นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียมฟลูออเรสเซนท์คอนจูเกตของโรคนิวคาสเซิล จากไก่ที่ทำให้มีภูมิคุ้มโรค

พรทิพย์ พรมเมือง[1] ช้องมาศ อันตรเสน[2] และ นฤพล พร้อมขุนทด[2]

Abstract

Prommuang, P., Antarasena, C. and Promkuntod, N.

Preparation of Newcastle disease virus fluorescent conjugate by immunization of chicken

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(6) : 837-847

The fluorescent conjugate for diagnosis of Newcastle disease was prepared in 6-week-old chickens by immunization with Newcastle disease virus (NDV), strain F and local isolated strain NK1180/42. The antisera with high neutralizing antibodies titers were collected and pooled.The immunoglobulin was fractionated and conjugated with the fluorescein isothiocyanate (FITC). The conjugate was tested for the specificity in NDV infected chorioallantoic membrane (CAM) and cryostat sections of tracheal epithelium, lung, heart, kidney, spleen, liver, Bursa of Fabricius, brain and intestine. A distinctive fluorescence was seen in the cytoplasm of infected cells of trachea, spleen, Bursa of Fabricius and intestine 48-72 hours after innoculation. The prepared conjugate was specific to NDV and diagnosis and result could be made in 1-2 hours.

Key words : Newcastle disease, fluorescent conjugate, chorioallantoic membrane, experimental chickens

Southern Veterinary Research and Development Center, Thung Song, Nakhon Si Thammarat 80110 Thailand.

[1]วท.บ.(ชีววิทยา) [2]สพ.บ. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

Corresponding e-mail: peapea 13 2000@yahoo.com

รับต้นฉบับ 9 สิงหาคม 2546 รับลงพิมพ์ 14 เมษายน 2547

บทคัดย่อ

พรทิพย์ พรมเมือง ช้องมาศ อันตรเสน และ นฤพล พร้อมขุนทด

การเตรียมฟลูออเรสเซนท์คอนจูเกตของโรคนิวคาสเซิลจากไก่ที่ทำให้มีภูมิคุ้มโรค

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(6) : 837-847

ศึกษาการเตรียมฟลูออเรสเซนท์คอนจูเกตของโรคนิวคาสเซิล เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคนิวคาสซิล โดยฉีดเชื้อไวรัสโรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus, NDV) สายเชื้อ F และเชื้อท้องที่ NK1180/42 เข้าไก่ทดลองอายุ 6 สัปดาห์ เก็บอิมมูนซีรั่มเมื่อได้แอนติบอดีระดับสูง นำมาตกตะกอนแยกอิมมูโนโกลบูลินแล้วย้อมด้วยสี fluorescein isothiocyanate (FITC) ทดสอบคอนจูเกตที่ได้ใน chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อท้องที่ NDV สายเชื้อ NK 49/43 และอวัยวะของไก่ทดลองที่หยอดเชื้อท้องที่ NDVสายเชื้อ NK49/43 ได้แก่ หลอดลม ปอด หัวใจ ไต ม้าม ตับ ต่อมเบอร์ซ่า สมองและลำไส้ ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วนไซโตพลาสมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ภายใน 48-72 ชม. ในหลอดลม ม้าม ต่อมเบอร์ซ่า และลำไส้ คอนจูเกตที่เตรียมได้มีความจำเพาะกับ NDV แอนติเจนและใช้เวลาในการตรวจและทราบผลภายในเวลา 1-2 ชม.

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่ร้ายแรงของสัตว์ปีกพวกไก่ และนกหลายชนิด (Ritchie *et al*., 1994; Alexander, 1997) โรคนี้จัดอยู่ในลำดับต้นๆ ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office Internationale des Epizooties, OIE) พบการเกิดโรคในหลายประเทศทั่วโลกทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา ออสเตรเลีย ยุโรป รวมทั้งทวีปเอเชีย ซึ่งพบการระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศโดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Spradbrow, 1988; Alexander, 2001; Aldous and Alexander, 2001) โรคนี้นอกจากทำให้เกิดความสูญเสียของสัตว์ปีกที่เป็นโรคโดยตรงแล้วยังก่อให้เกิดผลกระทบต่อศักยภาพทางเศรษฐกิจ (economic impact) ด้านการส่งออกเนื้อสัตว์ปีกรวมทั้งสินค้าแปรรูปและผลิตภัณฑ์ เช่น ขน หนัง ไข่ และน้ำเชื้อเพศผู้ เนื่องจากเป็นโรคต้องห้ามที่ถูกนำมาใช้เป็นมาตรการการกีดกันทางการค้าของประเทศผู้นำเข้า โดยเฉพาะกลุ่มประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป (EU) (Council of the Economic Community, 1992; Aldous and Alexander, 2001) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการแพร่เชื้อ Newcastle disease virus (NDV) จากแหล่งอื่นเข้าสู่ประเทศโดยผ่านทางเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกและส่งออกเนื้อสัตว์ปีก รวมทั้งสินค้าแปรรูปไปยังหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งนอกจากต้องพัฒนาด้านเทคโนโลยีระบบการผลิต การจัดการฟาร์มแล้ว ระบบการป้องกันและควบคุมโรคเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อลดความสูญเสียของสัตว์ที่เป็นโรค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลที่มีประสิทธิภาพและโปรแกรมการทำวัคซีนที่เหมาะสมใช้ในไก่พ่อ-แม่พันธุ์และไก่กระทงก็ตาม แต่ยังพบการเกิดโรคนี้ในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงในชนบทของประเทศไทย (Awan *et al*., 1994) ซึ่งไก่เหล่านี้มักไม่ได้ทำวัคซีน เมื่อติดเชื้อไวรัสสัตว์ป่วยจะขับเชื้อไวรัสปริมาณสูงออกมากับอุจจาระและจะแพร่ไปยังสิ่งแวดล้อมโดยจะติดไปกับคน เครื่องมือเครื่องใช้ (mechanical vectors) รวมทั้งสัตว์ปีกหลายชนิด ได้แก่ นก และนกน้ำ ซึ่งสัตว์เหล่านี้จะเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสไปสู่สัตว์ปีกอื่น นอกจากนี้เชื้อไวรัสที่ขับออกมาเป็นละอองฝอยทางลมหายใจจะทำให้เกิดการแพร่เชื้อไวรัสทางอากาศ (airborne spread) ไปได้ไกลมากกว่า 3 กม. และอาจติดต่อไปสู่ไก่ที่เลี้ยงเพื่ออุตสาหกรรม (Ritchie *et al*., 1994; Alexander, 1995) ดังนั้นการควบคุมเฝ้าระวังการเกิดโรคนิวคาสเซิลซึ่งเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์ปีกจึงเป็นมาตรการอย่างหนึ่งเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจะต้องมีความรวดเร็วและแม่นยำซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมโรคนิวคาสเซิล

โรคนิวคาสเซิลมีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Newcastle disease virus (NDV) ซึ่งเป็น Ribo nucleic acid ไวรัส หรือ RNA ไวรัส ปัจจุบัน The International Committee on Taxonomy of Virus, (ICTV) เรียกชื่อเชื้อ

NDV ได้อีกชื่อว่าเชื้อ Avian parainfluenza virus-1 (APM-1) หรือชื่อเดิม Avian paramyxovirus-1 และจัดอยู่ในสกุล Avulavirus (NDV-like virus) ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุล Rubulavirus ในวงศ์ Paramyxoviridae (Lamb *et al*., 2002) Beard and Hanson (1984) จำแนกสายเชื้อของเชื้อ NDV โดยแบ่งออกเป็น 5 สายเชื้อตามความรุนแรงของโรคขึ้นกับอาการที่ตรวจพบในไก่ที่ติดเชื้อไวรัส ได้แก่

1. viscerotropic velogenic เป็นสายเชื้อที่มีความรุนแรงสูง ไก่ที่ติดเชื้อนี้แสดงอาการป่วยและตายเฉียบพลัน ตรวจพบรอยเลือดออกในลำไส้

2. neurotropic velogenic เป็นสายเชื้อที่มีความรุนแรงสูง ไก่ที่ติดเชื้อไวรัสจะแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท มีอัตราการตายสูงแต่ไม่พบวิการของระบบทางเดินอาหาร

3. mesogenic มีความรุนแรงปานกลาง ไก่ป่วยแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท แต่มีอัตราการตายต่ำ

4. lentogenic เชื้อไวรัสสายเชื้อนี้มีความรุนแรงต่ำพบการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการในระบบทางเดินหายใจ

5. asymptomatic enteric เชื้อไวรัสสายเชื้อนี้ไม่มีความรุนแรง โดยเชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหาร

ไก่ทุกช่วงอายุจะมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสโรคนิวคาสเซิล

การวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานานในการตัดสินโรค (Alexander, 1998) การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสของสัตว์ปีก (Braune and Gentry, 1965) Maestrone and Coffin (1964) ใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ในการวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลในไก่ โดยตรวจพบไวรัสแอนติเจนจากอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หลอดลม ปอด ตับ ม้าม และต่อมเบอร์ซ่า ของไก่ทดลองอายุ 20 วันที่หยอดเชื้อ NDV โดยตรวจพบไวรัสแอนติเจนมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (fine granules) ในไซโตพลาสมของเซลล์ของหลอดลม สมอง ปอด ตับ ม้าม และต่อมเบอร์ซ่า ตั้งแต่ 3 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อและความเข้มของการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 4 หลังหยอดเชื้อ ส่วนในวันที่ 5 ถึงวันที่ 8 ความเข้มของการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนจะลดลงโดยตรวจพบในหลอดลม แต่ตรวจไม่พบในสมอง ม้าม และต่อมเบอร์ซ่า ของไก่ทดลอง Alexander (1988) และ Kouwenhoven (1993) กล่าวว่า การตรวจวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์โดยใช้หลอดลมเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และนอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบไวรัสแอนติเจนในอวัยวะภายในหลายอย่าง เช่น ปอด ม้าม ไต และต่อมเบอร์ซ่า Wobeser *et al*. (1995) ใช้วิธีนี้ตรวจเชื้อไวรัสโรคนิวคาสเซิลจากสมองนกน้ำ (wild waterfowl) ในประเทศแคนาดาที่แสดงอาการเป็นอัมพาตและให้ผลสอดคล้องกับการแยกเชื้อไวรัส

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียม Fluorescein labeled anti-NDV globulin สำหรับตรวจ NDV แอนติเจนในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะภายในต่างๆ โดยวิธี direct fluorescent antibody (FA) test และทดสอบคอนจูเกตที่เตรียมได้ในไก่ทดลองที่หยอดเชื้อนิวคาสเซิลไวรัส

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัส: เชื้อท้องที่ NDV ที่ใช้ในการทดลองมี 3 สายเชื้อ

1. เชื้อ NDV สายเชื้อ NK1180/42 แยกได้จากการระบาดของโรคนิวคาสเซิลในไก่ชนในจังหวัดนครศรีธรรมราช ปี 2542 นำมาเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักอีก 4 ครั้ง และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี plaque purification โดยการเก็บไวรัสจาก plaque เดี่ยวๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสใน Chick embryo fibroblast (CEF) เซลล์ 3 ครั้ง มี virus HA titer เท่ากับ 2^{13} เพื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจนหยอดไก่ทดลองในการเตรียมอิมมูนซีรั่ม

