระยะเวลาการไหลของวัคซีนที่ผลิตขึ้นเปรียบเทียบกับวัคซีนเพื่อการค้า พบว่า วัคซีนที่ผลิตขึ้นมีระยะเวลาการไหลมากกว่าวัคซีนเพื่อการค้า และพบว่า oil มีระยะเวลาการไหลน้อยกว่าวัคซีนทั้งสองชนิด

ผลการทดสอบความคงตัวของวัคซีน

หลังการเตรียมวัคซีน พบว่า วัคซีนผสมเข้ากันได้ดีเป็นเนื้อเดียวกัน และจากการประเมินความคงตัวของวัคซีนโดยการวางขวดบรรจุวัคซีนไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ผลที่ได้ปรากฏดังนี้

การเก็บรักษาวัคซีน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีความคงตัวอยู่อย่างน้อย 24 สัปดาห์

ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีความคงตัวอยู่ 20 สัปดาห์

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีความคงตัวอยู่ 16 สัปดาห์

ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ทำการตรวจผลของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการฉีดวัคซีนทุกครั้งเมื่อมีการเก็บตัวอย่างหลังได้รับวัคซีน โดยจะทำการตรวจสอบที่ 4 สัปดาห์ 3 วัน และ 5 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน เปรียบเทียบระหว่างวัคซีนเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น ในวันที่ 4 สัปดาห์ 3 วันหลังได้รับวัคซีน พบว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นไม่พบว่าก่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ คิดเป็นร้อยละ 60 เของไก่ที่นำมาทดสอบ และ ร้อยละ 40 ที่เหลือมีผลในระดับอ่อน ใกล้เคียงกับผลของวัคซีนที่ได้จากไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า คือวัคซีนไม่ก่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ คิดเป็นร้อยละ 70 และในวันที่ 5 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน ผลที่ได้ไม่แตกต่างจากช่วง 4 วันก่อนหน้า คือ วัคซีนที่ผลิตขึ้น ไม่พบว่าก่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ คิดเป็นร้อยละ 70 ของไก่ที่นำมาทดสอบ และไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าก็พบในลักษณะเดียวกันคือ ร้อยละ 80 ของไก่ที่นำมาทดสอบนั้น ไม่พบว่าวัคซีนก่อปฏิกิริยาใดๆต่อเนื้อเยื่อ อีกทั้งวัคซีนมีการกระจายตัวดี มีการหลงเหลือของวัคซีนอยู่เพียงเม็ดเล็กๆในไก่บางตัว และเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด ไม่พบการอักเสบ

ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S.Enteritidis

จากการสุ่มตัวอย่างซีรั่ม 30 ตัวอย่าง ในไก่ทดลองที่อายุ 4 สัปดาห์ ก่อนเริ่มให้วัคซีน ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างซีรั่มกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง หลังให้วัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์ (ไก่อายุ 6 สัปดาห์) พบว่าในกลุ่มที่ 3 ที่ให้วัคซีนเพื่อการค้า ให้ผลบวกต่อการทดสอบทั้ง 10 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 4 ที่ให้วัคซีนที่ผลิตเองพบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 4 ตัวอย่าง ส่วนไก่ในกลุ่มควบคุมที่ให้ PBS และ oil นั้น ไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ สองสัปดาห์ต่อมาพบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกยังคงที่ คือสามารถตรวจพบ

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเป็น 10 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่ให้วัคซีนเพื่อการค้า และกลุ่มที่ให้วัคซีนที่ผลิตขึ้นตามลำดับ และไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่เป็นกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 5

สำหรับการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (S/N ratio) ในการทดลองที่ 1 พบว่าไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า มีค่า S/N ratio ต่ำกว่าไก่ทดลองทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออายุ 6 และ 8 สัปดาห์ สำหรับไก่ในกลุ่มที่ 4 ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น มีระดับต่ำกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่2 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการไหลของวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมด้วยสูตรต่างๆ

กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	เวลา* (วินาที)			MEAN ± SE
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
2	oil	21.192	22.415	21.544	21.717 ± 0.36[a]
3	วัคซีนเพื่อการค้า	20.282	21.534	20.521	20.779 ± 0.38[a]
4	วัคซีนที่ผลิตขึ้น	29.542	30.382	29.640	29.854 + 0.26[b]

* สภาวะการทดสอบ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

[a-b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตายเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 3 วัน

กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	รอยโรคและสิ่งตกค้างที่ตำแหน่งการฉีดวัคซีน			
		ไม่พบ	ระดับอ่อน	ระดับปานกลาง	ระดับรุนแรง
1	PBS	10/10	0/10	0/10	0/10
2	oil	8/10	2/10	0/10	0/10
3	วัคซีนเพื่อการค้า	7/10	3/10	0/10	0/10
4	วัคซีนที่ผลิตขึ้น	6/10	4/10	0/10	0/10

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเชื้อตายเป็นเวลา 5 สัปดาห์

กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	รอยโรคและสิ่งตกค้างที่ตำแหน่งการฉีดวัคซีน			
		ไม่พบ	ระดับอ่อน	ระดับปานกลาง	ระดับรุนแรง
1	PBS	10/10	0/10	0/10	0/10
2	oil	10/10	0/10	0/10	0/10
3	วัคซีนเพื่อการค้า	8/10	2/10	0/10	0/10
4	วัคซีนที่ผลิตขึ้น	7/10	3/10	0/10	0/10

หมายเหตุ

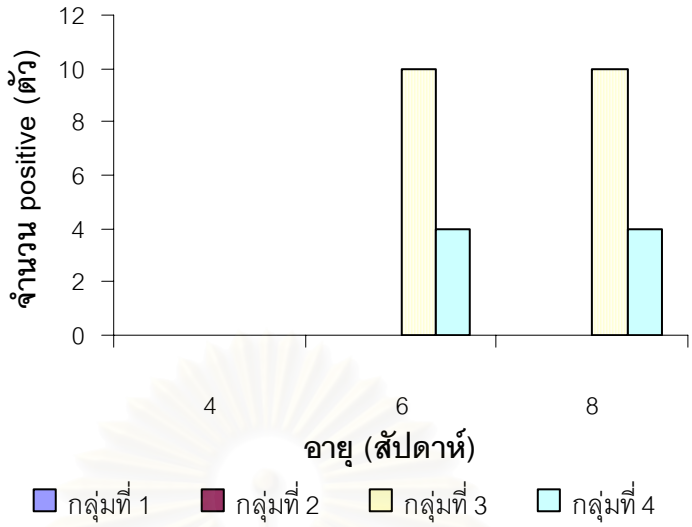
ระดับอ่อน บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีซีดลง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 เซนติเมตร ไม่มีวัคซีนเหลืออยู่

ระดับปานกลาง บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีซีดถึงแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 เซนติเมตรพบวัคซีนเหลืออยู่เป็นเม็ดเล็กๆในชั้น superficial muscle เท่านั้น

ระดับรุนแรง บริเวณที่เกิดรอยโรคมีสีแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร และพบวัคซีนเหลืออยู่เป็นลักษณะของถุงน้ำ เมื่อบีบมีวัคซีนไหลเยิ้มออกมา

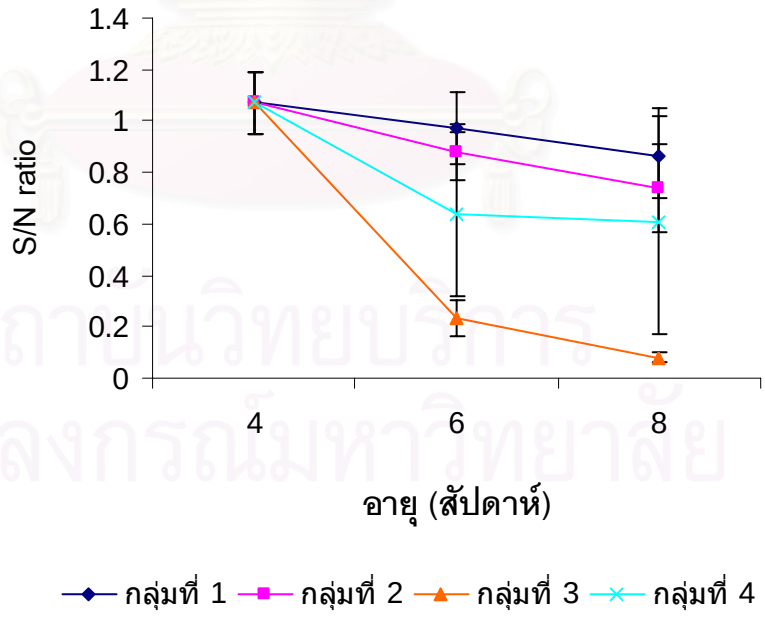
(ตามวิธีของ Stone (1997))

ภาพที่ 5 แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Enteritidis การทดลองที่ 1



หมายเหตุ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้ PBS กลุ่มที่ 2 ให้ oil emulsion
กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนเพื่อการค้า กลุ่มที่ 4 ให้ วัคซีนที่ผลิตเอง

