Efficacy of UMONIUM[38] Disinfectant against Avian Influenza Virus and Newcastle Disease Virus

Kanlaya Chuachan[1*], Kwankate Kanistanon[2], Varaporn Sukolapong[3], Kingkarn Sarachu[1]

Abstract

Objective —To determine whether different concentrations of UMONIUM[38] disinfectant would kill avian influenza virus (AIV) subtype H5N1 and Newcastle disease virus (NDV), both of which were isolated from naturally infected, native Thai chickens that died in the Northeast of Thailand.

Materials and Methods — Three concentrations (0.33%, 0.5%, and 2.5%) of UMONIUM[38] were tested by embryonated chicken egg assay against the AIV and NDV, 4 isolates each. To multiply these viruses for the test, AIV and NDV were separately injected into 10-day-old embryonated chicken eggs, and then each virus in the allantoic fluid was confirmed by both hemagglutination (HA) test and hemagglutination inhibition (HI) test. To test the efficacy of UMONIUM[38], each virus solution was mixed in vitro with UMONIUM[38] for 10 min. The mixtures were then injected into embryonated chicken eggs. The existence of viruses was determined by HA and HI tests, but the presence of the viral ribonucleic acids (RNA) was determined by real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) and RT-PCR for AIV and NDV, respectively. Embryonic infectious dose 50% (EID_{50}) concentration in virus solutions of AIV and NDV were also determined.

Results — None of either AIV or NDV was found in all virus solutions mixed with 3 concentrations of UMONIUM[38] by embryonated chicken egg assay, but both viral RNAs could be detected by molecular technique. Concentrations of viral solution used were $10^{4.7}$ - $10^{5.5}$ EID_{50}/ml for AIV and 10^{6} - $10^{7.16}$ EID_{50}/ml for NDV.

Conclusion — UMONIUM[38] can efficiently kill AIV subtype H5N1 and NDV when using at concentration of 0.33% to 2.5%. The concentration recommended by the manufacturer is 0.5% or 2.5%.

KKU Vet J. 2010;20(1):62-70 *http:/vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Disinfectant; UMONIUM[38]; Avian influenza virus, Newcastle disease virus

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2]Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[3]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

***Corresponding Author**: kchuachan@hotmail.com, kanchu1@kku.ac.th

ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล

กัลยา เจือจันทร์[1*], ขวัญเกศ กนิษฐานนท์[2], วราภรณ์ ศุกลพงศ์[3], กิ่งกาญจน์ สาระชู[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่ป่วยตายในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ นำเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ชนิดละ 4 ตัวอย่าง (isolate) ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสแต่ละตัวอย่างในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ตรวจยืนยันการพบเชื้อใน allantoic fluid ด้วยวิธี hemagglutination (HA) test และ hemagglutination inhibition (HI) test ตามลำดับ นำสารละลายเชื้อที่เตรียมได้ผสมกับสารละลายน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ที่ความเข้มข้นต่างๆ เท่ากับ 2.5% 0.5% และ 0.33% ตามลำดับ เมื่อครบ 10 นาที แบ่งส่วนผสมแยกทดสอบหาการมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัสด้วยวิธีฉีดไข่ไก่ฟักและยืนยันการพบเชื้อด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ อีกส่วนหนึ่งส่งตรวจหาอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid) ของเชื้อด้วยวิธี real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) และวิธี RT-PCR สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ตามลำดับ ในขณะเดียวกันนำสารละลายเชื้อแต่ละตัวอย่างมาทดสอบหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย embryo infectious dose 50% (EID_{50})

ผลการศึกษา พบว่า เชื้อไวรัสทุกตัวอย่างที่ได้รับการผสมกับน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตรวจไม่พบเชื้อไวรัสด้วยวิธีฉีดไข่ไก่ฟักแต่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ทั้งนี้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ทดสอบ สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมีตั้งแต่ $10^{4.7}$-$10^{5.5}$ EID_{50} ต่อมิลลิลิตร และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลมีตั้งแต่ 10^{6}-$10^{7.16}$ EID_{50} ต่อมิลลิลิตร

ข้อสรุป น้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] สามารถฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้เมื่อใช้ในขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 0.33%-2.5% ซึ่งขนาดที่ผู้ผลิตแนะนำคือที่ความเข้มข้น 0.5% หรือ 2.5%