2. เชื้อ NDV สายเชื้อ NK49/43 แยกได้จากไก่พื้นเมืองในจังหวัดนครศรีธรรมราช ปี 2543 นำมาเพาะเลี้ยงในไข่ไก่ฟัก 2 ครั้ง และทำการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์โดยวิธี plaque purification โดยการเก็บไวรัสจาก plaque เดี่ยวๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสใน CEF เซลล์ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักอีก 2 ครั้ง

มี HA titer เท่ากับ 2^{10} เพื่อใช้หยอดไก่ทดลองทดสอบประสิทธิภาพของคอนจูเกต

3. เชื้อ NDV สายเชื้อ F เป็นไวรัสวัคซีนนำมาเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟัก 4 ครั้ง มี HA titer เท่ากับ 211 เก็บเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ -80ºC จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

เซลล์เพาะเลี้ยง:

เตรียม CEF เซลล์ โดยนำเอ็มบริโอ (embryo) ของไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน มาย่อยแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Eagle,s minimum essential medium (MEM) มี tryptose phosphate broth 3%, calf serum 5%, เพ็นนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ยูนิต และ 100 มก./มล. ตามลำดับ และ $NaHCO_3$ 1.25 มก./มล.

ไก่ทดลองและไข่ไก่ฟัก:

ได้จากพ่อ-แม่พันธุ์ไวท์เลคฮอร์นที่เลี้ยงในคอกสัตว์ทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ ไม่เคยทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล ไข่ไก่ฟักนำมาใช้เพื่อเตรียมเชื้อ NDV เมื่อไข่ไก่ฟักมีอายุ 9-10 วัน จำนวน 80 ฟอง และส่วนหนึ่งนำมาฟักเป็นตัวเพื่อใช้เตรียมอิมมูนซีรั่มเมื่อไก่อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว และฟักเป็นตัวเพื่อนำมาหยอดเชื้อไวรัสในการทดสอบประสิทธิภาพของคอนจูเกตเมื่อไก่อายุ 6 สัปดาห์จำนวน 12 ตัว, อายุ 3 เดือน จำนวน 10 ตัว และไก่ชุดควบคุมกลุ่มละ 2 ตัว

การเตรียมอิมมูนซีรั่มและคอนจูเกตโกลบูลิน

ทำการเตรียมแอนติซีรั่มโดยหยอดเชื้อ NDV สายเชื้อ F เข้าจมูกและตาไก่ทดลองอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัวๆ ละ 0.3 มล. หลังจากนั้นอีก 2 สัปดาห์ฉีดเชื้อ NDV สายเชื้อ NK1180/42 เข้าหลอดเลือดดำที่ปีกปริมาณ 1 มล./ตัว ทำการฉีด 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อไวรัสครั้งสุดท้ายนาน 10 วัน จึงฆ่าไก่เก็บซีรั่ม นำไปตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ NDV โดยวิธี Haemagglutination inhibition (HI) test อิมมูนซีรั่มที่เตรียมได้มี ND-HI titer เท่ากับ 1:8192 นำอิมมูนซีรั่มที่ได้ไปแยกอิมมูโนโกลบูลิน โดยตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วย้อมด้วยสี fluorescein-isothiocyanate (FITC) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-50 gel filtration และ DEAE Sepharose fast flow column chromatography (Phamacia®) ดัดแปลงตามวิธีการของ Kawamura (1977) และ Johnson (1989)

การทดสอบคอนจูเกต

1. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อม (Potency test) เป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกตเพื่อใช้ย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธี direct immuno-fluorescence โดยนำคอนจูเกตที่เตรียมได้มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 แล้วทดสอบกับเนื้อเยื่ออวัยวะของไก่ทดลองที่หยอดเชื้อท้องที่ NK49/43 และ chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ไก่ฟักที่ตายหลังฉีดเชื้อท้องที่ NK49/43 2 วัน

2. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) เพื่อทดสอบความจำเพาะของคอนจูเกตโดยทำการทดสอบกับ CAM ปกติ, CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อท้องที่ NDV สายพันธุ์ NK49/43 และเชื้อ IBV สายเชื้อ H52 ซึ่งเป็นไวรัสวัคซีนใช้ทดสอบ spesificity ในการพิสูจน์เชื้อ IBV ใช้วิธี indirect FA test โดยทดสอบกับ monoclonal antibody 48.4 และ antimouse IgG FITC ตามวิธีการของ de Wit *et al*. (1995)

3. ทดสอบการสกัดกั้น (Blocking test) เพื่อทดสอบความจำเพาะของคอนจูเกตโดยใช้ CAM ของไข่ไก่ฟักชุดเดียวกับการทดสอบ potency test โดยวิธีการดังนี้

สไลด์แผ่นที่ 1 ย้อมด้วยคอนจูเกตที่เตรียมได้แล้วอบที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS นาน 10 นาที ตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนท์

สไลด์แผ่นที่ 2 หยดแอนติซีรั่มต่อเชื้อ NDV สายเชื้อ Ishii (Biken Lab., Japan) แล้วอบที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS นาน 10 นาที ย้อมด้วยคอนจูเกตที่เตรียมได้ทำเช่นเดียวกับสไลด์แผ่นที่ 1

สไลด์แผ่นที่ 3 หยดซีรั่มไก่ปกติแล้วทดสอบเช่นเดียวกับสไลด์แผ่นที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของคอนจูเกต

การทดลองที่ 1 ทำการทดสอบคอนจูเกตในเนื้อเยื่อของไก่ทดลองที่หยอดเชื้อท้องที่ NDV

วิธีการ แบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่มอายุ กลุ่มที่ 1 ใช้ไก่อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัว กลุ่มที่ 2 อายุ 3 เดือน จำนวน 10 ตัว หยอดเชื้อ NDV สายเชื้อ NK49/43 มี HA titer เท่ากับ 2^{10} เข้าจมูกไก่ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ปริมาณ 0.3 มล./ตัว ครั้งเดียว สังเกตอาการทุกวัน และทำการฆ่าไก่ตัวแรกหลังหยอดเชื้อ 24 ชั่วโมง และฆ่าทุกวันกลุ่มละ 1 ตัว ทำการผ่าซาก เก็บอวัยวะภายในได้แก่ สมอง หลอดลม ปอด หัวใจ ม้าม ไต ตับ ต่อมเบอร์ซ่า และลำไส้ เพื่อนำมาตัดด้วยเครื่องตัด (cryotome) ให้มีความหนา 3-5 ไมครอน แล้วนำมาตรวจด้วยวิธี direct FA test โดยยึดเนื้อเยื่อกับสไลด์ด้วย acetone นาน 10 นาที นำมาย้อมด้วยคอนจูเกตต่อโรคนิวคาสเซิลที่เตรียมได้อบในกล่องที่มีความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 30-45 นาที ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 นาน 10-15 นาที ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจหาไวรัสแอนติเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนท์

อวัยวะอีกส่วนนำมาบดทำเป็น 10% organ suspension นำส่วนใสฉีดเข้า allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วัน ปริมาณ 0.2 มล./ฟอง จำนวน 5 ฟอง ส่องไข่ทุกวัน ไข่ไก่ฟักที่ตายหลังฉีดตัวอย่าง นำ CAM มาตรวจด้วยวิธี direct FA test และนำ allantoic fluid (AF) มาทดสอบคุณสมบัติการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงไก่ความเข้มข้น 1% (haemagglutination test, HA)

การทดลองที่ 2 ทำการทดสอบ chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อท้องที่ NK49/43 เพื่อแยกเชื้อไวรัส

วิธีการ นำเชื้อ NDV สายเชื้อ NK 49/43 มี HA titer เท่ากับ 2^{10} ฉีดเข้า allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วัน ปริมาณ 0.2 มล./ฟอง จำนวน 5 ฟอง ส่องไข่ทุกวันนำไข่ที่ตายหลังฉีดเชื้อ เปิดเก็บ CAM ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง นำไปตัดด้วยเครื่องตัดแล้วตรวจหาไวรัสแอนติเจนตามวิธีการในการทดลองที่ 1 นำ allantoic fluid มาทดสอบคุณสมบัติการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงไก่ความเข้มข้น 1%

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบคอนจูเกต

จากการทดสอบคอนจูเกตได้ผลดังนี้

1. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อม จากการย้อมเนื้อเยื่ออวัยวะของไก่ทดลองที่หยอดเชื้อท้องที่ NDV สายเชื้อ NK49/43 และ CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อไวรัส ด้วยคอนจูเกตที่เจือจางระดับต่างๆ กัน พบว่าที่ระดับเจือจาง 1:200 เหมาะสมที่สุดโดยพบว่าความเข้มของการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในไซโตพลาสมของเซลล์ มีความชัดเจนและไม่มีเศษสี โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 4 FA unit

2. การทดสอบความจำเพาะของคอนจูเกตที่เตรียมได้ พบว่าเมื่อนำ CAM ทั้ง 3 ตัวอย่าง ย้อมด้วยคอนจูเกตต่อโรคนิวคาสเซิลจะตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนเฉพาะใน CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อท้องที่ NDV เท่านั้น และเมื่อนำ CAM ทั้ง 3 ตัวอย่าง ทดสอบกับ monoclonal antibody 48.4 ต่อเชื้อ IBV และ antimouse IgG FITC ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนเฉพาะใน CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อ IBV

Table 1. Results of the specificity test of NDV FA conjugate

tissue	Total test of 9-10 days old embryonated chicken egg	FA test	
		NDV	IBV
Normal CAM	5	- all	- all
NDV infected-CAM	5	+ all	- all
IBV infected-CAM	5	- all	+ all

+ immunofluorescence positive **- immunofluorescence negative**

เท่านั้น (Table 1)

3. การทดสอบการสกัดกั้น พบว่าในสไลด์แผ่นที่ 1 และ 3 ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจน ส่วนสไลด์แผ่นที่ 2 ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของคอนจูเกต

ผลการทดลองที่ 1: ไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อท้องที่ NDV ในกลุ่มที่ 1 อายุ 6 สัปดาห์ เมื่อฆ่าไก่ทดลองตัวที่ 1 หลังหยอดเชื้อ 24 ชั่วโมง ผ่าซากไก่และนำอวัยวะภายในได้แก่ สมอง หลอดลม หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ต่อมเบอร์ซ่า และลำไส้มาตรวจด้วยวิธี direct FA test ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ไก่ทดลองตัวที่ 2 ที่ฆ่าในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อ ตรวจพบไวรัสแอนติเจนในส่วนไซโตพลาสมของเซลล์เยื่อบุของหลอดลม ปอด ม้าม ลำไส้ และต่อมเบอร์ซ่า โดยไก่ยังมีอาการปกติ ไก่ทดลองเริ่มแสดงอาการ จำนวน 3 ตัว ในวันที่ 3 หลังหยอดเชื้อโดยแสดงอาการมีน้ำมูก น้ำตา หน้าบวม และอุจจาระเหลวสีเขียว ฆ่าไก่ทดลองตัวที่ 3 และ 4 ในวันที่ 3 และ 4 หลังการหยอดเชื้อตามลำดับ ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่หลอดลมและม้ามในไก่ตัวที่ 3 ที่ไต ตับ และต่อมเบอร์ซ่าในไก่ตัวที่ 4 ในวันที่ 5 หลังการหยอดเชื้อมีไก่ทดลองตาย 5 ตัว ตรวจ

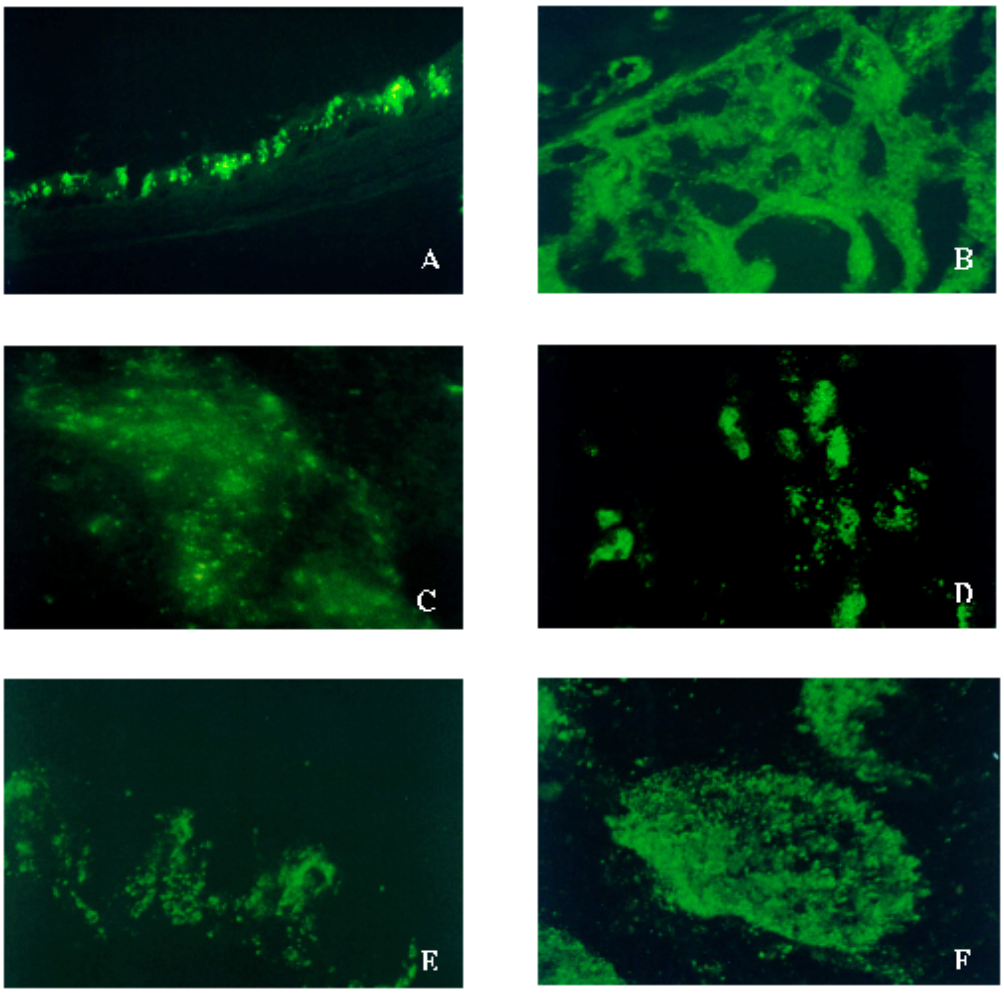

Figure 1. Fluorescent antigens in trachea (A), lung (B), spleen (C), kidney (D), intestine (E) and Bursa of Fabricius (F) of chickens experimentally infected with NDV.

พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่ม้ามและต่อมเบอร์ซ่า 3 ตัว ตับและหัวใจ 2 ตัว ในวันที่ 6 หลังการหยอดเชื้อไก่ทดลองที่เหลือตายหมดทั้ง 3 ตัว ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนได้เกือบทุกอวัยวะ เช่น ในหลอดลม (A), ปอด (B), ม้าม (C), ไต (D), ลำไส้ (E) และต่อมเบอร์ซ่า (F) (Figure 1) ของไก่ทดลองทุกตัว แต่ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่สมอง ส่วนไก่ทดลองตัวที่ 13 และ 14 ซึ่งเป็นไก่กลุ่มควบคุมแยกโรงเรือนที่เลี้ยง ฆ่าไก่ในวันสุดท้ายของการทดลอง ผ่าซากไก่ทดลองทั้ง 2 ตัว นำอวัยวะภายในมาตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนทุกอวัยวะ

เมื่อนำอวัยวะอีกส่วนของไก่ทดลองมาบดและทำการแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักจำนวน 5 ฟอง/ตัว เมื่อไข่ไก่ฟักตาย หลังฉีดเชื้อ 2 วันนำ CAM มาตรวจด้วยวิธี direct FA test ต่อเชื้อ NDV ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่ได้จากไก่ทดลองตัวที่ 1, 13 และ 14 ส่วนตัวที่ 2 ถึง 12 ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในไซโตพลาสมของ CAM และเมื่อนำ allantoic fluid มาทดสอบการเกาะกลุ่มกันกับเม็ดเลือดแดงไก่ (HA test) ให้ผลลบในไก่ทดลองตัวที่ 1, 13 และ 14 ส่วนไก่ตัวที่ 2 ถึง 12 ให้ผลบวก (Table 2) ทำการยืนยันชนิดของเชื้อ NDV ด้วยวิธี HI test ตามวิธีการของ Shortridge *et al*. (1982) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกัน

ส่วนผลการทดลองในไก่กลุ่มที่ 2 อายุ 3 เดือน ฆ่าไก่ทดลองตัวที่ 1 หลังหยอดเชื้อ 24 ชั่วโมง ผ่าซากไก่เก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ หลอดลม ปอด ม้าม ไต ตับ ลำไส้ และต่อมเบอร์ซ่า มาตรวจโดยวิธี direct FA test ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจน ส่วนไก่ทดลองตัวที่ 2, 3, 4 และ 5 ซึ่งฆ่าในวันที่ 2, 3, 4 และ 5 หลังหยอดเชื้อตามลำดับ ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่ม้าม ในไก่ตัวที่ 2 ที่หลอดลม ม้าม ไต ตับ ลำไส้ ในไก่ตัวที่ 3 ที่หลอดลม ม้าม ตับ ลำไส้ ในไก่ตัวที่ 4 และที่หลอดลม ลำไส้ ในตัวที่ 5 ไก่ทดลองตัวที่ 6 ซึ่งฆ่าในวันที่ 6 และไก่ทดลองตัวที่ 7 และ 8 ซึ่งตายในวันที่ 7 หลังหยอดเชื้อ ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนเกือบทุกอวัยวะ ยกเว้นสมองและตับ ไก่ทดลองตัวที่ 9 และ 10 ซึ่งฆ่าในวันที่ 8 และ 9 หลังการหยอดเชื้อ ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนทุกอวัยวะเช่นเดียวกับไก่