ภาพที่ 6 แสดง S/N ratio การทดลองที่ 1



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 **การทดลองที่** 2 ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันซัลโมเนลลา เอนเทอริติดิส ที่ผลิตขึ้นต่อการป้องกันการแพร่เชื้อผ่านไข่ และการถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่

ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย จากไข่ไก่

ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *S.* Enteritidis จากภายนอกไข่ไก่ได้ในวันที่สามหลังมีการป้อนเชื้อแก่แม่ไก่ในทุกกลุ่มทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง และไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า 2 ครั้ง (กลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ) ตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าไก่กลุ่มอื่นๆ คือ พบเพียง 1 ตัวอย่าง จาก 5 ตัวอย่างที่ตรวจ ดังแสดงในตารางที่ 7

ระยะเวลาที่ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อภายนอกไข่ อยู่ระหว่างวันที่ 3 วันที่ 5 และวันที่ 7 หลังการป้อนเชื้อ และจากการตรวจถุงไข่แดง พบเชื้อได้จากตัวอย่างของไข่ในกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่านั้น และพบเพียงครั้งเดียวในวันที่สามหลังการป้อนเชื้อ

ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย จากไส้ตันและรังไข่

จากตารางที่ 8 ตัวอย่างอวัยวะที่ทำการเก็บ คือ ไส้ตันและรังไข่ โดยเก็บที่ 28 วันหลังการป้อนเชื้อพิษทับ ผลที่ได้จากตัวอย่างไส้ตันพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าที่ได้รับวัคซีนสองครั้ง ซึ่งไม่พบเชื้อ *S.* Enteritidis กับไก่ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBS ที่ตรวจพบเชื้อถึง 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 0 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตัวอย่างไส้ตันที่ได้จากไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าเพียงครั้งเดียวที่อายุ 8 สัปดาห์ และตัวอย่างไส้ตันจากไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองทั้งกลุ่มที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียว และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนสองครั้ง พบไม่แตกต่างกัน คือ 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างของรังไข่ที่เก็บจากไก่ทุกกลุ่ม ไม่พบเชื้อ *S.* Enteritidis

ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ผลของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการฉีดวัคซีนเมื่อทำการเก็บตัวอย่างในวันสิ้นสุดการทดลอง (19 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน) เปรียบเทียบระหว่างวัคซีนพื่อการค้าที่ฉีดครั้งเดียว (กลุ่มที่ 2) ฉีดสองครั้ง (กลุ่มที่ 3) วัคซีนที่ผลิตขึ้นฉีดครั้งเดียว (กลุ่มที่ 4) และ ฉีดสองครั้ง (กลุ่มที่ 5) ผลที่ได้ปรากฏดังตารางที่ 9 พบว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้น ไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกันกับผลที่ได้จากไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า อีกทั้งวัคซีนมีการกระจายตัวดี นอกจากนี้เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด ไม่พบการอักเสบ

ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis

สุ่มตัวอย่างซีรั่ม 30 ตัวอย่าง ในไก่ทดลองที่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์ ก่อนเริ่มให้วัคซีน ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ หลังจากไก่ได้รับวัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์ (อายุ 10 สัปดาห์) สุ่มตัวอย่างซีรั่มกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง พบว่าไก่กลุ่มที่ 2 ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง มีจำนวนตัวอย่างซีรั่ม ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับตัวอย่างซีรั่มที่ได้จากไก่ทดลองกลุ่มที่ 5 ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตเอง ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 และ 4 มีจำนวนตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบเป็น 8 ตัวอย่าง และ 9 ตัวอย่างตามลำดับ สองสัปดาห์หลังจากนั้น (อายุ 12 สัปดาห์) พบว่าตัวอย่างซีรั่มของไก่ทดลองทุกกลุ่มให้ผลบวกต่อการทดสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบต่อการทดสอบตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง สองสัปดาห์หลังการให้วัคซีนครั้งที่สอง (อายุ 14 สัปดาห์) ไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 (วัคซีนเพื่อการค้า) ยังคงพบให้ผลบวกต่อการทดสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 90 เปอร์เซ็นต์ และไก่ทดลองกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่เป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตเองให้ผลบวกต่อการทดสอบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองกลุ่ม สองสัปดาห์ต่อมา (อายุ 16 สัปดาห์) ยังคงตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบของไก่ทดลอง โดยตัวอย่างซีรั่มของไก่ทดลองในกลุ่มที่ 2 (ให้วัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง) ให้ผลบวกต่อการทดสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 4 และ 5 ให้ผลบวกต่อการทดสอบเท่ากัน คือ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุด การทดลองที่อายุ 23 สัปดาห์ พบจำนวนตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบจากไก่ทดลอง แต่ละกลุ่มตั้งแต่กลุ่มที่ 2 ถึงกลุ่มที่ 5 คิดเป็น 90 90 100 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7

สำหรับการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (S/N ratio) ในการทดลองที่ 2 พบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น ทั้งจำนวน 1 และ 2 ครั้ง มีระดับ S/N ratio ต่ำกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่อายุ 10 สัปดาห์ (2 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน) จนสิ้นสุด การทดลอง แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ S/N ratio ในไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น ทั้งจำนวน 1 และ 2 ครั้ง ดังแสดงในภาพที่ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย จากไข่ไก่

กลุ่ม/ครั้งที่เก็บ(d.p.i)	เปลือกไข่							ถุงไข่แดง						
	1	3	5	7	9	11	13	1	3	5	7	9	11	13
1	0/5	2/5	1/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

ตารางที่ 8 ผลการเพาะเชื้อทางแบคทีเรีย จากไส้ตันและรังไข่

กลุ่ม	cloacal swab*		feces*		caecum		oviduct	
	จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์	จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์	จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์	จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์
1	0/10	0	0/10	0	4/20	20^{b}	0/20	0
2	0/10	0	0/10	0	1/20	5^{ab}	0/20	0
3	0/10	0	0/10	0	0/20	0^{a}	0/20	0
4	0/10	0	0/10	0	1/20	5^{ab}	0/20	0
5	0/10	0	0/10	0	1/20	5^{ab}	0/20	0

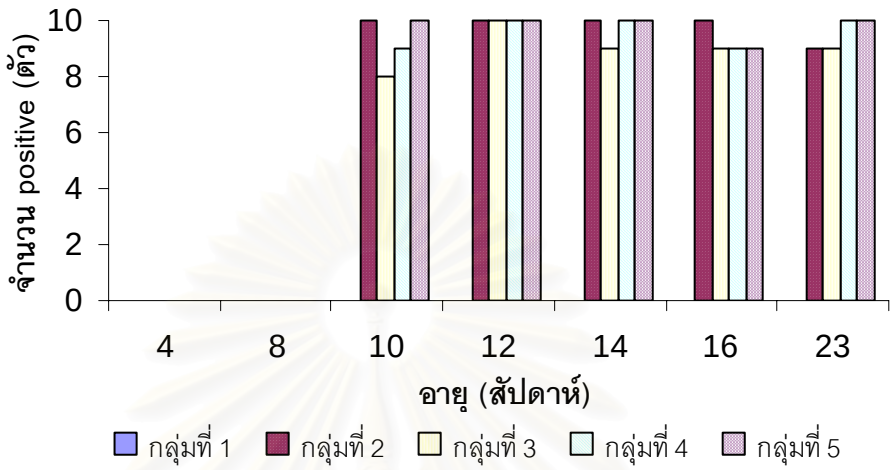
$^{a-b}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

* cloacal swab และ feces (อุจจาระจากกระดาษรองใต้กรง) เก็บในวันเริ่มการทดลอง อายุ 1 วัน และ อายุ 7 สัปดาห์ กับ 8 สัปดาห์ โดยเก็บกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง / ครั้ง

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ ภายหลังการให้วัคซีนเป็นเวลา 15 สัปดาห์