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(1):62-70 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: น้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] เชื้อไวรัสไข้หวัดนก เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[3]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ:** kchuachan@hotmail.com, kanchu1@kku.ac.th

บทนำ

โรคไข้หวัดนก (avian influenza หรือ bird flu) และโรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่สำคัญมากของสัตว์ปีก โรคไข้หวัดนกมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (avian influenza virus) ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* [1] ส่วนโรคนิวคาสเซิลมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus) ในวงศ์ *Paramyxoviridae* [2] ถึงแม้จะเป็นเชื้อไวรัสต่างวงศ์กันแต่มีส่วนประกอบที่คล้ายกันกล่าวคือ เป็นเชื้อไวรัสที่มีเปลือก (envelope) หุ้ม และมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded ribonucleic acid; RNA) ต่างกันตรงที่อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก แบ่งเป็น 8 ท่อน [3] ในขณะที่อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลต่อเนื่องยาวเป็นเส้นเดียว [2] ทั้งโรคไข้หวัดนกและโรคนิวคาสเซิลมีผลทำให้อัตราการป่วยและอัตราการตายของสัตว์ปีกสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่ซึ่งนอกจากจะเป็นสัตว์ปีกที่ไวต่อทั้งสองโรคนี้แล้ว ยังเป็นสัตว์ปีกที่มีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากทั่วโลก สำหรับการเลี้ยงไก่ในประเทศไทยมีทั้งที่เป็นการเลี้ยงแบบปล่อยหลังบ้านของเกษตรกรทั่วไป และเลี้ยงเป็นฟาร์มขนาดใหญ่ในรูปแบบธุรกิจของบริษัทเอกชน หากเกิดการระบาดของโรคไม่ว่าจะเป็นโรคไข้หวัดนกหรือโรคนิวคาสเซิล นอกจากต้องสูญเสียสัตว์ที่ป่วยหรือตายเป็นจำนวนมากแล้ว ยังส่งผลเสียต่อการส่งออกเนื้อไก่ไปจำหน่ายยังต่างประเทศ รวมถึงส่งผลเสียต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศในที่สุด และที่สำคัญทั้งสองโรคนี้จัดเป็นโรคสัตว์สู่คน (zoonosis) โดยโรคไข้หวัดนกทำให้คนป่วยและถึงตายได้ [4] ในขณะที่โรคนิวคาสเซิลมีผลทำให้เกิดโรคตาแดงในคน (conjunctivitis) [2] ดังนั้น การป้องกันและควบคุมโรคจึงเป็นมาตรการสำคัญที่จะช่วยลดความเสียหายดังที่กล่าวมาแล้วได้ ซึ่งไม่เฉพาะแต่สองโรคนี้เท่านั้น แต่ยังรวมถึงโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ในสัตว์ปีก น้ำยาฆ่าเชื้อจึงเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางและเกี่ยวข้องแทบทุกขั้นตอนการผลิตสัตว์ปีก เริ่มจากใช้เตรียมโรงเรือนก่อนนำสัตว์เข้าเลี้ยง จนถึงใช้ฆ่าเชื้อโรงเรือนอีกครั้งภายหลังการปลดสัตว์ปีก [5]

น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีรายงานว่าสามารถฆ่าทำลายเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้เช่น aldehyde (formaldehyde หรือ glutaraldehyde), phenolic disinfectant, quaternary ammonium compound [3,6,7] ซึ่งน้ำยาฆ่าเชื้อทุกชนิดที่ยกตัวอย่างมาล้วนเป็นชนิดหลักที่ทางกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ของประเทศไทย ได้แนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ในฟาร์มสัตว์ปีก [4] อย่างไรก็ตามน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีฤทธิ์และความเป็นพิษต่างกัน เช่น glutaraldehyde ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้างมาก สามารถฆ่าได้ทั้งเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส (ทั้งชนิดที่มีและไม่มีเปลือกหุ้ม) และพบว่าสารอินทรีย์ (organic matter) ที่ปนเปื้อนส่งผลเสียเพียงเล็กน้อยต่อประสิทธิภาพของ glutaraldehyde [5] แต่มีข้อเสียคือ glutaraldehyde ทำให้ผิวหนังอักเสบและก่อปัญหาต่อเดินหายใจได้ [8] ส่วน formalin ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้างใกล้เคียงกับ glutaraldehyde แต่สารอินทรีย์มีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของ formalin มากกว่า รวมทั้ง formalin มีผลระคายเคืองผิวหนังและชั้นเยื่อเมือก (mucous membrane) ของร่างกายผู้ปฏิบัติงานรวมทั้งก่อมะเร็งได้ด้วย [5] ในขณะที่ phenolic disinfectant เป็นอีกกลุ่มที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้างเช่นกัน รวมทั้งสามารถออกฤทธิ์ได้ดีแม้มี