Table 2. Results of immunofluorescence on organs of 6-week-old experimental chickens infected with the local NDV isolated strain (NK 49/43)

Chicken No.	Results of NDV	Kill or died Post inoculation	Clinical sign	lesion	FA test									Virus isolation	
					brain	trachea	lung	heart	spleen	kidney	liver	bursa	intestine	CAM	HA test
1	-	K 1d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	K 2d.PI.	Normal	Normal	-	++	-	-	++	-	-	+	+	+	+
3	+	K 3d.PI.	A	Normal	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+	+
4	+	K 4d.PI.	A	Normal	-	+++	+	-	+++	+	+	+	+	+	+
5	+	D5d.PI.	A	B	-	+++	++	-	++	+++	+	+++	++	+	+
6	+	D5d.PI.	A	B	-	+++	++	-	++	+++	-	+++	++	+	+
7	+	D5d.PI.	A	B	-	+++	++	-	++	++	-	++	++	+	+
8	+	D5d.PI.	A	B	-	+	+++	-	-	++	-	-	+	+	+
9	+	D5d.PI.	A	B	-	++	++	+	-	++	-	++	++	+	+
10	+	D6d.PI.	A	B	-	++	++	+	-	++	-	+	-	+	+
11	+	D6d.PI.	A	B	-	++	+++	+	++	+++	+	++	++	+	+
12	+	D6d.PI.	A	B	-	++	+++	++	++	-	+	++	++	+	+
13	-	K6dPI	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	K6dPi	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A = Nasal discharge, swelling of tissue around the eyes, greenish diarrhea
B = Swollen kidney and liver K = Killed D = Death
- = negative + = positive
- = no fluorescence + = mild ++ = moderate +++ = most fluorescent antigens were seen in infected tissues. (Corstvet and Sadler, 1964)

ทดลองตัวที่ 11 และ 12 ที่เป็นไก่ทดลองกลุ่มควบคุมซึ่งฆ่าในวันสุดท้ายของการทดลอง

เมื่อนำอวัยวะอีกส่วนของไก่ทดลอง กลุ่มที่ 2 มาบดและทำการแยกเชื้อ NDV ในไข่ไก่ฟักจำนวน 5 ฟองต่อตัว พบว่าไข่ไก่ฟักทุกฟองตายในวันที่ 2 หลังการฉีดเชื้อเมื่อนำ CAM มาตรวจด้วยวิธี direct FA test ตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่ได้จากไก่ทดลองตัวที่ 1, 9, 10, 11 และ 12 ส่วนตัวที่ 2 ถึง 8 ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในไซโตพลาสมของ CAM และเมื่อนำ allantoic fluid (AF) มาทดสอบการเกาะกลุ่มกันกับเม็ดเลือดแดงไก่ (HA test) ให้ผลลบในไก่ทดลองตัวที่ 1, 9, 10, 11 และ 12 ส่วนตัวที่ 2 ถึง 8 ให้ผลบวก (Table 3) ทำการยืนยันชนิดของเชื้อ NDV ด้วยวิธี HI test เช่นเดียวกับไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกัน

ผลการทดลองที่ 2: จากการนำ CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อท้องที่สายเชื้อ NK 49/43 เข้า allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วัน พบว่าไข่ไก่ฟักทุกฟองตายในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ เมื่อนำ CAM มาตรวจหาไวรัสแอนติเจนตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในไซโตพลาสมของ CAM และเมื่อนำ allantoic fluid (AF) มาทดสอบการเกาะกลุ่มกันกับเม็ดเลือดแดงไก่ ตรวจพบ haemagglutination activity ของ AF ไข่ไก่ทุกฟอง

วิจารณ์

การวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลด้วยวิธี direct FA test เป็นวิธีการที่ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ วิธีการตรวจไม่ยุ่งยากสำหรับคอนจูเกตที่เตรียมได้เมื่อเจือจางด้วย PBS ที่ระดับต่างๆ พบว่าที่ระดับความเจือจาง 1:200 (หรือ 200 เท่า) เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้งาน การเก็บแอนติซีรั่มและคอนจูเกตควรเก็บที่อุณหภูมิ 4ºC แต่ถ้าต้องการเก็บเป็นระยะเวลานานๆ ควรแบ่งเก็บในปริมาณน้อยๆ ในขนาด 0.1-0.5 มล. ที่อุณหภูมิ -20ºC จะทำให้เก็บได้นานเป็นปีและสะดวกในการนำออกมาใช้ (สมเนตร, 2524; Collins *et al*., 2002) การนำคอนจูเกตมาแช่แข็งและละลายบ่อยครั้งจะทำให้ fluorochrome แยกตัวออกจากโปรตีนทำให้ประสิทธิภาพของคอนจูเกตเสียไป (สมเนตร, 2524) ผลการทดสอบความจำเพาะ และทดสอบการสกัดกั้นแสดงว่าคอนจูเกตที่เตรียมได้มีความจำเพาะต่อ NDV แอนติเจน

จากการตรวจอวัยวะส่วนต่างๆ ของไก่ทดลองที่

Table 3. Results of immunofluorescence on organs of 3-month-old experimental chickens infected with the local NDV isolated strain (NK 49/43)