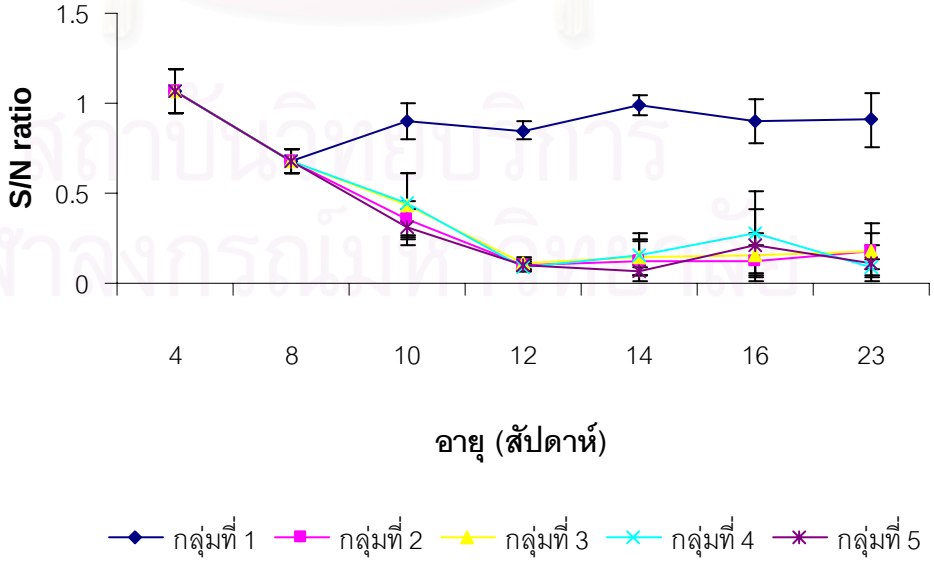
กลุ่ม	ชนิดวัคซีน	รอยโรคและสิ่งตกค้างที่ตำแหน่งการฉีดวัคซีน			
		ไม่พบ	ระดับอ่อน	ระดับปานกลาง	ระดับรุนแรง
2	วัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง	20/20	0/20	0/20	0/20
3	วัคซีนเพื่อการค้า 2 ครั้ง	20/20	0/20	0/20	0/20
4	วัคซีนที่ผลิตขึ้น 1 ครั้ง	20/20	0/20	0/20	0/20
5	วัคซีนที่ผลิตขึ้น 2 ครั้ง	20/20	0/20	0/20	0/20

ภาพที่ 7 แสดงจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Enteritidis การทดลองที่ 2



หมายเหตุ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้ PBS
กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง
กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีนเพื่อการค้า 2ครั้ง
กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีนที่ผลิตเอง 1 ครั้ง
กลุ่มที่ 5 ให้วัคซีนที่ผลิตเอง 2 ครั้ง

ภาพที่ 8 แสดง S/N ratio การทดลองที่ 2



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วัคซีนที่ดี นอกจากจะสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มของเชื้อ *S.* Enteritidis ในอวัยวะต่างๆ ได้แล้ว ไม่ควรก่อผลกระทบใดๆต่อตัวไก่ ไม่ว่าจะเป็นน้ำหนักตัว หรือคุณภาพซาก (Barrow et al., 1990; Timms et al., 1990; Sherrill et al.,1999; Woodward et al., 2002) ผลที่ได้จากการชั่งน้ำหนักตัวไก่ทุกๆสัปดาห์ พบว่า วัคซีนที่ผลิตขึ้น ไม่ส่งผลกระทบใดๆต่อน้ำหนักตัวไก่ เนื่องจาก ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับวัคซีน กับไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน

เมื่อทำการประเมินความหนืดและความคงตัวของวัคซีน พบว่า ความหนืดของวัคซีนที่ผลิตขึ้น ถึงแม้จะมีระยะเวลาการไหลของวัคซีนที่ช้ากว่าวัคซีนเพื่อการค้า แต่ในทางปฏิบัติไม่เห็นความแตกต่างเนื่องจากเมื่อวัดระยะเวลาการฉีดวัคซีนในไก่แต่ละกลุ่มมีความใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบความคงตัวของวัคซีนที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนเพื่อการค้า พบว่าความคงตัวของวัคซีนเพื่อการค้ามีความคงตัวได้นานกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสูตรการเตรียมที่บริษัทไม่เปิดเผยและวิธีการในการผลิตวัคซีนด้วยเครื่องมือที่ดีกว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นเองมาก โดยการผลิตวัคซีนในเชิงอุตสาหกรรมจะอาศัยความดันในการผลักอิมัลชันให้ผ่านรูเล็กๆ ที่กำหนดขนาดอนุภาคของอิมัลชันให้สม่ำเสมอ และเล็กละเอียดขึ้น อิมัลชันจึงมีความหนืดและความคงตัวมาก

ผลของวัคซีนต่อปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อ พบว่าจากการที่วัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้นเป็นวัคซีนเชื้อตายในรูป WO (water in oil) เตรียมจากน้ำมันแร่ ทำให้วัคซีนที่ฉีดส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดแต่ไม่รุนแรงมากถึงกับทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบ และเมื่อเปรียบเทียบวัคซีนที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนเพื่อการค้า พบว่าความรุนแรงใกล้เคียงกัน ซึ่งวัคซีนเพื่อการค้าชนิดนี้ไม่สามารถทราบรายละเอียดของวัตถุดิบในการใช้เนื่องจากเป็นความลับของบริษัทผู้ผลิต ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดที่ระดับอ่อน และเนื่องจากในการทดลองนี้ศึกษาถึงผลของวัคซีนต่อปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อในระยะเวลาที่ยาวนานหลังจากได้รับวัคซีน คือ 4 สัปดาห์ 3 วัน และ 5 สัปดาห์ จึงทำให้ไม่เห็นความผิดปกติของเนื้อเยื่อหลังได้รับวัคซีน ซึ่งโดยทั่วไป การประมวลผลควรทำในช่วง 7-14 วันหลังได้รับวัคซีน ดังเช่นการศึกษาของ Stone (1993) และ Stone (1997) ที่รายงานว่าปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อของวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันแร่ จะมีมากกว่าวัคซีนที่เตรียมจากน้ำมันจากสัตว์และพืช โดยรายงานในช่วงเวลาหลังจากไก่ทดลองได้รับวัคซีนไปแล้ว 7 วัน นอกจากนี้ Fukanoki และคณะ (2001) พบว่าวัคซีนเชื้อตายในรูป WO มีผลต่อปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดมาก หลังฉีดวัคซีนไปแล้ว 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ผู้ทดลองแนะนำว่าการใช้สัดส่วนของน้ำมันแร่ที่ลดลงจะสามารถลดปฏิกิริยาการอักเสบที่มีต่อเนื้อเยื่อลงได้

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย ในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเชื้อ *S.* Enteritidis ในอวัยวะภายในของไก่ ในการทดลองที่ 1 เมื่อไก่อายุครบ 8 สัปดาห์ ทำการป้อนเชื้อพิษทับ ความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis เท่ากับ 10^6 cfu/ml. ป้อนปาก ตัวละ 1 มิลลิลิตร สามวันหลังการป้อนเชื้อพิษทับ เก็บตัวอย่าง ไส้ตัน ตับ และม้าม นำมาทำการตรวจเพาะเชื้อ *S.* Enteritidis ผลที่ได้ พบว่า ไส้ตัน เป็นตำแหน่งที่มีการตรวจพบเชื้อได้มากที่สุด โดยเฉพาะไก่กลุ่มควบคุมที่ให้ PBS และ oil สอดคล้องกับงานทดลองอื่นๆที่ผ่านมา ที่พบว่าไส้ตัน คือ อวัยวะที่พบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้มากที่สุด เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณการตรวจพบเชื้อในอวัยวะต่างๆ (Shivaprasad et al., 1990; Gast and Beard., 1990b; Turnbull and Snoeyenbos., 1973) ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำไส้ส่วนไส้ตันมี caecal tonsil ซึ่งเป็น limphiod organ ที่เป็นเป้าหมายในการเข้าเซลล์ของเชื้อก่อนที่จะแพร่ไปยังอวัยวะต่างๆ (Carter and Collins, 1974, Andreas et al., 2000) จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่พบเชื้อได้มากในลำไส้ส่วนไส้ตัน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่ม คือกลุ่มที่สาม ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า และกลุ่มที่สี่ ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองนั้นพบเชื้อ *S.* Enteritidis ในไส้ตันน้อยกว่าไก่ในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการตรวจเชื้อในตับและม้าม เมื่อทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการพบเชื้อ *S.* Enteritidis ในตับ ม้าม และไส้ตัน ของไก่ที่ได้รับวัคซีน มีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่าไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน สอดคล้องกับการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ซึ่งพบว่า ไก่ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้น มีระดับแอนติบอดีที่มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน ดังนั้น สรุปได้ว่า วัคซีนที่ผลิตขึ้นเองนั้นสามารถเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *S.* Enteritidis ได้

หลังจากการป้อนเชื้อพิษทับ 1 สัปดาห์ นำไก่ที่เหลือของทุกกลุ่มมาเก็บตัวอย่าง ไส้ตัน ตับ และม้าม สามารถตรวจพบเชื้อในปริมาณที่สูงกว่าช่วง 3 วัน หลังได้รับเชื้อ ยกเว้น ม้าม ที่ตรวจพบในเปอร์เซ็นต์ที่เท่าเดิม ซึ่งระยะเวลาในการตรวจพบในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Bjerrum และคณะ (2003) ที่พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ในตับและม้ามได้ครั้งแรกหลังป้อนเชื้อขนาด 10^7 cfu/ml. ในไก่อายุ 14 วัน ไปแล้ว 2-3 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าไส้ตันของไก่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน ตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า และวัคซีนที่ผลิตขึ้น พบเชื้อ *S.* Enteritidis 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานทดลองของ Gast และ Beard (1990b) ที่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อได้สูงสุด 1 สัปดาห์หลังป้อนเชื้อขนาด 10^9 cfu/ml. โดยการป้อนทางปาก และเปอร์เซ็นต์การ ตรวจพบก็สอดคล้องกับการทดลองนี้คือ พบ 58 เปอร์เซ็นต์ ในไส้ตัน 51 เปอร์เซ็นต์ ในตับ และ 47 เปอร์เซ็นต์ ในม้าม เช่นเดียวกับการทดลองของ Nakamura และคณะ (1994) ที่ตรวจเชื้อ *S.* Enteritidis ในตัวอย่างของตับ ม้าม รังไข่ ไส้ตันและมูลไก่ หลังการป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ โดยให้เชื้อขนาด10^9 cfu/ml.ป้อนทางปาก สามารถตรวจพบเชื้อ ได้ 1 สัปดาห์ หลังป้อนเชื้อ และ ตรวจ