ดินและสารอินทรีย์ปนเปื้อน แต่ phenolic disinfectant มีผลระคายเคืองผิวหนัง มีความเป็นพิษสูงต่อสุกรและแมว และมักตกค้างเป็นแผ่นคราบบางๆ บนพื้นผิว ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้ [5] สำหรับ quaternary ammonium compound โดยทั่วไปถือว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อด้อยกว่ากลุ่ม aldehyde เพราะออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจมีผลต่อเชื้อราได้บ้างแต่ไม่ทำลายสปอร์ของเชื้อรา และมีผลต่อเชื้อไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้มเท่านั้น รวมถึงประสิทธิภาพจะลดลงมากเมื่อมีสารอินทรีย์ปนเปื้อน แต่เนื่องจากน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มนี้ไม่มีคราบสีตกค้าง ไม่มีกลิ่นฉุน ไม่กัดกร่อนอุปกรณ์และไม่เป็นพิษต่อผู้ปฏิบัติงาน จึงเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมากในโรงงานผลิตนมและอาหาร [5]

UMONIUM[38] (MEDICAL INSTRUMENTS) (Huckert's International; Nivelles, Belgium) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อตัวใหม่ในกลุ่ม quaternary ammonium compound มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ alkyl dimethyl benzylammonium chloride (10% w/v) และ isopropyl alcohol (10% w/v) โดยบริษัทผู้ผลิตให้ข้อมูลประกอบผลิตภัณฑ์ไว้ว่า ไม่มีส่วนประกอบของ aldehyde ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้แม้มีสารอินทรีย์ ไม่ระคายเคือง มีความเป็นพิษต่ำและสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ สำหรับขนาดใช้ที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้คือ 0.5%-2.5% ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ UMONIUM[38] ในการฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

เชื้อไวรัสที่ใช้ศึกษา

เชื้อไวรัสที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีสองชนิด คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ชนิดละ 4 ตัวอย่าง (isolate) เชื้อทั้งหมดแยกได้จากไก่พื้นเมืองที่ป่วยตายในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การเพิ่มจำนวนและการตรวจหาเชื้อไวรัส

การเพิ่มจำนวนและการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ทำโดยการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก เนื่องจากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยเหมือนกัน กล่าวคือ นำสารละลายที่ต้องการตรวจหาเชื้อไวรัส ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน โดยฉีดเข้าตำแหน่ง allantoic cavity ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรต่อฟอง จำนวน 5 ฟองต่อตัวอย่าง นำไข่ไก่ฟักเข้าตู้ฟักไข่ และตรวจดูการตายของตัวอ่อนทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตายมาทำการเก็บ allantoic fluid (AF) ส่วนไข่ฟองที่ตัวอ่อนยังไม่ตายให้รอเก็บ AF หลังฟักไข่ครบ 4 วัน จากนั้นยืนยันการพบเชื้อไวรัสด้วยวิธี hemagglutination test (HA) test และ hemagglutination inhibition test (HI) test ตามลำดับ ในกรณีที่เป็นการตรวจหาเชื้อ หากไม่พบเชื้อไวรัสในการฉีดไข่ passage ที่ 1 ให้เก็บ AF ของไข่ทั้ง 5 ฟองในตัวอย่างเดียวกันรวมกันแล้วฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก passage ที่ 2 โดยเริ่มต้นทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนแรก หากตรวจไม่พบเชื้อไวรัสอีก จึงจะรายงานว่าไม่พบเชื้อไวรัสในตัวอย่างส่งตรวจ [9, 10]