Chicken No.	Results of NDV	Kill or died Post inoculation	Clinical sign	lesion	FA test									Virus isolation	
					brain	trachea	lung	heart	spleen	kidney	liver	bursa	intestine	CAM	HA test
1	-	K1d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	K2d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
3	+	K3d.PI.	Normal	Normal	-	+	-	-	++	++	+	+	+	+	+
4	+	K4d.PI.	Normal	Normal	-	+	-	-	+++	+	-	+	+	+	+
5	+	K5d.PI.	A	Normal	-	++	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6	+	K6d.PI.	A	Normal	-	++	+	+	+	+++	-	+	+	+	+
7	+	D7d.PI.	A	B	-	+++	+	+	++	+++	-	+	+	+	+
8	+	D7d.PI.	A	B	-	+++	+	+	++	+++	-	+	+	+	+
9	+	K8d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	K9d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	K9d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	K9d.PI.	Normal	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A = Nasal discharge, swelling of tissue around the eyes, greenish diarrhea
B = Swollen kidney and liver K = Killed D = Death
- = negative + = positive
- = no fluorescence + = mild ++ = moderate +++ = most fluorescent antigens were seen in infected tissues

หยอดเชื้อท้องที่ NDV ได้แก่ สมอง หลอดลม ปอด หัวใจ ม้าม ตับ ไต ต่อมเบอร์ซ่า และลำไส้ ย้อมด้วยคอนจูเกตของโรคนิวคาสเซิลที่เตรียมได้จะตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในส่วนของไซโตพลาสมของเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัสจะแบ่งตัวในไซโตพลาสมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Alexander, 1997) จึงสามารถตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนได้ในไซโตพลาสมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

ในไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 อายุ 6 สัปดาห์ตรวจพบไวรัสแอนติเจนในเซลล์เยื่อบุของหลอดลมไก่ทดลองทุกตัวที่ฆ่าหลังหยอดเชื้อตั้งแต่ 24 ชม. ถึงวันที่ 6 แต่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในไก่ทดลองตัวที่ 1 ที่ฆ่าภายใน 24 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อสอดคล้องกับ Kouwenhoven (1993) ซึ่งกล่าวว่าจะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อได้ตั้งแต่ 24-48 ชม. หลังจากไก่ได้รับเชื้อ NDV และเมื่อนำอวัยวะต่างๆ ของไก่ทดลองที่ฆ่าหรือตายหลังหยอดเชื้อ 24 ชม. มาตัดแล้วย้อมด้วยคอนจูเกตที่เตรียมได้ ตรวจพบเชื้อไวรัสที่หลอดลม ม้าม ต่อมเบอร์ซ่า ลำไส้ โดยเริ่มพบเชื้อตั้งแต่ไก่ยังไม่แสดงอาการป่วย แต่ที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสแอนติเจนที่สมองของไก่ทดลองทุกตัวที่หยอดเชื้อท้องที่ NK 49/43 อาจเป็นเพราะไวรัสสายเชื้อนี้ไม่ใช่สายเชื้อรุนแรงที่ทำให้เกิดอาการทางระบบประสาท (neurotropic velogenic)

ในไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 อายุ 3 เดือนจะตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนได้ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อโดยพบที่ม้าม ส่วนไก่ทดลองที่ฆ่าในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 หลังหยอดเชื้อพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนที่หลอดลม ปอด หัวใจ ม้าม ไต และลำไส้ ส่วนในวันที่ 7 หลังหยอดเชื้อมีไก่ทดลองตาย 2 ตัว ตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนได้ทุกอวัยวะ ยกเว้นสมองและตับ ในวันที่ 8 และ 9 หลังหยอดเชื้อ เมื่อฆ่าไก่ทดลอง 2 ตัวสุดท้ายซึ่งไก่ไม่แสดงอาการป่วยและตรวจไม่พบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนซึ่งอาจเป็นเพราะไก่ทดลองกลุ่มนี้มีอายุมากทำให้มีความต้านทานโรคได้ดีกว่าไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีอายุน้อยกว่า (McFerran and McCracken, 1988; Alexander, 1997) เมื่อนำอวัยวะของไก่ทดลองทุกตัวบดและฉีดเพื่อเพาะแยกเชื้อ NDV ในไข่ไก่ฟัก นำ CAM ตรวจหาไวรัสแอนติเจน และนำ AF ไปทดสอบคุณสมบัติการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงไก่ (HA test) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ FA test กับการแยกเชื้อ NDV ในไข่ไก่ฟักให้ผลสอดคล้องกัน (Table 2 และ 3)

เชื้อ NDV เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเริ่มติดเชื้อบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้นแล้วเพิ่มจำนวนเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดภาวะ viremia เชื้อจะกระจายไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย จึงสามารถตรวจพบการเรืองแสงของไวรัสแอนติเจนในอวัยวะเกือบทุกส่วนของร่างกายหลังจากได้รับเชื้อ NDV เชื้อ NDV สายเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ (lentogenic) ต้องใช้ proteolytic enzyme เช่น trypsin เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวน ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถพบได้เฉพาะในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร ส่วน virulent virus เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตามธรรมชาติสามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนโดยไม่จำเป็นต้องใช้ proteolytic enzyme จึงทำให้เชื้อ NDV สเตรนนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ในทุกอวัยวะของร่างกายทำให้เกิดการติดเชื้อทั่วร่างกาย (systemic infection) (Aldous and Alexander, 2001)

อาการป่วยและความรุนแรงของโรคนิวคาสเซิลในไก่และสัตว์ปีกที่ติดเชื้อไวรัสจะมีความแตกต่างกัน โดยพบตั้งแต่สัตว์ป่วยตายกระทันหันและมีอัตราการตายสูงถึง 100% จนถึงป่วยแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายเชื้อไวรัส, อายุของไก่, สภาพภูมิคุ้มกันของสัตว์, สภาพแวดล้อมที่ทำให้สัตว์เครียด, ปริมาณของเชื้อไวรัสและทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย และการติดเชื้อจุลชีพอื่นร่วม (Alexander, 1997) ไก่ที่นำมาทดลองได้จากพ่อ-แม่พันธุ์ที่ไม่เคยได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล เมื่อได้รับเชื้อ NDV ไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) มีอายุน้อยจึงแสดงอาการป่วยและตายอย่างรวดเร็วตั้งแต่ในวันที่ 5 และตายหมดในวันที่ 6 หลังหยอดเชื้อ ซึ่งเชื้อ NDV มีระยะฟักตัวนาน 2-15 วัน (Alexander, 1997) ไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 (อายุ 3 เดือน) ที่มีอายุมากแสดงอาการป่วยช้ากว่าและมีไก่ทดลองในกลุ่มนี้ตายเพียง 2 ตัวจากไก่ทั้งหมด 10 ตัวในวันที่ 7

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคระบาดที่รุนแรง สร้างความเสียหายทั้งจากการที่สัตว์ป่วยโดยตรงและยังส่งผลทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคที่ได้ผลรวดเร็วและมีความ

แม่นยำสูง ดังเช่น วิธี direct FA test ซึ่งสามารถทราบผลการตรวจได้ภายใน 1-2 ชม. หลังรับตัวอย่างส่งตรวจ และอวัยวะที่เหมาะสมที่จะตรวจคือ หลอดลม ปอด ม้าม ไต ซึ่งสอดคล้องกับ Alexander (1997) การตรวจหาไวรัสแอนติเจนในเนื้อเยื่อด้วยวิธี direct immunofluorescence เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้ผลการวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำ ทำให้สามารถควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วหลังทราบผลการชันสูตรทำให้เกษตรกรเกิดความสูญเสียน้อยที่สุด นอกจากนี้การเตรียมคอนจูเกตได้เองในห้องปฏิบัติการจะช่วยประหยัดงบประมาณในการซื้อคอนจูเกตจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงและหาซื้อยาก

เอกสารอ้างอิง

สมเนตร บุญพรรคนาวิก. 2524. อิมมูโนฟลูออเรสเซนท์เทคนิค. โรงพิมพ์พิฆเนศ กรุงเทพฯ. หน้า 1-31.

Aldous, E.W. and Alexander, D.J. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1): Technical Review: Avian Pathol. 30: 117-128.

Alexander, D.J. 1988. Newcastle Disease Diagnosis. In Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston. p.147-183.

Alexander, D.J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J. Comp. Path. 112: 105-126.

Alexander, D.J. 1997. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae Infections. In Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa state University Press. Ames, Iowa. p.541-569.

Alexander, D.J. 1998. Newcastle Disease Virus and Other Avian Paramyxovirus. In Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th ed.. American Association of Avian Pathologists. Rose Printing, Thallahassee, Florida. p.156-163.

Alexander, D.J. 2001. Newcastle disease. British Poultry Science. 42: 5-22.

Awan, M.A., Otte, M.J. and James, A.D. 1994. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry :a review. Avian Pathol. 23: 405-423.

Beard, C.W. and Hanson, R.P. 1984. Newcastle disease. In Disease of Poultry. 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.393-402

Braune, M.A. and Gentry, R.F. 1965. Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory virus. University of Pensylvania, USA. p.535-545.

Collins, A.B., Colvin, R.B., Nousari, H.C., and Anhalt, G.J. 2002. Immunofluorescent methods. In the Diagnosis of Renal and Skin Diseases. In Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. ASM Press,Washington D.C. p.393-402.

Corstvet, R.E. and Sadler, W.W. 1964. Diagnosis of Certain Avian Diseases With the Fluorescent Antibody Technique. Poultry Sci. 43: 1280-1288.

Council of the Economic Community.1992. Council Directive 92/66 EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. Official of the European Communities, L260, p.1-20.

de Wit, J.J., Koch, G., Kant, A., and Roogelaar, D.V.J. 1995. Detection by immunofluorescent assay of serotype-specific and group-specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems. Avian Pathol. 24: 465-474.

Johnson, D.G. 1989. Immunofluorescence. In Antibody Volumn II: a practical approach. IRL Press, Oxford. Press, England. p.179-200.

Kawamura, A. 1977. Fluorescent antibody technique and their application. 2nd ed. University Tokyo Press, Tokyo. p.13-76.

Kouwenhoven, B. 1993. Newcastle disease. In Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p.341-361.

Lamb, R.A., Collin, P.L., Kolakofsky, D., Melero, J.A., Nagri, Y., Oldstone, M.B.A., Pringle, C.R. and Rima, B. 2002. Family Paramyxoviridae. The Universal Virus Database of the InteRibonuecleic acidtional Committee on Taxonomy of Virus. Retrieved May 3, 2003, from http://www.ncbi.nlm.nih. gov/ICTVdb/Ictv/fs_param.htm.

Maestrone, G. and Coffin, D.L. 1964. Study of Newcastle disease by means of fluorescent antibody technique. Am. J. Vet.Res. 25(104): 217-223.

McFerran, J.B. and McCracken, R.C. 1988. Newcastle Disease Diagnosis. In Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston. p.161-183.

Ritchie, B.W., Harrison, G.J. and Harrison, L.R. 1994. Paramyxoviridae. In Avian Medicine: Principles and Application. Winger Publishing, Inc., Lake Worth, Florida. p.920-928.

Shortridge, K.F., Allan, W.H. and Alexander, D.J. 1982. Newcastle disease laboratory and vaccine evaluation. Hong Kong University Press, Hong Kong. 53 pages.

Spradbrow, P.B. 1988. Geographical distribution. In Newcastle disease, Kluwer Acadamic Publishers, Boston. p.247-255.

Wobeser, G., Leighton, F.A., Norman, R., Myers, D.J. Onderka, D., Pybus, M.J. Neufeld, J.L. Fox, G.A., and Alexander, D.J. 1995. Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. Can. Vet. J. 34: 353-359.