ไม่พบเชื้อหลังจากป้อนเชื้อไปแล้ว 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Gast และคณะ (1992) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตาย *S.* Enteritidis ในไก่อายุ 23 สัปดาห์ และมีการป้อนเชื้อพิษทับ 4 สัปดาห์หลังจากให้วัคซีน พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจพบเชื้อต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนพบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งสองกลุ่มพบเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ และ 33 เปอร์เซ็นต์ ในตับและม้าม ตามลำดับ

เมื่อศึกษาระดับแอนติบอดี พบว่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีในไก่ทดลองหลังให้วัคซีน 2 สัปดาห์ โดยไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้น มีจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า มีจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตขึ้น เช่น กระบวนการเตรียมเชื้อเพื่อใช้เป็นวัคซีนที่มีความแตกต่างกัน สื่อที่ใช้ในวัคซีน ทำให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายในการทดลองให้ผลที่แตกต่างกันออกไป ทั้งผลต่อการลดการเกาะกลุ่มของเชื้อในลำไส้ การแพร่เชื้อผ่านไข่ การถ่ายเชื้อจากแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อมผ่านมูลไก่ และการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีหลังได้รับวัคซีน (Barrow et al.,1990; Timms et al., 1990; Gast et al., 1992; Cooper et al.,1993) แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้สามารถพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ตลอดระยะเวลาการทดลอง ทั้งไก่ที่ได้รับวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้า และวัคซีนที่ผลิตขึ้น

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถอธิบายแนวโน้มของการแพร่กระจายของเชื้อสู่อวัยวะภายในที่สำคัญ พบว่านอกจากตรวจพบปริมาณเชื้อ *S.* Enteritidis ได้มากในลำไส้แล้ว ยังสามารถพบได้ในตับและม้าม หลังจากการทดลองป้อนเชื้อทางปาก เป็นไปตามทฤษฎีกลไกการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในไก่ อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Gast และคณะ (1990) ที่ตรวจพบเชื้อโดยเรียงลำดับปริมาณการตรวจพบในอวัยวะต่างๆจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ไส้ตัน ตับ และม้าม นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าความชุกของการตรวจพบเชื้อจะสูงที่สุดในช่วง 1 สัปดาห์หลังป้อนเชื้อเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาด้านพยาธิวิทยาพบเชื้อที่ ตับ และม้าม 3 วันหลังจากได้รับเชื้อทางปาก ในขณะที่พบเชื้อที่ไส้ตันในวันที่ 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ (Hirsh, 1999) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในกระแสเลือดก่อนที่จะมีการติดเชื้อเฉพาะที่โดยเฉพาะที่ไส้ตัน

โดยสรุป ในการตรวจเชื้อ *S.* Enteritidis ในอวัยวะภายใน จากการทดลองที่ 1 พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งที่เป็นวัคซีนเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้นเองสามารถลดปริมาณการตรวจพบเชื้อในอวัยวะต่างๆได้ โดยเฉพาะจาก ม้ามและไส้ตัน อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบโดยรวมจากทุกอวัยวะแล้ว ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีน มีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจพบเชื้อน้อยกว่าไก่ที่ไม่ได้รับวัคซีน แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากประสิทธิภาพของวัคซีนแล้ว การตรวจพบปริมาณของเชื้อ ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ความรุนแรงของเชื้อ ความสามารถในการแทรกซึม

เข้าเนื้อเยื่อ ระยะเวลาที่เชื้ออยู่ในกระแสเลือดและอวัยวะนั้นๆ เป็นต้น (Sadler et al., 1969; Kinde et al., 2000; De Buck et al.,2004)

การทดลองที่ 2 สามารถตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis จากเปลือกไข่ครั้งแรกในวันที่สามหลังการป้อนเชื้อ โดยพบว่าในไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้า 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง สามารถตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าไก่กลุ่มอื่นๆ โดยไก่ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBS สามารถตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 3 5 และ 7 หลังการป้อนเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Okamura และคณะ (2001) ที่ตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ในช่วง 4-7 วันหลังป้อนเชื้อ และยังพบว่า เชื้อ *S.* Enteritidis มีความสามารถในการเกาะกลุ่มอยู่ที่ระบบสืบพันธุ์ของแม่ไก่ไข่ ซึ่งทำให้เป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้เชื้อดังกล่าว มีการปนเปื้อนมาสู่ไข่ไก่ (Williams and Whittemore, 1967; Turnbull and Snoeyenbos, 1973; Timmoney et al., 1989; Gast and Beard, 1990a,b; Shivaprasad et al., 1990)

การตรวจเชื้อจากถุงไข่แดง พบเชื้อได้จากตัวอย่างของไข่ในกลุ่มที่ได้รับ PBS และตรวจพบเฉพาะในวันที่สามหลังป้อนเชื้อเท่านั้น มีความเป็นไปได้หลายประการที่จะกล่าวถึงสาเหตุการพบเชื้อดังกล่าว ประการแรกคือ เกิดการติดเชื้อที่รังไข่ของแม่ไก่ แล้วเชื้อมีการ transovarian จึงตรวจพบเชื้อในถุงไข่แดงได้ อีกประการหนึ่ง คือ เชื้อที่พบอาจเป็นเชื้อที่อยู่บริเวณเปลือกไข่ ซึ่งมาจากแม่ไก่ที่ติดเชื้อถ่ายมูลไก่ที่มีเชื้อแล้วเปรอะเปื้อนบริเวณเปลือกไข่ และเชื้อสามารถที่จะแทรกผ่านรู (pores) ของเปลือกไข่ปกติ (Williams and Whittemore, 1967; Williams et al., 1968) หรือไข่ที่มีการแตกร้าวได้ (Borland, 1975) อีกทั้งพบว่าแนวโน้มของการตรวจพบเชื้อในส่วนของถุงไข่แดงนั้นเกี่ยวเนื่องกับปัจจัยหลายประการ เช่น ปริมาณของเชื้อที่ไก่ได้รับ อายุของไก่ ความสามารถในการแทรกซึมไปตามอวัยวะนั้นๆของเชื้อ โดยอายุที่สามารถตรวจพบเชื้อได้มากนั้น พบว่าในไก่ที่ขึ้นไข่อายุระหว่าง 20-88 สัปดาห์ หลังจากการทดลองให้เชื้อ *S.* Enteritidis ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ป้อนเข้าปาก สามารถตรวจพบเชื้อได้มากในไก่ที่อายุมากกว่า 50 สัปดาห์ขึ้นไป เนื่องจาก การพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันจะลดลงในไก่ที่อายุมากขึ้น อีกทั้งในไก่ที่อายุน้อยกว่า 4 สัปดาห์ ก็พบว่าการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันยังไม่ดีพอ อาจมีผลให้มีแนวโน้มการติดเชื้อได้ง่าย (Shivaprasad et al., 1990) นอกจากนี้ในบางงานวิจัยพบว่าในส่วนของไข่แดงนั้น vitelline membrane มีบทบาทสำคัญในการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Enteritidis (Gast and Holt, 2000; Thiagarajan et al., 1994) ซึ่งอาจส่งผลให้ตรวจพบเชื้อได้ทั้งจากส่วนของไข่แดง และจากส่วนของ vitelline membrane หรืออย่างใดอย่างหนึ่งได้

ผลการเพาะเชื้อ จากตัวอย่างไส้ตัน และรังไข่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (28 วันหลังการป้อนเชื้อพิษทับ) ผลที่ได้จากตัวอย่างไส้ตัน พบว่าไก่ที่ได้รับวัคซีนเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น ครั้งเดียวและสองครั้ง ตรวจพบเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ตัวอย่างของรังไข่ที่เก็บจากไก่ทุกกลุ่ม ไม่พบเชื้อ *S.* Enteritidis สาเหตุของการตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว อาจเนื่องมาจากช่วง