การเตรียมสารละลายเชื้อไวรัส

ในการเตรียมสารละลายเชื้อไวรัสได้ดัดแปลงจากการศึกษาของ Suarez และคณะ [11] โดยนำ AF ที่ผ่านการพิสูจน์แล้วว่ามีเชื้อไวรัสที่ต้องการทดสอบ เตรียมให้ได้ 2^6 HA units/25 μl สำหรับเชื้อทั้ง 2 ชนิด จากนั้นเจือจางเชื้อด้วย phosphate buffered saline (PBS) ในสัดส่วน 1:10 ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเชื้อที่จะใช้ทดสอบต่อไป สารละลายที่ได้นี้ต่อไปจะเรียกว่าสารละลายเชื้อ

การเตรียมสารละลายน้ำยาฆ่าเชื้อ

ผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 5% (1:20) 1% (1:100) และ 0.67% (1:150)

การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเอ็มบริโอ (embryo) ของไก่

นำสารละลายน้ำยาฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 5% เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ความเข้มข้นเท่ากับเมื่อผสมสารละลายเชื้อแล้วคือ 2.5% จากนั้นฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันจำนวน 5 ฟอง นำไข่เข้าฟักในตู้ฟักไข่และส่องตรวจการมีชีวิตของเอ็มบริโอเป็นเวลา 4 วัน เมื่อพบการตายของเอ็มบริโอ จึงทำการเจือจางส่วนผสมน้ำยาฆ่าเชื้อด้วย PBS ลงไปอีกและฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน โดยทำซ้ำขั้นตอนเดิม ทำซ้ำเรื่อยๆ จนกว่าจะไม่พบการตายของเอ็มบริโอ ซึ่งจากการทดสอบพบว่าส่วนผสมที่ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อเท่ากับ 0.25% ไม่ทำให้เอ็มบริโอตาย

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อไวรัส

นำสารละลายเชื้อแต่ละตัวอย่าง แยกผสมกับสารละลายน้ำยาฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:1 (ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อในหลอดทดสอบจะลดลงครึ่งหนึ่งจากที่เตรียม โดยจะเหลือเท่ากับที่ทางบริษัทผู้ผลิตกำหนด ยกเว้นความเข้มข้น 0.33% (1:300) ซึ่งจะต่ำกว่าที่กำหนดไว้) เมื่อครบ 10 นาที นำส่วนผสมมาเจือจางด้วย PBS เพื่อให้ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อเป็น 0.25% ก่อนฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน (ตามผลการทดสอบความเป็นพิษของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อตัวอ่อนของไก่) ในขณะเดียวกันนำสารละลายเชื้อของทุกตัวอย่างแยกผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับในตัวอย่างที่ผสมด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ จากนั้นเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วย PBS ในสัดส่วนเดียวกับที่เจือจางตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อ 2.5% เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ถูกเจือจางมากที่สุดและปริมาณเชื้อเหลือน้อยที่สุด แล้วจึงฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ซึ่งขั้นตอนตั้งแต่การฉีดส่วนผสมเข้าไข่ไก่ฟักจนถึงการตรวจหาการคงอยู่ของเชื้อไวรัส ได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเพิ่มจำนวนและการตรวจหาเชื้อไวรัส

ส่วนผสมในทุกหลอดทดสอบที่นำไปฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก ได้แบ่งส่วนหนึ่งนำไปทดสอบหาอาร์เอ็นเอของเชื้อ เฉพาะการตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้ส่งไปตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน สังกัดกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ส่วนการตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้ยึดตามวิธีของ Creelan และคณะ [12]

การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส

นำสารละลายเชื้อทุกตัวอย่างมาประเมินหาค่า embryo infectious dose 50% (EID_{50}) โดยเจือจางสารละลายเชื้อด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 1/10 หรือ 10^{-1} เท่าจากตั้งต้น (10-fold dilution) จนถึงความเข้มข้น 10^{-10} จากนั้นฉีดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นเข้าในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ความเข้มข้นละ 5 ฟอง ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร นำไข่ไก่ฟักเข้าตู้ฟักไข่ และตรวจดูการตายของเอ็มบริโอทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไข่ไก่ฟักที่เอ็มบริโอตาย มาทำการเก็บ AF ส่วนไข่ฟองที่เอ็มบริโอยังไม่ตายรอเก็บ AF หลังฟักไข่ครบ 4 วัน จากนั้นยืนยันการพบเชื้อไวรัสด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ นำผลการทดสอบมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในหน่วย EID_{50} ตามวิธีที่กำหนดไว้ใน Poultry Disease Subcommittee and Committee on Animal Health Agriculture Board [13]