อายุของไก่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง คือ อายุ 27 สัปดาห์ และเป็นสัปดาห์ที่ 4 หลังการป้อนเชื้อพิษทับ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน อาจมีผลทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Timoney และคณะ (1989) ที่พบว่าในส่วนของ oviduct สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 4 และตรวจพบครั้งสุดท้ายในวันที่ 7 หลังป้อนเชื้อพิษทับ เท่านั้น แต่จากการศึกษาของ Gast และ Beard (1990c) ที่ศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะเวลาที่สามารถตรวจพบเชื้อในอวัยวะภายใน คือ ตับ ม้าม รังไข่ และไข่ไก่ พบว่าความชุกของการตรวจพบเชื้อในตับ ม้าม และรังไข่จะสูงที่สุดในช่วง 1 สัปดาห์แรก หลังได้รับเชื้อและยังตรวจพบเชื้อไปจนกระทั่งช่วง 5 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ อีกทั้งยังตรวจพบเชื้อในไข่ไก่ได้ตลอด 24 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่มีการแพร่เชื้อผ่านมาทางไข่ เกิดขึ้นเป็นแบบครั้งคราว (intermittent transmission) (Gast, 1997a) ทำให้ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างในการทดลองนั้นตรวจพบเชื้อได้ในจำนวนตัวอย่างที่น้อย อย่างไรก็ตาม นอกจากความสามารถของเชื้อที่สามารถหลบซ่อนอยู่ในเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในและลำไส้ (Gast, 1997a) การตรวจพบเชื้อได้มากหรือน้อยยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีก เช่น ปริมาณเชื้อที่ป้อน ความรุนแรงของเชื้อในการแทรกซึมเข้าเนื้อเยื่อ อายุ และความไวรับของสายพันธุ์ไก่ต่อเชื้อ (Gast and Holt, 2000b)

จากผลการเพาะเชื้อ *S.* Enteritidis ของตัวอย่างไส้ตัน ในทดลองการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบกับการทดลองที่ 2 พบว่าในไก่อายุน้อยจะมีความไวต่อการรับโรคติดเชื้อ*S.* Enteritidis มากกว่าไก่อายุมาก ซึ่งไก่ที่อายุมากจะสามารถต้านทานการติดเชื้อจากธรรมชาติ อาจเนื่องมาจากการพัฒนาของเชื้อจุลชีพประจำถิ่น ที่พบปกติในลำไส้ (normal flora) หรือสารบางชนิด เช่น กรด HCl fibronectin glycolipid lactoferrin lysozyme mucus ที่พบได้เป็นปกติในทางเดินอาหาร ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามอายุ จนมีความเข้มข้นมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงกรดด่างในกระเพาะบด และเอนไซม์เยื่อบุลำไส้ (Cooper and Fahey, 1970)

จำนวนไก่ที่ให้ผลบวกในการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis ในการทดลองที่ 2 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับวัคซีนครั้งเดียวที่อายุ 8 สัปดาห์ กับไก่ที่ได้รับวัคซีนสองครั้งที่อายุ 8 และ 12 สัปดาห์ และไม่พบความแตกต่างระหว่างวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น และเมื่อพิจารณาระดับแอนติบอดีจากการตรวจด้วยวิธี ELISA ไม่พบความแตกต่างระหว่างวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้น เช่นเดียวกัน ไม่ว่าจะเป็นการทำวัคซีนครั้งเดียวหรือสองครั้ง ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า วัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้นสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ดีไม่ต่างกับวัคซีนเพื่อการค้า แต่อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างที่พบระหว่างวัคซีนที่ผลิตเพื่อการค้าและวัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้น อาจเกิดจากความเข้มข้นของปริมาณเชื้อที่นำมาผลิตวัคซีนที่แตกต่างกัน สื่อและความรุนแรงของเชื้อ รวมถึงกระบวนการในการคัดเลือกส่วนของแบคทีเรียที่นำมาใช้ผลิตวัคซีน ซึ่งล้วนมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนในการ

กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis ทั้งสิ้น (Nicholas and Cullen, 1991; Kaiser et al., 2002; Nakamura et al., 1994)

แม้ว่าในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ผ่านมา พบว่าการทำวัคซีนเชื้อเป็นอาจให้ประสิทธิผลที่ดีกว่าวัคซีนเชื้อตาย (Barrow et al., 1990; Babu et al., 2004) เช่น การทำวัคซีนเชื้อเป็นในรูปแบบที่จำลองการติดเชื้อธรรมชาติ โดยให้ผ่านระบบทางเดินอาหาร อาจกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก เช่น sIg A ที่สูงกว่า สามารถหวังผลในการลด colonization ในลำไส้ได้ หรือการให้วัคซีนเชื้อเป็นในระบบอื่น ๆ ก็ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (CMI) ได้ดีกว่า เนื่องจากเชื้อเป็นแอนติเจนชนิด endogenous ซึ่งสามารถถูกนำเสนอผ่าน MHC class I เพื่อไปกระตุ้น cytotoxic T cell ได้ ในส่วนของวัคซีนเชื้อตาย เนื่องจากเป็นแอนติเจนชนิด exogenous ทำให้ไม่สามารถแสดงผ่าน MHC class I จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และอาจไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก เนื่องจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือกของลำไส้ต้องจำลองการติดเชื้อตามธรรมชาติ ให้มีการ endocytosis โดย M cell

จากการทดลองนี้ เป็นการให้วัคซีนเชื้อตายแบบ subcutaneous ซึ่งแอนติเจนที่อยู่ในวัคซีนจะมีลักษณะเป็น exogenous antigen เท่านั้น ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ เพิ่มปริมาณในเซลล์และนำเสนอผ่าน MHC class I ได้ ทำให้วัคซีนไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ cytotoxic T cell ได้ แต่อย่างไรก็ตาม exogenous antigen ก็สามารถถูกเก็บกินโดย phagocytic cell แล้วนำเสนอผ่าน MHC class II ให้ helper T cell รวมทั้งแอนติเจนยังสามารถกระตุ้น B lymphocyte ได้โดยตรง ดังนั้น ผลของการทำวัคซีนดังกล่าวจะทำให้ได้ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำเป็นหลัก โดยเฉพาะ IgG และ IgM ในกระแสเลือด (สันนิภา, 2545) ส่วนการตอบสนองภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือกของลำไส้ ต้องการการกระตุ้นโดยตรงดังกลไกที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้น การทำวัคซีนชนิดนี้ไม่สามารถหวังผลภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก รวมทั้งการป้องกันการ colonization ของเชื้อที่ลำไส้ได้ นอกจากนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นแบบ systemic มีโอกาสในการซึมผ่านและคงสภาพในเนื้อเยื่อบุลำไส้ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในเบื้องต้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แอนติบอดีในกระแสเลือดสามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อซัลโมเนลลาในอวัยวะต่างๆ ลดการเป็น carriers และลดอาการทางคลินิก อีกทั้งยังมีผลให้สัตว์สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อได้มากขึ้น (Janeway and Travers, 1994; สันนิภา, 2545) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษายังไม่สามารถหาข้อสรุปของความสัมพันธ์ของการฉีดวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อซัลโมเนลลาต่อ colonization ของเชื้อที่ลำไส้ หลังการป้อนเชื้อพิษทับ ซึ่งหมายถึงการลดการถ่ายเชื้อของแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อม

สรุป การให้วัคซีนชนิดเชื้อตายที่ผลิตขึ้น สามารถลดการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในอวัยวะภายใน กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.* Enteritidis นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติโดยทั่วไปของวัคซีนที่ผลิตขึ้นกับวัคซีนเพื่อการค้าแล้ว พบว่าประสิทธิภาพของวัคซีน ความหนืด ความคงตัว และปฏิกิริยาของวัคซีนต่อเนื้อเยื่อ ไม่มีความแตกต่างกัน และข้อสำคัญของการใช้วัคซีนที่ผลิตขึ้นนี้ คือ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการผลิตวัคซีนขึ้นใช้เองภายในประเทศ

ข้อแนะนำ จากการทดลอง ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด ในการลดการแพร่เชื้อผ่านไข่ เนื่องจากการตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis ในถุงไข่แดงนั้น พบเพียงตัวอย่างเดียวในวันที่สามหลังการป้อนเชื้อของไก่ทดลองในกลุ่มควบคุม ซึ่งเชื้อที่พบอาจผ่านมาทางเปลือกไข่ที่มีการปนเปื้อนมูลไก่ที่มีเชื้อก็เป็นได้ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของวัคซีนต่อการลดการแพร่เชื้อผ่านไข่ การลด colonization ของเชื้อที่ลำไส้ และการลดการถ่ายเชื้อของแม่ไก่สู่สิ่งแวดล้อม อีกทั้งศึกษาถึงระยะเวลาในการตรวจพบเชื้อ ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการป้อนเชื้อพิษทับและความไวต่อเชื้อของไก่ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. การสร้างภูมิคุ้มในไก่ ใน โรคติดเชื้อในไก่. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 240.

จิโรจ ศศิปรียจันทร์. 2544. โรคติดเชื้อซัลโมเนลลา ใน การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ธนาเพรส แอนด์ กราฟฟิค. หน้า 93-97.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. โรคซัลโมเนลโลซิส. ใน แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โนเบิล พริ้นท์. หน้า 93.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. *Salmonella* spp. ใน การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 204-208.

สันนิภา สุรทัตต์. 2545. Veterinary Immunology an Update. กรุงเทพมหานคร: บริษัทโนวาร์ตีส (ประเทศไทย)จำกัด. 78 หน้า.

ศศิธร คณะรัตน์ และ สุปราณี สีหาราช. 2546. โรคซัลโมเนลโลซิสกับการปศุสัตว์. ใน หนังสือประกอบการฝึกอบรม Zoonosis โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน, อรุณ บ่างตระกูลนนท์ (บรรณาธิการ). กรุงเทพมหานคร: สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 182-193.

อำนาจ ศรีรัตนบัลล์. 2543. *Salmonella* spp. ใน โรคลำไส้: การวินิจฉัย และการรักษา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 100.

ภาษาอังกฤษ

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 2000. Cytokines. In cellular and molecular immunology, 4th ed. Philadelphia : W.B. Saunders, pp. 235-269.

Altekruse, S., Koehler, J., Hickman-Brenner, R., Tauxe, R.V. and Ferris, K. 1993. A comparison of *Salmonella* Enteritidis phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks. Epidemiol. Infect. 110: 17-22.

Altmeyer, R.M., McNern, J.K., Bossio, J.C., Rosenshine, I., Finlay, B.B. and Galan, J.E. 1993. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. Mol. Microbiol 7: 89-98.

Andreas, J.B., Rene'e, M.T. and Fred, H. 2000. Virulence mechanism of *Salmonella* and their genetic basis. In: *Salmonella* in domestic animals. C. Wray and A. Wray (eds.). New York: CABI Publishing, pp. 57-72.

Babu, U., Dalloul, R.A., Okamura, M., Lillehoj, H.S., Xie, H., Raybourne, B.R., Gaines, D. and Heckert, R.A. 2004. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune responses in chickens following salmonella vaccination and challenge. Vet. Immunol. Immunopathol. 101(304): 251-257.

Bangtrakulnonth, A., Marnrim, N., Kusum, M., Yuthayong, P., Sutivigit, Y., Jiamwatasuk, N. and Saitanu, K. 1995. Detection of Salmonellae from fecal specimens: A comparison of modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis and selenite-F broth. In: Second Asia-Pacific symposium on typhoid fever and other Salmonellosis. Suttipant Sarasombath and Sansnee Senawong (eds.). Southeast Asian J Trop Med Public Health. 26 (Suppl 2): 235-237.

Bangtrakulnonth, A. 2002. Protocols for isolation, identification, serotyping and susceptibility testing of *Salmonella*. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), in collaboration with Centers for Disease Control and Prevention, USA, Danish Veterinary Laboratory, Denmark and National Salmonella and Shigella Center, Thailand. 39-56.

Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Danilo, M.A., Wong, L.F. and Aarestrup, F.M. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. Emerging Infect. Dis. 10(1): 131-136.

Barrow, P.A., Hassan, J.O. and Berchieri, A.Jr. 1990. Reduction in fecal excretion of *Salmonella* Typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S.* Typhimurium organisms. Epidemol. Infect. 104: 413-426.

Bean, N.H., Goulding, J.S., Daniels, M.T. and Angulo, F.J. 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States,1988-1992. J. Food. Prot. 60: 1265-1286.

Bjerrum, L., Engberg, R.M. and Pedersen, K. 2003. Infection models for *Salmonella* Typhimurium DT110 in day-old and 14-day-old broiler chickens kept in isolators. Avian Dis. 47: 1474-1480.

Board, R.G. 1966. The course of microbial infection of the hen's eggs. J. App. Bacteriol. 29: 319-341.

Borland, E.D. 1975. *Salmonella* infection in poultry. Vet. Rec. 97: 406-408.

Cason, J.A., Cox, N.A. and Bailey, J.S. 1994. Transmission of *Salmonella* Typhimurium during hatching of broiler chicks. Avian Dis. 38: 583-588.

Carter, P.B. and Collins, F.M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. J.Expt. Med. 139:1189-1203.

Cooper, G.N. and Fahey, K.J. 1970. Oral immunization in experimental Salmonellosis.III Behavior of virulent and temperature-sensitive mutant strains in the intestinal tissues of rats. Infect. Immun. 2: 192-200.

Cooper, G.L., Nicholas, R.A. and Bracewell, C.D. 1989. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella* Enteritidis. Vet. Rec. 125: 567-572.

Cooper, G.L., Venables, L.M., Nicholas, J.R.A., Cullan, G.A. and Hormaeche, C.E. 1993. Further studies of the application of live *Salmonella* Enteritidis aroA vaccines in chickens. Vet. Rec. 133: 31-36.

Corrier, D.E., Hargis, B., Hinton, A.Jr, Lindsey, D., Caldwell, D., Manning, J. and DeLoach, J. 1991. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis. 35: 337-343.

Corrier, D.E., Elissalde, M.H., Ziprin, R.L. and DeLoach, J.R. 1991. Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on *Salmonella* colonization of broiler chicks. Avian Dis. 35: 40-45.

Corrier, D.E., Hollister, A.G., Nisbet, D.J., Scanlan, C.M., Beier, R.C. and DeLoach, J.R. 1994. Competitive exclusive of *Salmonella* Enteritidis in Leghorn chicks: comparison of treatment by crop gavage,drinking water,spray or lyophilized alginate beads. Avian Dis. 38: 297-303.

Cowden, J.D., Chisholm, D., O'Mahony, M., Lynch, D., Mawer, S.L., Spain, G.E., Ward,L. and Rowe, B. 1989. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection associated with the consumption of fresh shell egg products. Epidemiol. Infect. 103: 47-52.

De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination. J.App.Microbiol. 97(2):233-251.

Fleischman, G.J., Napier, C.L., Stewart, D. and Palumbo, S.A. 2003. Effect of temperature on the growth response of *Salmonella* Enteritidis inoculated onto the vitelline membranes of fresh eggs. J. Food. Prot. 66(8): 1368-1373.

Fukanoki, S., Iwakura, T., Iwaki, S., Maysumoto, K., Takeda, R., Ikeda, K., Shi, Z. and Mori, H. 2001. Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing newcastle disease virus heamagglutination-neuraminidase glycoprotein. Avian Pathol. 30: 509-516.

Gast, R.K., and Beard, C.W. 1990a. Production of *Salmonella* Enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. Avian Dis. 34: 438-446.

Gast, R.K., and Beard, C.W. 1990b. Serological detection of experimental *salmonella* Enteritidis infection in laying hens. Avian Dis. 34: 721-728.

Gast, R.K., and Beard, C.W. 1990c. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. Avian Dis. 34: 991-993.

Gast, R.K., Stone, H.D., Holt, P.S., Beard, C.W. 1992. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis. 36: 992-999.

Gast, R.K., Stone, H.D., Holt, P.S. 1993. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. Avian Dis. 37: 1085-1091.

Gast, R.K. 1997a. Paratyphoid infections. In: Diseases of Poultry. B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.). 10 th ed. Iowa: Iowa State Univ. Press, pp. 97-121.

Gast, R.K. 1997b. *Salmonella* infections. In: Diseases of Poultry. B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.). 10 th ed. Iowa: Iowa State Univ. Press, pp. 81-82.

Gast, R.K. and Holt, P.S. 2000a. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yoke and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. Avian Dis. 44: 706-710.

Gast, R.K. and Holt, P.S. 2000b. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. Poult. Sci. 79: 559-563.

Gast, R.K. and Holt, P.S. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. Poult. Sci. 80(7): 997-1002.

Gast, R.K., Holt, P.S. and Murase, T. 2005. Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidlberg into Egg yolks in an in vitro contamination model. Poult. Sci. 84: 621-625.

Guard-Petter J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. Environ. Microbiol. 3: 421-430.

Hirsh, D.C. 1999. *Salmonella*. In: Veterinary Microbiology. D.C. Hirsh and Y.C. Zee (eds.). Massachusetts: Blackwell Science, pp. 75-79.

Hopper, S.A. and Mawer, S. 1988. *Salmonella* Enteritidis in a commercial layer flock. Vet. Rec. 123: 351.

Horrox, N. 1995. *Salmonella*. In: International Hatchery Practice. 10(2): I-XVI.

Humphrey, T.J., Mead, G.C. and Rowe, B. 1988. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemol. Infect. 100: 175-184.

Humphrey, T.J., greenwood, M., Gillbert, R.J., Rowe, B. and Chapman, P.A. 1989a. The survival of *salmonellas* in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. Epidemol. Infect. 103: 35-45.

Humphrey, T.J., Baskerville, A., Mawer, S., Rowe, B. and Hopper, S.A. 1989b. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. Epidemol. Infect. 103: 415-523.

Humphrey, T.J. 1990. Growth of *salmonellas* in intact shell eggs: influence of storage temperature. Vet. Rec. 126: 292.

Janeway, C.A. and Travers, P. 1994. Host defense against infection and Structure of the antibody molecule and immunology genes. In: Immunology : the immune system in health and disease. London : Current Biology limited, pp. 3.1-3.29, 9.1-9.25.