ผลการศึกษา

เชื้อไวรัสทุกตัวอย่างที่ผสมกับน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสด้วยวิธีฉีดไข่ไก่ฟัก แต่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อได้ด้วยวิธี real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) และ RT-PCR สำหรับการตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ทดสอบ สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมีตั้งแต่ $10^{4.7}$-$10^{5.5}$ EID_{50} ต่อมิลลิลิตร และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลมีตั้งแต่ 10^{6}-$10^{7.16}$ EID_{50} ต่อมิลลิลิตร (**Table 1**)

วิจารณ์

น้ำยาฆ่าเชื้อที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีฤทธิ์และมีความเป็นพิษแตกต่างกัน ดังนั้นในการเลือกใช้งานนอกจากจะพิจารณาถึงสรรพคุณในการฆ่าเชื้อที่ต้องการแล้ว ยังควรคำนึงถึงพิษที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ปฏิบัติงานและผลตกค้างต่อสิ่งแวดล้อมด้วย น้ำยาฆ่าเชื้อ quaternary ammonium compound ถึงแม้จะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อด้อยกว่ากลุ่ม aldehyde เนื่องจากออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจมีผลต่อเชื้อราได้บ้างแต่ไม่ทำลายสปอร์ของเชื้อรา และมีผลเฉพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้มเท่านั้น รวมถึงประสิทธิภาพจะลดลงมากเมื่อมีสารอินทรีย์ปนเปื้อน นอกจากนั้นยังมีราคาที่ค่อนข้างแพงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มอื่นๆ แต่เนื่องจากน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มนี้ไม่กัดกร่อนอุปกรณ์และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน จึงเป็นน้ำยาฆ่าเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ และในโรงงานผลิตนมและอาหาร [5]

Table 1. Effect of UMONIUM[38] on Avian Influenza Virus (AIV) Subtype H5N1 and Newcastle Disease Virus (NDV)

Virus Type	EID_{50} per ml	Disinfectant concentration			
		0%	0.33%	0.5%	2.5%
AIV					
Isolate 1	$10^{5.41}$	$+^{1}$ / $+^{2}$	- / +	- / +	- / +
Isolate 2	$10^{5.41}$	+ / +	- / +	- / +	- / +
Isolate 3	$10^{4.70}$	+ / +	- / +	- / +	- / +
Isolate 4	$10^{5.50}$	+ / +	- / +	- / +	- / +
NDV					
Isolate 1	$10^{7.16}$	+ / +	NT	- / +	- / +
Isolate 2	$10^{6.50}$	+ / +	NT	- / +	- / +
Isolate 3	$10^{7.12}$	+ / +	NT	- / +	- / +
Isolate 4	$10^{6.00}$	+ / +	NT	- / +	- / +

Symbols: $+^{1}$ / $+^{2}$ = positive by virus isolation/ positive by real time RT-PCR for AIV subtype H5N1 or RT-PCR for NDV,
Abbreviations: EID=embryonic infectius dose, NT=not tested

UMONIUM[38] เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อตัวใหม่ในกลุ่ม quaternary ammonium compound มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ alkyl dimethyl benzylammonium chloride และ isopropyl alcohol ซึ่งจากเอกสารประกอบการขายผลิตภัณฑ์ระบุไว้ว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไม่ลดลงเมื่อสัมผัสกับสารอินทรีย์ ไม่มี aldehyde เป็นส่วนประกอบจึงไม่ระคายเคืองผิวหนังและไม่เป็นอันตรายเมื่อสูดดมไอระเหยของน้ำยาฆ่าเชื้อเข้าไป และสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ ซึ่งตรงกันข้ามกับ glutaraldehyde ที่มีผลทำให้ผิวหนังอักเสบและก่อปัญหาในทางเดินหายใจได้ [8] สำหรับฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อนั้นจากการทดลองจะเห็นว่า เมื่อใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ในความเข้มข้น 0.5%-2.5% ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดจะสามารถฆ่าทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้ และในกรณีที่เกิดความผิดพลาดในการผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยมีความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อเพียง 0.33% (1:300) ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทางบริษัทผู้ผลิตกำหนด (คือ 0.5% หรือ 1:200) ยังสามารถฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ได้ด้วย และในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบพบว่า ไม่มีผลทำลายอาร์เอ็นเอของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suarez และคณะ [11] ที่ได้นำน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ผลพบว่า phenolic disinfectant และ quaternary ammonium compound ไม่มีผลทำลายอาร์เอ็นเอของเชื้อ ส่วน chlorine compound และ peroxygen compound สามารถฆ่าเชื้อได้และทำลายอาร์เอ็นเอของเชื้อได้ด้วยเมื่อใช้ในขนาดที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ทั้งนี้เป็นเพราะ phenolic disinfectant และ quaternary ammonium compound มีผลต่อโปรตีนหรือไขมันที่ผิวทำให้เชื้อไวรัสเสียสภาพ (denature) [14] ในขณะที่ chlorine compound และ peroxygen compound มีผลต่อสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ด้วย จึงสามารถทำลายอาร์เอ็นเอของเชื้อได้โดยตรง [15,16]

ด้วยคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] ที่สามารถฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้โดยไม่ทำลายอาร์เอ็นเอของเชื้อ ทำให้นำมาใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการได้อีกทางหนึ่ง กล่าวคือ ใช้ฆ่าเชื้อก่อนนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการอ้างอิง (referent laboratory) เพื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ในทางตรงข้ามอาจเตรียมเชื้อจากห้องปฏิบัติการอ้างอิงส่งไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่ายเพื่อตรวจสอบมาตรฐานการวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้เช่นกัน

จากการทดลองในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า น้ำยาฆ่าเชื้อ UMONIUM[38] สามารถฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลได้เมื่อใช้ในขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 0.33%-2.5% ซึ่งขนาดที่ผู้ผลิตแนะนำคือ ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือ 2.5%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท บางกอก แอดวานซ์ เทคโนโลยี่ จำกัด ที่ให้เงินสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนที่ช่วยตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เอกสารอ้างอิง

1. Swayne DE, Senne DA, Beard CW. Avian influenza. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.* 4th ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA.; 1998. p.150-155.
2. Alexander DJ. Newcastle disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougal LR, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry.* 11th ed. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 64-87.
3. Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougal LR, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry.* 11th ed. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 135-160.
4. ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์. *การควบคุมโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย.* เชิดชัย กำวิจิตรรัตนโยธา, สุรสิงห์ ศรีจำรูญ, เชาววิทย์ กังแฮ, บรรณาธิการ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 2549.
5. Quinn PJ, Markey BK. Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 1069-1103.
6. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, รุ่งโรจน์ แจ่มอ้น, นำดี แซ่เฮ็ง, นพดล มีมาก. การศึกษาความคงอยู่ ความคงทนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสภาพแวดล้อมต่างๆ และความไวต่อยาฆ่าเชื้อโรค. ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 2548.
7. Ruano M, El-Attrache J, Villegas P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Dis.* 2001;45(4):972-977.

8. Scott EM, Gorman SP. Glutaraldehyde. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p.61-88.
9. Office International des Epizooties (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 [Internet] [revised 2008 July 17; cited 2009 January 20]. Available from: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf.
10. Office International des Epizooties (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Internet] [revised 2008 July 17; cited 2009 January 20]. Available from: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
11. Suarez DL, Spackman E, Senne DA, Bulaga L, Welsch AC, Froberg K. The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.* 2003;47: 1091-1095.
12. Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 2002;31:493-499.
13. Poultry Disease Subcommittee and Committee on Animal Health Agriculture Board. *Methods for the Examination of Poultry Biologic.* 2nd ed. National Academy of Science, National Research Council. Washington, DC. 1963.
14. Prince HN, Prince DL. Principles of viral control and transmission. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 543-571.
15. Block SS. Peroxygen compounds. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 185-204.
16. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 135-157.