Kaiser, M. G., Lakshmanan, N., Wing, T. and Lamont, S. J. 2002. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis burden in broiler breeder chicks genitically associated with vaccine antibody response. Avian Dis. 46: 25-31.

Keller, L.H., Benson, C.E., Krotec, K. and Eckroade, R.J. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect. Immun. 63; 2443-2449.

Kim, C.J., Emery, D.A., Rinke, H., Nagaraja, K.V. and Halvorson, D.A. 1989. Effect of time and temperature on growth of *Salmonella* Enteritidis in experimentally inoculated eggs. Avian Dis. 33: 735-742.

Kinde, H., Shivaprasad, H.L., Daft, B.M., Read, D.H., Ardans, A., Breitmeyer, R., Rajashekara, G., Nagaraja, K.V. and Gardner, I.A. 2000. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with salmonella enteritidis, phage type 4. Avian Dis. 44: 239-248.

Lister, S.A. 1988. Salmonella Enteritidis infection in broilers and broiler breeders. Vet Rec. 123: 350.

Lock, J.L. and Board, R.G. 1992. Persistance of contamination of hen's egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serovars. Epidemol. Infect. 108: 389-396.

McIlroy, S.G., McCracken, R.M., Neill, S.D. and O'Brien, J.J. 1989. Control, prevention and eradication of *Salmonella* Enteritidis infection from broiler and broiler breeder flocks. Vet. Rec. 125: 545-548.

Minga, U.M. 1992. A disc ELISA for the detection of Salmonella group D antibodies in poultry. Res. Vet. Sci. 52: 384-386.

Nagaraja, K.V. and Rajashekara, G. 1999. Vaccination against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: Dilemma and Realities. In: Salmonella *enterica* serovar Enteritidis in human and animals. A.M. Saeed, R.K. Gast, M.E. Potter and P.G. Wall (eds.). Iowa: Iowa State Univ. Press, pp. 397-404.

Nakamura, M., Nagamine, N., Takahashi, T., Suzuki, S. and Sato, S. 1994. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. Avian Dis. 38: 717-724.

Nicholas, R. A. J. and Cullen, G. A. 1991. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella* Enteritidis in chickens flocks. Vet. Rec. 128: 74-76.

Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. 2001. Differences among six *salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian Dis. 45: 61-69.

Poppe, C. 2000. *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: *Salmonella* in domestic animals. C. Wray and A. Wray (eds.). New York: CABI Publishing, pp. 107-132.

Rodrigue, D.C., Tauxe, R.V. and Rowe, B. 1990. International increase in *Salmonella* Enteritidis : a new pandemic? Epidemiol. Infect. 105: 21-27.

Sadler, W. W., Brownell , J. R. and Fanelli , M. J. 1969. Influence of age and inoculum level on shed pattern of Salmonella Typhimurium in chickens. Avian Dis. 13: 793-803.

Sheela, R.R., Babu, U., Mu, J., Elankumaran, S., Bautista, D.A., Raybourne, R.B., Heckert, R.A. and Song, W. 2003. Immune responses against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. Clin.Diagn.Lab.Immunol. 10(4): 670-679.

Sherrill, D., Charles, E.B.,David, J.H. and Robert, J.E. 1999. Field observations with *Salmonella* Enteritidis bacterins. Avian Dis. 43: 664-669.

Shivaprasad, H.L., Timoney, J.F., Morales, S., Lucio, B. and Baker, R.C. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. Avian Dis. 34: 548-557.

Shivaprasad, H.L. 1997. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Diseases of Poultry, B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.). 10 th ed. Iowa: Iowa State Univ. Press, pp. 82-96.

Stone, H.D., Brugh, M., Hopkins, S.R., Yoder, H.W. and Beard, C.W. 1978. Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. Avian Dis. 22: 666-674.

Stone, H.D. and Xie, Z. 1990. Efficacy of Experimental newcastle disease water-in-oil emulsion vaccines formulated from squalane and squalene. Avian Dis. 34: 979-983.

Stone, H.D. 1991. The preparation and efficacy of manually emulsified newcastle disease oil emulsion vaccines. Avian Dis. 35: 8-16.

Stone, H.D. 1993. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. Avian Dis. 37: 399-405.

Stone, H.D. 1997. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal,vegetable and synthetic oils. Avian Dis. 41: 591-597.

Suphabphant, W., York, M.D. and Pomeroy, B.S. 1982. Use of two vaccines (Live G30D or Killed RW16) in prevention of *Salmonella* Typhimurium infections in chickens. Avian Dis. 27: 602-615.

Suthienkul, O., Siripanichgon, K., Pariyanonda, A., Chantrasri, C., Sangpetchsong, V., Utrarachakit, F., Punchitton, S., Bangtrakulnonth, A., Sangkasuwan, P., Kittigul, L. and Vathanophas, K. 1995. Rapid *Salmonella* detection in frozen food by modified technique using modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health. 26 (Suppl 2): 238-241.

Thiagarajan, D., Saeed, A.M. and Asem, E.K. 1994. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. Poult. Sci. 73: 89-98.

Thiagarajan, D., Saeed, A.M., Turek, J. and Asem, E.K. 1996. *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8. Infect. Immun. 64: 5015-5021.

Timms, L.M., Marshall, R.N., Breslin, M.F. 1990. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated adjuvant vaccine. Vet.Rec. 127: 611-614.

Timms, L.M., Marshall, R.N., Breslin, M.F. 1994. Laboratory and field-trial assessment of protection given by an experimental *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivated adjuvant vaccine. Br. Vet. J. 150(1): 93-102.

Timoney, J.F., Shivaprasad, H.L., Baker, R.C. and Rowe, B. 1989. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. Vet.Rec. 125: 600-601.

Toshiyuki, M., Holt, P.S. and Gast, R.K. 2005. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in albumen and yolk contents of eggs inoculated with this organism onto the vitelline membrane. J. Food. Prot. 68(4): 718-721.

Turnbull, P.C.B., Snoeyenbos, G.H. 1973. Experimental salmonellosis in the chicken.1.Fate and host response in alimentary canal,liver, and spleen. Avian Dis. 153-177.

Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M. and Bager, F. 2000. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe [Online]. Available from: http://www.cdc.gov/ [2000,September 27]

Williams, J.E. and Whittemore, A.D. 1967. A method for studying microbial penetration through the outer structures of avian egg. Avian Dis. 11: 467-490.

Williams, J.E., Dillard, L.H. and Hall, G.O. 1968. The penetration patterns of *Salmonella* Typhimurium through the outer structures of chicken eggs. Avian Dis. 12: 445-466.

Woodward, M.J. Gettinby,G., Breslin, M.F., Corkish, J.D. and Houghton, S. 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine,in laying chickens. Avain Pathol. 31: 383-392.

Wooley, R.E., Gibbs, P.S. and Shotts, Jr., E.B. 1999. Inhibition of *Salmonella* Typhimurium in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli.* Avian Dis. 43: 245-250.

Wray, C. 1997. Salmonellosis. In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 3 rd ed. OIE Paris, pp. 642-650.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PBS (Phosphate Buffered Saline) **pH 7.0** ปริมาตร 1 ลิตร

solution A			**solution B**		
NaCl	8	กรัม	Na_2HPO_4	1.15	กรัม
KCl	0.2	กรัม	KH_2PO_4	0.2	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.132	กรัม	Distilled water	200	มิลลิลิตร
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1	กรัม			
Distilled water	800	มิลลิลิตร			

นำ solution A และ B เข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบตามเวลา วางทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำทั้งสอง solution มาผสมและคนให้เข้ากัน

NSS (Normal Saline Solution) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	9	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันก่อนนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

BPW (Buffered Peptone Water) **pH 7.5** ปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	10	กรัม (Gelysate™, USA.)
NaCl	5	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	9	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันก่อนนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

PSD (Peptone Saline Dilution) **pH 7.0** ปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	8.5	กรัม (Gelysate™, USA.)
NaCl	1	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันก่อนนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

XLT4 (Xylose-Lysine-Tergitol 4) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

XLT4 base	59	กรัม
XLT4 supplement	4.6	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

XLT4 supplement จะใส่เมื่ออุณหภูมิของสารละลายลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส ห้าม autoclave

MSRV (Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

MSRV medium base	15.8	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร

TTB (Tetrathionate Broth) (OXOID®, England) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

TTB base	77	กรัม
Brilliant green	0.01	กรัม
Iodine	10	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คน TTB base กับ DW ให้เข้ากันบนความร้อน วางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม brilliant green และ iodine

BGA (Brilliant Green agar) (Difco™, France) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

BGA	58	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร

TSI (Triple Sugar Iron agar) (HIMEDIA®, USA.) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

TSI	65	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันบนความร้อน แล้วเทลงหลอดทดลอง จากนั้นนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

MIL (Motility Indole Lysine medium) (Difco™, France) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

MIL	36.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันก่อนนำเข้าอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดสอบซีรั่มของไก่ทดลองโดยวิธี ELISA

การทดลองที่ 1

กลุ่ม / ค่า OD	หลังให้วัคซีน 2 สัปดาห์	หลังให้วัคซีน 4 สัปดาห์
1/1	0.87	0.48
2/1	0.89	0.53
3/1	0.97	0.9
4/1	0.93	0.82
5/1	0.99	0.86
6/1	1.19	0.93
7/1	0.83	0.75
8/1	0.71	0.86
9/1	0.78	0.83
10/1	0.83	0.80
1/2	0.88	0.47
2/2	0.80	0.70
3/2	0.99	0.68
4/2	0.74	0.46
5/2	0.82	0.93
6/2	0.80	0.80
7/2	0.73	0.85
8/2	0.86	0.80
9/2	0.63	0.88
10/2	0.70	0.61
1/3	0.21	0.05
2/3	0.22	0.06
3/3	0.20	0.07
4/3	0.21	0.11
5/3	0.16	0.05
6/3	0.13	0.05
7/3	0.29	0.07
8/3	0.16	0.06
9/3	0.20	0.09
10/3	0.35	0.08
1/4	0.90	0.92
2/4	0.71	0.77
3/4	0.94	0.84
4/4	0.80	0.06
5/4	0.74	0.64
6/4	0.70	0.13
7/4	0.17	0.05
8/4	0.43	0.08
9/4	0.17	0.93
10/4	0.20	1.10

หมายเหตุ ค่า cut off = 0.59 negative control = 0.90

positive control = 0.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2

group	2 weeks 1st p.v. (อายุ 10 สัปดาห์)	4 weeks 1st p.v. (อายุ 12 สัปดาห์)	2 weeks 2nd p.v. (อายุ 14 สัปดาห์)	4 weeks 2nd p.v. (อายุ 16 สัปดาห์)	6 weeks 2 nd p.v. (อายุ 18 สัปดาห์)
1	1.07	0.98	1.06	0.91	1.14
1	1.04	0.98	1.08	0.95	1.05
1	1.10	0.99	1.17	1.12	1.26
1	1.07	0.90	1.06	0.92	1.10
1	1.26	1.07	1.23	1.23	1.10
1	1.13	1.10	1.15	1.07	1.20
1	1.10	1.00	1.10	0.73	1.13
1	1.05	0.99	1.05	0.96	1.14
1	1.22	0.97	1.06	0.98	1.10
1	1.13	1.00	1.12	1.02	1.05
2	0.34	0.09	0.08	0.10	0.16
2	0.48	0.09	0.06	0.40	0.14
2	0.70	0.10	0.06	0.06	0.08
2	0.33	0.14	0.13	0.10	0.07
2	0.34	0.13	0.09	0.11	0.07
2	0.25	0.08	0.52	0.09	0.12
2	0.51	0.08	0.13	0.14	0.62
2	0.33	0.08	0.15	0.19	0.08
2	0.49	0.06	0.06	0.06	0.70
2	0.44	0.06	0.11	0.09	0.08
3	0.35	0.05	0.20	0.21	0.11
3	0.85	0.08	0.07	0.06	0.08
3	0.78	0.09	0.06	0.06	0.16
3	0.55	0.08	0.14	0.15	0.07
3	0.68	0.09	0.19	0.16	0.27
3	0.35	0.14	0.16	0.15	0.13
3	0.19	0.13	0.07	0.12	0.86
3	0.54	0.11	0.05	0.06	0.16
3	0.34	0.09	0.06	0.73	0.21
3	0.31	0.20	0.74	0.73	0.08

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4	0.38	0.05	0.20	0.24	0.23
4	0.55	0.06	0.08	0.06	0.11
4	0.61	0.05	0.08	0.08	0.10
4	0.42	0.08	0.08	0.12	0.10
4	0.54	0.08	0.18	0.24	0.09
4	0.97	0.10	0.26	0.50	0.06
4	0.63	0.10	0.06	0.10	0.06
4	0.17	0.13	0.30	0.42	0.06
4	0.54	0.09	0.51	0.90	0.07
4	0.29	0.12	0.07	0.54	0.12
5	0.15	0.09	0.06	0.55	0.07
5	0.23	0.06	0.06	0.20	0.37
5	0.45	0.10	0.05	1.10	0.11
5	0.32	0.08	0.07	0.07	0.22
5	0.47	0.14	0.06	0.06	0.07
5	0.33	0.11	0.24	0.06	0.06
5	0.29	0.06	0.08	0.07	0.07
5	0.45	0.10	0.08	0.06	0.06
5	0.53	0.09	0.07	0.06	0.13
5	0.25	0.11	0.07	0.24	0.09

หมายเหตุ

negative control อายุ 10,12 สัปดาห์ = 1.19

positive control อายุ 10,12 สัปดาห์ = 0.19

negative control อายุ 14,16 สัปดาห์ = 1.14

positive control อายุ 14,16 สัปดาห์ = 0.17

negative control อายุ 18 สัปดาห์ = 1.16

positive control อายุ 18 สัปดาห์ = 0.23

ค่า cut off = 0.59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวนตัวที่ให้ผลในการทดสอบซีรั่มของไก่ทดลองโดยวิธี ELISA การทดลองที่ 1

อายุ (สัปดาห์)	4			6			8		
/จำนวนตัว	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.
กลุ่มที่ 1	0	10	0	0	10	0	0	10	0
กลุ่มที่ 2	0	10	0	0	10	0	0	0	0
กลุ่มที่ 3	0	10	0	10	10	0	10	0	0
กลุ่มที่ 4	0	10	0	4	6	0	4	6	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวนตัวที่ให้ผลในการทดสอบซีรั่มของไก่ทดลองโดยวิธี ELISA **การทดลองที่** 2

อายุ (สัปดาห์)	4			8			10			12			14			16			23		
/จำนวนตัว	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.	Pos.	Neg.	sus.
กลุ่มที่ 1	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0
กลุ่มที่ 2	0	10	0	0	10	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	9	0	1
กลุ่มที่ 3	0	10	0	0	10	0	8	0	2	10	0	0	9	0	1	9	0	1	9	0	1
กลุ่มที่ 4	0	10	0	0	10	0	9	1	0	10	0	0	10	0	0	9	1	0	10	0	0
กลุ่มที่ 5	0	10	0	0	10	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	9	1	0	10	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 13.0

ค่า OD ของผลการทดสอบซีรั่มของไก่ทดลองโดยวิธี ELISA การทดลองที่ 1

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
w2pv	Between Groups	2.760	3	.920	29.294	.000
	Within Groups	1.131	36	.031		
	Total	3.891	39			
w4pv	Between Groups	3.089	3	1.030	17.937	.000
	Within Groups	2.066	36	.057		
	Total	5.155	39			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

w2pv

Duncan

		Subset for alpha = .05		
Group	N	1	2	3
Commercial	10	.2130		
Myvaccine	10		.5760	
Oil	10			.7950
Control	10			.8990
Sig.		1.000	1.000	.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

w4pv

Duncan

		Subset for alpha = .05	
Group	N	1	2
Commercial	10	.0690	
Myvaccine	10		.5520
Oil	10		.7180
Control	10		.7760
Sig.		1.000	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่า OD ของผลการทดสอบซีรั่มของไก่ทดลองโดยวิธี ELISA การทดลองที่ 2

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
w10	Between Groups	3.802	4	.951	35.516	.000
	Within Groups	1.204	45	.027		
	Total	5.006	49			
w12	Between Groups	6.536	4	1.634	1206.055	.000
	Within Groups	.061	45	.001		
	Total	6.597	49			
w14	Between Groups	7.482	4	1.871	104.870	.000
	Within Groups	.803	45	.018		
	Total	8.285	49			
w16	Between Groups	4.712	4	1.178	20.807	.000
	Within Groups	2.548	45	.057		
	Total	7.260	49			
bfchall	Between Groups	7.545	4	1.886	72.985	.000
	Within Groups	1.163	45	.026		
	Total	8.708	49			

Post Hoc Tests

w10

	group	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan[a]	5	10	.3470		
	2	10	.4210	.4210	
	3	10	.4940	.4940	
	4	10		.5100	
	1	10			1.1170
	Sig.		.063	.258	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

w12

	group	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	4	10	.0860	
	2	10	.0910	
	5	10	.0940	
	3	10	.1060	
	1	10		.9980
	Sig.		.276	1.000

w14

	group	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	5	10	.0840	
	2	10	.1390	
	3	10	.1740	
	4	10	.1820	
	1	10		1.1080
	Sig.		.141	1.000

w16

	group	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	2	10	.1340	
	3	10	.2430	
	5	10	.2470	
	4	10	.3200	
	1	10		.9890
	Sig.		.117	1.000

bfchall

	group	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	4	10	.1000	
	5	10	.1250	
	2	10	.2120	
	3	10	.2130	
	1	10		1.1270
	Sig.		.159	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุรีรัตน์ หนูมี เกิดวันเสาร์ที่ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2544 จากนั้นเข้าทำงานเป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์ ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2544 เข้ารับการศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2545 ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย