

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ พลาสมาเดียม กัลลินาเซียม ในไก่ด้วยวิธี IFA และ ELISA และ
ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่จำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ



นางสาวพัชรี ทรงประโคน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1450-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF ANTIBODY TITRE AGAINST *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTED
CHICKEN BY IFA AND ELISA AND STUDY ON THE MOLECULAR WEIGHT
OF PROTEIN SPECIFIC TO INFECTED SERA



Miss Pucharee Songprakhon

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology

Department of Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1450-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ พลาสมาเดียม กัลลีนาเซียม ในไก่ด้วยวิธี IFA และ ELISA และศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนที่จำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ
โดย	นางสาวพัชรี ทรงประโคน
ภาควิชา	พยาธิวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. พงษ์ หาดบุญทอนากร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เล็ก อัสวพลังชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. พงษ์ หาดบุญทอนากร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นิคม ชัยศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มานพ ม่วงใหญ่)

พัชรี ทรงประโคน : การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ในไก่ด้วยวิธี IFA และ ELISA และศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่จำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ (DETECTION OF ANTIBODY TITRE AGAINST *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTED CHICKEN BY IFA AND ELISA AND STUDY ON THE MOLECULAR WEIGHT OF PROTEIN SPECIFIC TO INFECTED SERA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร. พงษ์ หาญยุทธนากร ; 118 หน้า, ISBN 974-17-1450-5

ศึกษาอัตราการติดเชื้อและระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ด้วยวิธี IFA (Immuno fluorescence Assay) วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) และการวิเคราะห์โปรตีนแอนติเจนของเชื้อ ด้วยวิธี Western blot โดยใช้ไก่เนื้อ จำนวน 120 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มอายุ คือ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มอายุละ 40 ตัว ในแต่ละกลุ่มอายุแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ในการทดลองทำการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดดำที่ปีก ปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (infected rbc) ตามลำดับ และติดตามผลการทดลองโดยการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดทุกๆ 3 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองผลปรากฏว่าไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งหมดมีอัตราการติดเชื้อ 66.67% โดยไก่กลุ่มอายุ 10 วันและ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ มีอัตราการติดเชื้อ 100% เท่ากัน และไก่กลุ่มอายุ 10 วัน ซึ่งได้รับเชื้อปริมาณ 10⁶ เซลล์ มีความไวสูงสุด เริ่มตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ และมีค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อสูงสุดในวันที่ 12 และเป็นกลุ่มที่ไก่ตายสูงสุด 90% สำหรับไก่กลุ่มอายุ 30 วัน ทุกกลุ่มย่อยไม่พบเชื้อตลอดการทดลอง

การทดสอบหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของไก่ทดลองทุกกลุ่มต่อเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ด้วยวิธี IFA และ วิธี ELISA ผลปรากฏว่าซีรัมไก่ทุกอายุให้ผลบวกจากการทดสอบ 100 และ 56.67% ตามลำดับ การทดสอบด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่กลุ่มอายุ 10 และ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อมีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อสูง 100% ไก่อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10³ infected rbc เริ่มตรวจพบระดับแอนติบอดีได้เร็วที่สุดในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ และพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรัมไก่ 100% ในวันที่ 6 และจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ที่ระดับแอนติบอดี 1/15625 ส่วนไก่กลุ่มควบคุมให้ผลแปรปรวนเล็กน้อยตลอดการทดลอง สำหรับผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA ซีรัมของไก่กลุ่มอายุ 10 วัน ทุกกลุ่มย่อยให้ผลบวก 70 และ 100% ในวันที่ 12 และ 15 ของการทดลอง โดยมีค่าเฉลี่ย OD ระหว่าง 0.308-0.410 ซีรัมของไก่กลุ่มอายุ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยให้ผลบวกน้อยกว่ากลุ่มอายุ 10 วัน ยกเว้นกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10 infected rbc ขณะที่ไก่กลุ่มอายุ 30 วัน ให้ผลบวกน้อยและแปรปรวนมาก ส่วนกลุ่มควบคุมทุกอายุส่วนใหญ่ให้ผลลบต่อการทดสอบ ผลการทดสอบในซีรัมไก่ที่เก็บมาจากแหล่งที่มีการระบาด จำนวน 67 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าการทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA ไก่มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ 94.03 และ 55.2% ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA วิเคราะห์และเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อในกระแสเลือดของไก่ทดลอง พบว่าวิธี IFA มีความไว 56.45% และความจำเพาะ 100% ส่วนวิธี ELISA มีความไว 78.37% และมีความจำเพาะ 83.33%

ทำการแยก crude *P. gallinaceum* antigen ด้วยวิธี SDS-PAGE และนำมาวิเคราะห์หาความจำเพาะของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ ด้วยวิธี Western blot โดยใช้ซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อและมีระดับแอนติบอดีสูง ผลปรากฏว่าพบแถบโปรตีนแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชัดเจน ที่น้ำหนักโมเลกุล 186, 169.8, 106.6, 101.1, 78.5, 74.1, 57.2, 53.7, 48.7, 46.7, 41, 37.7, 31.7, 21.3 และ 20 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับผลของปฏิกิริยาที่เกิดจากซีรัมของไก่ที่ไม่ติดเชื้อและที่ติดเชื้ออื่นๆ พบว่าแถบโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีของเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม มีน้ำหนักโมเลกุล 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 และ 37.7 kDa .

ภาควิชาพยาธิวิทยา

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4275557031 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD : *PLASMODIUM GALLINACEUM* / ANTIBODY / CHICKEN / IFA / ELISA / WESTERN BLOT

PUCHAREE SONGPRAKHON : DETECTION OF ANTIBODY TITRE AGAINST *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTED CHICKEN BY IFA AND ELISA AND STUDY ON THE MOLECULAR WEIGHT OF PROTEIN SPECIFIC TO INFECTED SERA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUWANNEE NITHIUTHAI, D.V.M., Ph.D. THESIS COADVISOR : PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, B.Sc. , Ph.D. 118 pp. ISBN 974-17-1450-5

The infection rate and antibody titer against *Plasmodium gallinaceum* by means of IFA (Immuno fluorescence Assay), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and Western blot analysis were studied in experimental infected 10-, 20- and 30-day-old broilers. There were 40 chickens in each group which was divided into 4 subgroups, 10 chickens each. Different amount of *P. gallinaceum* infected rbc, 0, 10, 10^3 and 10^6 were injected intravenously into animals. All chickens were examined by thin film Giemsa stained smear every 3 days for 30 days. At the end of experiment, the overall infection rate was 66.67%, all *P. gallinaceum* infected chickens in 10- and 20-day-old groups showed high infection rate 100%. Ten-day-old chickens infected with 10^6 infected rbc had shortest prepatent period, 3 days after infection, which suggested their highest sensitivity toward *P. gallinaceum* infection. They also showed highest parasitemia on the 12th day after infection with highest mortality rate at 90%. Parasite was not found in all 30-day-old chicken groups throughout the experiment.

Antibody against *P. gallinaceum* of all chicken sera were detected by IFA and ELISA showing different level of positive result, 100 and 56.67% respectively. Antibody detection by IFA gave a good satisfactory result. Experimental infected 10- and 20-day-old chickens infected with 10, 10^3 and 10^6 infected rbc gave 100% positive result, 10-day-old with 10^3 infected rbc had highest sensitivity, the antibody titre could be detected on the 3rd day of infection and throughout the experiment at 1/15625. Antibody detection by ELISA, 10-day-old chickens infected with 10, 10^3 and 10^6 infected rbc gave positive results at 70 and 100% on days 12th and 15th after infection respectively (mean OD 0.308-0.410). In 20-day-old chicken groups infected with 10 infected rbc had less positive rate than the groups infected with 10^3 and 10^6 infected rbc. In 30-day-old infected chickens gave a poor positive result and highly fluctuated. Almost all chickens in the control groups showed negative result. Sixty seven sera of chicken from the *P. gallinaceum* endemic area were tested with IFA and ELISA showing 94.03 and 55.02% positive result respectively. In comparison with thin film stained smear, the results revealed that IFA showed sensitivity and specificity at 56.45% and 100% whereas 78.37% and 83.33% for ELISA testing.

The crude protein of *P. gallinaceum* was separated by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis. The protein profiles which highly reacted with the *P. gallinaceum* sera had molecular weight at 186, 169.8, 106.6, 101.1, 78.5, 74.1, 57.2, 53.7, 48.7, 46.7, 41, 37.7, 31.7, 21.3 and 20 kDa. Compared to protein profiles interacted with non-immune sera and chicken sera with different infection, the protein bands from *P. gallinaceum* origin which specific to those antibody in *P. gallinaceum* infected sera would be 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 and 37.7 kDa.

Department	Pathology	Student's signature.....
Field of study	Pathobiology	Advisor's signature.....
Academic year	2002	Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถของ รศ. สพ.ญ. ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อ. ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้แนวความคิด ให้คำแนะนำ ตลอดจนชี้แนะแนวทางและแก้ไขข้อบกพร่องจนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ. ดร. มานพ ม่วงใหญ่ และ ผศ. ดร. สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา ที่ได้ให้ความรู้ทางวิชาการในสาขาวิชาปรสิตวิทยา รวมทั้งให้ข้อคิดและกำลังใจตลอดการเรียนในหลักสูตรปริญญาโทระดับบัณฑิต ขอขอบคุณบุคลากรและเจ้าหน้าที่หน่วยปรสิตวิทยา คุณทุเรียน แก้วทอง และคุณวินัย จันทร์หอม สำหรับความช่วยเหลือในห้องสัตว์ทดลองตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณ รศ.ดร. นิคม ชัยศิริ และเจ้าหน้าที่หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ.พารณ ดีคำ้อย ภาควิชาหอนอนพยาธิวิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือในการฝึกฝนทักษะการปฏิบัติงาน เพื่อให้เกิดความชำนาญด้านอิมมูโนวิทยา

ขอขอบคุณ รศ. น.สพ. ดร. จิโรจน์ ศศิปรีย์จันทร์ สำหรับความอนุเคราะห์สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณ ผศ. อัจฉรา ธวัชสิน สำหรับคำแนะนำการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ดำเนิน เสาะสีบงาม สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ การเลี้ยงไก่และการศึกษาการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มไก่ในเขตจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ได้อนุญาตให้เข้าไปทำการเจาะเลือดไก่ภายในฟาร์มสำหรับนำมาใช้ในการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยโรคมาลาเรียไก่และโรคปรสิตเขตร้อนในประเทศไทย หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและจากทบวงมหาวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ช่วยสนับสนุนทางการเงินและเป็นแรงใจจนประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณพี่และน้องที่เป็นกำลังใจตลอดมา

พัชรี ทรงประโคน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
การจัดลำดับขั้นของเชื้อมาลาเรียไก่.....	3
รูปร่างลักษณะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรียของสัตว์ปีก.....	4
วงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ไก่.....	5
การติดต่อ การระบาด และการกระจายทางภูมิศาสตร์.....	7
อาการทางคลินิก.....	8
พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ.....	9
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน.....	10
การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย.....	11
การตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยตรง.....	11
การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....	11
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย.....	12
การทดสอบทางซีรัมวิทยาเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย.....	12
การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย ด้วยวิธี IFA.....	13
การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี ELISA.....	14
การตรวจทางซีรัมวิทยาของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Western blot analysis.....	16
โรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	23
การเตรียมเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และการประเมินจำนวน เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในเลือด.....	24
การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>	26
การเตรียมซีรัม.....	28
การทดลองฉีดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณต่างๆในไก่เนื้อ เพื่อศึกษาภาวะการติดเชื้อ อัตราการตาย ภาวะโลหิตจาง และการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ.....	29
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี IFA.....	30
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA.....	32
การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ที่มีความจำเพาะ ต่อแอนติบอดีจากซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี Western blot analysis.....	34
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	37
อัตราการติดเชื้อและอัตราการตาย.....	37
อัตราการติดเชื้อ.....	37
อัตราการตาย.....	38
ระดับเชื้อในกระแสเลือดและภาวะโลหิตจาง.....	40
ระดับเชื้อในกระแสเลือด.....	40
ภาวะโลหิตจาง.....	43
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี IFA.....	46
การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera.....	46
การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC.....	47
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่ทดลอง.....	48
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่จากภาคสนาม.....	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่ที่ติดเชื้ออื่นๆ.....	50
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA.....	51
การเตรียมแอนติเจน.....	51
การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude <i>Pg</i> antigen.....	55
การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera.....	56
การทดสอบหาค่า cut off ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA.....	57
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมไก่ทดลอง.....	57
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมไก่จากภาคสนาม.....	63
การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมไก่ที่ติดเชื้ออื่นๆ.....	64
การเปรียบเทียบผลของการตรวจหาเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> จากเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์และการทดสอบหาระดับ แอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี IFA กับวิธี ELISA.....	64
การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ที่มีความจำเพาะ ต่อแอนติบอดีจากซีรัมไก่ติดเชื้อด้วยวิธี Western blot analysis.....	67
การแยกโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE.....	67
การทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis.....	68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง วิจัยาณณ์และข้อเสนอแนะ.....	71
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	118

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ <i>P. gallinaceum</i>	6
3.1 แสดงตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดของตาราง hemocytometer	25
3.2 ภาพแสดงการแบ่งตารางบนสไลด์ เพื่อใช้ในการทดสอบ IFA.....	31
4.1 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	38
4.2 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	39
4.3 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	39
4.4 ค่าเฉลี่ยระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อ ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	40
4.5 ค่าเฉลี่ยระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อ ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	41
4.6 ความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10, 20 และ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>	42
4.7 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	44
4.8 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	45
4.9 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	45
4.10 ผลบวกต่อการติดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในการทดสอบด้วยวิธี IFA จากการเรืองแสงของเชื้อระยะต่างๆที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงบนสไลด์แอนติเจน.....	46
4.11 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera แสดงถึง end point ของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ.....	47
4.12 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
4.13 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	49
4.14 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	50
4.15 การแยกเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ออกจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี Ficoll-paque discontinuous gradients	52
4.16 แสดงเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> infected rbc ที่ทำฟิล์มบางและย้อมด้วยสี ยิมซ่า 10% จากตะกอนเม็ดเลือดที่แยกได้ด้วยการปั่นวิธี ficoll-paque discontinuous gradients.....	53
4.17 ฟิล์มเลือดบางย้อมสียิมซ่า 10%	54
4.18 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการหา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude <i>Pg</i> antigen.....	55
4.19 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการหา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera.....	56
4.20 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อประเมินค่า cut off ของการทดลอง	57
4.21 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อ ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	59
4.22 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อ ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	59
4.23 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	60
4.24 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 10 วัน ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
4.25 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	61
4.26 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	61
4.27 ร้อยละของซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อ (PI) และไม่ติดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> (NI) ที่ให้ผลบวกต่อ crude <i>Pg</i> antigen ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA.....	62
4.28 แสดงการกระจายของผลการตรวจหาเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> จากไก่ภาคสนาม 2 ฟาร์ม จำนวน 67 ตัวอย่าง.....	63
4.29 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ <i>E. tenella</i> Newcastle และ <i>L. sabrazesi</i> จำนวน 32 ตัวอย่าง.....	64
4.30 แถบโปรตีนของ crude <i>Pg</i> antigen และเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ ทำการแยกโดยวิธี SDS-PAGE.....	67
4.31 แถบโปรตีนแอนติเจนของ crude <i>Pg</i> antigen ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบกับซีรัมไก่ ด้วยวิธี Western blot.....	69
4.32 ไดอะแกรมแสดงแถบโปรตีนแอนติเจนของ crude <i>Pg</i> antigen ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบกับซีรัมไก่ด้วยวิธี Western blot.....	69
ผ1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ₁₀ น้ำหนักโมเลกุลและระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อน.....	114

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 ร้อยละของการติดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในไก่เนื้อ กลุ่มอายุ 10, 20 และ 30 ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc24	
4.2 ร้อยละของไก่เนื้อที่มีภาวะโลหิตจาง (ค่า PCV ต่ำกว่า 24%) ในกลุ่มอายุ 10, 20 และ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ปริมาณ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc32	
4.3 การเปรียบเทียบผลของการตรวจหาเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> จากฟิล์มเลือดบางด้วยกล้อง จุลทรรศน์และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี IFA กับวิธี ELISA..... 66	
4.4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และ เม็ดเลือดแดงปกติของไก่ที่ทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และด้วยวิธี Western blot analysis ที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีในซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ.....70	

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ผ1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	87
ผ2 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	88
ผ3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc.....	89
ผ4 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 infected rbc	90
ผ5 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 ³ infected rbc	91
ผ6 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 ⁶ infected rbc	92
ผ7 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	93
ผ8 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	94
ผ9 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10 ³ และ 10 ⁶ infected rbc	95
ผ10 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน ไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	96

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

หน้า

ผ11	แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) . ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 infected rbc	97
ผ12	แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc	98
ผ13	แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc	99
ผ14	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc	100
ผ15	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc	101
ผ16	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc	102
ผ17	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน ในไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ.....	103
ผ18	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 เซลล์ infected rbc	104
ผ19	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc	105
ผ20	แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc	106
ผ21	ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude <i>Pg</i> antigen.....	107
ผ22	ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera.....	107
ผ23	ค่าเฉลี่ย OD ของ Non-infected sera (NI).....	107
ผ24	ค่าเฉลี่ย OD ของ <i>Pg</i> immune sera (PI).....	108
ผ25	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน.....	114

คำย่อ

คำย่อ

คำเต็ม

ABTS	: 2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid-6) Ammonium salt
ANA	: Antinuclear antibody
BSA	: Bovine serum albumin
DPI	: Day post infection
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	: Fluorescein-conjugated rabbit affinity purified antibody to chicken IgG
H ₂ O ₂	: Hydrogen peroxide
IFA	: Immunofluorescence assay
irbc	: infected red blood cells
kDa	: Kilodalton
NI	: Non-infected sera
nm	: นาโนเมตร
OD	: Optical density
PBS	: Phosphate buffer saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PCV	: Packed cell volume
PI	: <i>Pg</i> immune sera
<i>Pg</i>	: <i>Plasmodium gallinaceum</i>
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
SSUrRNA	: Small subunit ribosomal RNA
UI	: ไมโครลิตร
UV	: แสงอัลตราไวโอเล็ต

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มาลาเรียในสัตว์ปีก (Avian malaria) เกิดจากเชื้อโปรโตซัว สกุล พลาสโมเดียม (*Plasmodium*) หลายชนิด เช่น *P. circumflexum*, *P. durae*, *P. cathemerium* ซึ่งก่อโรคในนก (Garnham, 1966) *P. gallinaceum* และ *P. juxtannucleare* ก่อโรคในไก่ โดยมียุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงเสื่อ (*Mansonia* spp.) ยุงป่า (*Armigeres* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำโรค (Huff, 1965 ; Levine, 1985 ; Soulsby, 1982)

ในประเทศไทยโรคมาลาเรียในไก่มีสาเหตุเกิดจาก *P. gallinaceum* (ทัศนีย์และคณะ, 2538 ; ทวีและคณะ, 2543) โดยเกิดการระบาดขึ้นครั้งแรกในไก่เนื้อที่เลี้ยงบนเล้าลอยในเขตชานเมืองกรุงเทพฯ และจังหวัดนครนายก และต่อมาได้มีการระบาดอย่างแพร่หลายและต่อเนื่องทุกปีจนถึงปัจจุบัน ทำให้เกิดความเสียหายและเป็นปัญหาด้านเศรษฐกิจทั้งในไก่เนื้อและไก่ไข่ที่เลี้ยงแบบครัวเรือนและแบบอุตสาหกรรม (ชัยศิริ, 2542 ; มานพ, 2540) ไก่ที่เลี้ยงในบริเวณที่มีน้ำขังหรือการเลี้ยงบนเล้าลอยมีโอกาสได้รับเชื้อจากยุงได้ง่าย (ชัยศิริ และคณะ, 2539) สำหรับไก่ติดเชื้อมีอาการรุนแรงมักพบมีอุจจาระสีเขียว ซึม เบื่ออาหาร โลหิตจาง และตายในที่สุด ไก่เนื้อมีอัตราการป่วยสูงร้อยละ 24.19 และอัตราการตายสูงร้อยละ 19.22 (ทัศนีย์ และคณะ, 2538) ไก่ไข่มีอัตราการไข่ลดลงร้อยละ 10-30 และอัตราการตายร้อยละ 20 (ปิยนุช, 2541)

หลังจากมีการระบาดครั้งแรกเป็นต้นมา ได้มีผู้ศึกษาวิจัยด้านต่างๆเกี่ยวกับโรคมาลาเรียในไก่ทั้งในภาคสนามและในห้องทดลอง โดยเฉพาะทางด้านการติดเชื้อ การก่อโรค การเฝ้าระวังโรค การควบคุม การรักษา การตรวจวินิจฉัย และอื่นๆ เป็นต้น ในด้านการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียในทางห้องปฏิบัติการนั้น ปัจจุบันยังคงนิยมใช้เทคนิคการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบางย้อมสี และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1900 จนถึงปัจจุบัน การตรวจต้องอาศัยความรู้ความชำนาญสูง ตรวจได้เพียงครั้งละ 1 ตัวอย่าง ใช้เวลาในการตรวจต่อตัวอย่างค่อนข้างนาน และบางครั้งโดยเฉพาะในกรณีที่มีปริมาณเชื้อในกระแสเลือดต่ำ อาจให้ผลที่คลาดเคลื่อนได้ (Makler *et al.*, 1998) นอกจากนี้การตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสีนั้น อาจไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่าเชื้อที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเป็นเชื้อ *พลาสโมเดียม* ชนิดใด เนื่องจากเชื้อ *พลาสโมเดียม* ที่ก่อโรคมาลาเรียในไก่มีมากกว่า 1 ชนิดที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน (Garnham, 1966 ; Levine, 1985 ; Van Riper *et al.*, 1994 ; Laird, 1998) และแม้ว่าได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับตรวจสอบสารพันธุกรรมของยีนที่มีรหัสในการสร้าง small subunit

ribosomal RNA (SSUrRNA) ที่มีความจำเพาะและมีความไวสูงต่อเชื้อมาลาเรียในไก่ได้เป็นผลสำเร็จแล้วก็ตาม (ทวี, 2542 ; สุวรรณิ และคณะ, 2543) แต่เนื่องจากการตรวจด้วยเทคนิค PCR มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้ในขณะที่มีเชื้อปรากฏอยู่ในกระแสเลือดของไก่ป่วยเท่านั้น จึงอาจไม่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยเพื่อการศึกษาระบาดวิทยาของโรคมาลาเรีย

การวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาและซีรั่มวิทยา น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการวินิจฉัยโรคมาลาเรียในไก่เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจการติดเชื้อได้แม้ว่าเชื้อจะไม่ปรากฏอยู่ในกระแสเลือดก็ตาม (Voller *et al.*, 1974 ; Voller *et al.*, 1975) การแปลผลทำได้รวดเร็วและเสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษา จึงเป็นเหตุผลที่มุ่งใจที่จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ

P. gallinaceum โดยวิธี immunofluorescence assay (IFA) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียในไก่ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะของเทคนิค IFA และ ELISA ในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum*
2. เพื่อศึกษาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน
3. ศึกษาโปรตีนที่จำเพาะของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี Western blot analysis

สมมุติฐานของการวิจัย

1. IFA และ ELISA เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง มีความเหมาะสมในการใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่
2. ไก่ที่มีอายุต่างกันมีระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* แตกต่างกัน
3. มวลโมเลกุลของโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี Western blot analysis

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาเทคนิค IFA และ ELISA ที่ใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ได้เป็นผลสำเร็จ
2. ทราบถึงระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่มีอายุต่างกัน
3. ทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดลำดับชั้นของเชื้อมาลาเรียไก่

เชื้อมาลาเรียซึ่งก่อโรคในคนและสัตว์เป็นโปรโตซัวหรือสัตว์เซลล์เดียว จัดอยู่ในสกุล พลาสโมเดียม (*Plasmodium*) การจำแนกเชื้อสามารถทำได้โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อ จากฟิล์มเลือดบางย้อมสี Rowmanosky (Garnham, 1966) และปัจจุบันได้เริ่มมีการจำแนกตาม ลักษณะทางพันธุกรรมแต่ยังไม่สมบูรณ์ การจัดลำดับชั้นตามลักษณะรูปร่างของเชื้อ (Levine, 1985) มีดังนี้

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

Subclass Coccidia

Order Eucoccidiida

Suborder Haemosporina

Family Plasmodiidae

Genus *Plasmodium*

(Subgenus *Haemamoeba*)

P. gallinaceum

การศึกษาเชื้อมาลาเรียจากชนิดของโฮสต์แท้ ขนาดและรูปร่างลักษณะของเชื้อระยะ schizont ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง จำนวนของ merozoites ที่อยู่ภายใน schizonts รูปร่างของเชื้อระยะ gametocytes ตำแหน่งและอัตราการเจริญของเชื้อระยะ exoerythrocytic schizonts ได้มีการ จำแนกเชื้อสกุล พลาสโมเดียม ออกเป็น 9 subgenera แต่ที่มีรายงานในสัตว์ปีกทั้งหมดมีเพียง 4 subgenera คือ *Haemamoeba*, *Huffia*, *Giovannolaia* และ *Novyalla* รวมทั้งสิ้น 32 ชนิด (species) โดยที่ *P. gallinaceum* ถูกจัดอยู่ใน subgenus *Haemamoeba* (Garnham, 1966 ; Levine, 1985 ; Van Riper *et al.*, 1994 ; Laird, 1998)

รูปร่างลักษณะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรียของสัตว์ปีก

โดยทั่วไปเชื้อ พลาสโมเดียม ทุกชนิดเป็นปรสิตที่เจริญเติบโตอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ทั้งในโฮสต์แท้และยุงที่เป็นพาหะ การเจริญเติบโตในโฮสต์แท้ทั้งในคนและสัตว์มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แบ่งออกเป็น 2 ระยะกว้างๆ คือ ระยะที่อยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดง (Exo-erythrocytic stage) และระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytic stage) มีเพียงรายละเอียดบางประการเท่านั้นที่แตกต่างกัน

เชื้อ พลาสโมเดียม มีลักษณะที่สำคัญของพลาซึม Apicomplexa คือ apical complex ซึ่งประกอบด้วย polar ring, rhoptries, micronemes, subpellicular microtubules และ conoid อยู่ในด้านหน้าสุดของเชื้อระยะต่างๆ และลักษณะเด่นของเชื้อในสกุลนี้ คือ ขณะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงเชื้อจะมีขบวนการเปลี่ยนแปลงฮีโมโกลบินเป็น hemozoin และ hemozoin หรือที่มักเรียกว่าเม็ดสีของมาลาเรีย (malarial pigment) และเชื้อระยะมีเพศ (gametocytes) เป็นปรสิตอยู่ในเม็ดเลือดแดงเท่านั้น (Van Riper *et al.*, 1994)

รูปร่างลักษณะเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่พบในไก่มี 2 แบบ คือ ในระยะแรกเชื้ออยู่ในไซโตพลาสซึมของแมคโครฟาจและไฟโบรบลาสต์ที่บริเวณผิวหนังเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบไม่มีเพศ schizonts มีขนาดเล็กมาก และพบได้ยาก การศึกษารายละเอียดมีค่อนข้างน้อย (Garnham, 1966) เชื้อที่อยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะที่สอง อยู่ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelial cells) ของอวัยวะภายในทั่วร่างกาย เช่น ตับ ม้าม สมอง เป็นต้น เจริญเติบโตแบบไม่มีเพศ schizonts มีขนาดใหญ่ สังเกตพบได้จากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

เชื้อระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง การเจริญเติบโตเป็นแบบไม่มีเพศและแบบมีเพศอยู่ในไซโตพลาสซึม โดยเชื้อที่ไม่มีเพศมี 2 แบบ คือ trophozoite และ schizonts สำหรับ trophozoite ระยะแรก มีขนาดเล็ก 1 ไมครอน รูปร่างรี ตรงกลางมีลักษณะทึบ ไม่มีส่วนของวงแหวน มักพบอยู่ที่ส่วนหัว ท้าย หรือด้านข้างนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง (Garnham, 1966 ; Laird, 1998) เมื่อเจริญเติบโตมากขึ้นมีรูปร่างไม่แน่นอน (amoeboid form) และมีเม็ดสีของมาลาเรียเกิดขึ้น ส่วน schizont เกิดจากการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของ trophozoite ซึ่งเมื่อโตเต็มที่อาจมีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน ขนาดประมาณ 8 ไมครอน ลักษณะทั่วไปประกอบด้วย 16-20 merozoites (Garnham, 1966) สูงสุดไม่เกิน 32 merozoites (Laird, 1998) และมีเม็ดสีรวมตัวเป็นกระจุก สำหรับเชื้อระยะที่มีเพศ (gametocyte) มีลักษณะเด่น คือ รูปร่างกลม รี หรือบางครั้งเว้าๆแหว่งๆ ขนาด 8-9 ไมครอน อยู่ชิดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ บางครั้งอาจไปเบียดนิวเคลียสให้ผิดตำแหน่งไปจากปกติ เชื้อเพศผู้ (microgametocyte) ไซโตพลาสซึมมีลักษณะการติดสีจาง นิวเคลียสไม่ชัดเจนติดสีชมพู เม็ดสีของมาลาเรียติดสีน้ำตาลเข้มมีหลายขนาดกระจายอยู่ทั่ว เชื้อ

เพศเมีย (macrogametocyte) ไชโตพลาสซึมติดสีฟ้าเทาเข้ม และเม็ดสีที่กระจายอยู่มีขนาดใกล้เคียงกัน

วงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่

โดยทั่วไปวงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกคล้ายคลึงกับที่พบในคน และสัตว์อื่น กล่าวคือ ต้องการโฮสต์ 2 ชนิด ได้แก่ โฮสต์ซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยุงซึ่งเป็นโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง สำหรับวงชีวิตของ *P. gallinaceum* นั้น มีข้อแตกต่างจากเชื้อที่พบในสัตว์ปีกอื่นน้อยมาก

ก. การเจริญเติบโตของ *P. gallinaceum* ในไก่

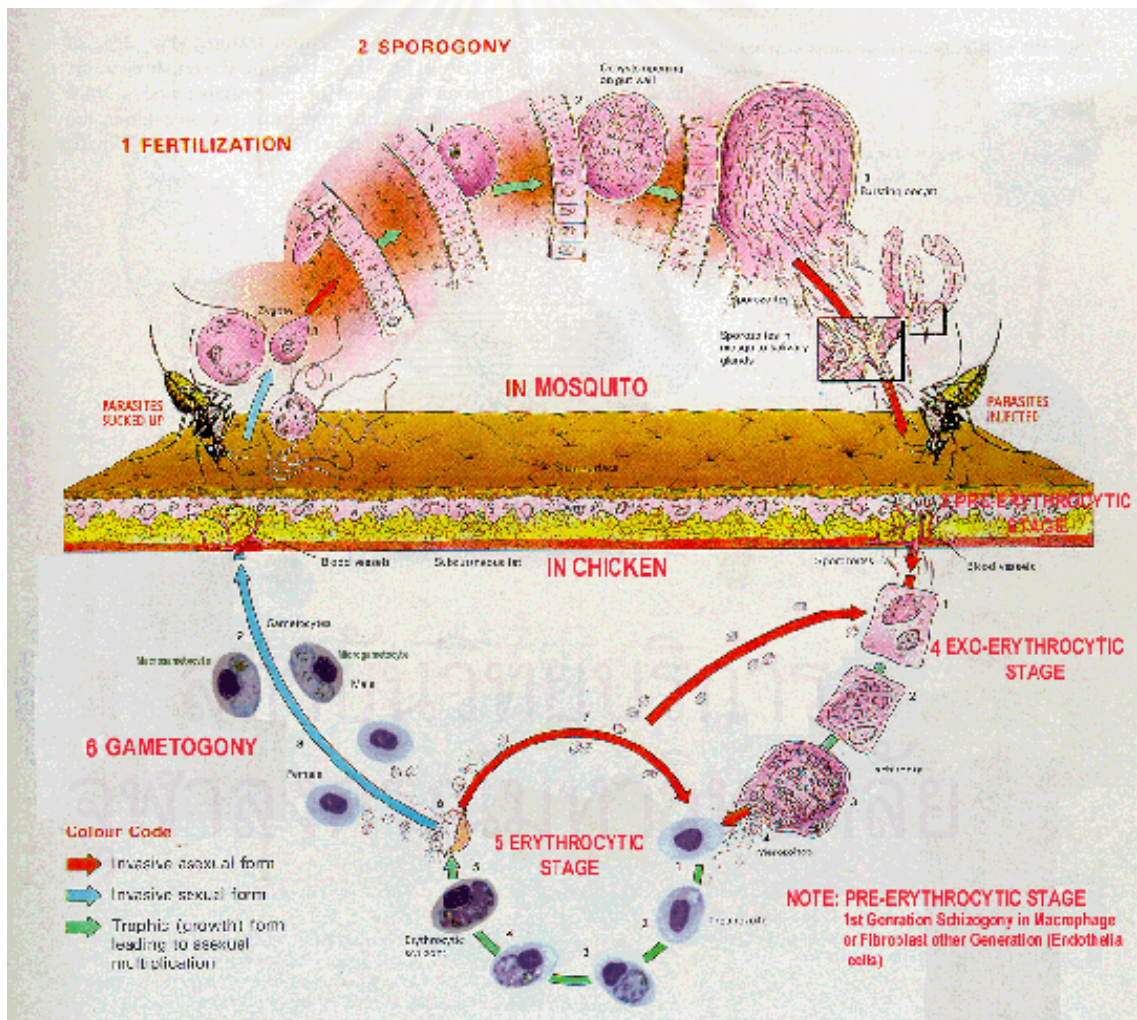
วงชีวิตของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ (รูปที่ 2.1) เชื้อมีการพัฒนาเป็น 3 ระยะ คือ ระยะแรกมีการเจริญเติบโตอยู่ที่ผิวหนังหรือที่เรียกว่า Primary exoerythrocytic stage ระยะที่สองมีการเจริญเติบโตอยู่นอกเม็ดเลือดแดง (Exoerythrocytic stage) และระยะที่สามมีการเจริญเติบโตอยู่ในเม็ดเลือดแดง (Erythrocytic stage) สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อในยุงที่เป็นพาหะมีการเจริญเติบโตเพียงระยะเดียว คือ Sporogony (Garnham, 1966 ; McGhee, 1988)

เริ่มจากยุงปล่อยเชื้อระยะ sporozoites ที่ปนมากับน้ำลายในขณะที่ดูดเลือดไก่ เชื้อจะเข้าไปเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศอยู่ในไซโตพลาสซึมของแมคโครฟาจและไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังในบริเวณที่ยุงกัดและดูดเลือดจำนวน 2 รอบ โดยครั้งแรกจะเจริญและแบ่งตัวเป็นระยะ cryptozoites ซึ่งประกอบด้วย 100-200 merozoites ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และการเจริญครั้งที่ 2 เป็นระยะ metacryptozoites ที่สามารถแบ่งตัวได้ merozoites เพิ่มขึ้นจำนวนมากกว่าเดิมหลายเท่าตัว ภายในเวลา 36-40 ชั่วโมง เมื่อแตกออก merozoites จะกระจายไปทั่วและเข้าไปอยู่ใน endothelial cells ของเส้นเลือดที่ตับ ม้ามและสมอง เจริญเติบโตเป็นระยะ schizonts และแตกออกขณะเจริญได้เต็มที่ จากนั้นเชื้อระยะ merozoites จะกระจายเข้าสู่กระแสเลือด ไปเจริญเติบโตอยู่ในเม็ดเลือดแดงต่อไป ด้วยระยะฟักตัวเพียง 72-75 ชั่วโมงก็สามารถตรวจพบเชื้อในเม็ดเลือดแดง

หลังจากเชื้อเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงก็จะเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศ และพัฒนาเป็นขั้นตอนจาก trophozoites เป็น schizonts มีรูปร่างลักษณะตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อ schizonts เจริญเติบโตเต็มที่และ merozoites แตกออก บางส่วนจะกลับเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ทุกวัน และเจริญเติบโตเป็น schizonts ได้อีก โดยใช้เวลาในการพัฒนาเพียง 36 ชั่วโมงต่อรอบของการเจริญเติบโต สำหรับบางส่วนของเชื้อที่ออกมาจากเม็ดเลือดแดงจะเข้าไปเจริญอยู่ใน endothelial cells ของเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะภายใน และมีอีกส่วนหนึ่งที่จะเจริญไปเป็นระยะที่มีเพศในเม็ดเลือดแดง โดยเชื้อเพศผู้ และเชื้อเพศเมียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจะมีการพัฒนาขั้นต่อไปได้ เมื่อเชื้อเข้าไปผสมพันธุ์กันในยุงที่เป็นพาหะของเชื้อเท่านั้น (Garnham, 1966)

ข. การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. gallinaceum* ในยุง

เมื่อมียุงมาดูดเลือดไก่ที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะ gametocytes เชื้อจะเข้าไปอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของยุง microgametocyte 1 เซลล์จะแบ่งตัวเป็น microgamete 6-8 เซลล์ ที่มีลักษณะเรียวยาว ในเวลาเพียง 10-15 นาที ส่วน macrogametocyte จะเจริญเป็น macrogamete จากนั้น microgamete จะเข้าไปผสมกับ macrogamete กลายเป็น zygote ซึ่งพัฒนาต่อไปเป็น ookinete ซึ่งสามารถไชทะลุผนังกระเพาะอาหารของยุงไปเจริญเป็น oocyst อยู่ที่ด้านนอกของกระเพาะยุง oocyst จะเจริญและแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศให้ sporozoite จำนวนมาก เมื่อ oocyst เจริญเติบโตเต็มที่ จะแตกและปล่อย sporozoites ออกมากระจายอยู่ทั่วตัวยุง โดย sporozoites ส่วนใหญ่มักรวมตัวอยู่ที่ต่อมน้ำลายของยุง เมื่อยุงไปดูดเลือดไก่จะปล่อยให้เชื้อระยะ sporozoites เข้าสู่ไก่ทำให้ไก่ได้รับเชื้อและมีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียต่อไป (Soulsby, 1982)



รูปที่ 2.1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* (ระยะที่อยู่ในโฮสต์มีกระดูกสันหลังดัดแปลง จาก Knell, 1991 โดย ทวี, 2543)

การติดต่อ การระบาด และการกระจายทางภูมิศาสตร์

จากการทดลองของหลายรายงานพบว่ายุงที่เป็นพาหะนำที่สำคัญของโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก มีหลายชนิด ได้แก่ ยุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงเสื่อ (*Mansonia* spp.) ยุงป่า (*Armigeres* spp.) และ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) (Huff, 1965 ; Soulsby, 1982 ; Levine, 1985) สำหรับยุงที่มักพบว่าเป็นพาหะตามธรรมชาติ คือ ยุง *Culex* และ *Aedes* (Smyth, 1994 ; Springer, 1997) เชื้อระยะ oocyst ที่เจริญอยู่ในยุงไม่มีผลกระทบต่ออาการชีวิต ยุงสามารถดูดเลือดที่ติดเชื้อได้อีกโดยไม่ก่อโรค เว้นแต่ถ้ามี oocyst เจริญมากเกินไป และยุงอาจจะมิแหล่งอาหารที่จำเป็นไม่เพียงพอเท่านั้น

การติดเชื้อมาตามธรรมชาติเริ่มจากเชื้อระยะ sporozoites ซึ่งเป็นระยะติดต่อ ถูกยุงปล่อยออกมาพร้อมกับน้ำลายในขณะดูดเลือด เข้าไปเจริญเติบโตในตัวโฮสต์ โดยจะไปเจริญอยู่นอกเม็ดเลือดแดง ในเซลล์แมคโครฟาจหรือไฟโบรบลาสต์บริเวณผิวหนังที่ถูกยุงกัด ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของอวัยวะภายในต่างๆทั่วร่างกาย และในเซลล์เม็ดเลือดแดง ตามลำดับ ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้ว ระยะเวลาของการฟักตัวขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ปริมาณเชื้อที่ได้รับ วิธีที่ได้รับเชื้อ และชนิดของสัตว์ปีก ซึ่งโดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 6-16 วันหลังได้รับเชื้อ จึงสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ (Smyth, 1994)

การกระจายของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกพบได้ทั่วโลก ทั้งในทวีปเอเชีย ออฟริกา อเมริกาใต้ และอเมริกาเหนือ ความชุกของเชื้อในสัตว์ปีกตามแหล่งต่างๆ เช่น ในภาคพื้นเอเชียตอนใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าเชื้อมีความชุกสูง 1-4% ในอเมริกาเหนือบริเวณที่มีความชุกสูงคือทางตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐ และบริเวณที่มีความชุกต่ำคือตอนเหนือและตอนกลางของแคนาดา ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการกระจายของยุง *Culex* ซึ่งเป็นพาหะนำที่เหมาะสม และโฮสต์ที่เป็นสัตว์ปีกซึ่งเป็นตัวกักเชื้อ โดยมีความแตกต่างกันตามสภาพทางภูมิศาสตร์ ในแหล่งที่อบอุ่นและความชื้นสูงมักมีความชุกสูงกว่าแหล่งที่หนาวจัด ความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และยุงพาหะเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก ในฤดูกาลที่อบอุ่นและความชื้นสูงมักมียุงพาหะจำนวนมาก พบว่าเชื้อมีความชุกสูง แต่ในช่วงที่ยุงพาหะมีจำนวนน้อยความชุกของเชื้อก็จะน้อยลงเป็นสัดส่วนกัน

จนถึงปัจจุบันได้มีการตรวจพบเชื้อ *พลาสโมเดียม* จำนวน 35 ชนิด ในสัตว์ปีก 1,000 กว่าชนิด รวม 3 ลำดับ (order) คือ Anseriformes, Passeriformes และ Columbiformes (Springer, 1997) เชื้อบางชนิดไม่ก่อโรคหรือก่อโรคน้อยมาก มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถก่อโรครุนแรงในนก เป็ด และไก่ เช่น *P. relictum*, *P. cathemerium*, *P. elongatum*, *P. circumflexum*, *P. juxtannucleare* และชนิดที่ก่อโรครุนแรงที่สุดในไก่เลี้ยง คือ *P. gallinaceum* (Smyth, 1994) สำหรับโฮสต์แท้ตามธรรมชาติของเชื้อนี้ คือ ไก่ป่า (Garnham, 1966 ; Springer, 1997)

Garnham (1966) รายงานว่า เชื้อ *P. gallinaceum* มีเพียง strain เดียว คือ Brumpt's strain แม้ว่าเคยมีบางรายงานว่าเชื้อนี้อาจจะมีมากกว่า 1 strain แต่ผลจากการทดลองต่างๆ พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และ ชีวนิสัย (behavior) ไม่แตกต่างกัน แม้จะชักนำให้ กลายพันธุ์ก็ตาม นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้อยู่ในภาวะที่ผิดปกติได้ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ของลักษณะรูปร่าง เชื้อระยะมีเพศ เม็ดสีของมาลาเรีย erythrocytic schizont และ phanerozoite เป็นต้น

อาการทางคลินิก

ในแหล่งที่มีการระบาดของ เชื้อ *P. gallinaceum* อาการของไก่มีความผันแปรสูง ตั้งแต่ไม่ แสดงอาการ แสดงอาการเล็กน้อยและเรื้อรังมีอัตราการตายต่ำ จนถึงแสดงอาการเฉียบพลัน รุนแรง และมีอัตราการตายสูง ในไก่ที่แสดงอาการของโรคอย่างเฉียบพลัน มักจะนอนจมอยู่บริเวณมุมใด มุมหนึ่งของเล้า หน้าและหงอนในระยะแรกจะมีเลือดคั่งแดง และต่อมาหงอนจะมีลักษณะซีด ท้องเสีย อาจมีสีเขียวเข้ม และเบื่ออาหาร ไก่ป่วยอาจจะตายภายใน 1 สัปดาห์ในขณะที่มีเชื้อปรากฏ อยู่ในกระแสเลือดสูง อุณหภูมิร่างกายไม่แน่นอน ไก่ป่วยมีอาการผอมแห้งขึ้นเรื่อยๆเมื่อโรครุนแรง ขึ้น มีภาวะเลือดจาง ม้ามและตับมีขนาดใหญ่ ถ้าไก่เป็นอัมพาตจะตายในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เนื่องจากเชื้อระยะ exoerythrocytic ที่อยู่ในเซลล์เยื่อบุเส้นเลือดฝอยที่สมองถูกดูดตัน (Garnham, 1966)

ไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* มีอัตราการตายแตกต่างกันตามขนาดและอายุ ลูกไก่ขนาดเล็ก น้ำหนักต่ำกว่า 250 กรัม อัตราการตายสูง 100% ไก่ที่มีน้ำหนัก 300-350 กรัม อัตราการตาย 87% ในขณะที่ไก่ใหญ่น้ำหนักตัว 1,000 กรัม อัตราการตายเพียง 45% (Garnham, 1966) ไก่อายุน้อยมี อัตราการติดโรคและอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่มีขนาดใหญ่หรือไก่ที่โตเต็มวัย นอกจากนี้ไก่ที่อายุมาก เมื่อมีการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือจากการทดลอง การก่อโรคมักไม่รุนแรง ไม่แสดงอาการป่วยหรือ ตาย ไก่มักมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เชื้อสามารถแฝงตัวอยู่ในระดับต่ำๆได้เป็นเวลานานหลายปี

นอกจากอายุของโฮสต์แล้ว สายพันธุ์ของโฮสต์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความไวของ การติดโรค เชื้อชนิดเดียวกันหรือ strain เดียวกันอาจก่อโรคแตกต่างกันในโฮสต์ที่ต่างกัน ตามปกติ ไก่ป่าซึ่งเป็นโฮสต์ธรรมชาติจะค่อนข้างทนทานต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในขณะที่ไก่เลี้ยงมีความไว สูง มักก่อโรคค่อนข้างรุนแรงโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย พบว่าการระบาดของโรคในไก่เลี้ยงเกิดขึ้นได้ ง่ายและอัตราการตายสูง (Levine, 1985) สัตว์ปีกทุกชนิดที่ได้รับการติดเชื้อระยะต่างๆในเลือดจะมีความไวต่อเชื้อสูงกว่าการติดเชื้อระยะ sporozoits จากถุงขณะที่ดูดเลือด และไก่เพศเมียพบเชื้อใน กระแสเลือดสูงกว่าเพศผู้

พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดจาก *P. gallinaceum* คล้ายคลึงได้กับที่เกิดขึ้นกับมาลาเรียชนิดอื่นๆ ระยะที่ก่อโรคของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ คือ **ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงตามกระแสเลือดทั่วไป และระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดในเซลล์เยื่อบุเส้นเลือดฝอยที่สมอง** ไก่ที่แสดงอาการเฉียบพลัน มีภาวะโลหิตจางเกิดขึ้นเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ซึ่งอาจเป็นผลจากเชื้อมีการแบ่งตัวในเม็ดเลือดแดงรวดเร็ว ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายเมื่อเชื้อแตกออกจากเซลล์โดยตรง หรือเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีเชื้อมีสภาพเปราะบาง แตกง่ายและเร็วกว่าปกติ ซึ่งโดยทั่วไปในสัตว์ปกติการทำลายเม็ดเลือดแดงด้วยกลไกนี้เกิดขึ้นน้อยมาก แต่ในรายที่เป็นโรคมาลาเรียจะพบได้บ่อยและการที่เม็ดเลือดแดงถูกเซลล์เม็ดเลือดขาวทำลายโดยการจับกิน (erythrophagocytosis) ที่มีผลมาจากกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ต่อสิ่งแปลกปลอม และพบได้สูงสุดในม้าม จากการที่เม็ดเลือดแดงจำนวนมากถูกทำลายอย่างรวดเร็วและโฮสต์ไม่สามารถสร้างขึ้นทดแทนได้ทัน ปริมาณเม็ดเลือดแดงลดต่ำลงเหลือน้อยกว่า 1×10^6 ดังนั้นจึงเป็นผลทำให้เกิดภาวะโลหิตจางขึ้นในที่สุด (Garnham, 1966) ความรุนแรงของภาวะโลหิตจางนั้น ขึ้นกับสัดส่วนของจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดง ส่วนมากถ้าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ต่ำกว่า 20% สัตว์ป่วยจะตายได้ (Van Riper *et al.*, 1994 ; Springer, 1997) สำหรับพยาธิกำเนิดของภาวะโลหิตจางที่มีจำนวนเชื้อเพียงเล็กน้อยในเม็ดเลือดแดงยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด

นอกจากนี้การที่เม็ดเลือดแดงจำนวนมากถูกทำลายอย่างต่อเนื่องจะทำให้พลาสมา มีความเป็นกรดมากขึ้นและมีความหนืดสูง เนื่องจากปริมาณโปรตีนในพลาสมาโดยเฉพาะ gammaglobulin, macroglobulin และ fibrin เพิ่มขึ้น การไหลเวียนของเลือดน้อยลง เป็นสาเหตุทำให้เกิด phagocytosis สูงขึ้น และออกซิเจนจับเกาะกับฮีโมโกลบินลดน้อยลง

ซากของไก่ที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมีลักษณะแห้งน้ำ ซีดจาง รอยโรคที่ปรากฏตามอวัยวะภายในต่างๆที่เห็นได้ชัด คือ ส่วนใหญ่จะมีน้ำหรือเลือดคั่ง ตับและม้ามขนาดใหญ่และมีสีเข้มดำ คล้ำเนื่องจากการสะสมของเม็ดสีของมาลาเรียจำนวนมาก ม้ามอาจมีขนาดใหญ่มากขึ้นกว่าเดิมถึง 20 เท่า อาจมีของเหลวคั่งอยู่ในถุงเยื่อหุ้มหัวใจ ไก่ที่รอดชีวิตภายหลังการติดเชื้อพบต่อมน้ำเหลืองมีการคั่งน้ำ ขยายใหญ่ (McGhee, 1988)

ลักษณะทางพยาธิสภาพต่างๆ อวัยวะส่วนใหญ่มี degenerative change เกิดขึ้นซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่สำคัญของโรค พบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและเม็ดสีจำนวนมากอยู่ใน phagocytic cells ของตับและม้าม เม็ดสีของมาลาเรียจำนวนมากพบได้ทั่วไปและมักอยู่รวมกันเป็นกระจุกใหญ่ ตับมี centrilobular necrosis เกิดขึ้นเนื่องจากการอุดตันของ central vein และระยะปลายจะพบเซลล์ตับขยายขนาด มี vacuole และ fatty change เกิดขึ้น เซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก กระจายอยู่ทั่วไป ต่อมน้ำเหลืองมีเซลล์แมโครฟาจจำนวนมาก และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ

พบเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ exoerythrocytic schizont กระจายอยู่ทั่วไป แต่จะพบมากที่ม้าม และตับ สำหรับไก่ที่ก่อนตายมีอาการเป็นอัมพาตเฉียบพลัน สมองจะมีลักษณะบวม เลือดคั่ง มีจุดเลือดออกเล็กๆ และหลอดเลือดฝอยส่วนใหญ่ถูกอุดด้วย exoerythrocytic schizonts และอาจจะมีเนื้อตายเกิดขึ้น (McGhee, 1988 ; Van Riper et al., 1994 ; Springer, 1997)

ค่า Blood Urea Nitrogen เพิ่มขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากไตมีการอักเสบ ส่วนการเปลี่ยนแปลงอื่นๆทางพยาธิคลินิกไม่เด่นชัด

ไก่ที่ติดเชื้อ ระดับเชื้อในกระแสเลือดและอาการจะผันแปรตามอายุของสัตว์ โดยทั่วไปใช้เวลา 9 วัน ก็ปรากฏเชื้อขึ้นสูง และสัตว์แสดงอาการของโรค ในระยะที่มีรุนแรง ระดับเชื้อขึ้นสูงอยู่ประมาณ 10 สัปดาห์ จากนั้นเชื้อจะลดต่ำลงเรื่อยๆ สลับกับการพบเชื้อมากบ้างน้อยบ้าง แต่จะไม่เคยหมดไปอย่างสิ้นเชิง ไก่ที่มีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ และไก่ที่โตเต็มที่ปกติจะมีความต้านทานต่อเชื้อสูง การติดเชื้อไม่รุนแรง มักไม่ตาย มีชีวิตรอดได้ทั้งการได้รับเชื้อตามธรรมชาติและในห้องทดลอง และมีชีวิตอยู่ได้นานหลายปี (Garnham, 1966)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกมีค่อนข้างน้อยแม้ว่าจะมีการริเริ่มมาช้านานแล้วก็ตาม แต่มักเป็นการทดลองเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการต่อต้านการติดโรคมาลาเรียในคนเป็นส่วนใหญ่ ไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรียอาจถูกกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มโรคขึ้นได้ตามธรรมชาติ และสามารถต้านทานต่อโรคได้ ภาวะภูมิคุ้มโรคที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อมาลาเรียคล้ายคลึงกับการติดเชื้ออื่น กล่าวคือแบ่งเป็น 2 แบบ คือ ภูมิคุ้มโรคแบบฟิงแอนติบอดี (humoral immunity) และ ภูมิคุ้มโรคแบบฟิงเซลล์ (cell-mediated immunity) ในระหว่างการติดเชื้อมาลาเรีย แอนติเจนจากเชื้อมาลาเรียจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองและสร้างภูมิคุ้มกันได้ทั้ง 2 แบบ แต่ภูมิคุ้มกันดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นไก่ที่ได้รับเชื้อจึงแสดงอาการป่วยและในรายที่เชื้อมีความรุนแรงอาจทำให้ตายได้ (Garnham, 1966) จากการทดลองใช้แอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* กระตุ้นให้ไก่ปลอดเชื้อเกิดภูมิคุ้มกันต่อโรคมาลาเรีย แล้วใช้เชื้อที่มีความรุนแรงสูงฉีดให้ปรากฏว่าไก่สามารถมีชีวิตรอดได้ แม้ว่าจะคงตรวจพบเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดได้ในระดับต่ำก็ตาม แสดงให้เห็นว่าไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่เป็น protective immunity ได้มากพอที่จะยับยั้งไม่ให้ไก่แสดงอาการป่วยและยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ในระดับหนึ่ง (Todorovic et al., 1967, Todorovic et al., 1968)

Garnham (1966) รายงานว่าเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ sporozoite และ primary exoerythrocytic stage นั้นไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับเชื้อ ระยะ secondary exoerythrocytic stage ที่สามารถกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันขึ้นได้ และมีผลทำให้เชื้อ

ระยะ phanerzoite และ merozoite ไม่สามารถเข้าสู่ endothelial cell ของหลอดเลือดฝอยได้ตามปกติ สำหรับเชื้อระยะ erythrocytic form ก็สามารถกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันได้ในระดับหนึ่งแต่ไม่สูงพอที่จะเกิดภาวะ premunition เชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดยังคงมีความไวสูง แต่ merozoite ที่อยู่ใน schizont มีจำนวนลดลง สำหรับ merozoite ที่อยู่ในสภาวะในพลาสมาจะถูกทำลายได้

ในไก่ทดลองที่ตัด bursa of fabricius ออกไป เมื่อได้รับเชื้อรุนแรง ปรากฏว่า เชื้อมีระยะฟักตัวสั้นลง ระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง อัตราการตายสูงกว่าปกติ และระดับแอนติบอดีมีระดับที่ต่ำกว่าปกติมาก (Congdon *et al.*, 1969 Van Riper *et al.*, 1994) แสดงว่า humoral immunity และ B- lymphocyte มีบทบาทต่อการติดเชื้อดังกล่าว แม้ว่าจะไม่สมบูรณ์ก็ตาม เนื่องจากการศึกษาทางอิมมูโนวิทยาทั้งซีรัมวิทยาและกลไกการสร้างภูมิต่อเชื้อ *P. gallinaceum* มีค่อนข้างน้อยมาก จึงน่าจะนำมาศึกษาในรายละเอียดให้มากขึ้น

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียไก่

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียไก่ทำได้โดยการศึกษาจากประวัติและอาการทางคลินิกจากภาคสนาม ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยยืนยันผลให้ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และง่าย ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การตรวจหาเชื้อโดยตรง และการตรวจทางอ้อมเพื่อหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยตรง

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยตรง ได้แก่ การศึกษาเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงตามกระแสเลือดทั่วไป และเชื้อระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงในเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในโดยเฉพาะตับและม้าม วิธีที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การวินิจฉัยเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อตรวจหาเชื้อทางปรสิตวิทยา จากฟิล์มเลือดย้อมสี Rowmanowsky หรือตรวจหาเชื้อทางจุลพยาธิวิทยา และการวินิจฉัยเชื้อจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ เป็นต้น

1. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ก. การตรวจหาเชื้อในเม็ดเลือดแดงจากกระแสเลือดทั่วไป เป็นการตรวจวินิจฉัยทางปรสิตวิทยาที่ใช้เป็นมาตรฐานมาตั้งแต่อดีตมาบรรพ์ โดยศึกษาจากฟิล์มเลือดบางหรือหนาย้อมสี Romanowsky ที่นิยมใช้ เช่น สี Giemsa, Wright-Giemsa, May-Grunwald Giemsa, Leishman และสี Field's rapid เป็นต้น ซึ่งสีดังกล่าวมีคุณลักษณะพิเศษสามารถทำให้เชื้อมีการติดสีแตกต่างกัน สังเกตเห็นเป็นสีฟ้า ม่วง แดง ชมพู และน้ำตาลได้ชัดเจน จึงสามารถจำแนกลักษณะของอวัยวะ

ส่วนต่างๆของเชื้อได้ง่าย ตรวจสอบเชื้อระยะต่างๆ trophozoites, schizonts หรือ gametocytes และนับจำนวนได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง แต่การตรวจวินิจฉัยเชื้อในสัตว์ปีกด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยความรู้ และผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทาง และบางครั้งอาจจะจำแนกชนิดได้ยาก ในกรณีที่มีอัตราการติดเชื้อมากในกระแสเลือดต่ำหรือมีตัวอย่างจำนวนมากๆ อาจต้องใช้เวลาในการตรวจนานและทำให้ผลคลาดเคลื่อนได้ (Makler *et al*, 1998) และสามารถตรวจเชื้อได้เพียงบางระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงเท่านั้น ไม่สามารถตรวจเชื้อระยะ sporogonic และ exoerythrocytic schizont ได้ จึงอาจจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นร่วมด้วย

ข. การตรวจหาเชื้อมอกเม็ดเลือดแดงจากเนื้อเยื่อ เป็นการตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียระยะที่เชื้อเจริญอยู่นอกเม็ดเลือดแดงตามอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย คือ ตับ ม้าม ปอดและสมอง วิธีนี้มักทำในกรณีที่สัตว์ตายเท่านั้น โดยการผ่าซากไก่และตัดชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆ ตามขั้นตอนที่เป็นมาตรฐานทางพยาธิวิทยา ย้อมสี Haematoxylin และ Eosin และนำมาศึกษาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Garnham, 1966)

2. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย เป็นการวินิจฉัยด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular biology-based technique) ที่นิยมคือ เทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction, PCR) เช่น small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) เป็นต้น วิธีนี้สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อมาลาเรียที่มีจำนวนน้อยมากในเลือด สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีนี้ ปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียบางชนิดในคนและสัตว์ ในสัตว์ปีกได้มีการจำแนกชนิดด้วยวิธีนี้เพียง 3 ชนิด คือ *P. gallinaceum*, *P. lophurae* และ *P. juxtannucleare* เท่านั้น และยังไม่สามารถนำมาใช้ประเมินระดับของเชื้อหรือใช้เพื่อการวินิจฉัยทั่วไป

การทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย

โดยทั่วไปการทดสอบทางซีรั่มวิทยาขึ้นกับปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี และสามารถตรวจวัดได้ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการนำแอนติเจนและแอนติบอดีมารวมกันและปล่อยให้มีการจับเกาะหรือทำปฏิกิริยากัน ขั้นตอนที่สองเป็นการตรวจสอบการจับเกาะหรือทำปฏิกิริยากับแอนติเจนและแอนติบอดีด้วยวิธีที่เหมาะสม ดังนั้นการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียจึงเป็นการวินิจฉัยด้วยวิธีทางอ้อม โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งใช้สารบางอย่างติดฉลากกับแอนติบอดีเพื่อเป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ตัวอย่างสารติดฉลาก เช่น เอนไซม์ สารเรืองแสง หรือสารกัมมันตภาพรังสี เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยเพื่อ

ทดสอบหาระดับภูมิคุ้มกันของโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มักมีการศึกษาในคน วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Immunofluorescence assay (IFA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Western blot analysis เป็นต้น

1. การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย ด้วยวิธี IFA

วิธี IFA เริ่มมีการพัฒนาโดยนำแอนติบอดีมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ในห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1941 โดย Coon และคณะ (1941) ได้รายงานถึงการนำสารเรืองแสงมาติดฉลากกับแอนติบอดีเพื่อตรวจหาแอนติเจน หรือตรวจหาแอนติบอดีในชิ้นเนื้อ หลังจากนั้นก็มีผู้ให้ความสนใจนำมาพัฒนาใช้ตรวจหาเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียในคน ลิง หนู และในสัตว์ปีก (Zuckerman, 1969)

วิธี IFA เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถสังเกตเห็นเชื้อได้ชัดเจน ในสัตว์ปีก เทคนิค IFA สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *P. gallinaceum* ในระยะ ookinetes (Adini and Warburg, 1999) sporozoites (Ramirez *et al.*, 1991 ; Rocha *et al.*, 1993) exo-erythrocytic stage (El-Nahal, 1966 ; Ramirez *et al.*, 1991) erythrocytic stage (Todorovic *et al.*, 1968 ; Soni and Cox, 1975b ; Soni and Cox, 1975c) นอกจากนี้มีผู้รายงานว่าวิธีนี้นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีได้ด้วย (El-Nahal, 1966 ; Dooris and McGhee, 1975)

การทดสอบด้วยวิธี IFA มีหลักการง่าย ๆ คือ การปล่อยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะ และใช้สารเรืองแสงประเภท fluorescein ติดฉลากกับแอนติบอดีเป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยาดังกล่าวศึกษาได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ซึ่งมีความยาวแสงสูงสุด 495 มิลลิเมตรหรือนาโนเมตร ปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกสามารถมองเห็นได้มีสีเขียวสด ที่มี molar quantum 92% วิธีทดสอบ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ Direct และ Indirect IFA (Nakamura and Bylund, 1997)

Direct IFA เป็นการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่ในสภาพชิ้นเนื้อหรือบนสไลด์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ทำปฏิกิริยากันโดยตรง สำหรับ Indirect IFA เป็นการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยมีหลักการคือ ให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะ และใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกตัวหนึ่งโดยทางอ้อม เพื่อป้องกันเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบหรือไม่ โดยทั่วไปมักนิยมใช้ตรวจสอบ antinuclear antibody (ANA) ซึ่งได้ผลดีกับเนื้อเยื่อที่มีนิวเคลียสมาก น้ำยาเคมี เช่น acetone จะสามารถ fix แอนติเจนในเนื้อเยื่อเพื่อยับยั้งการสลายตัวได้ดี และทำให้ผนังเซลล์มี permeability สูง ANA สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นผลของการทดสอบจึงเห็นได้ชัดเจน และตัวอย่างซีรัมที่ต้องการทดสอบสามารถนำมาหาค่าเชิงปริมาณได้

(quantitative technique) ผลลัพธ์ที่ได้ถือเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ให้ผลบวก ตัวอย่างเช่น ความเข้มข้นของซีรัม 1/320 ให้ผล ANA น้อยกว่าความเข้มข้นของซีรัม 1/10240 เป็นต้น การไตเตรตที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกควรมีช่วงของ dilution factor คือ 3.162 ($\sqrt{10}$) ค่าความเข้มข้นของซีรัมที่ควรนำมาใช้ในการทดลองมี 2 ช่วง และเพิ่มเป็น 10 เท่า ไปเรื่อยๆ ดังนี้ 1/10, 1/32, 1/100, 1/320, 1/1000, 1/3200, 1/10000 และต่อไปเป็นลำดับ

ปัจจุบันวิธี IFA นิยมใช้มากสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม โดยให้ซีรัมที่ต้องการตรวจทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียที่ทำเป็นแผ่นฟิล์มเลือดบางบนสไลด์ และใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินใน ซีรัมที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยา ถ้าซีรัมนั้นมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียอยู่ เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ UV การเรืองแสงของเชื้อจะปรากฏบนแผ่นสไลด์ (El-Nahal, 1966 ; Congdon *et al.*, 1969 ; Dooris and McGhee, 1975 ; Manawadu and Voller, 1978) สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ Fluorescein และ Rhodamine ซึ่งอยู่ในรูปของ Fluorescein isothiocyanate (FITC) และ Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) ตามลำดับ สารเรืองแสงเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สามารถดูดซับแสงสีหนึ่งและปล่อยแสงอีกสีหนึ่งออกมา สารเรืองแสงจะดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่นน้อยซึ่งมีพลังงานสูง และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าซึ่งมีพลังงานต่ำกว่าออกมา สำหรับ FITC จะดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร และปล่อยแสงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งเป็นแสงสีเขียวได้มากที่สุด (Garvey *et al.*, 1977)

2. การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อด้วยวิธี ELISA

ELISA เป็นวิธีทดสอบระดับภูมิคุ้มกันที่มีหลักการและขั้นตอนการทดสอบคล้ายคลึงกับวิธี IFA หลักการ คือ การใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีเพื่อชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบน solid phase และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์ (substrate) จะเกิดสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือตรวจวัดด้วยเครื่อง ELISA reader เอนไซม์ที่นิยมใช้เป็นสารติดฉลากคือ horseradish peroxidase และ alkaline phosphatase ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบด้วยวิธี ELISA สามารถใช้ตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี นิยมใช้ 96-well plastic microtiter plate เป็น solid phase ในการเคลือบ (coat) ตัวอย่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ

การทดสอบด้วยวิธี ELISA แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ competitive ELISA และ noncompetitive ELISA

ก. **Competitive ELISA** เป็นการทดสอบที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีปริมาณน้อยๆ แม้ว่าโดยทั่วไปมักจะใช้เพื่อการตรวจหาแอนติเจนก็ตาม ในการทดสอบเพื่อตรวจหา

แอนติเจน มีหลักการ คือ แอนติบอดีจะถูก coat อยู่บนพื้นผิวของ microtiter plate และให้แอนติเจน ตัวอย่างที่นำมาทดสอบทำปฏิกิริยาแข่งขันกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ กรณีนี้ถ้าแอนติเจน ตัวอย่างสามารถจับกับแอนติบอดีที่ coat ไว้ แอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์ก็จะไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ ดังนั้นเมื่อเติม substrate ลงไป ก็จะไม่เกิดสีขึ้น ในทางตรงกันข้ามถ้าแอนติเจนตัวอย่างไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ coat ไว้ แอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ เมื่อเติม substrate ก็จะมีสีขึ้น

การทดสอบด้วยวิธี Competitive ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับ Noncompetitive ELISA พบว่า Competitive ELISA มีความจำเพาะสูงกว่าแต่มีความไวต่ำกว่ามาก ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น โมเลกุลขนาดเล็ก ความบริสุทธิ์ของแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ เป็นต้น

ข. Noncompetitive ELISA วิธีนี้มีการใช้มากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางคลินิก ปฏิบัติการ เป็นการทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีก็ได้ หลักการทดสอบ คือ ถ้าเป็นการตรวจหาแอนติบอดี แอนติเจนจะถูก coat บนผิวพลาสติกของ microtiter plate แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจะทำปฏิกิริยากัน ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และเติม substrate เพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ถ้าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนจะปรากฏสีที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าหรืออ่านผลได้จาก ELISA Reader (Carpenter,1997) ในกรณีที่ต้องการทดสอบหาแอนติเจนใช้หลักการเดียวกัน เว้นแต่ให้แอนติบอดีถูก coat บนผิวพลาสติกของ microtiter plate เท่านั้น

การทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่ให้ผลบวกหรือลบโดยศึกษาจากสีที่ปรากฏนั้น ความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถวัดได้ และเป็นสัดส่วนกับระดับของผลบวก ถ้าสีที่เกิดขึ้นมีความเข้มสูงมากแสดงว่าปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยามีจำนวนมาก การวัดความเข้มของสีทำได้โดยใช้ absorbance ที่ specific ของ wavelenght ของ substrate และการอ่านผลควรทำในเวลาจำกัดมิฉะนั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนง่าย

เนื่องจาก ELISA เป็นการทดสอบที่มีความหลากหลาย น่าเชื่อถือ ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีความไวสูง สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ทั้งการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี มักนิยมใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Carpenter,1997) และประเมินระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อได้ จึงมีการนำมาใช้ศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียทั้งในคนและสัตว์ (Voller et al. 1974; Voller et al. 1975 ; Graczyk et al. 1993 ; Graczyk et al.1994)

ในสัตว์ปีกการทดสอบเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี ELISA มีการศึกษาค่อนข้างน้อยมาก ในปี ค.ศ.1993 Graczyk และคณะ ได้ศึกษาและพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. elongatum* และ *P. relictum* ในเป็ดและในนกเพนกวินโดยใช้แอนติเจนของเชื้อ *P. falciparum* 3 ชนิด คือ circumsporozoite (CS) protein (R32tet₃₂)

P. falciparum gametocyte antigen (P.F.R27) และ crude red blood cell extract (CRBCE) ปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง *P. elongatum* และ *P. relictum* ต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. falciparum* ทั้ง 3 ชนิด (Graczyk et al. 1993 ; Graczyk et al.1994)

3. การตรวจทางซีรัมวิทยาของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Western blot analysis

Western blot analysis เป็นการจำแนกโปรตีนแอนติเจนด้วยน้ำหนักโมเลกุล และทดสอบหาความจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้วิธีทางชีวเคมี คือ electrophoresis และวิธีทางซีรัมวิทยาคัดลยคลึงกับการทดสอบ ELISA ผสมเข้าด้วยกัน กล่าวคือ การแยกโปรตีนของแอนติเจนตามน้ำหนักโมเลกุลบนแผ่นเจลด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้วิธีที่เรียกว่า Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคซึ่งมีหลักการการแยกโปรตีนโดยการเคลื่อนที่ตามน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยประจุไฟฟ้า โดยใช้ SDS ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น detergent ที่มีประจุลบ สามารถยึดเกาะกับโปรตีนโดยรอบ และทำให้โปรตีนเสียสภาพเนื่องจากไปทำลายพันธะ disulfide ของโปรตีนหลายๆขนาดที่รวมตัวกันอยู่ ให้สลายตัวออกเป็นหน่วยย่อย และเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไปยังขั้วบวก โปรตีนที่แยกได้จากแผ่นเจลนี้ถูกย้ายไปยังแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสได้โดยการ blot และสามารถตรวจสอบความจำเพาะต่อแอนติบอดีได้เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาด้วย substrate ปฏิกิริยาที่ปรากฏอาจมีมากกว่าน้ำหนักโมเลกุล 1 ตำแหน่งของแอนติเจนที่สามารถจับกับแอนติบอดีได้ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละตำแหน่งนั้นสามารถประเมินได้จากสัดส่วนของระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางของ tracker dye marker เคลื่อนที่ ทำให้ทราบถึงปริมาณของโปรตีนเป้าหมาย ขนาด น้ำหนัก และความบริสุทธิ์ของโปรตีน (Ledue and Garfin, 1997)

เนื่องจากปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาสามารถสังเกตได้จากสีที่เกิดขึ้นชัดเจน จึงมีการนำมาใช้ในการศึกษาทางชีวเคมี วิทยาศาสตร์การแพทย์ วิทยาศาสตร์การสัตว ในการศึกษาเกี่ยวกับโรคมาลาเรีย ได้มีการทดลองใช้ SDS-PAGE ในการวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *P. lophurae* ระยะ erythrocytic merozoites พบว่า แถบของโปรตีนจาก merozoites แตกต่างจากแถบของโปรตีนของเม็ดเลือดแดง (Hollingdale and Kilejian, 1979) และบางรายงานที่ได้นำวิธี Western blot analysis ไปใช้ในการตรวจหาความจำเพาะของการติดเชื้อมาลาเรีย Rocha และคณะ (1993) รายงานว่า monoclonal antibody ของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ sporozoite มีปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของ *P. berghei* ระยะ sporozoites ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 200 และ 54 kDa ในขณะที่แอนติเจนของ *P. gallinaceum* ระยะ sporozoites ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามต่อแอนติเจนของ *P. berghei* ระยะ sporozoites ต่อมา Adini and Warburg (1999)

ได้ทดลองพบว่า monoclonal antibody ต่อ ookinete ของ *P. gallinaceum* surface protein น้ำหนักโมเลกุล 28 kDa มีความจำเพาะต่อ โปรตีนของ *P. gallinaceum* ทั้งระยะ ookinete และ oocyst เมื่อทำการทดสอบด้วย Western blot analysis

โรคมาลาเรียในไก่ในประเทศไทย

อุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในไก่และสัตว์ปีกอื่น

ในประเทศไทย เชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกเริ่มมีการค้นพบหรือมีการระบาดมาตั้งแต่เมื่อไรไม่ทราบแน่ชัด แต่จากผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซา ที่ระบุไว้ในระหว่างปี ค.ศ. 1964-1967 ได้ตรวจพบเชื้อรวม 8 ชนิด คือ *P. relictum*, *P. fallax*, *P. matutinum*, *P. giovannolai*, *P. circumflexum*, *P. vaughani*, *P. nucleophilum* และ *P. rouxi* ในสัตว์ปีกจำนวน 47 ชนิด ในทุกภาคของประเทศ (Laird, 1998) ต่อมาในปี พ.ศ. 2539 สุดจิตต์ และคณะ ได้รายงานการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium* spp. ในนกไก่ฟ้าสีทอง สำหรับข้อมูลการพบเชื้อมาลาเรียในไก่นั้นหน่วยปรสิตวิทยาได้ตรวจพบในไก่ไข่ 1 ราย ที่นำฟิล์มเลือดมาส่งตรวจ ในปี 2537 แต่ไม่ได้ระบุว่าเชื้อชนิดใด (Personal communication) ในปี 2538 ทศนีย์ และคณะ ได้รายงานอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุจาก *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยเกิดการระบาดขึ้นในฟาร์มไก่เนื้อแห่งหนึ่งในเขตมีนบุรี กรุงเทพมหานคร และในเวลาใกล้เคียงได้มีการระบาดของโรคมาลาเรียขึ้นในฟาร์มไก่เนื้อในเขตจังหวัดนครนายกและฉะเชิงเทราเช่นกัน (ชัยศิริ และคณะ, 2539 ; ทศนีย์ และคณะ, 2538) ต่อมาในปี 2540 มีรายงานการระบาดของโรคมาลาเรียในไก่ไข่เป็นครั้งแรกที่จังหวัดฉะเชิงเทรา (ปิยนุช และทศนีย์, 2541) หลังจากที่ได้พบว่ามีการระบาดของโรคมาลาเรียเกิดขึ้นในประเทศไทย และโรคนี้เป็นสาเหตุหลักประการหนึ่งซึ่งสร้างปัญหาและทำความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ จึงมีการศึกษาทั้งภาคสนามและในห้องปฏิบัติการในหลายด้าน เช่น ความชุก การแพร่ระบาด อากาศ การก่อโรค การตรวจวินิจฉัย การรักษา และการควบคุม เป็นต้น

ความชุกและการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในไก่

จากผลการสำรวจแหล่งที่มีการตรวจพบเชื้อระหว่างเดือน มกราคม พ.ศ. 2540 ถึง เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2542 พบว่าเชื้อมีการระบาดแพร่หลายสูงถึง 30 จังหวัด (ปิยนุช, 2543) โดยตรวจพบเชื้อในไก่เนื้อ 16 จังหวัด ไก่ไข่ 17 จังหวัด และไก่ที่ไม่ได้ระบุชนิดอีก 10 จังหวัด แบ่งตามเขตพื้นที่การปกครอง (เขตปศุสัตว์) ได้ดังนี้

เขต 1 กรุงเทพมหานคร อยุธยา สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี นนทบุรี ปทุมธานี

เขต 2 สมุทรปราการ ชลบุรี นครนายก ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา

เขต 3 นครราชสีมา สุรินทร์

เขต 4 ขอนแก่น ชัยภูมิ

เขต 5 ลำพูน

เขต 6 พิษณุโลก นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร

เขต 7 เพชรบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี

เขต 8 นครศรีธรรมราช กระบี่

เขต 9 สงขลา ตรัง นราธิวาส พัทลุง

ชัยศิริ (2545) รายงานว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2533-2544 โรคมาลาเรียในไก่มีการระบาดมากที่สุดในปีสุดท้ายเขต 2 โดยเฉพาะจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งมีการเลี้ยงไก่ไข่เป็นจำนวนมาก การระบาดเกิดขึ้นแพร่หลายมากที่สุดในช่วงฤดูฝนที่มียุ้งชุกชุม ไก่ป่วยที่มีเชื้อในกระแสเลือดเป็นตัวแพร่เชื้อไปยังไก่ตัวอื่นในฟาร์มเดียวกันหรือฟาร์มข้างเคียงได้ตลอดเวลา เนื่องจากลักษณะที่ตั้งของฟาร์มเลี้ยงไก่ โรงเรือนตั้งอยู่บนบ่อปลา หรือบริเวณโดยรอบอาจเป็นป่า ทุ่งนา พงหญ้า ที่มีแหล่งน้ำขัง บึงน้ำ บ่อปลา ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงที่ดี จึงทำให้ยุงที่เป็นพาหะนำมีโอกาสแพร่เชื้อได้อย่างต่อเนื่อง (ชัยศิริ และคณะ, 2539) สอดคล้องกับรายงานของ สุธจิตต์ และคณะ (2543) ที่ได้ทำการศึกษาพยาหาระบาดในฟาร์มไก่แห่งหนึ่งที่เคยมีการระบาดของโรคมาลาเรีย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2540 ถึง พฤศจิกายน 2541 รายงานว่าพบยุงเป็นจำนวนมากในช่วงฤดูฝน รวม 7 ชนิด คือ *C. gelidus*, *C. tritaeniorhynchus*, *C. quinquefasciatus*, *M. uniformis*, *M. Annulifera*, *M. Indiana* และ *A. barbirostris* แต่ตรวจไม่พบเชื้อตามธรรมชาติจากยุงทุกชนิดดังกล่าว ขณะที่ สุวรรณี และคณะ (2543b) ศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่ายุง 3 ชนิด คือ *A. aegypti*, *C. gelidus* และ *C. tritaeniorhynchus* มีอัตราการติดเชื้อสูงร้อยละ 100, 60 และ 73.91 ตามลำดับ

อาการทางคลินิก

ทัศนีย์ และคณะ (2538) รายงานว่าจากภาวะการติดเชื้อตามธรรมชาติไก่เนื้อที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียในการระบาดครั้งแรกมีอาการ หงอย ซึม ไม่กินอาหาร โลหิตจาง ขาไม่ค่อยมีแรง คอตก อุจจาระเหลวมีสีเขียว อาจหายใจทางปาก อุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ นอนหมอบรวมกลุ่มหรือแยกจากฝูง ต่อมาอีก 1-2 วัน ไก่ป่วยก็จะตาย ก่อนตายมักจะมีอาการอาเจียน น้ำลายไหล ไก่ที่แสดงอาการป่วยมีอายุตั้งแต่ 18 ถึง 68 วัน อัตราการติดเชื้อ 24.19% และตาย 19.22% ขณะที่วินัย และคณะ (2542) พบว่าไก่เนื้อพันธุ์สยาม-ญี่ปุ่น ที่แสดงป่วยตั้งแต่ อายุ 1 - 18 เดือน อัตราการติดเชื้อ 65% และตาย 18%

สำหรับไก่ที่ติดเชื้อนั้น อัตราการไขลดลง 10-30% ไขมีขนาดเล็ก เปลือกบาง บวมและแตกง่าย ไก่กินอาหารน้อยลง 21% โลหิตจาง (หงอนซีด) 56% อุจจาระมีสีเขียว 53% หน้าบวม 13% ตัวอ่อนผิดปกติ 10% เป็นหวัดและขาไม่มีแรง 8% และมีการตายผิดปกติ บางฟาร์มก็อาจมีอัตราการตายถึง 20% (ปิยนุช, 2541)

ปิยะนันท์ (2542) ทดลองใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 5×10^3 infected rbc ฉีดเข้าใต้ผิวหนังไก่เนื้ออายุ 2 สัปดาห์ โดยพบว่าไก่มีอัตราการติดโรค 100% และตาย 66.67% เริ่มตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในวันที่ 4 และระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง ไก่ที่ได้รับเชื้อแสดงอาการซึม 100% อุจจาระมีสีเขียว 67% และ เลือดจาง 100% ในขณะที่ สุวรรณี และคณะ (2543a) ทดลองใช้เชื้อปริมาณ $0.6-6 \times 10^5$ ฉีดเข้าทางเส้นเลือดไก่ไข่เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณมากจะตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้เร็วกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่ำ ไก่ที่รับเชื้อ 1 infected rbc อัตราการติดเชื้อ 33.33% ไก่ที่ได้รับเชื้อมากขึ้นมีอัตราการติดเชื้อสูงและตายสูงขึ้น ผันแปรตามปริมาณเชื้อที่ได้รับและระดับเชื้อในกระแสเลือด 100% และ 100% ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเกิดภาวะโลหิตจาง

ดำเนิน (2544) ทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อคณะเพศอายุ 10 20 และ 30 วัน พบว่าอัตราการติดเชื้อ 22% 16% และ 34% ตามลำดับ และอัตราการตาย 20% 12% และ 18% ตามลำดับ ไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณมากเกิดภาวะโลหิตจาง 40-60% และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความผันแปรสูง ไก่ที่ตายทุกตัวพบว่ก่อนตายมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอยู่ระหว่าง 15.0-24.0%

พยาธิสภาพและพยาธิวิทยา

ทศนีย์ และคณะ (2539) รายงานว่าจากภาคสนามไก่ที่ป่วยและตายด้วยโรคมาลาเรียมีลักษณะรอยโรคที่สังเกตได้ คือ ตับและม้ามขยายใหญ่ สมองมีเลือดคั่ง เช่นเดียวกับ วินัย และคณะ (2542) ที่พบว่า ตับและม้ามมีขนาดใหญ่ เลือดคั่งที่สมอง และพบมีจุดเลือดออกที่กล้ามเนื้อหน้าอกของซากไก่บางตัว ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่ตับ พบมีการเสื่อมของเซลล์รอบๆ central vein และพบ hemosiderin ใน sinusoids และ Kupffer's cell ส่วนที่ม้ามพบ hyperplasia ของ red pulp และ hemosiderosis บริเวณสมองมีเชื้อมาลาเรียใน brain capillaries หลายแห่งถูกอุดตัน

ผลจากการทดลองของปิยะนันท์ (2542) ที่ฉีดเชื้อให้ไก่เนื้อเพศผู้ พบว่าเมื่อทำการผ่าซากสังเกตพบรอยโรค คือม้ามและตับมีสีดำนดำ 100% ม้ามจะขยายใหญ่ 100% มีของเหลวคั่งในถุงหุ้มหัวใจ 100% และไตบวมน้ำ 66.67% ในวันที่ 8 หลังจากได้รับเชื้อ ตรวจพบ malarial pigment กระจายอยู่ทั่วไป โดยสะสมเป็นจำนวนมากที่ตับและม้าม และพบได้ประปรายที่สมอง หัวใจและไต และตรวจพบเชื้อระยะ exoerythrocytic schizonts ในเยื่อบุหลอดเลือดที่ม้าม ตับ ปอด ไต และ

สมอง และ malarial pigment ต่อมา สุทธิศักดิ์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาทดลองพบว่า ให้ผลคล้ายคลึงกัน

การรักษาโรคมาลาเรียในไก่

จากหลายรายงานที่ได้ทำการทดลองรักษาโรคมาลาเรียในไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยประยุกต์มาจากยาที่ใช้ได้ผลในการรักษาโรคมาลาเรียในคน (ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ปิยนุช และคณะ, 2542a ; ปิยนุช และคณะ, 2542b ; วินัย และคณะ, 2542 ; ดำเนิน, 2544)

การรักษาโรคในภาคสนาม ในช่วงต้นที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียในไก่เนื้อ ทำการรักษาด้วยยา 2 ชนิด เข้า-ป่าย ติดต่อกันนาน 5 วัน โดยตอนเช้า ใช้ คลอโรควิน ผสมน้ำให้กิน 3 วัน ติดต่อกัน โดยวันแรก ให้ในขนาด 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักไก่ 1 กิโลกรัม วันที่ 2 และ 3 ในขนาด 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักไก่ 1 กิโลกรัม ต่อวัน สำหรับตอนบ่าย ใช้ยาซัลฟาโมโนเมทท็อกซิน โดย 2 วันแรกให้ในขนาด 200 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมต่อวัน ผสมน้ำให้กิน ในวันที่ 3-5 ในขนาด 100 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัมต่อวัน (ทัศนีย์ และคณะ, 2538) ต่อมาวินัย และคณะ (2542) รักษาไก่เนื้อด้วยยาคลอโรควิน ผสมน้ำป้อนปากโดยตรง ในวันแรก ขนาด 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม และ ขนาด 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ติดต่อกันอีก 3 วันหลังการรักษา พบว่าให้ผลดีไ้มีอัตราการติดเชื้อลดลงจนกระทั่งไม่พบในที่สุด ขณะที่ปิยนุช และคณะ (2542a) ทดลองรักษาการติดเชื้อในไก่เนื้ออายุ 49 วัน ใช้ยาผสมน้ำให้กิน โดยให้คลอโรควิน ขนาด 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ติดต่อกันนาน 6 วัน พบว่าทำให้เชื้อในกระแสเลือดลดลง และยาดีออกซีไซคลิน ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 4 วัน และต่อมา ใช้ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม อีก 4 วันติดต่อกัน เชื้อลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ในปี พ.ศ. 2544 ดำเนิน ได้ใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าหลอดเลือดแดงของไก่เนื้ออายุ 23 วัน และเมื่อตรวจพบเชื้อระยะ schizonts และ gametocytes ในกระแสเลือดตั้งแต่ 13.19-63.71% ได้ทดลองรักษาด้วยยา 5 ชนิด คือ อาทิสูเนต คลอโรควิน ดีออกซีไซคลิน ไพโรมาควิน และอาทิสูเนตร่วมกับไพโรมาควิน ในขนาด 10, 10, 50, 0.50 และ 10+50 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ โดยป้อนปากให้กินวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 5 วัน ผลปรากฏว่ายาคลอโรควิน และดีออกซีไซคลินมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการรักษาการติดเชื้อระยะ asexual blood stages แต่ไม่มียาชนิดใดที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการรักษาการติดเชื้อระยะ gametocytes และ exoerythrocytes ที่อยู่ในตับและม้ามของไก่

สำหรับการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ไข่นั้น ปิยนุช และคณะ (2542b) รายงานว่ายาคลอโรควินมีประสิทธิภาพดีต่อการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ไข่ อายุ 12 สัปดาห์ ทำให้ไก่ที่ป่วยอยู่ฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดฉะเชิงเทรา มีอาการดีขึ้น เมื่อให้ยาคลอโรควินฟอสเฟต ผสมน้ำให้กิน ขนาด 10

มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 5 วัน และหลังจากหยุดยาไปนาน 1 สัปดาห์ ให้ซ้ำอีก 1 ครั้ง นาน 5 วันเช่นกัน เชื้อในกระแสเลือดลดลงในระดับหนึ่ง แต่ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปจากกระแสเลือดได้ แม้ว่าไก่ป่วยมีอาการดีขึ้น อัตราการตายลดลง อัตราการไข่เพิ่มขึ้น และเปลือกไข่หนาขึ้นก็ตาม

การควบคุมและป้องกัน

การควบคุมและป้องกัน เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตที่มีอากาศร้อนชื้น การเกษตรกรรมหลักเป็นการเพาะปลูก ทำนา และเลี้ยงสัตว์ จึงมีพื้นที่ที่มีน้ำขังอยู่ทั่วไปในแหล่งที่เลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะฟาร์มเลี้ยงไก่ที่สร้างโรงเรือนอยู่บนบ่อปลา หรือบริเวณโดยรอบของเล้ามีน้ำขังตลอดปี กลายเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงที่ดี ไก่ที่เลี้ยงในโรงเรือนเปิดมีการติดเชื้อมาลาเรีย เกิดการระบาดของโรคได้ต่อเนื่อง ตลอดทั้งปี และเนื่องจากยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดไปได้ ดังนั้นการควบคุมยุงพาหะนำจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งสามารถทำได้โดยกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง เช่น ขจัดแหล่งน้ำขัง มีการระบายน้ำ ถางหรือตัดหญ้าที่อยู่รอบๆ เล้าไก่ให้โล่งเตียนไม่ให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ใช้ยาพ่นฆ่ายุง ใช้กับดักยุงวางรอบๆ เล้าไก่ ป้องกันยุงให้เข้าไปในเล้าไก่น้อยลง การกางมุ้งคลุมเล้าลอยบนบ่อปลา เป็นต้น (ทัศนีย์และคณะ, 2538 ; ชัยศิริ และคณะ, 2539 ; ปิยนุช และ ทัศนีย์, 2541 ; วินัย และคณะ 2542) และหรืออาจจำเป็นต้องเปลี่ยนระบบการเลี้ยงเป็นโรงเรือนปิดซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ดีและแก้ปัญหาได้แน่นอน นอกจากนี้ ถ้าเป็นระบบโรงเรือนเปิดที่บริเวณรอบๆ มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรียสูง มีการเลี้ยงไก่หนาแน่นเป็นจำนวนมากและมีการระบาดของโรคมาลาเรียแพร่หลาย ควรตรวจเลือดไก่และสังเกตอาการเป็นระยะ เป็นการเฝ้าระวังโรค ทำให้ทราบถึงสภาวะของการติดเชื้อ เพื่อที่จะหาทางป้องกันและรักษาได้ทันต่อเหตุการณ์

ปัญหาและความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่

ตั้งแต่เริ่มมีการระบาดของโรคมาลาเรียเป็นครั้งแรกในปี 2538 จนกระทั่งถึงปัจจุบัน ไก่ที่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรมมีการระบาดของโรคแพร่ขยายออกไปในหลายๆ จังหวัดทั่วทุกภาคของประเทศ การป่วยและตายของไก่ที่เป็นโรคมาลาเรียมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีอัตราความสูญเสียทางเศรษฐกิจสูง ไก่ที่ติดเชื้อป่วยและตายทำให้รายได้ของเกษตรกรลดลง ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่เป็นจำนวนมาก ในระยะแรกนั้นได้มีผู้ประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นในฟาร์มไก่เนื้อ 4 ฟาร์มว่าทำให้สูญเสียเงินถึงหนึ่งล้านบาท และอาจเป็นโรคที่สร้างปัญหาและความสูญเสียมากกว่าโรคติดเชื้ออื่น (ชิต และชัยศิริ, 2541) นอกจากนี้ไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรียทำให้ไข่ลดลง 10-30% ตาย 20-48% (ปิยนุช และทัศนีย์, 2541 ; ปิยนุช, 2543) ดังนั้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนควบคุมและรักษาโรคไม่ให้มีการระบาดเพิ่มมากขึ้นอีก จึงน่าจะหาแนวทาง

การพัฒนาวิชาการใหม่ๆด้านต่างๆเพื่อแก้ปัญหาทางเศรษฐกิจได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีวินิจฉัยเชื้อที่มีความถูกต้องแม่นยำ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียไก่อ

ปัจจุบันการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่เป็นปัญหาและระบาดอยู่ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของประเทศ ยังมีข้อจำกัดค่อนข้างสูง นอกเหนือจากการวินิจฉัยด้วยวิธีทางสัตวศาสตร์ของเชื้อที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์แล้ว การพัฒนางานด้านการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยังมีค่อนข้างน้อย การศึกษาในรายงานต่างๆที่ผ่านมา นิยมการตรวจเพื่อหาเชื้อโดยตรง ด้วยวิธีทางปรสิตวิทยาจากฟิล์มเลือดย้อมสี ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานในการประเมินอัตราการติดเชื้อ ระดับเชื้อในกระแสเลือด (ทัศนีย์ และคณะ, 2539 ; ปิยนุช และคณะ, 2541 ; ปิยนันท์, 2542 ; ทวี, 2542 ; สุวรรณี และคณะ, 2543a) และประสิทธิภาพของยา (ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ปิยนุช และคณะ, 2542; คำเนิน, 2544) ซึ่งเป็นวิธีทางสัตวศาสตร์ที่อาศัยกล้องจุลทรรศน์เป็นสำคัญ วิธีดังกล่าวมีความไวจำกัด ตรวจตัวอย่างเลือดได้เพียงครั้งละหนึ่งตัวอย่าง ใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างนาน เชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์ปีกแต่ละชนิดมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน จึงตรวจและแยกชนิดได้ยากมาก ผลที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการตรวจ สำหรับการตรวจด้วยวิธีทางพยาธิวิทยาจากซากและเนื้อเยื่อสัตว์ที่ตายเป็นการตรวจหาเชื้อที่อยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและเม็ดสีของมาลาเรีย (ปิยนันท์, 2542 ; คำเนิน, 2544) มักใช้วินิจฉัยกรณีที่สัตว์ตายเท่านั้นส่วนการตรวจด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์ เช่น เทคนิค PCR นั้น แม้ว่าทวี (2542) และสุวรรณีและคณะ (2543a) ได้ศึกษามาเป็นเวลาพอสมควรแล้วก็ตาม แต่ยังคงอยู่ในขั้นการศึกษาทดลอง และความไวสูงสุดที่ตรวจได้ในขณะนี้คือ ที่ระดับการติดเชื้อ 0.5% เท่านั้น (Personal communication) ในขณะนี้จึงยังไม่สามารถนำมาใช้เป็นบรรทัดฐานในการประเมินอัตราการติดเชื้อ ระดับเชื้อในกระแสเลือด ประสิทธิภาพของยา หรือแม้แต่ระบาดวิทยาของโรคได้ การพัฒนาวิธีทางซีรั่มวิทยา เช่น IFA และ ELISA จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยและเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้เพื่อการเฝ้าระวังโรคนี้เป็นอย่างยิ่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาดังกล่าวครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 9 ขั้นตอน คือ การเตรียมสัตว์ทดลอง (3.1) การเตรียมเชื้อ *P. gallinaceum* และการประเมินจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในเลือด (3.2) การเตรียมแอนติเจน (3.3) การเตรียมซีรัม (3.4) การทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณต่างๆในไก่เนื้อ เพื่อศึกษาภาวะการติดเชื้อ อัตราการตาย ภาวะโลหิตจาง และการทดสอบระดับแอนติบอดีในไก่ที่ติดเชื้อ (3.5) การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA (3.6) และวิธี ELISA (3.7) การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดี ด้วยวิธี Western blot analysis (3.8) การวิเคราะห์ข้อมูล (3.9)

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ที่ใช้ตลอดการทดลอง เป็นไก่เนื้อและไก่ไข่ รวมทั้งสิ้น 380 ตัว แบ่งใช้ตามลักษณะงานดังนี้

3.1.1 ไก่ไข่พันธุ์ Babcock B380 เพศผู้ ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย จำนวนที่ใช้ตลอดการทดลอง รวม 200 ตัว โดยใช้ในการผ่านเชื้อต่อเนื่องครั้งละ 5 ตัว ตามวิธีในข้อ 3.2.2 ไก่ทั้งหมดนำมาเลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน และนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเมื่อมีอายุ 2-12 สัปดาห์

3.1.2 ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb คละเพศ อายุ 14 วัน จำนวน 30 ตัว ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย เพื่อเตรียมแอนติเจน ในการทดลองที่ 3.6, 3.7 และ 3.8 ครั้งละ 10 ตัว

3.1.3 ไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres คละเพศ จำนวนรวม 150 ตัว แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 จำนวน 30 ตัว ที่อายุ 2-3 สัปดาห์ นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเชื้อมาลาเรียเพื่อใช้ในการทดลองที่ 3.5 ตามข้อ 3.2.2 ส่วนที่ 2 จำนวน 120 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มอายุ กลุ่มอายุละ 40 ตัว นำมาเลี้ยงตั้งแต่อายุ 1, 11 และ 21 วัน และเมื่อไก่มีอายุ 10, 20 และ 30 วัน จึงใช้เพื่อการทดลองที่ 3.5

ไก่ที่ใช้ทั้งหมดตามข้อ 3.1.1-3.1.3 เลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองชั้น 8 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ช่างกรงไว้ในห้องที่กรุผนังและและคลุมกรงด้วยมุ้งผ้า เพื่อป้องกันไม่ให้ยุงกัด ให้กินน้ำและอาหารสำเร็จรูป และทำวัคซีน ตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ (จิโรจ, 2544)

3.2 การเตรียมเชื้อ *P. gallinaceum* และการประเมินจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในเลือด

3.2.1 เชื้อที่ใช้ตลอดการทดลอง คือ *P. gallinaceum* สายพันธุ์ MN 2543 ของหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เชื้อนี้มีการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง โดยผ่านเชื้อเข้าในไก่ไขทุก 2 สัปดาห์ และผ่านเชื้อเข้ายุงลาย *Aedes aegypti* Liverpool strain ทุก 6 เดือน เพื่อให้ความรุนแรงและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อคงที่ (Garnham, 1966)

3.2.2 การผ่านเชื้อหรือการเพาะเลี้ยงเชื้อในไก่ เจาะเลือดไก่ที่มีระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือดสูงกว่า 50% จากเส้นเลือดดำที่คอ ปริมาตร 1.0-2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับ Heparin 5,000 IU ฉีดเข้าใต้ผิวหนังไก่บริเวณคอ ใช้เลือดปริมาตร 0.2-0.5 มิลลิลิตร ต่อไก่ 1 ตัว ทำการผ่านเชื้อให้ไก่ในข้อ 3.1.1 และ 3.1.3 ด้วยวิธีเช่นนี้ ครั้งละ 5 ตัว ทุก 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อ 5 วัน เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ปีก ทุก 2 วัน นำมาป้ายสไลด์ ย้อมสี ตรวจหาและประเมินระดับเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2.3 เมื่อตรวจพบว่าเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงกว่า 50% จึงเก็บเลือดเพื่อนำไปผ่านเชื้อเข้าไกรุ่นใหม่เช่นเดิมต่อไป

3.2.3 การตรวจหาเชื้อ การประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด และการคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อต่อเลือด 1 มิลลิลิตร

3.2.3.1 การตรวจหาและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด (%Parasitemia) ตามวิธีของ ทวี (2542) ใช้เข็มเบอร์ 23 เจาะเส้นเลือดที่ปีก นำเลือดมาป้ายบนแผ่นสไลด์เพื่อทำฟิล์มเลือดบาง และย้อมด้วยสียิมซ่า 10% ตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า และนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจากจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1,000 เม็ดเลือดแดง และประเมินค่าร้อยละของระดับเชื้อในกระแสเลือด โดยคำนวณจากสูตร

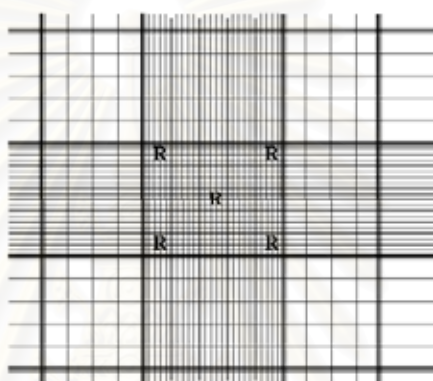
$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.3.2 การคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (total red cell count) ตามวิธีของ กนกนาถ (2525) โดยใช้เลือดที่ผสม Heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัว ดูดเลือดด้วย red blood cell count pipette ปริมาตร 0.5 ส่วน และน้ำยา Gower's solution 100 ส่วน ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมหยดลงในสไลด์ชนิดที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือด (hemocytometer) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์

แสงสว่าง กำลังขยาย 10 เท่า ตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ในตาราง 5 ตำแหน่ง (R) ดังรูปที่ 3.1
คำนวณค่า total red cell count จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{Total red cell count (1 ul)} &= \text{Actual cell count} \times \text{Dilution correction factor} \times \text{Volume correction factor} \\ &= \text{Actual cell count} \times 200 \times 50 \\ &= \text{Actual cell count} \times 10^4 \end{aligned}$$

ดังนั้น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่นับได้ $\times 10^7$ เซลล์ และเมื่อนำมาคูณด้วย %Parasitemia ค่าที่ได้เป็นจำนวนของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ต่อ เลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.1 แสดงตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดของตาราง hemocytometer

R = ตำแหน่งที่ใช้นับเม็ดเลือดแดง

3.2.3.3 การหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume, PCV) และประเมินภาวะโลหิตจาง เจาะเลือดที่ปักตามวิธีข้อ 3.2.3.1 ใช้หลอด Hematocrit ดูดเลือด บั่นด้วย Hematocrit centrifuge ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที วัดค่า PCV โดยใช้ Hematocrit reader บั่นที่กผล และประเมินภาวะโลหิตจาง ตามเกณฑ์มาตรฐาน ค่า PCV ของเลือดไก่ที่ต่ำกว่า 24% ถือว่าไก่มีภาวะโลหิตจาง (Malden *et al.*, 1979 ; Goodwin *et al.*, 1992)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum*

แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ มี 2 แบบ คือ แบบที่ 1 แอนติเจนเป็น intact *Pg* infected rbc เตรียมไว้บนสไลด์เพื่อทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี IFA ตามข้อ 3.6 แอนติเจนแบบที่ 2 เป็น Crude *Pg* antigen ที่เตรียมโดยบดเชื้อจนละเอียด เพื่อให้ทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ตามข้อ 3.7 และ Western blot analysis ตามข้อ 3.8

3.3.1 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียเพื่อการทดสอบด้วยวิธี IFA

(ตามวิธีของ Manawadu and Voller, 1978)

ไ้จากข้อ 3.1.2 จำนวน 10 ตัว นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ตามข้อ 3.2.2 จนกระทั่งระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงประมาณ 80% จะะเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับ Heparin 5,000 IU นำไปปั่นด้วยความแรง 1,157xg นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดชั้นพลาสมาและชั้นเม็ดเลือดขาวทิ้ง นำตะกอนเม็ดเลือดแดงมาล้างด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 ปั่นด้วยความแรง 1,157xg นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ครั้ง ก่อนเติมสารละลาย PBS ที่มีส่วนผสมของ Bovine Serum Albumin (BSA) 3.5% ลงในตะกอนเม็ดเลือดแดง อัตราส่วน 2:1 เขย่าให้เข้ากัน ดูดมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด กลายเป็นฟิล์มเลือดบาง ทิ้งให้แห้ง แขนใน acetone ที่เย็นจัด นาน 5 นาที ทิ้งให้แห้ง หุ้มด้วยกระดาษทิชชูและแผ่นฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองตามข้อ 3.6

3.3.2 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียเพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ Western blot analysis

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในไ้จากข้อ 3.1.2 จำนวน 20 ตัว ตามวิธีในข้อ 3.2.2 เมื่อระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงกว่า 80% นำมาใช้ในการเตรียมแอนติเจน ตามขั้นตอนดังนี้

3.3.2.1 การเตรียมตะกอนเม็ดเลือดแดง (ตามวิธีของ Andreasen and Latimer, 1989 ; Latimer *et al*, 1989) เริ่มจากการแยกเม็ดเลือดออกเป็นชั้นด้วยวิธี Ficoll-paque discontinuous gradients โดยใช้ Histopaque[®] (Sigma) ที่มีความหนาแน่น 1.119 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นกันกรวย ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม Ficoll-paque (Amersham Pharmacia Biotech AB) ที่มีความหนาแน่น 1.077 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไป และเติมเลือด ปริมาตร 1.5 มล. ลงที่ชั้นบนสุด นำไปปั่นด้วยความแรง 2,057xg ด้วย swinging bucket rotor (Varifuge 20 RS ; Heraeus sepatech) นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดูดชั้นเม็ดเลือดทุกชั้น แต่ละชั้นแยกใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1,157xg

นาน 5 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง ดูดตะกอนปริมาตรเล็กน้อยมาทำฟิล์มเลือดบาง และย้อมด้วยสียิมซ่า 10 % นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.3.2.2 เติม PBS pH 7.4 ลงในตะกอนเลือด ให้มีปริมาตรรวม 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ปั่นล้าง 3 ครั้ง ที่ความแรง 1,157xg นานครั้งละ 5 นาที ตะกอนที่ได้นำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน และนำออกมาตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก ดูดส่วนที่อยู่ก้นหลอดเพียงเล็กน้อยนำไปหยดบนสไลด์ ทำฟิล์มเลือดบางและย้อมด้วยสียิมซ่า 10 % ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เติม PBS pH 7.4 ลงในหลอดที่มีตะกอนเลือดจนกระทั่งมีปริมาตรรวม 1.5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปปั่นแยกเชื้อตามวิธีในข้อ 3.3.2.3

3.3.2.3 การแยกเชื้อออกจากส่วนประกอบอื่นของเซลล์เม็ดเลือดแดง ใช้วิธี Ficoll-paque discontinuous gradients โดยใช้ Histopaque® (Sigma) และทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 ดูดทิ้งชั้นของ hemoglobin, cytosol และนิวเคลียส (บางส่วน) และดูดเก็บชั้นของเชื้อและนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง (บางส่วนที่มีเชื้อเกาะติดอยู่) นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.2.4 ปั่นล้างส่วนของเชื้อและนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงบางส่วนที่มีเชื้อเกาะติดอยู่ 3 ครั้ง ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.2 ตะกอนที่ได้นำมาเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ก่อนนำออกมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 เท่าของตะกอน ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ เปลี่ยนใส่หลอดทดลองก้นกรวย ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.3.2.5 เชื้อที่เตรียมได้ตามข้อ 3.3.2.4 นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Sonicator (Vibracell) ที่ Amplitude 40% ครั้งละ 2 วินาที หยุด 2 วินาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปั่นด้วยความแรง 41,657xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดูดเก็บสารละลายส่วนบน หาปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 3.3.2.6 และนำไปใช้เป็น crude *Pg* antigen โดยแบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้สำหรับการทดสอบในข้อ 3.7 และ 3.8

3.3.2.6 การตรวจหาปริมาณโปรตีนของ crude *Pg* antigen ทำตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน ปริมาณที่ใช้ คือ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร crude *Pg* antigen ที่เตรียมในข้อ 3.3.2.5 นำมาทำให้เจือจาง 2 เท่า ใช้ BSA, crude *Pg* antigen และ blank ปริมาตรอย่างละ 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมสารละลายต่างทองแดง (Alkaline copper solution) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายฟอลินซีโอคัลเตอว์ (Folin-Ciocalteu) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของโปรตีนใน crude *Pg* antigen จากกราฟมาตรฐาน

3.4 การเตรียมซีรัม

3.4.1 วิธีเตรียมซีรัม

ซีรัมทุกตัวอย่างในข้อ 3.4.2 เตรียมโดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ ปริมาตร 1-3 มิลลิลิตร ทิ้งให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (spectrafuge, Labnet) นาน 5 นาที ดูดซีรัม เก็บใส่หลอด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เพื่อการทดลองในข้อ 3.6, 3.7 และ 3.8

3.4.2 ซีรัมไก่ที่ใช้ในการทดสอบ

แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ ซีรัมอ้างอิง ซีรัมของไก่ทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณต่างๆ และซีรัมของไก่ที่ติดเชื้ออื่นนอกเหนือจาก *P. gallinaceum*

3.4.2.1 ซีรัมอ้างอิง ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

ก. *Pg immune* (PI) sera จำนวน 26 ตัวอย่าง เตรียมจากไก่ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ตามข้อ 3.1.1 และรอดชีวิต โดยระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงในระยะแรก และต่อมาเชื้อลดต่ำลงจนกระทั่งตรวจไม่พบเชื้อจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า นาน 2 สัปดาห์

ข. Non-infected (NI) sera จำนวน 10 ตัวอย่าง เตรียมจากไก่ในข้อ

3.1.1 อายุ 1 เดือน ที่ไม่เคยได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* หรือเชื้อชนิดอื่น

3.4.2.2 ซีรัมของไก่ทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณต่างๆ เตรียมจากไก่เนื้อ อายุ 10, 20 และ 30 วัน จากข้อ 3.1.3 จำนวนรวม 120 ตัว ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.5.1 โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

3.4.2.3 ซีรัมไก่ไขในฟาร์มที่มีประวัติการระบาดของโรคมาลาเรีย และตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด เก็บตัวอย่างจากไก่ที่มีอาการอุจจาระเขียว หน้าและหงอนซีด จำนวน 67 ตัวอย่าง

3.4.2.4 ซีรัมของไก่ที่มีการติดเชื้ออื่น

ก. ซีรัมจากไก่ไข่ เพศผู้ อายุ 2 สัปดาห์ ที่ได้รับเชื้อบิด *Eimeria tenella* นาน 2 สัปดาห์ จำนวน 18 ตัวอย่าง

ข. ซีรัมจากไก่พื้นเมือง พันธุ์ผสม ไม่ทราบอายุและที่มา จากตลาดสัตว์ปีกคลองเตย กรุงเทพมหานคร ที่ตรวจพบเชื้อ *Leucocytozoon sabrazesi* ในกระแสเลือดและตรวจอุจจาระพบไข่ของหนอนพยาธิหลายชนิด เช่น สกุล *Capillaria*, *Ascaridia*, *Heterakis* พยาธิกลุ่ม *Spirurids* และพยาธิตัวตืด จำนวน 4 ตัวอย่าง

ค. ซีรัมจากไก่ไข่ เพศผู้ อายุ 10 สัปดาห์ ที่ได้รับเชื้อไวรัส Newcastle นาน 3 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.5 การทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณต่างๆในไก่เนื้อ เพื่อศึกษาภาวะการติดเชื้อ อัตราการตาย ภาวะโลหิตจาง และการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ

3.5.1 ไก่ที่ใช้ในการทดลองเป็นไก่เนื้อ ตามข้อ 3.1.3 จำนวน 120 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม อายุ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มละ 40 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว โดยได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ครั้งเดียว ฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่ปีก ดังนี้

- กลุ่มย่อยที่ 1 กลุ่มควบคุม ทุกตัวไม่ได้รับเชื้อ ฉีด PBS pH 7.4 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร
- กลุ่มย่อยที่ 2 ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 1×10^1 infected rbc
- กลุ่มย่อยที่ 3 ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 1×10^3 infected rbc
- กลุ่มย่อยที่ 4 ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 1×10^6 infected rbc

3.5.2 เชื้อที่ฉีดเข้าไก่ทดลองในข้อ 3.5.1 ใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะเวลาที่อยู่ในกระแสเลือดเตรียมตามวิธีการในข้อ 3.2.3.1 นับจำนวนเชื้อในเลือดตามวิธีการในข้อ 3.2.3.2 และจำนวนเชื้อที่ฉีดทำให้เจือจางด้วย PBS pH 7.4

3.5.3 บันทึกอัตราการตายของไก่ทุกกลุ่มทุกวัน

3.5.4 เก็บตัวอย่างเลือดตามวิธีในข้อ 3.2.3.1 และตัวอย่างซีรัมตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยเก็บจากไก่ทุกตัวทุกกลุ่ม ทุก 3 วัน ติดต่อกัน เป็นเวลานาน 30 วัน

3.5.5 ศึกษาอัตราการติดเชื้อ และระดับเชื้อในกระแสเลือด โดยทำฟิล์มเลือดบางและย้อมสียิมซ่า 10% ตรวจสอบเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ประเมินอัตราการติดเชื้อ และระดับเชื้อในกระแสเลือดตามวิธีการในข้อ 3.2.3.1

3.5.6 ศึกษาภาวะโลหิตจาง โดยหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพื่อประเมินภาวะโลหิตจางตามวิธีในข้อ 3.2.3.3 ไก่ที่มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ต่ำกว่า 24% ถูกประเมินว่ามีภาวะโลหิตจาง (Malden et al., 1979 ; Goodwin et al., 1992)

3.5.7 ทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA, ELISA และ Western blot analysis และประเมินผลการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ

3.6 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA

3.6.1 สไลด์แอนติเจนซึ่งเตรียมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามข้อ 3.3.1 นำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที ผึ่งให้แห้ง ใช้น้ำยาทาเล็บขีดแบ่งตารางลงบนฟิล์มสไลด์แอนติเจน จำนวน 10 ช่อง ต่อ 1 สไลด์ ดังรูปที่ 3.2 และทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนนำไปใช้ทดสอบตามข้อ 3.6.2

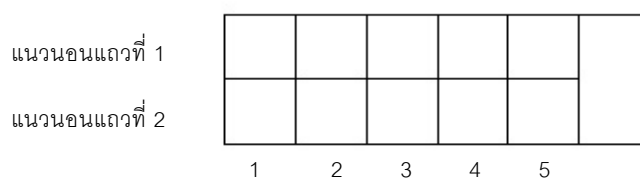
3.6.2 ใช้เทคนิค IFA ทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ตามขั้นตอน โดยเริ่มจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera และ FITC (Fluorescein conjugated rabbit affinity purified antibody to chicken IgG) จากนั้นจึงทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อตามข้อ 3.4.2.2, 3.4.2.3 และ 3.4.2.4 ควบคู่กับ NI และ PI sera และ FITC ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.6.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera

ก. เจือจาง NI และ PI sera ด้วย PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625 และ 1/78125

ข. นำสไลด์แอนติเจนจากข้อ 3.6.1 จำนวน 2 แผ่น แผ่นที่ 1 ใช้สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI sera และแผ่นที่ 2 ใช้สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PI sera นำ sera ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่องของตารางสไลด์แอนติเจนตามลำดับความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำ FITC ที่เจือจาง 1/100 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่องของตาราง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที การทำแต่ละขั้นตอนต้องระวังไม่ให้สไลด์แห้ง ใช้สารละลาย PBS-glycerine 50% หยดลงบน สไลด์ปิดด้วย cover glass ขนาด 24x60 ตารางมิลลิเมตร ศึกษาการเรืองแสงของเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (BH2-RECA) กำลังขยาย 40 เท่า ทุกตัวอย่างทำซ้ำ 8 ครั้ง

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera ประเมินจากผลการเรืองแสง โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ตำแหน่งที่ไม่พบการเรืองแสงบนสไลด์ของ NI ที่เจือจาง ในขณะที่พบการเรืองแสงได้ชัดเจนมากใน PI sera



รูปที่ 3.2 ภาพแสดงการแบ่งตารางบนสไลด์ เพื่อใช้ในการทดสอบ IFA

3.6.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC

ทำด้วยวิธีเช่นเดียวกับการทดสอบหาความเข้มข้นของ NI และ PI sera ตามข้อ 3.6.2.1 ใช้ NI และ PI sera ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1/625 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่องของตารางสไลด์แอนติเจนตามแนวนอนแถวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใช้ FITC ที่เจือจางด้วย PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 และ 1/100000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในช่องที่ 1-5 ตามลำดับ ทั้ง 2 แถว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยดสารละลาย PBS-glycerine 50% ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass ทุกตัวอย่างทำซ้ำ 5 ครั้ง

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC ประเมินจากผลการเรืองแสง โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ตำแหน่งที่ไม่พบการเรืองแสงบนสไลด์ของ NI sera ที่เจือจาง ในขณะที่พบการเรืองแสงได้ชัดเจนมากที่สุดใน PI sera

3.6.2.3 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในซีรัมไก่ทดลอง

ซีรัมไก่ทดลองทุกตัวอย่างนำมาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125 และ 1/15625 หยดลงในแต่ละช่องของตารางสไลด์แอนติเจนตามลำดับความเข้มข้นในแนวนอน โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อช่อง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยด FITC ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1/100 ลงในทุกช่องตาราง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสไลด์ และตรวจการเรืองแสง ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.1 ในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ซีรัมไก่ทดลองทุกตัวอย่าง และทุกครั้ง ต้องใช้ NI และ PI sera ทำควบคุมเสมอ เพื่อควบคุมความถูกต้องของการทดสอบทั้ง negative และ positive control ตามลำดับ

3.6.2.4 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในซีรัมไก่จากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย และไก่ติดเชื้อื่น ทำการทดสอบด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.6.2.3

3.7 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA

3.7.1 Crude *Pg* antigen ซึ่งเตรียมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามข้อ 3.3.2 นำมาทำละลายและใช้เพื่อการทดสอบในข้อ 3.7.2

3.7.2 ใช้เทคนิค ELISA (Voller, 1974) นำมาทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ตามขั้นตอน โดยเริ่มจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Crude *Pg* antigen, NI และ PI sera จากนั้นจึงทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อตามข้อ 3.4.2.2, 3.4.2.3 และ 3.4.2.4 ควบคู่กับ NI และ PI sera ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.7.3 การตรวจหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน

เจือจาง Crude *Pg* antigen ด้วย 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 ในอัตราส่วน 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 และ 1/25600 นำมาหยดลงในหลุมของ microplate (F-96 maxisorp, NUNC, Denmark) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างส่วนเกินออกด้วย PBS-Tween (0.05% Tween-20 ใน PBS pH7.4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใช้ BSA 1% ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม NI และ PI sera ที่เจือจางด้วย PBS-Tween ในอัตราส่วน 1/100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม peroxidase conjugated (Rabbit anti-chicken IgG horseradish peroxidase conjugated, Sigma) ที่เจือจางด้วย PBS-Tween ในอัตราส่วน 1/30000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid-6) Ammonium salt, Sigma) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เติม 1% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำไปอ่านค่า absorbance (Optical Density, OD) ที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader (Titertek Multiskan, MCC) การทดสอบนี้ใช้แอนติเจนแต่ละความเข้มข้น จำนวน 16 หลุม และทุกตัวอย่าง ทำซ้ำ 5 ครั้ง

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน ประเมินจากการนำซีรัมของ NI และ PI sera มาทดสอบ พบว่าค่าเฉลี่ย OD ที่ได้มีความแตกต่างกันเป็นอัตราส่วนเฉลี่ย 3-6 เท่า จากการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมและเลือกใช้ คือ 1/400

3.7.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera ทำได้เช่นเดียวกับการตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน ตามข้อ 3.7.3 ใช้แอนติเจนในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1/400 หยดลงใน microplate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างส่วนเกินออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม BSA 1% ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

เติม NI และ PI sera ที่เจือจาง ด้วย PBS-Tween ในอัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1000 และ 1/10000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม peroxidase conjugated เจือจาง 1/30000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม ABTS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.01% H_2O_2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เติม 1% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera แต่ละความเข้มข้นทำจำนวน 12 หลุม และแต่ละตัวอย่างทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของของซีรัม ประเมินจากค่าเฉลี่ย OD ของ NI และ PI sera มีความแตกต่างกันเป็นอัตราส่วนเฉลี่ย 3-5 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1/100

3.7.5 การหาค่า cut off ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA

ทำการทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ crude Pg antigen NI และ PI sera peroxidase conjugated ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร วิธีการทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.4

การกำหนดค่า cut off ของการทดสอบ คำนวณได้จากผลรวมของค่าเฉลี่ย OD ของ NI sera และ 4 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($X \pm 4SD$) สำหรับการกำหนดค่าบวกและค่าลบ ประเมินได้จากค่า cut off โดยการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ให้ผลบวก ต้องมีค่า OD มากกว่าหรือเท่ากับค่า cut off และถ้าค่า OD ที่ได้ต่ำกว่าแสดงว่าผลการทดสอบเป็นผลลบ (Smith, 1995)

3.7.6 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในซีรัมไก่ทดลอง

การทดสอบด้วยวิธี ELISA ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ซีรัมไก่ทดลองทุกตัวอย่าง และทุกครั้ง ต้องใช้ NI และ PI sera เป็น negative และ positive control ตามลำดับ เพื่อควบคุมความถูกต้องของการทดสอบ

จากการทดสอบข้อ 3.7.3 และข้อ 3.7.4 แอนติเจนความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1/400 NI และ PI sera และซีรัมของไก่ทดลองที่เจือจางในอัตราส่วน 1/100 ทำการทดสอบตามขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบหาความเข้มข้นของ crude *Pg* antigen, NI และ PI sera

3.8 การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีจากซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี Western blot analysis

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนแอนติเจน

Crude *Pg* antigen จากข้อ 3.3.2 ความเข้มข้น 6.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปผสมกับบัฟเฟอร์ของตัวอย่าง (2X sample solubilizing solution) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ที่ทิ้งไว้จนกระทั่งเย็น นำไปปั่นที่ความแรง 1,157xg นาน 5 นาที นำไปใช้ในการแยกโปรตีนตามข้อ 3.8.2

3.8.2 การแยกโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.8.2.1 การเตรียมเจล

ก. การเตรียม separating gel 12 % เตรียมโดยใช้ Acrylamide 30% 4 มิลลิลิตร separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) 2.5 มิลลิลิตร 10% SDS 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 3.35 มิลลิลิตร 10% ammonium persulphate 0.25 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเทลงใน Gel cast และเติมน้ำกลั่นประมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อปิดผิวบนของเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที รอให้เจลแข็งตัว

ข. การเตรียม Stacking gel 5 % เตรียมโดยใช้ acrylamide 30 % 0.8 มิลลิลิตร stacking gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 6.8) 1.45 มิลลิลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตร และ 10% ammonium persulphate 25 ไมโครลิตร และ TEMED 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหลังจาก separating gel แข็งตัวดีแล้ว เทน้ำส่วนบนออกให้หมด แล้วเทส่วนผสมของ Stacking gel ลงบน separating gel ใช้หวี (comb) เสียบลงไปในด้านบนของชุดเตรียมเจล ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที หลังจากที่เจลแข็งตัวดีแล้ว นำแผ่นเจลวางลงใน Clamp assembly ตามแนวตั้ง ของเครื่อง electrophoresis (Mini-PROTEAN 3 Cell[®], Bio-Rad) ทั้ง 2 ข้าง เติม

Electrode buffer ในช่องกลางจนท่วมแนวบนของแผ่นเจล และเติมลงในช่องด้านข้างให้สูงประมาณ 3 เซนติเมตร

3.8.2.2 การศึกษาโปรตีนแอนติเจน

ก. การแยกโปรตีนแอนติเจน โปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 22-205 kDa จำนวน 1 ตัวอย่าง และใช้ Crude *Pg* antigen ที่เตรียมในข้อ 3.8.1 แต่ละตัวอย่างนำมาหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล ตัวอย่างละ 15 ไมโครลิตร แยกโปรตีนแอนติเจน separating gel 12 % และ Stacking gel 5 % โดยใช้ electrode buffer และกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 65 นาที

ข. การศึกษาแถบโปรตีน แผ่นเจลที่แยกโปรตีนแอนติเจน ตามข้อ ก. นำมาย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 0.5% นาน 1 ชั่วโมง เทสีออกและเติมสารละลาย Destaining solution เพื่อกำจัดส่วนเกินของสีออก แช่และล้างเจลเป็นระยะจนแถบโปรตีนปรากฏชัดเจน และเห็นสีพื้นหลังใส บันทึกภาพ ทำให้เจลแห้ง วัดขนาดและน้ำหนักของแถบโปรตีนของ Crude *Pg* antigen โดยหาระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในเจลเดียวกัน

3.8.3 การใช้เทคนิค Western blot

แผ่นเจลที่แยกโปรตีนแอนติเจนของ Crude *Pg* antigen และยังไม่ย้อมสี ในข้อ 3.8.2.2 (ก.) นำมา blot ลงบนแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ด้วยชุด Blot (Mini Trans-Blot, Bio-Rad) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 350 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้นำมาย้อมสี Ponceau S solution (Sigma) นาน 5 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร แถบโปรตีนที่เห็นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ล้างสีทั้งหมดออกด้วย PBS-Tween แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน blocking solution ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้แผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดสอบ

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น strip แช่ด้วย PBS-Tween ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า นาน 5 นาที เททิ้ง เติมซีรัมที่เจือจางด้วย PBS-Tween ในอัตราส่วน 1/100 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง strip ด้วย PBS-Tween ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า peroxidase conjugate ที่เจือจางด้วย PBS-Tween ในอัตราส่วน 1/5000 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง strip ด้วย PBS-Tween ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เช่นเดิม แช่ strip ใน 2,6-dichloroindophenol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จนสังเกตเห็นแถบสี หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง ขนาด

ของแถบโปรตีนแอนติเจนบน strip ของไนโตรเซลลูโลสนำมาเปรียบเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐานที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเดียวกัน (Weber and Osborn, 1969)

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณหา Sensitivity, Specificity, Accuracy Predictive value positive test และ Predictive value negative test ของการทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA ตามวิธีของ Smith (1995)

% Parasitemia	Test		Total
	+	-	
	Positive	Negative	
+	A	B	A+B
Positive	True positive	False positive	
-	C	D	C+D
Negative	False negative	True Negative	
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

$$\text{Sensitivity} = [A / (A+C)] \times 100$$

$$\text{Specificity} = [D / (B+D)] \times 100$$

$$\text{Accuracy} = [(A+D) / (A+B+C+D)] \times 100$$

$$\text{Predictive value positive test} = [A / (A+B)] \times 100$$

$$\text{Predictive value negative test} = [D / (C+D)] \times 100$$

สถาบันวิจัยประชากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อ คณะเพศ จำนวน 120 ตัว 3 กลุ่มอายุ คือ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มละ 40 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว โดยฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดในปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ เพื่อศึกษา ภาวะการติดเชื้อ อัตราการตาย ภาวะโลหิตจาง และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในไก่ที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี IFA ELISA และโปรตีนแอนติเจนของเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot analysis มีดังนี้

4.1 อัตราการติดเชื้อและอัตราการตาย

4.1.1 อัตราการติดเชื้อ

จากการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดทุก 3 วันติดต่อกันจนถึงวันที่ 30 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลปรากฏว่าไก่เนื้ออายุ 10 วัน และอายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ซึ่งได้รับเชื้อปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc มีอัตราการติดเชื้อ 0%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ ส่วนไก่เนื้ออายุ 30 วัน ไม่พบอัตราการติดเชื้อตลอดการทดลอง อัตราการติดเชื้อของไก่อายุ 10 และ 20 วัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับไก่กลุ่มอายุ 30 วัน (ตารางที่ 4.1)

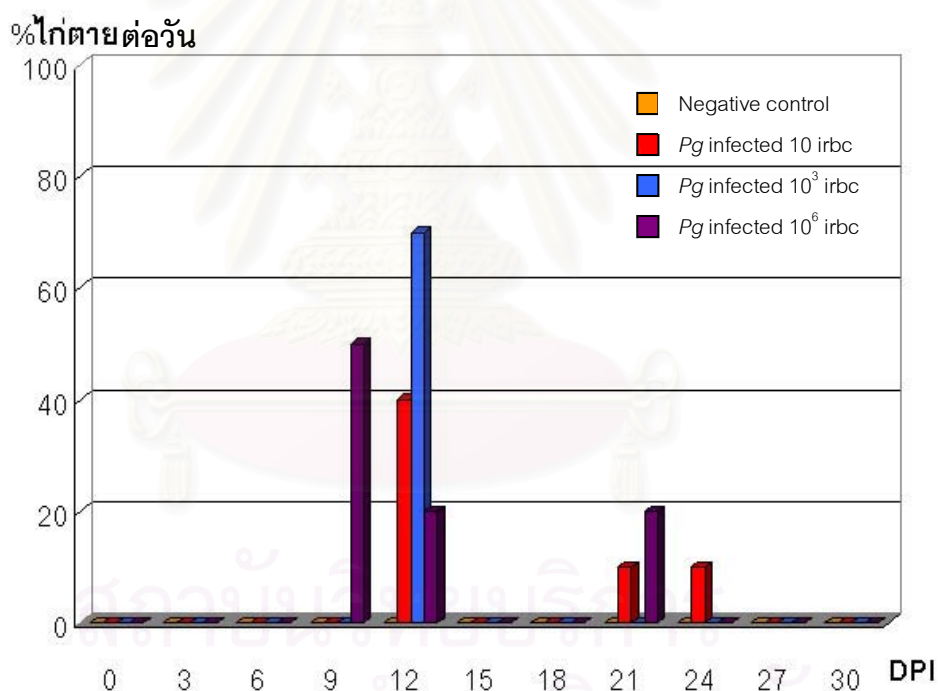
ตารางที่ 4.1 ร้อยละของการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อ คณะเพศ อายุ 10, 20 และ 30 วัน (กลุ่มอายุละ 40 ตัว) กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc และติดตามผลเป็นเวลานาน 30 วัน

ปริมาณเชื้อ (infected rbc)	อายุไก่ (วัน)		
	10	20	30
0	0 ^{ax}	0 ^{ax}	0 ^{ax}
10	100 ^{by}	100 ^{by}	0 ^{ax}
10 ³	100 ^{by}	100 ^{by}	0 ^{ax}
10 ⁶	100 ^{by}	100 ^{by}	0 ^{ax}

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.1.2 อัตราการตาย

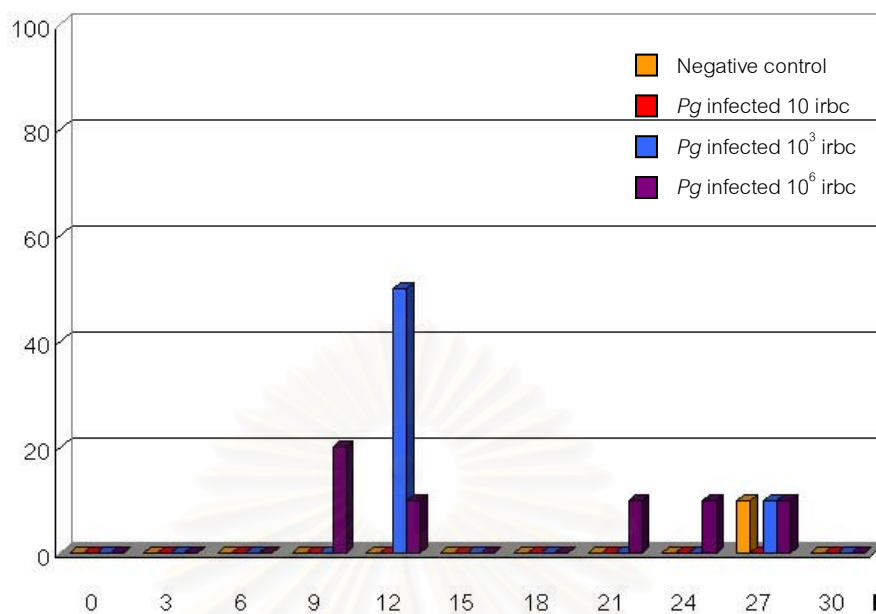
เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ไก่อายุ 10 วัน พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 100% อัตราการตายรวม 73.33% (22/30 ตัว) โดยไก่กลุ่มย่อยที่ 2-4 ที่ได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 infected rbc อัตราการตายสูง 60, 70 และ 90% ตามลำดับ หลังจากได้รับเชื้อไก่ตายมากที่สุดในวันที่ 12(4/10 ตัว) 12(7/10 ตัว) และ 9(5/10 ตัว) (รูปที่ 4.1) ส่วนไก่อายุ 20 วัน อัตราการติดเชื้อ 100% เช่นกัน แต่มีอัตราการตายเพียง 40.0% (12/30 ตัว) โดยไก่กลุ่มย่อยที่ 3 และ 4 ที่ได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 infected rbc มีอัตราการตาย 60% เท่ากัน ไก่ตายมากที่สุดในวันที่ 9 (2/10 ตัว) และ 12 (5/10 ตัว) ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ขณะที่ไก่กลุ่มควบคุม อายุ 10 และ 20 วัน ไม่พบการตายตลอดการทดลอง ยกเว้นในวันที่ 27 ไก่อายุ 20 วัน ตาย 10% สำหรับไก่อายุ 30 วัน ซึ่งไม่มีการติดเชื้อพบว่าในระยะก่อนสิ้นสุดการทดลองทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อมีอัตราการตาย 10-20% ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.1 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ

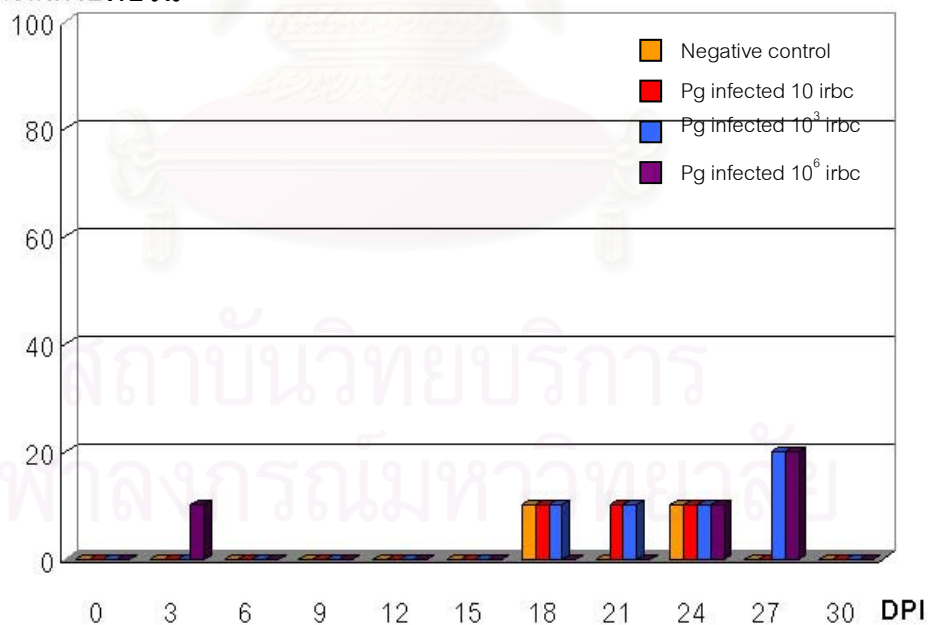
P. gallinaceum ชนิดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

%ไก่ตายต่อวัน



รูปที่ 4.2 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

%ไก่ตายต่อวัน



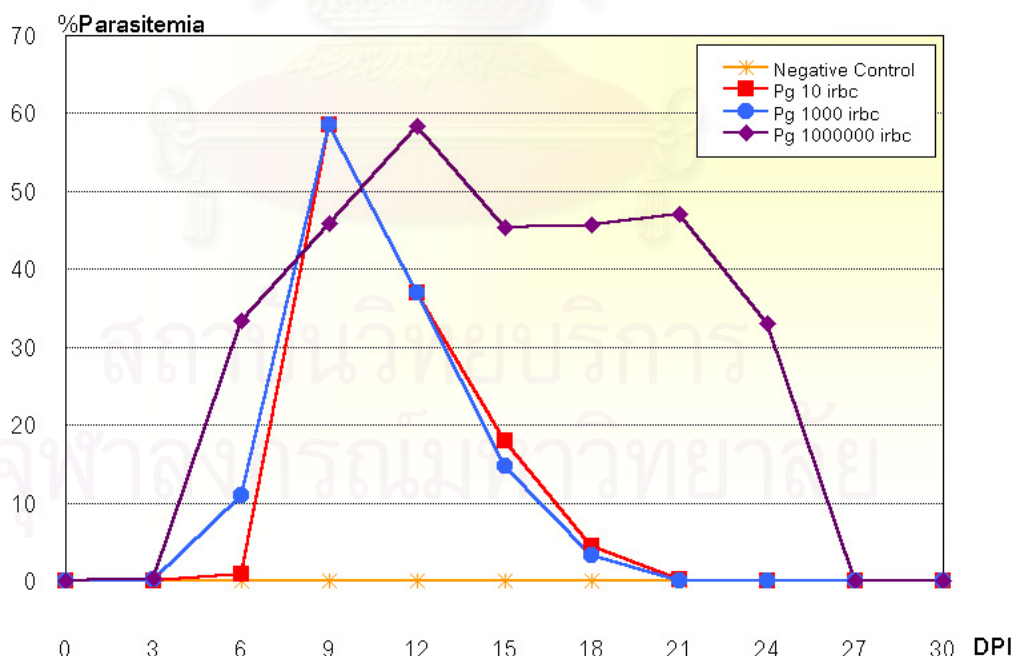
รูปที่ 4.3 ร้อยละของไก่ที่ตายต่อวันของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

4.2 ระดับเชื้อในกระแสเลือดและภาวะโลหิตจาง

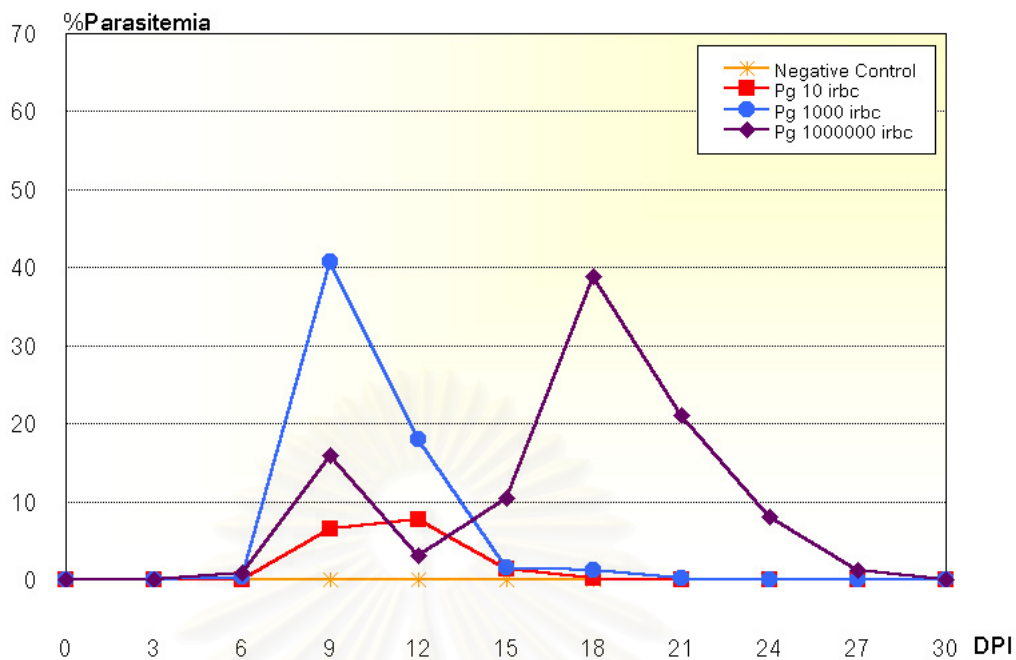
4.2.1 ระดับเชื้อในกระแสเลือด

ผลการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของไก่ที่ได้รับการฉีดเชื้อ พบว่าไก่กลุ่มอายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 2-4 ซึ่งได้รับเชื้อปริมาณ 10^0 , 10^3 และ 10^6 infected rbc เริ่มตรวจพบเชื้อในวันที่ 6, 3 และ 3 DPI ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด 0.081 ± 1.54 , 0.21 ± 0.63 และ $0.312 \pm 0.47\%$ ตามลำดับ และในวันที่ 9, 9 และ 12 DPI ตรวจพบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงสุด 58.6 ± 26.84 , 58.5 ± 13.5 และ $58.3 \pm 28.0\%$ ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ ผ1 (ภาคผนวก ก หน้า 87) ไก่กลุ่มอายุ 20 วัน เริ่มตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 6 DPI พร้อมกันทุกกลุ่มย่อย โดยไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10^0 , 10^3 และ 10^6 infected rbc ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด 0.021 ± 0.042 , 0.33 ± 0.66 และ $0.812 \pm 1.13\%$ ตามลำดับ และในวันที่ 12, 9 และ 18 DPI พบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงสุดที่ 7.71 ± 10.96 , 40.8 ± 27.57 และ $38.87 \pm 40.89\%$ ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 และ ตารางที่ ผ2 (ภาคผนวก ก หน้า 88)

ไก่ทั้งกลุ่มอายุ 10 และ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ หลังจากที่ได้รับเชื้อขึ้นสูงสุด ไก่ส่วนหนึ่งตาย ไก่ที่รอดชีวิตระดับเชื้อค่อยๆ ลดต่ำลงไม่พบจนกระทั่งตรวจไม่พบในที่สุด เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.6) สำหรับไก่กลุ่มอายุ 30 วัน ตรวจไม่พบเชื้อในไก่ทุกตัวทุกกลุ่มย่อย ตลอดการทดลอง (ตารางที่ ผ3 ภาคผนวก ก หน้า 89)



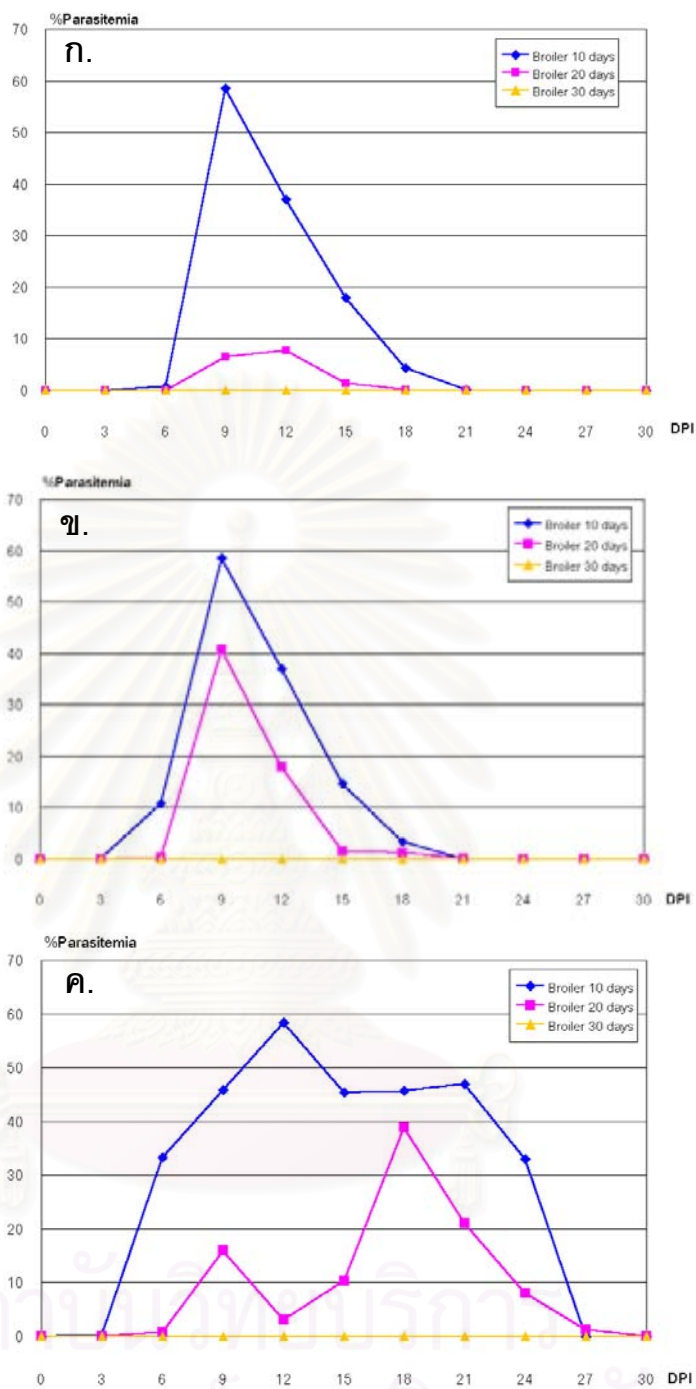
รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของเชื้อที่พบในกระแสเลือดของไก่อายุ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 2-4 ซึ่งได้รับเชื้อปริมาณ 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่อายุ 10 วัน peak ขึ้นสูงกว่าไก่อายุ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อปริมาณเดียวกัน ระดับของเชื้อที่ขึ้นสูงมีความสอดคล้องกัน ยกเว้นในกลุ่มย่อยที่ 4 ซึ่งได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc พบว่าระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นลงเป็น 2 peak คล้ายกัน เว้นแต่ peak ที่ขึ้นสูงแตกต่างกัน (รูปที่ 4.6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดในไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 และ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือด และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

ก. กลุ่มย่อยที่ 2 ไก่ได้รับเชื้อปริมาณ 10 infected rbc

ข. กลุ่มย่อยที่ 3 ไก่ได้รับเชื้อปริมาณ 10³ infected rbc

ค. กลุ่มย่อยที่ 4 ไก่ได้รับเชื้อปริมาณ 10⁶ infected rbc

4.2.2 ภาวะโลหิตจาง

ผลการตรวจหาค่า PCV และประเมินภาวะโลหิตจางของไก่ทดลองอายุ 10 วัน ปรากฏว่าในวันที่ 12 หลังจากได้รับเชื้อ พบภาวะโลหิตจางในไก่กลุ่มย่อยที่ 2-4 ที่ได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 infected rbc มีค่าเฉลี่ย PCV 21.33 ± 3.88 , 24.16 ± 6.53 และ $22.83 \pm 4.91\%$ ตามลำดับ และค่าเฉลี่ย PCV ของไก่ทั้ง 3 กลุ่มย่อยค่อยๆสูงขึ้นเป็นลำดับ จนกระทั่งอยู่ในเกณฑ์ปกติในวันที่ 27 หลังจากที่ได้รับเชื้อ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับไก่ควบคุมกลุ่มย่อยที่ 1 ที่ไม่ได้รับเชื้อ ค่าเฉลี่ย PCV อยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่พบภาวะโลหิตจาง ยกเว้นในวันที่ 24 และ 27 ของการทดลองที่มีค่าเฉลี่ย PCV $24.15 \pm 3.15\%$ ซึ่งเป็นค่าเริ่มต้นที่ประเมินว่าไก่อยู่ในภาวะโลหิตจาง สำหรับไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 พบว่าในวันที่ 18 และ 15 ของการทดลอง มีค่าเฉลี่ย PCV $25.16 \pm 2.75\%$ ซึ่งเป็นค่าปกติ ดังรูปที่ 4.7 และตารางที่ ๗ (ภาคผนวก ก หน้า 93)

ไก่เนื้ออายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 2-4 ซึ่งได้รับเชื้อ 10^3 , 10^6 และ 10^6 infected rbc ตรวจพบภาวะโลหิตจางในวันที่ 12 เช่นกัน ค่าเฉลี่ย PCV 23.45 ± 3.83 , 22.30 ± 4.89 และ $23.71 \pm 3.66\%$ ตามลำดับ ไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ค่าเฉลี่ย PCV ลดต่ำลงเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc ค่าเฉลี่ย PCV ในวันที่ 15 และ 18 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ค่าเฉลี่ย PCV ในวันที่ 15, 18 และ 30 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ภาวะโลหิตจางของไก่ที่ได้รับเชื้อทุกกลุ่มย่อยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับไก่ควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ ดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ ๘ (ภาคผนวก ก หน้า 94)

ไก่เนื้ออายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อ 10^3 , 10^6 และ 10^6 infected rbc ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของไก่ทุกตัวตลอดการทดลอง ค่าเฉลี่ย PCV อยู่ในเกณฑ์ปกติ เว้นแต่ไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc ระหว่างวันที่ 24-30 มีค่าเฉลี่ย PCV $23.0 \pm 1.75\%$ ซึ่งต่ำกว่าค่าปกติ ดังรูปที่ 4.9 ตารางที่ ๘9 (ภาคผนวก ก หน้า 95)

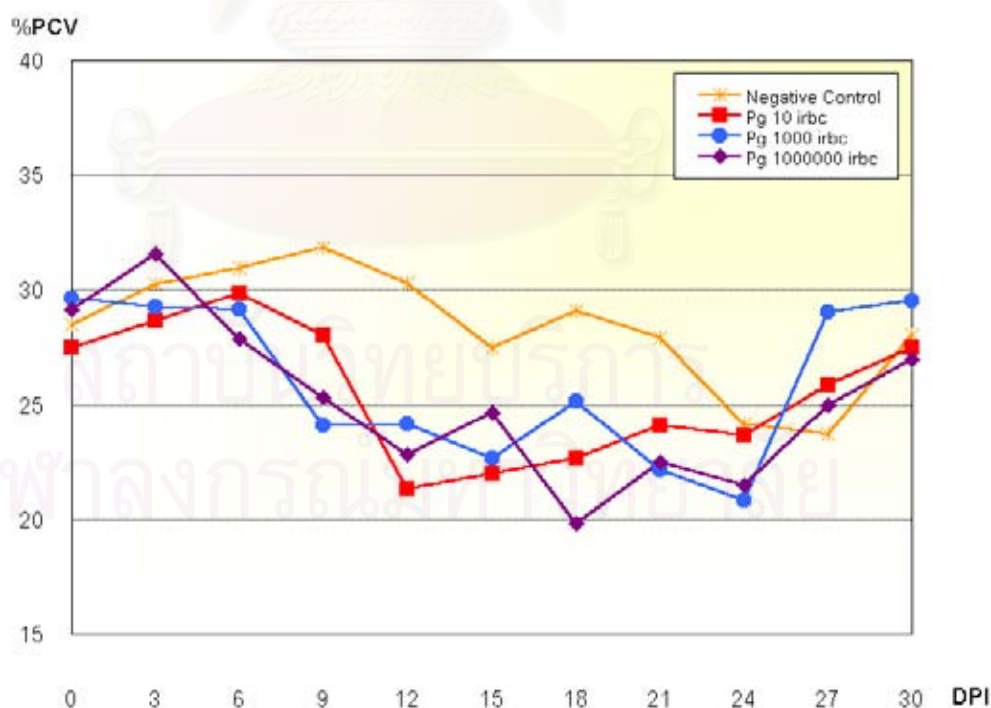
ผลจากตารางที่ 4.3 พบว่าอัตราการพบภาวะโลหิตจางในไก่อายุ 10 วัน ไก่ควบคุมกลุ่มย่อยที่ 1 ที่ไม่ได้รับเชื้อที่มีภาวะโลหิตจาง 50% ซึ่งไม่แตกต่างกับไก่กลุ่มย่อยที่ 2-4 ที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10^3 และ 10^6 ที่มีภาวะโลหิตจาง 60% และ 70% ตามลำดับ สำหรับไก่กลุ่มย่อยที่ 4 ที่ได้รับเชื้อ ปริมาณ 10^6 infected rbc มีภาวะโลหิตจางเพียง 30% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มอื่น เนื่องจากไก่ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่มีระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง ไก่จำนวนมากตายอย่างรวดเร็วก่อนที่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า PCV สำหรับไก่อายุ 20 วัน ที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10^3 , 10^6 และ 10^6 infected rbc พบภาวะโลหิตจางสูง 90%, 60% และ 80% ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อซึ่งมีภาวะโลหิตจางเพียง 10% ส่วนไก่อายุ 30 วัน ที่ได้รับการฉีดเชื้อแต่ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดตลอดการทดลอง พบว่ากลุ่มย่อยที่ 2-4 มีภาวะโลหิตจาง 10%, 80% และ 40% ตามลำดับ และไก่ควบคุมกลุ่มย่อยที่ไม่ได้รับเชื้อมีภาวะโลหิตจาง 20% โดยไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ

10^3 และ 10^6 infected rbc มีภาวะโลหิตจางแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 10 infected rbc

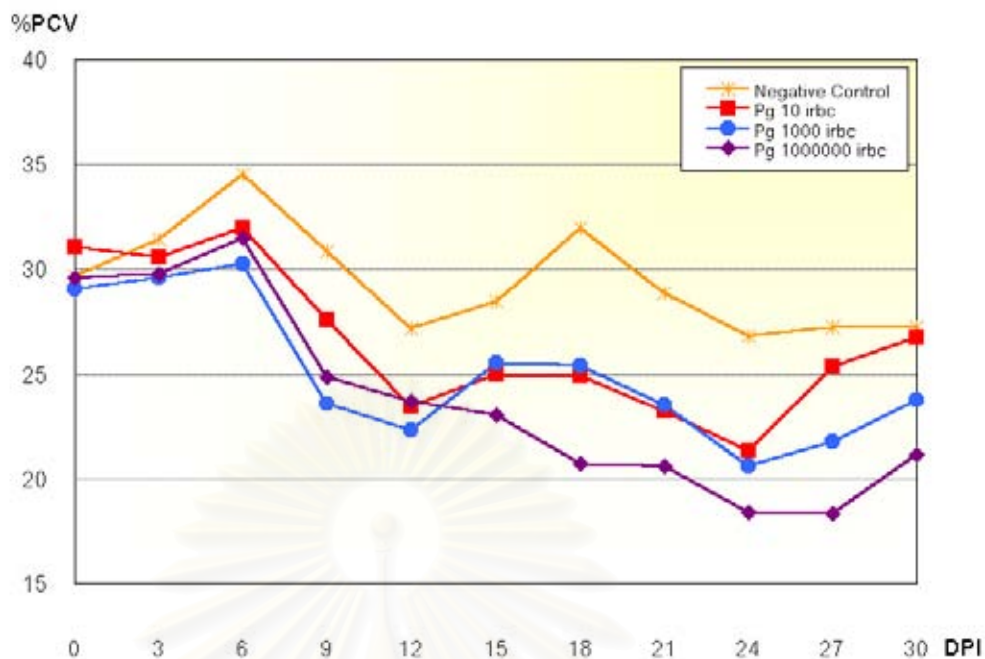
ตารางที่ 4.2 ร้อยละของไก่เนื้อ คละเพศ ที่มีภาวะโลหิตจาง (ค่า PCV ต่ำกว่า 24%) ในกลุ่มอายุ 10, 20 และ 30 วัน (กลุ่มอายุละ 40 ตัว) กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

ปริมาณเชื้อ infected rbc	อายุไก่ (วัน)		
	10	20	30
0	50 ^{ax}	10 ^{ax}	20 ^{ax}
10	60 ^{ax}	90 ^{bx}	10 ^{ay}
10^3	70 ^{ax}	60 ^{bx}	80 ^{bx}
10^6	30 ^{ax}	80 ^{by}	40 ^{bxy}

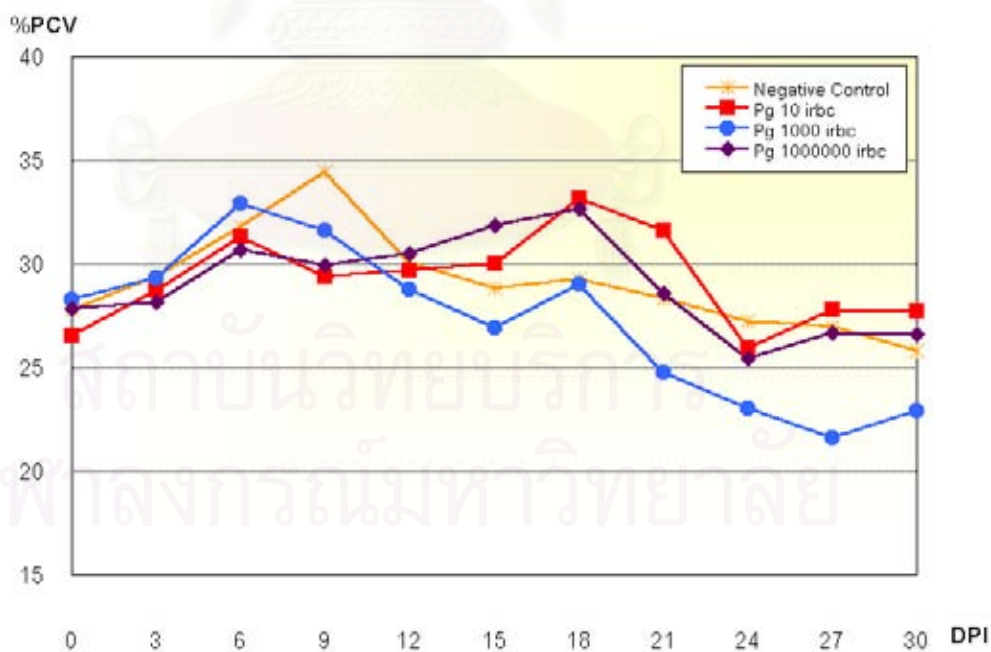
ตัวอักษรกำกับที่ต่างกััน หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.7 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.9 ค่าเฉลี่ย PCV ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

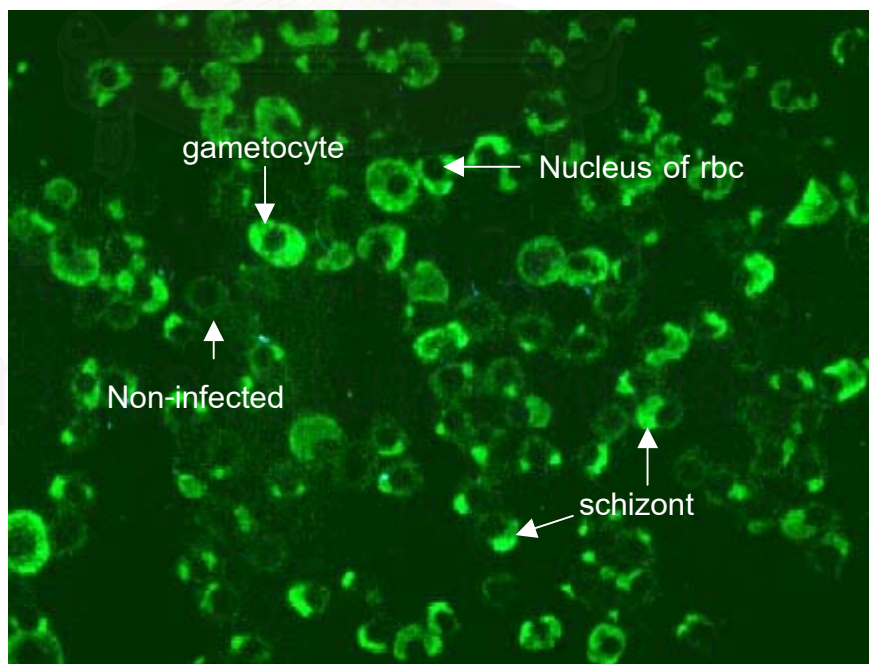
4.4 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA

4.4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera

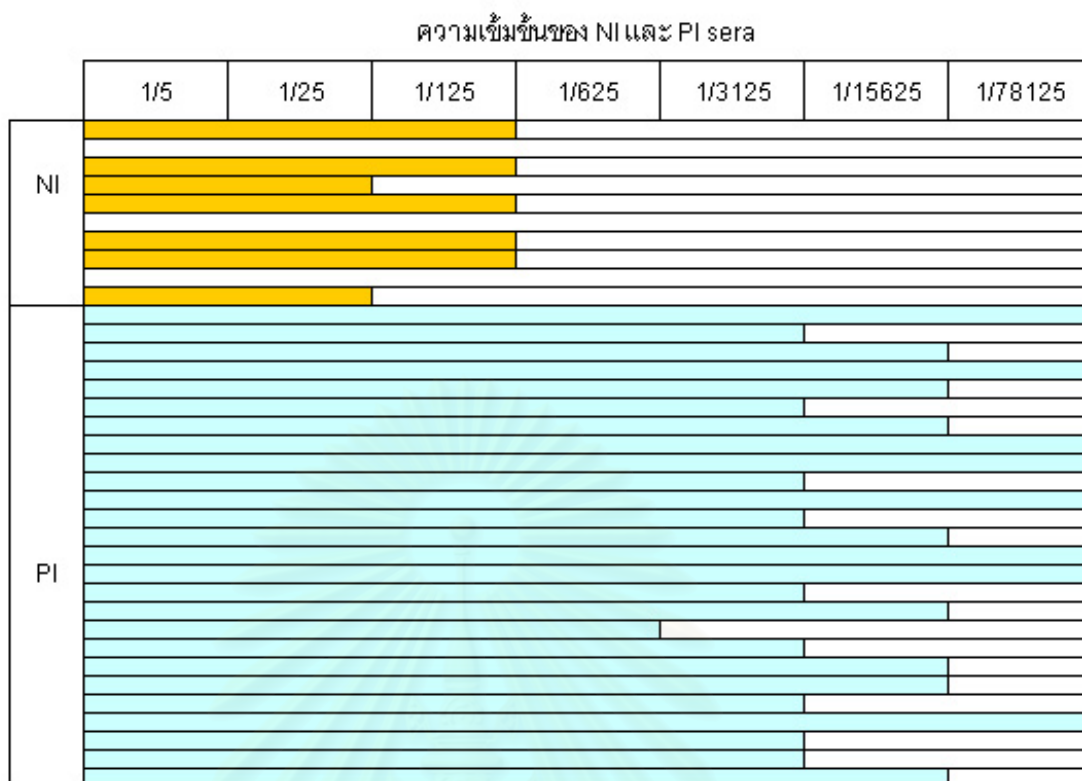
การหาความเข้มข้นของ NI และ PI sera ที่เจือจางในอัตราส่วน 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625 และ 1/78125 โดยทำการทดสอบกับสไลด์แอนติเจน และใช้ FITC ที่เจือจาง 1/100 ผลปรากฏว่าตรวจพบการเรืองแสงของเชื้อ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือดแดงระยะต่างๆ บนสไลด์แอนติเจน ลักษณะของการทดสอบด้วยวิธี IFA ที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อแสดงในรูปที่ 4.10

สำหรับการใช้ NI sera จำนวน 10 ตัวอย่างในการทดสอบ พบว่า end point ที่ให้ผลบวกมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1/5 ถึง 1/125 ส่วน PI sera จำนวน 26 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ให้ผลบวกที่ความเข้มข้นระหว่าง 1/5 ถึง 1/78125 โดย end point ที่ให้ผลบวกมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1/625 ถึง 1/78125 (รูปที่ 4.11)

ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera ในการนำมาใช้เพื่อประเมินการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทดลอง ด้วยวิธี IFA คือ 1/625 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าผลของการเรืองแสงที่พบใน NI sera ที่ใช้ทดสอบทุกตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 1/125 ฉะนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI sera ที่นำมาใช้ควบคุมการทดลองสำหรับการทดสอบและประเมินผลลบต่อการติดเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ คือ 1/625 ส่วนความเข้มข้นของ PI sera ที่นำมาทดสอบและให้ผลบวกในการเรืองแสงต่อเชื้อมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นของ NI sera มาก โดย PI sera ที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อต่ำที่สุด หรือมี end point ของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบและให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ ต่ำที่สุด คือ 1/625



รูปที่ 4.10 ผลบวกต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในการทดสอบด้วยวิธี IFA จากการเรืองแสงของเชื้อระยะต่างๆที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงบนสไลด์แอนติเจน



รูปที่ 4.11 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera แสดง end point ของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบและให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. gallinaceum* บนสไลด์แอนติเจน

4.4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC

ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC ที่เจือจางในอัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 และ 1/100000 โดยทดสอบกับ PI sera จำนวน 26 ตัวอย่าง และ NI sera จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 1/625 บนสไลด์แอนติเจน ปรากฏว่าความเข้มข้นของ FITC 1/10 และ 1/100 ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ใน PI sera 100% (26/26) ความเข้มของการเรืองแสงต่อเชื้อชัดเจนใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มข้นของ FITC 1/1000 ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อใน PI sera 15.38% (4/26) และความเข้มข้นของ FITC 1/10000 และ 1/100000 ทุกตัวอย่างของ PI sera ให้ผลลบทั้งหมด สำหรับ NI sera ที่นำมาทดสอบทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้ผลลบต่อการทดสอบทุกความเข้มข้นของ FITC ที่ใช้

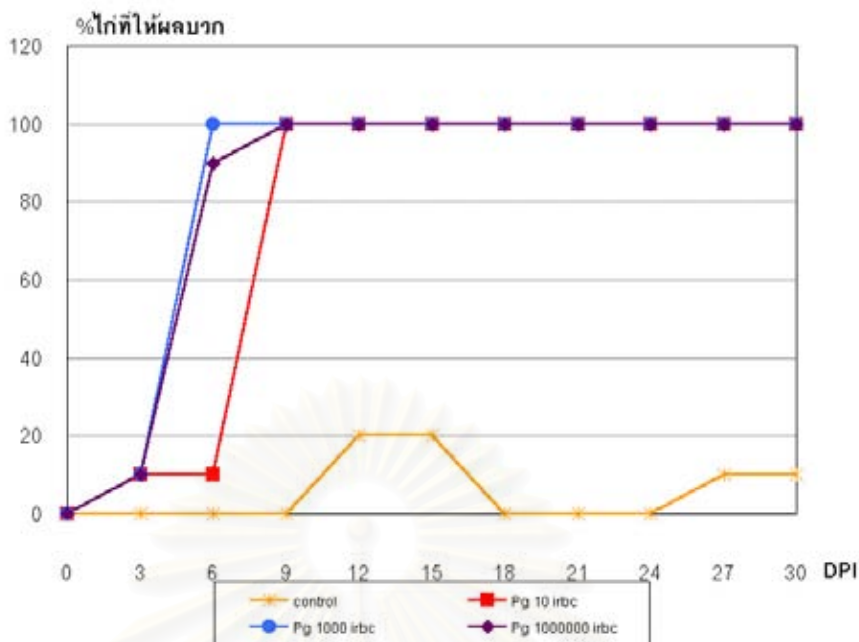
ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC ที่นำมาใช้ในการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ทุกกลุ่ม คือ 1/100

4.4.3 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่ทดลองกลุ่มอายุ 10, 20 และ 30 วัน

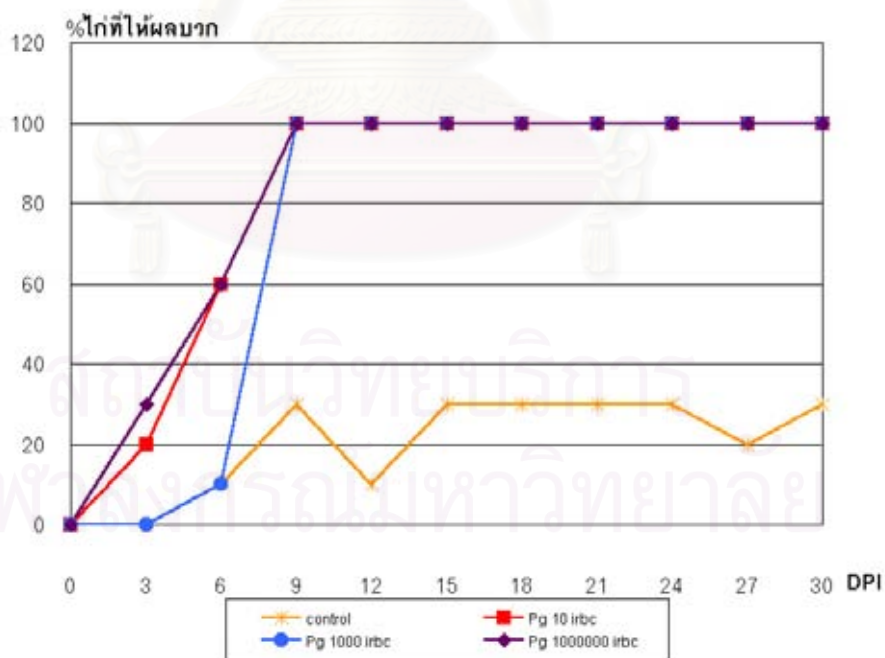
ผลการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่ทดลองทั้ง 3 กลุ่มอายุ ที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10^3 และ 10^6 infected rbc ซีรัมไก่ทดลอง NI และ PI sera ที่ใช้มีความเข้มข้น 1/625 และ FITC 1/100 พบว่าซีรัมของไก่อายุ 10 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ 3 วัน ทุกกลุ่มย่อยให้ผลบวกต่อการทดสอบ 10% เท่ากัน และตั้งแต่วันที่ 9 หลังจากได้รับเชื้อจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซีรัมของไก่ทุกกลุ่มย่อยที่ 2-4 ทุกตัวให้ผลบวกต่อการทดสอบ (100%) ซีรัมของไก่ติดเชื้อที่รอดชีวิตมีระดับแอนติบอดีสูงสุด 1/15625 ในวันสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ซีรัมไก่ควบคุมกลุ่มย่อยที่ 1 ซึ่งไม่ได้รับเชื้อ พบว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ ยกเว้นในวันที่ 15 และ 30 ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 20 และ 10% ที่ระดับแอนติบอดี 1/625 และ 1/625 ตามลำดับ (รูปที่ 4.12)

ผลการทดสอบซีรัมของไก่อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 2-4 ซึ่งได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 infected rbc พบว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบเป็นครั้งแรก 20%, 10% และ 30% ในวันที่ 3, 6 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อ ตามลำดับ และซีรัมของไก่ทุกกลุ่มย่อยทุกตัว (100%) ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ในวันที่ 9 หลังจากที่ได้รับเชื้อและจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซีรัมของไก่ติดเชื้อที่รอดชีวิตมีระดับแอนติบอดีสูงสุด 1/15625 ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนซีรัมของไก่ควบคุม 5-30% ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลอง (รูปที่ 4.13)

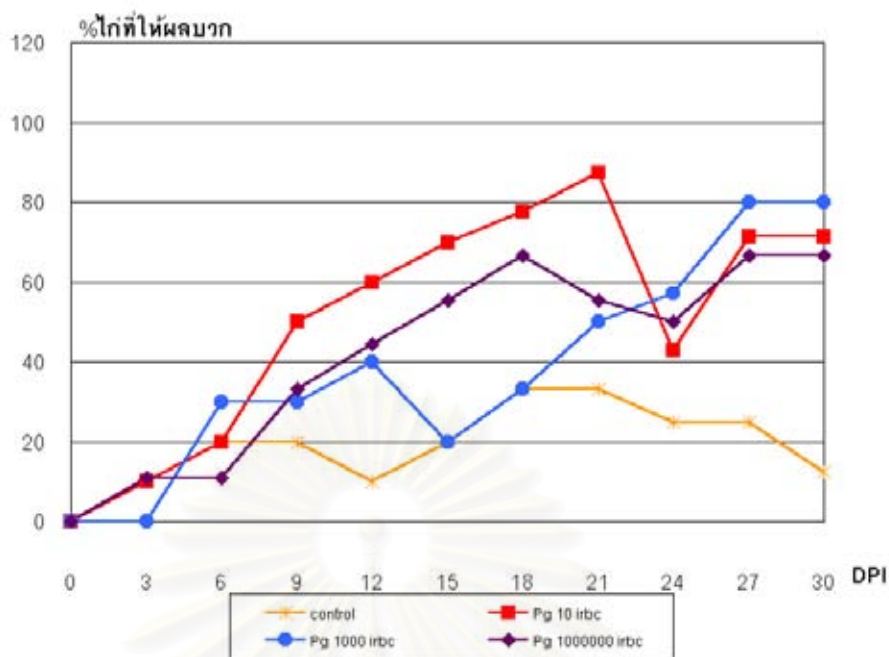
ในไก่อายุ 30 วัน ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อตลอดการทดลอง ปรากฏว่าในวันที่ 6 หลังจากได้รับเชื้อ ซีรัมของไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^3 และ 10^6 และกลุ่มย่อยที่ใช้ควบคุมการทดลอง ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 20, 30 และ 10% ตามลำดับ ซึ่งตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่าซีรัมของกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อให้ผลบวกต่อการทดสอบ 30-85% และไม่สม่ำเสมอ โดยระดับแอนติบอดีมีอัตราส่วนไม่เกิน 1/3125 สำหรับซีรัมไก่กลุ่มควบคุม พบว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ 10-30% ระดับแอนติบอดี 1/625 ตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.12 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.13 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.14 ร้อยละของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ในไก่เนื้อ อายุ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc และติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

4.4.4 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่จากภาคสนามในแหล่งที่มีการระบาดของโรค

การตรวจซีรัมไก่ภาคสนาม จำนวน 67 ตัวอย่าง ที่ใช้ซีรัมเจือจาง 1/25 ถึง 1/15625 และ FITC 1/100 ผลที่ได้นำมาประเมินเปรียบเทียบกับ NI และ PI sera ที่เจือจาง 1/625 ผลปรากฏว่าซีรัมไก่ภาคสนามให้ผลบวกต่อการทดสอบ 94.03% (63/67) โดยซีรัมไก่ฟาร์ม TC ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 85.7% (30/34) และฟาร์ม SS ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 100% (33/33) ดังตารางที่ 4.3

4.4.5 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA ในซีรัมไก่ที่ติดเชื้ออื่นๆ

การทดสอบด้วยวิธี IFA เพื่อศึกษาปฏิกิริยาข้ามของเชื้อ *P. gallinaceum* กับซีรัมไก่ที่มีการติดเชื้อบิด *E. tenella* จำนวน 18 ตัวอย่าง เชื้อไวรัส Newcastle จำนวน 10 ตัวอย่าง และเชื้อ *L. sabrazesi* ร่วมกับหนองพยาธิ จำนวน 4 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าซีรัมไก่ที่ติดเชืวดังกล่าวทั้งหมดให้ผลลบต่อการทดสอบ แสดงว่าแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อทั้ง 3 ดังตารางที่ 4.3

4.4 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA

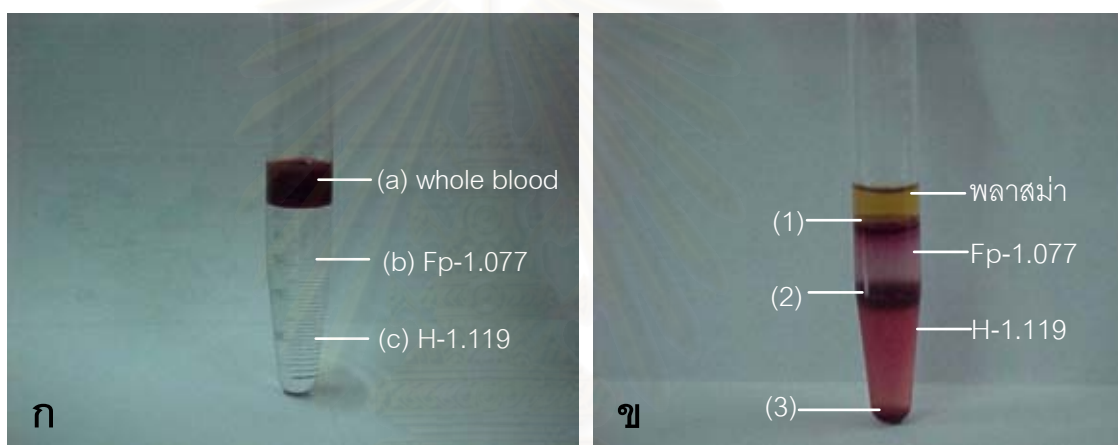
4.5.1 การเตรียมแอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* จาก whole blood ที่ตรวจพบเชื้อใน กระแสเลือดสูง 80% และแยกชั้นของเม็ดเลือดด้วยวิธี ficoll-hypaque discontinuous gradients ที่มีความหนาแน่นของสาร Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 ตามลำดับ (รูปที่ 4.15ก) ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ผลปรากฏว่าหลังจากการปั่น เม็ดเลือดถูกแยกเป็น 3 ชั้น สังเกตเห็นได้ชัดเจน คือ (1) ชั้นที่อยู่ระหว่างพลาสมา และ Ficoll-paque 1.077 (2) ชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 และ (3) ชั้นตะกอนที่ก้นหลอด หลังจากดูชั้นของเม็ดเลือดแต่ละชั้นใส่แยกหลอดนำมาปั่นล้าง ศึกษาตะกอนจากฟิล์มเลือดบางย้อมสียิมซ่า 10% พบว่าตะกอนของชั้นเม็ดเลือดทั้ง 3 ชั้น มีเชื้อ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือดแดงเจือปน โดยในชั้นที่อยู่ระหว่างพลาสมา และ Ficoll-paque พบว่ามีเม็ดเลือดขาว และเชื้อระยะ gametocytes เพศเมียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง และเชื้อเพศผู้ที่ exflagellate ออกมาจำนวนมาก (รูปที่ 4.16ก) ในชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 พบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะ trophozoites จำนวนน้อย schizonts จำนวนมาก และ gametocytes จำนวนน้อย (รูปที่ 4.16ข) ชั้นตะกอนที่ก้นหลอด พบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะ trophozoites และเม็ดเลือดแดงปกติที่ไม่ติดเชื้อจำนวนมาก (รูปที่ 4.16ค)

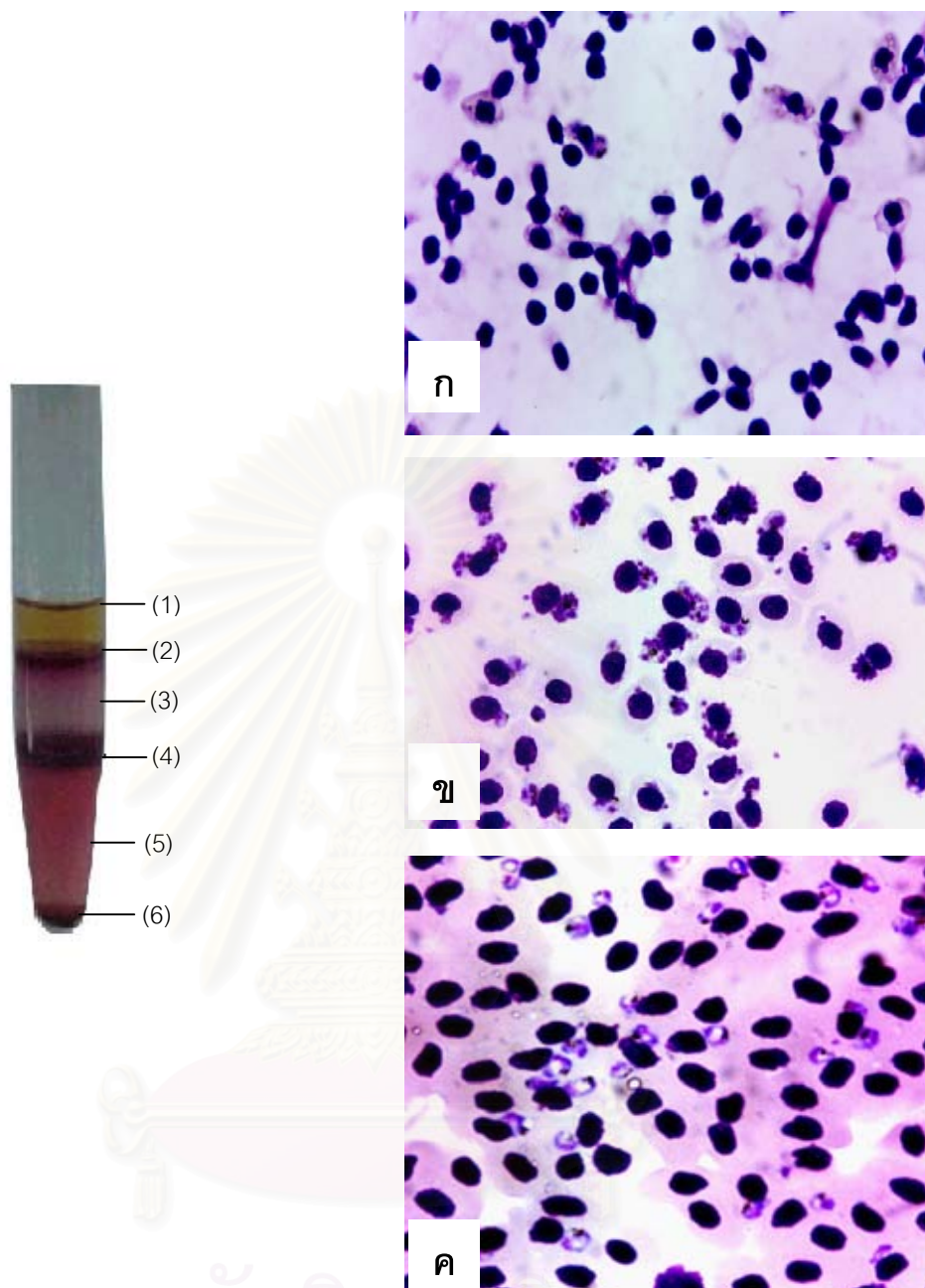
ผลจากการนำตะกอนแต่ละชั้น ทั้ง 3 ชั้น ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยวิธี Freeze-thaw และแยกเชื้อด้วยวิธี ficoll-hypaque discontinuous gradients ครั้งที่ 2 และปั่นล้าง ทำฟิล์มบางย้อมสีเช่นเดิม ตรวจสอบเชื้อและศึกษาลักษณะ ปรากฏว่าพบเชื้อได้สูงสุดจากตะกอนเม็ดเลือดแดงชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 เชื้อระยะ merozoites จำนวนมาก แตกออกจากเม็ดเลือดแดงและอยู่เป็นอิสระ พบ schizonts ที่เกาะติดอยู่กับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงเป็นจำนวนมากเช่นกัน และมีเชื้อระยะ gametocyte ปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนกับลักษณะของเชื้อในเม็ดเลือดแดงก่อนการเตรียมแอนติเจน (รูปที่ 4.17 ก และ ข) ตะกอนเม็ดเลือดจากชั้นอื่นนั้น พบว่ามีเชื้อจำนวนน้อยมาก

crude *Pg* antigen ที่เตรียมได้จากเม็ดเลือดทั้ง 3 ชั้น เมื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนจาก BSA พบว่า crude *Pg* antigen ที่เตรียมจากตะกอนเม็ดเลือดแดงของชั้นเม็ดเลือดที่อยู่ระหว่างพลาสมา และ Ficoll-paque 1.077 ชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 และชั้นตะกอนที่ก้นหลอด มีปริมาณโปรตีน 8.15, 6.96 และ 9.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับโปรตีนแอนติเจนที่นำไปใช้เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ตลอดการศึกษารั้งนี้เลือกใช้ crude *Pg* antigen ที่เตรียมจากจากตะกอนของชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077

เนื่องจากชั้นนี้ตรวจพบเชื้อได้สูงสุดและมีการปนเปื้อนของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่น้อยที่สุด (รูปที่ 4.17ข)



รูปที่ 4.15 การแยกเชื้อ *P. gallinaceum* ออกจากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี Ficoll-paque discontinuous gradients (ก) การเตรียมเลือด และ Histopaque ก่อนการปั่นแยกชั้น (a) whole blood (b) Ficoll-paque (Fp) density 1.077 (c) Histopaque (H) density 1.119 (ข) การแยกชั้นของเลือดหลังจากปั่นที่ 2,057xg (1) เม็ดเลือดชั้นที่อยู่ระหว่างพลาสมา และ Ficoll-paque 1.077 (2) เม็ดเลือดชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 และ (3) ตะกอนเม็ดเลือดที่ก้นหลอด

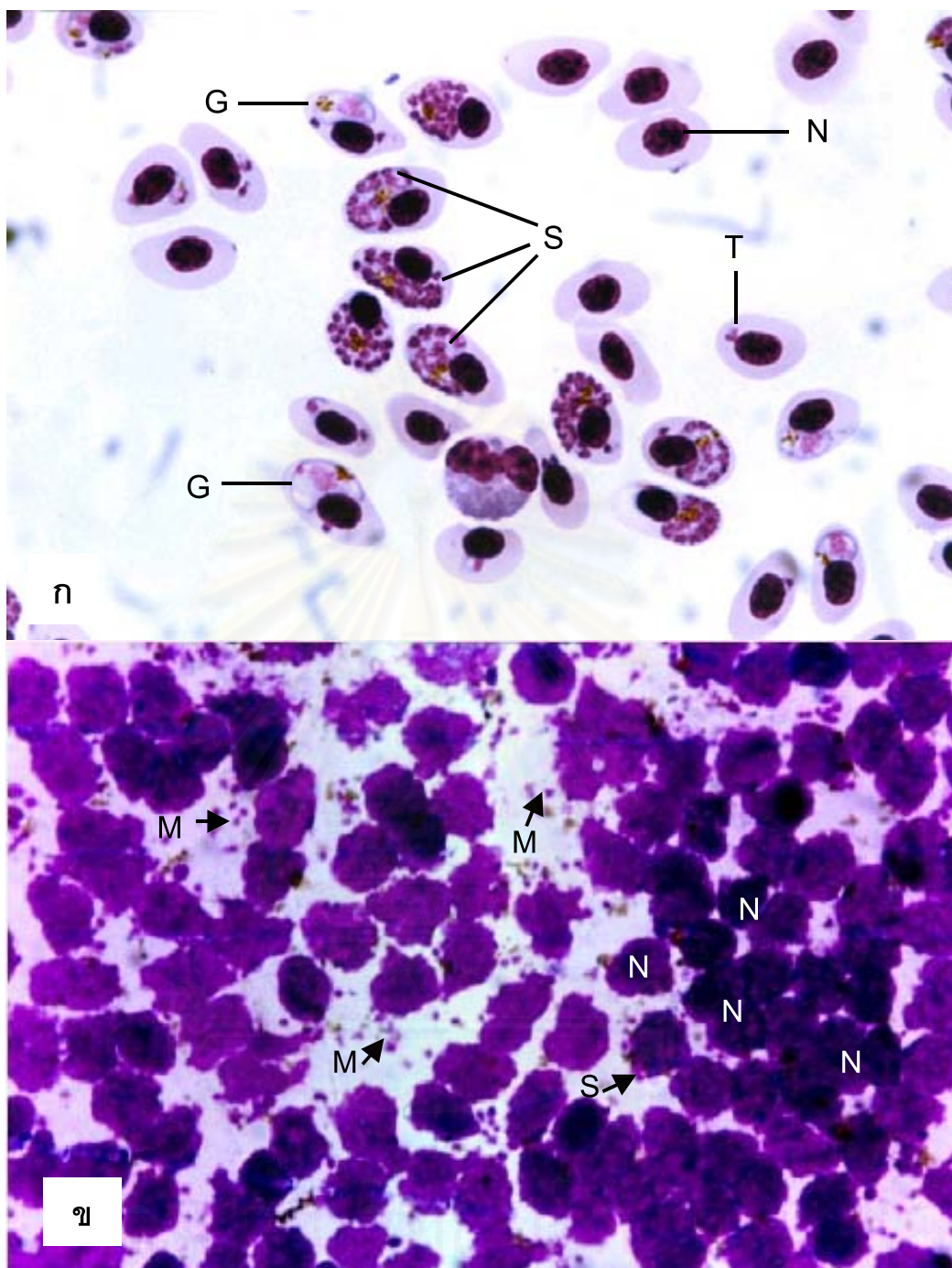


รูปที่ 4.16 แสดงเชื้อ *P. gallinaceum* infected rbc ที่ทำฟิล์มบางและย้อมด้วยสียิมซ่า 10% จาก ตะกอนเม็ดเลือดที่แยกได้ด้วยการปั่นวิธี ficoll-paque discontinuous gradients

ก. เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อระยะ gametocytes จากชั้นที่อยู่ระหว่าง พลาสมาและ Ficoll-paque 1.077 (2)

ข. เม็ดเลือดแดงติดเชื้อระยะ trophozoites, schizonts และ gametocytes จากชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 (4)

ค. เม็ดเลือดแดงติดเชื้อระยะ trophozoites และเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อจากชั้น ตะกอนที่ก้นหลอด (6)



รูปที่ 4.17 พิล์มเลือดบางย้อมสีิมซ่า 10%

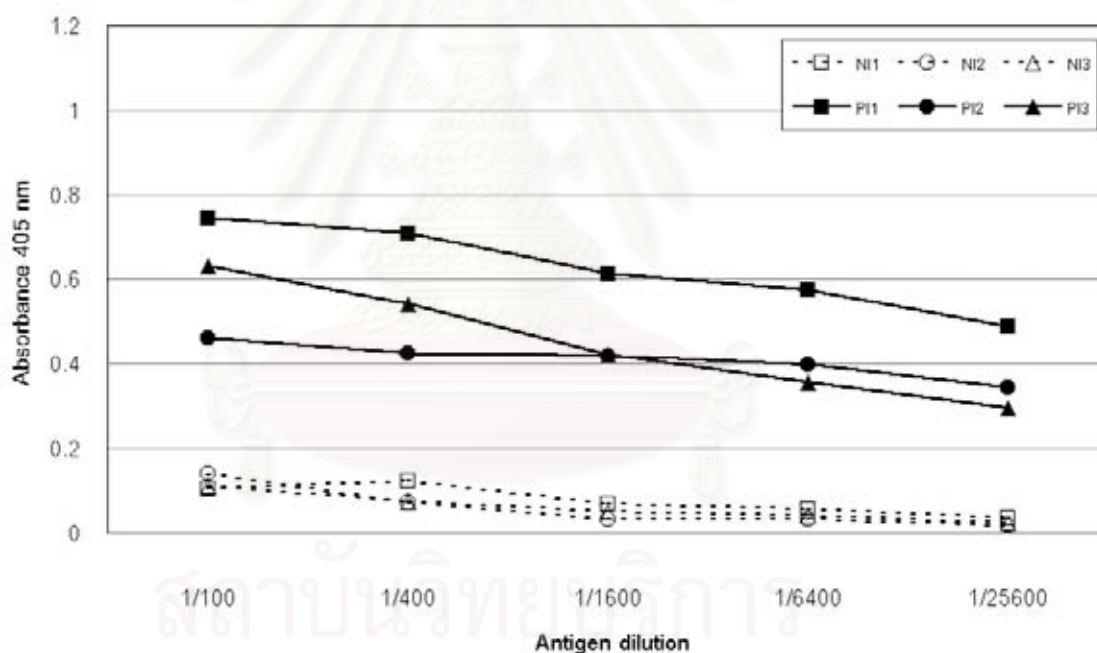
ก. เลือดที่มีระดับเชื้อ *P. gallinaceum* 80%

ข. ตะกอนเม็ดเลือดแดงจากชั้นที่อยู่ระหว่าง Histopaque 1.119 และ Ficoll-paque 1.077 และเม็ดเลือดแดงถูกทำให้แตกด้วยวิธี Freeze-thaw

G = gametocytes M = free merozoites N = นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง S = schizonts SN = schizonts ที่เกาะติดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง T = Trophozoites

4.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude *Pg* antigen

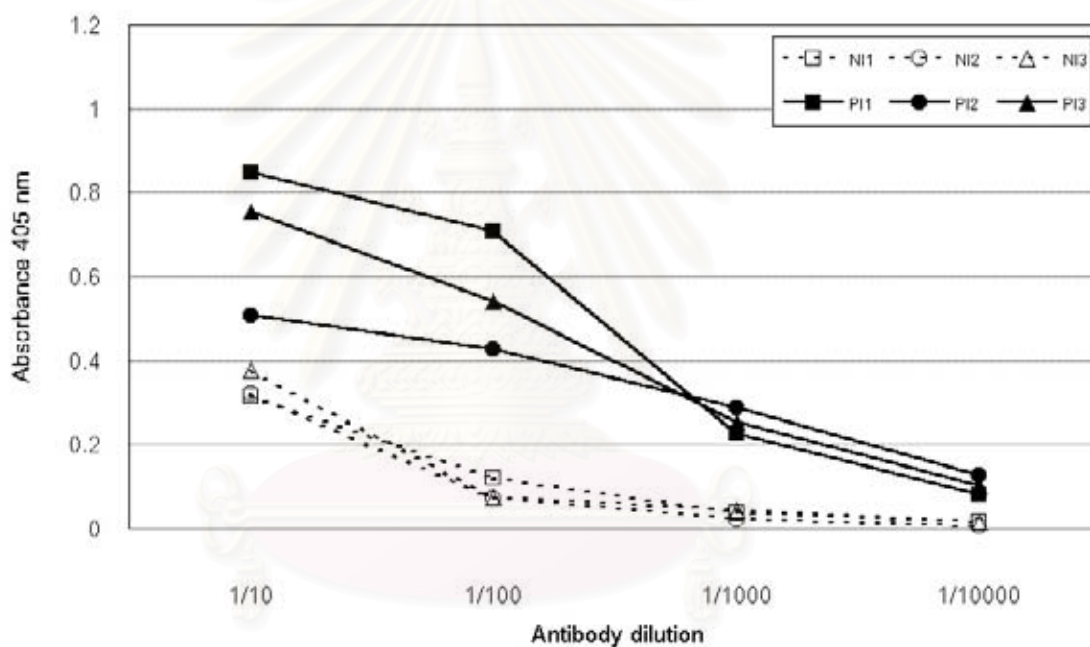
ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude *Pg* antigen ด้วยวิธี ELISA ใช้ crude *Pg* antigen เจือจาง 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 และ 1/25600 NI sera จำนวน 3 ตัวอย่าง และ PI sera จำนวน 3 ตัวอย่าง เจือจาง 1/100 peroxidase conjugated 1/30000 และ วัดค่า OD ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ Absorbance 405 นาโนเมตร ผลปรากฏว่าค่าเฉลี่ย OD ของ NI sera ที่วัดได้อยู่ระหว่าง 0.026–0.118 ขณะที่ค่าเฉลี่ย OD ของ PI sera อยู่ระหว่าง 0.376-0.612 ซึ่งค่าเฉลี่ยสูงกว่า 0.4 และช่วงระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของ NI และ PI sera ห่างกัน 3-6 เท่า ทุกความเข้มข้นของ crude *Pg* antigen ที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude *Pg* antigen อยู่ระหว่าง 1/100-1/1600 สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้เลือก crude *Pg* antigen 1/400 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ทดสอบตลอดการศึกษา (รูปที่ 4.18 และตารางที่ ผ21 ภาคผนวก ก หน้า 107)



รูปที่ 4.18 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude *Pg* antigen อัตราส่วน 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 และ 1/25600 โดยใช้ NI sera (----) 3 ตัวอย่าง และ PI sera (—) 3 ตัวอย่าง เจือจางในอัตราส่วน 1/100 peroxidase conjugated 1/30000

4.5.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera

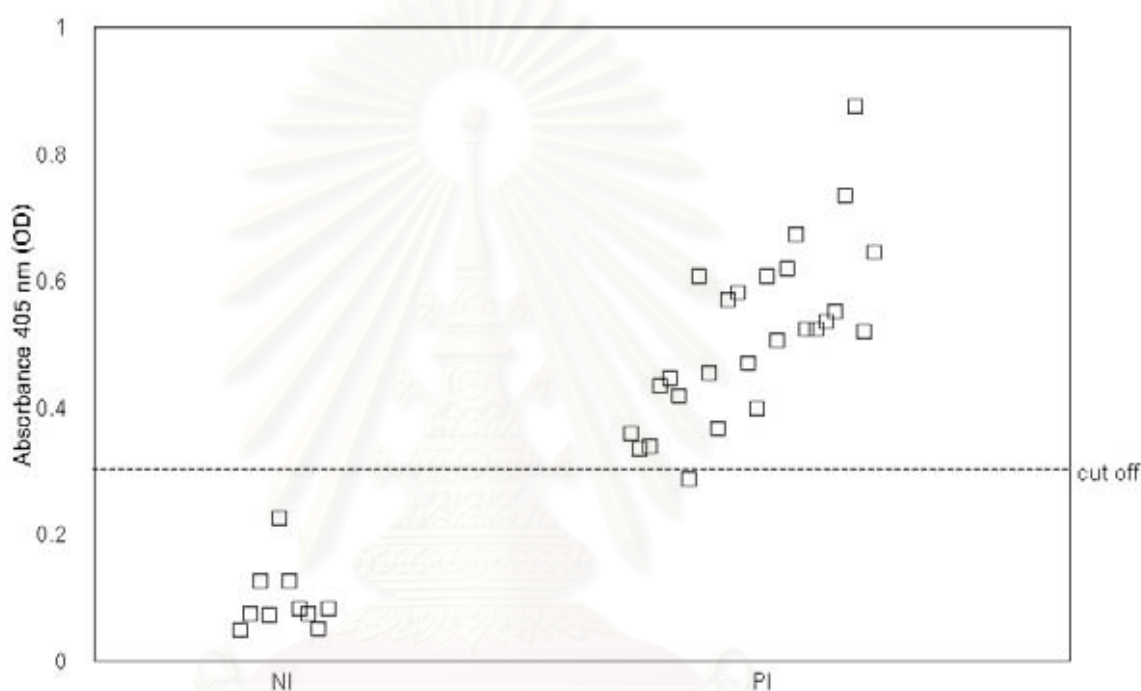
ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera โดยใช้ NI และ PI sera เจือจาง 1/10, 1/100, 1/1000 และ 1/10000 crude *Pg* antigen 1/400 และ peroxidase conjugated 1/30000 พบว่าค่าเฉลี่ย OD ของ NI sera ที่วัดได้อยู่ระหว่าง 0.022–0.338 โดย OD ที่วัดได้จากการทดสอบกับ NI sera 1/10 มีค่าเฉลี่ย 0.338 ส่วน NI sera ที่ความเข้มข้นอื่นมีค่าเฉลี่ย OD ต่ำมาก (รูปที่ 4.19 และตารางที่ ผ22 ภาคผนวก ก หน้า 107) สำหรับค่าเฉลี่ย OD ของ PI sera อยู่ระหว่าง 0.102-0.7.3 โดย OD ของ PI sera 1/10 เท่านั้นที่มีค่าเฉลี่ยห่างกัน 6 เท่า และค่าที่วัดได้สูงกว่า 0.4 การทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ NI และ PI sera 1/100 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ทดสอบ ELISA ตลอดการศึกษา



รูปที่ 4.19 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI (---) 3 ตัวอย่าง และ PI sera (—) 3 ตัวอย่าง อัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1000 และ 1/10000 ใช้ crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000

4.5.4 การทดสอบหาค่า cut off ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA

ในการศึกษาค่า cut off จากผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ crude *Pg* antigen 1/400 NI และ PI sera 1/100 ใช้ peroxidase conjugated 1/30000 เมื่ออ่านค่าที่ Absorbance 405 นาโนเมตร และค่า cut off ประเมินจากค่าเฉลี่ย OD ของ NI sera รวมกับ 4 เท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* มีค่าเท่ากับ $0.0953 \pm 4(0.053)$ ผลปรากฏว่าได้ค่า cut off เท่ากับ 0.307 (รูปที่ 4.20)



รูปที่ 4.20 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการประเมินค่า cut off ของการทดลอง ใช้ NI 10 ตัวอย่าง และ PI sera 26 ตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร

4.5.5 การทดสอบระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA

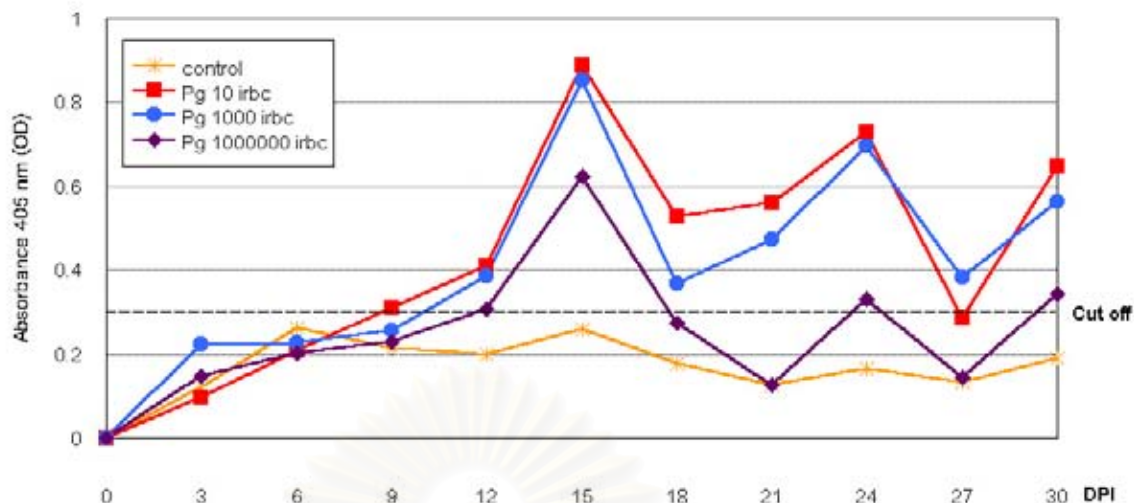
4.5.5.1 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อในซีรัมของไก่ทดลอง 3 กลุ่มอายุ

ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในซีรัมของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc โดยใช้ crude *Pg* antigen 1/400 (ความเข้มข้น 17.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซีรัมไก่ทดลอง PI และ NI sera 1/100 และ peroxidase

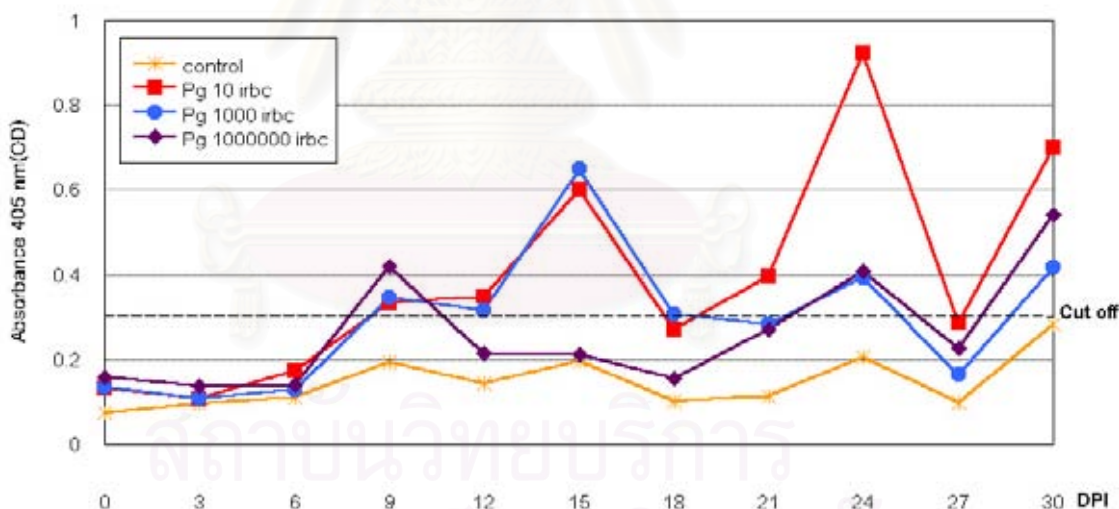
conjugated 1/30000 อ่านค่า Absorbance ที่ 405 นาโนเมตร พบว่าไก่อายุ 10 วัน ทุกกลุ่มย่อย หลังจากได้รับเชื้อ 10^1 , 10^3 และ 10^6 infected rbc เป็นเวลา 9 วัน ซีรัมให้ผลบวกต่อการทดสอบ 60, 10 และ 20% (ตารางที่ 4.3) ค่าเฉลี่ย OD 0.410 ± 0.152 , 0.386 ± 0.114 และ 0.308 ± 0.196 ตามลำดับ ในวันที่ 12 หลังจากได้รับเชื้อ และค่าเฉลี่ย OD พบได้สูงสุดในวันที่ 15 โดยค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^1 และ 10^3 infected rbc สูงกว่าค่า cut off ตลอดจนการทดลอง ในขณะที่ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc มีค่าใกล้เคียงหรือต่ำกว่าค่า cut off ตั้งแต่วันที่ 18 ของการทดลองเป็นต้นไป (รูปที่ 4.21 ตารางที่ ๘14 ภาคผนวก ก หน้า 100) ร้อยละของซีรัมไก่อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยต่างๆที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี ELISA แสดงในรูปที่ 4.24 ในวันที่ 12 ของการทดลอง ซีรัมของไก่ทุกกลุ่มให้ผลบวก 70% และวันที่ 15 ให้ผลบวก 100% จนเกือบตลอดการทดลอง ในขณะที่ซีรัมของไก่ควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อให้ผลลบค่าเฉลี่ย OD ต่ำกว่าค่า cut off ตลอดจนการทดลอง ยกเว้นในวันที่ 6 และ 15 ซีรัมไก่ควบคุมบางตัว (40%) มีค่า OD สูง $0.371-0.441$

ในไก่อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 2-4 ได้รับเชื้อปริมาณ 10^1 , 10^3 และ 10^6 infected rbc ซีรัมให้ผลบวกต่อการทดสอบ 40, 40 และ 50% (ตารางที่ 4.3) ค่าเฉลี่ย OD 0.334 ± 0.128 , 0.344 ± 0.136 และ 0.419 ± 0.254 ตามลำดับ ในวันที่ 9 หลังจากได้รับเชื้อ โดยซีรัมของไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^1 infected rbc ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 100% ในวันที่ 15, 24 และ 30 ยกเว้นในวันที่ 18 และ 27 ค่าเฉลี่ย OD ต่ำกว่าค่า cut off ของการทดสอบเล็กน้อย ส่วนซีรัมของไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc มีค่าเฉลี่ย OD ต่ำกว่า แต่ให้ผลบวกต่อการทดสอบสูงสุด 80% ในวันที่ 15, 18, 24 และ 30 ยกเว้นในวันที่ 21 และ 27 ค่าเฉลี่ย OD ต่ำกว่าค่า cut off สำหรับซีรัมของไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc นั้นค่าเฉลี่ย OD ส่วนใหญ่ต่ำกว่าค่า cut off ยกเว้นวันที่ 9, 24 และ 30 หลังจากได้รับเชื้อ ร้อยละของซีรัมไก่ติดเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ แสดงในรูปที่ 4.25 สำหรับซีรัมของไก่ควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อให้ผลลบต่อการทดสอบ ค่าเฉลี่ย OD ต่ำกว่าค่า cut off ตลอดจนการทดลอง ยกเว้นในวันที่ 30 ซีรัมไก่ควบคุมบางตัว (20%) มีค่า OD $0.432-0.516$ (รูปที่ 4.22 ตารางที่ ๘15 ภาคผนวก ก หน้า 101)

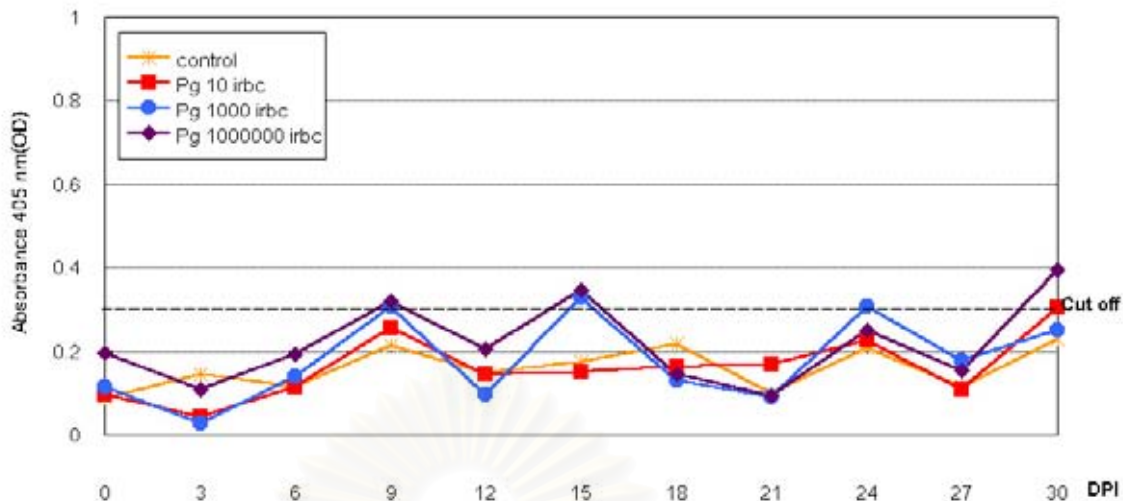
ไก่อายุ 30 วัน ไก่กลุ่มย่อยที่ 2-4 ที่ได้รับเชื้อแต่ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดตลอดการทดลอง ซีรัมให้ผลบวกลดลงและมีความแปรปรวนมากกว่าไก่อายุ 10 และ 20 วัน ยกเว้นไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ให้ผลบวกต่อการทดสอบสูงสุด 82% ในวันที่ 30 หลังจากได้รับเชื้อ และมีค่าเฉลี่ย OD 0.396 ± 0.121 ไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^1 และ 10^3 infected rbc ให้ผลบวกสูง 42.85% เท่ากัน ในวันที่ 30 และ 24 ค่าเฉลี่ย OD 0.305 ± 0.186 และ 0.308 ± 0.259 ตามลำดับ สำหรับซีรัมของไก่ควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อค่า OD เฉลี่ย ต่ำกว่า cut off ตลอดจนการทดลอง (รูปที่ 4.23, รูปที่ 4.26 และตารางที่ ๘16 ภาคผนวก ก หน้า 102)



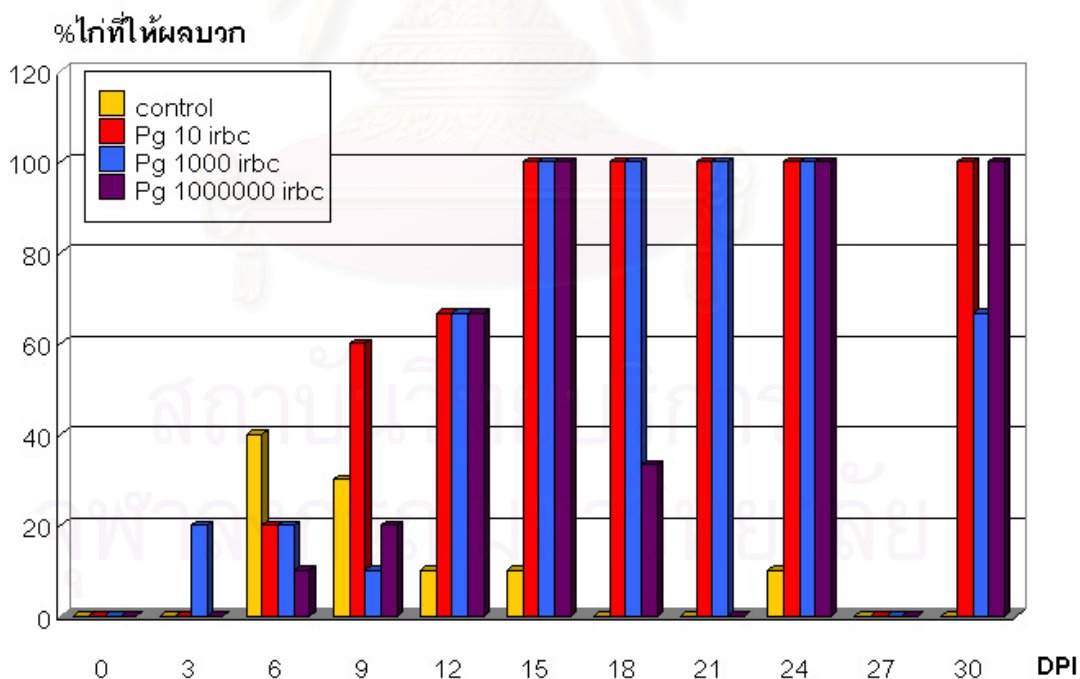
รูปที่ 4.21 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือด ปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร



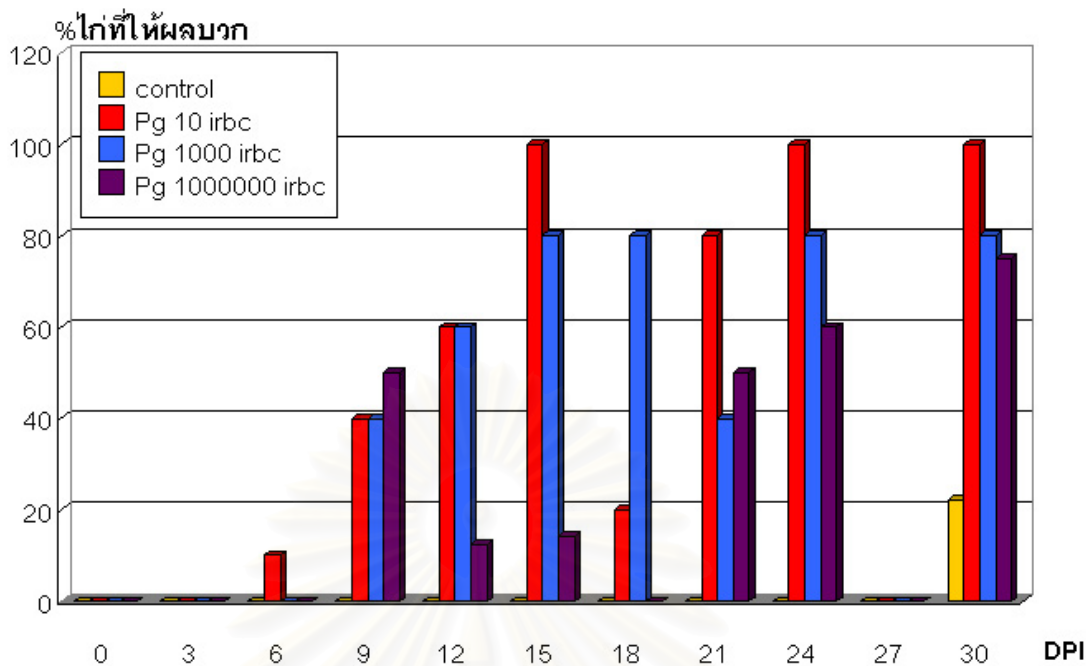
รูปที่ 4.22 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คละเพศ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือด ปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร



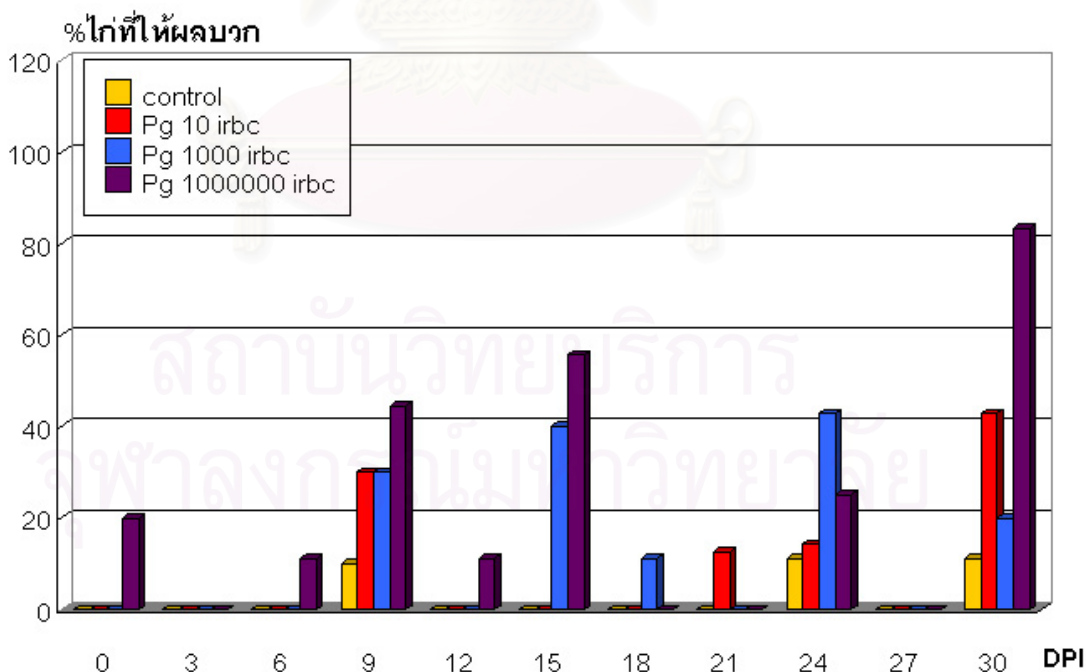
รูปที่ 4.23 ค่าเฉลี่ย OD จากผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือด ปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร



รูปที่ 4.24 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

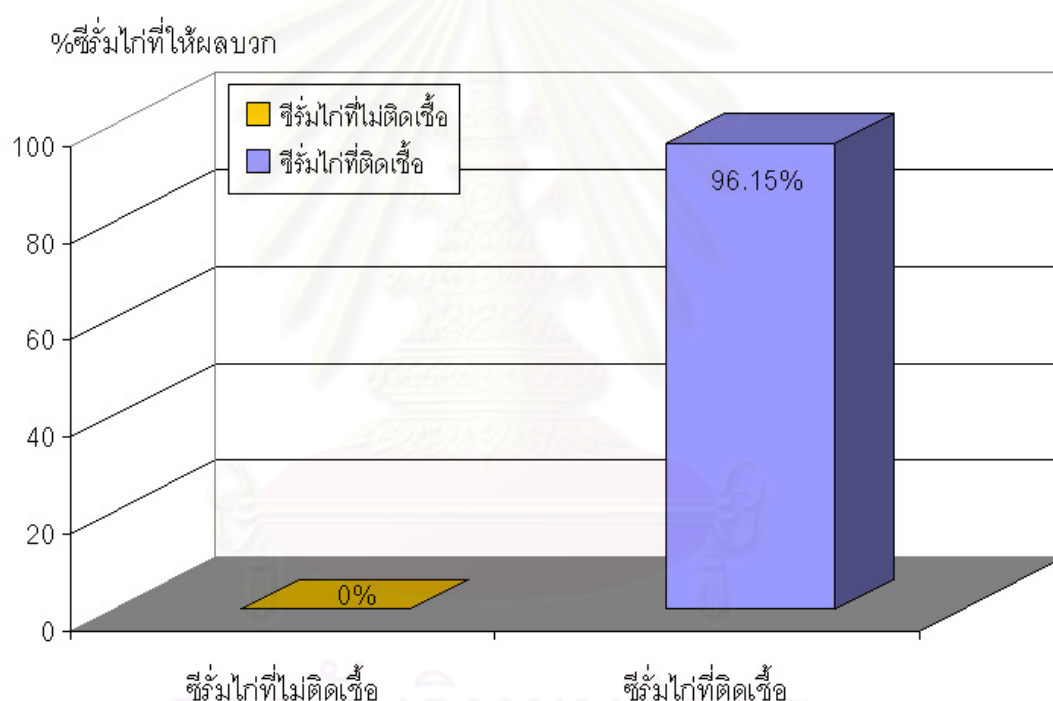


รูปที่ 4.25 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน



รูปที่ 4.26 ร้อยละของไก่ทดลองที่ซีรัมให้ผลบวกต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้อ คณะแพศ อายุ 30 วัน กลุ่มย่อยที่ 1-4 ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10^3 และ 10^6 infected rbc ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน

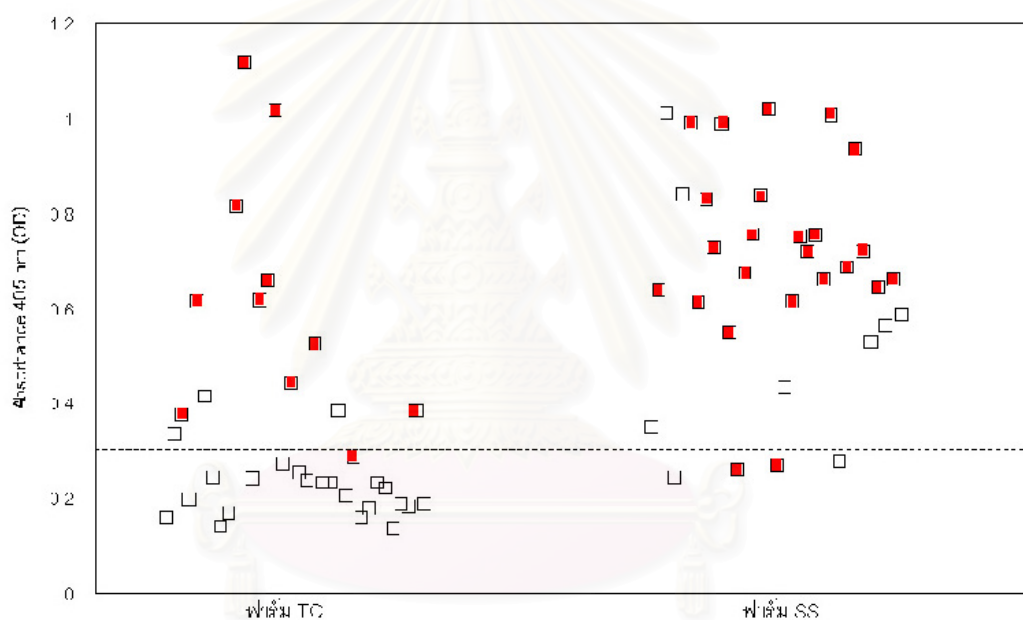
การทดสอบหาร้อยละของซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* (PI) จำนวน 26 ตัวอย่าง และซีรัมอ้างอิงที่ไม่ติดเชื้อ (NI) ต่อ crude *Pg* antigen ด้วยวิธี ELISA แสดงในรูปที่ 4.27 โดยใช้ซีรัมอ้างอิง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า Absorbance ที่ 405 นาโนเมตร ผลปรากฏว่าซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อให้ผลบวกต่อการทดสอบ 96.15% (25/26) ค่า OD อยู่ระหว่าง 0.334-0.874 (0.523 ± 0.13) ซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อเพียง 1 ตัวอย่าง (3.85%) ที่พบว่ามีค่า OD 0.287 ซึ่งน้อยกว่าค่า cut off อาจเนื่องจากการเก็บซีรัมเร็วเกินไป (วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อเข้าทางผิวหนัง ซึ่งยังไม่สามารถตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด) สำหรับซีรัมอ้างอิงที่ไม่ติดเชื้อ ทุกตัวอย่างให้ผลลบต่อการทดสอบ มีค่า OD 0.048-0.225



รูปที่ 4.27 ร้อยละของซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อ (*P. gallinaceum* (PI) และไม่ติดเชื้อ (*P. gallinaceum* (NI) ที่ให้ผลบวกต่อ crude *Pg* antigen ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ซีรัมอ้างอิง 1/100 แอนติเจน 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า Absorbance ที่ 405 นาโนเมตร

4.5.5.2 การทดสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P.gallinaceum* ในซีรัมไก่ภาคสนาม

ผลการทดสอบซีรัมไก่ภาคสนาม จำนวน 67 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ซีรัมตัวอย่าง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร พบว่าซีรัมตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 55.22% (37/67) โดยซีรัมไก่ไข่ฟาร์ม TC ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 26.47% (9/34) ซีรัมไก่ไข่ฟาร์ม SS ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 84.85% (28/33) ในขณะที่ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาเชื้อจากฟิล์มเลือดบางของตัวอย่างเลือดไก่ทั้ง 2 ฟาร์ม พบว่าตรวจพบเชื้อ *P.gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงรวมทั้งสิ้น 52.24% (35/67) ตัวอย่าง จากไก่ในฟาร์ม TC และฟาร์ม SS 32.4% (11/34) และ 72.7% (24/33) ตามลำดับ (รูปที่ 4.28)

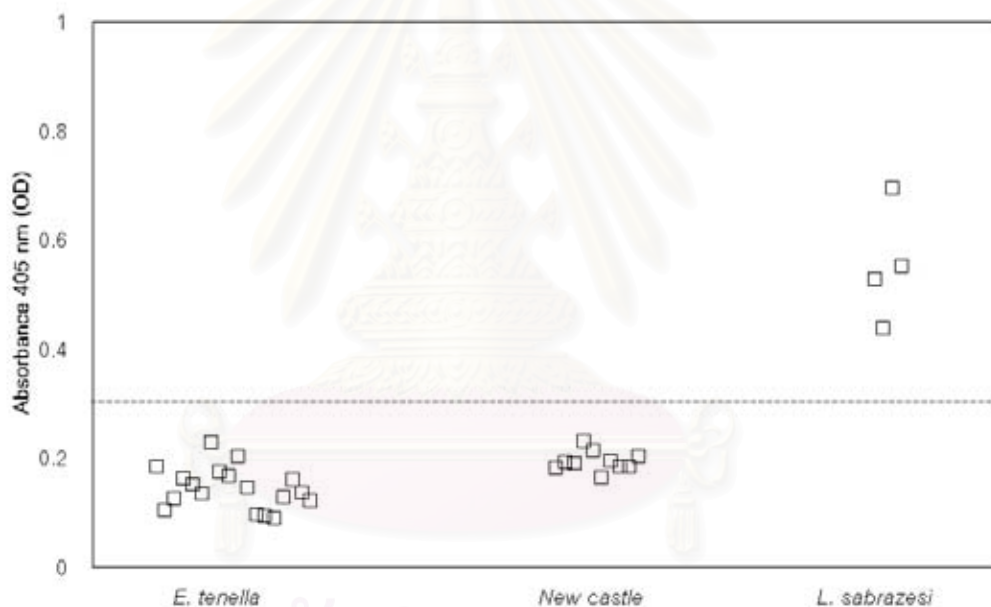


□ ตัวอย่างซีรัมไก่ที่นำมาทดสอบ ■ ตัวอย่างซีรัมไก่ที่ตรวจพบระดับเชื้อในกระแสเลือด

รูปที่ 4.28 แสดงการกระจายของผลการตรวจหาเชื้อ *P. gallinaceum* จากไก่ภาคสนาม 2 ฟาร์ม จำนวน 67 ตัวอย่าง ฟาร์ม TC จำนวน 34 ตัวอย่าง และฟาร์ม SS จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า 10% และการตรวจหา ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ใช้ซีรัมเจือจาง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร

4.5.5.3 การทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P.gallinaceum* ในซีรัมไก่ติดเชื้ออื่นๆเพื่อศึกษาปฏิกิริยาข้าม

ผลการใช้ซีรัมไก่ที่ติดเชื้ออื่นนอกเหนือจาก *P. gallinaceum* จำนวนรวม 32 ตัวอย่าง คือ ซีรัมไก่ที่ติดเชื้อบิด *E. tenella* จำนวน 18 ตัวอย่าง เชื้อไวรัส Newcastle จำนวน 10 ตัวอย่าง และเชื้อ *L. sabrazesi* ร่วมกับและหนองพยาธิหลายชนิด จำนวน 4 ตัวอย่าง นำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ซีรัม 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร ปรากฏว่าซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *E. tenella* และเชื้อไวรัส Newcastle ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ *P. gallinaceum* โดยให้ผลลบต่อการทดสอบทุกตัวอย่าง ในขณะที่ซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *L. sabrazesi* ร่วมกับหนองพยาธิหลายชนิด ทำปฏิกิริยาข้าม โดยให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี ELISA ทุกตัวอย่าง (รูปที่ 4.29)



รูปที่ 4.29 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *E. tenella* Newcastle และ *L. sabrazesi* จำนวน 32 ตัวอย่างตามลำดับ ที่นำมาทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ใช้ซีรัมเจือจาง 1/100 crude *Pg* antigen 1/400 peroxidase conjugated 1/30000 และอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร

4.5.6 การเปรียบเทียบผลของการตรวจหาเชื้อ *P. gallinaceum* จากเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี IFA กับวิธี ELISA

จากตารางที่ 4.3 เป็นการเปรียบเทียบผลจากการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า 10% โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และผลจากการทดสอบหาระดับ

แอนติบอดีด้วยวิธี IFA และ ELISA ปรากฏว่าในไก่ทดลองกลุ่มอายุ 10 และ 20 วัน ทุกตัวในกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 10^1 , 10^3 และ 10^6 infected rbc ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดและให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA 100% (ตารางที่ 4.3) ซึ่งให้ผลสูงกว่าการตรวจด้วยวิธี ELISA ในขณะที่ไก่ทดลองกลุ่มอายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อแต่ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA 30-50% ในซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อ ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด 50% พบว่าการตรวจด้วยวิธี ELISA ให้ผลสูงกว่า (96.15%) และ IFA ให้ผลสูงสุด (100%) สำหรับ ซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ไม่ติดเชื้อ (NI) ซีรัมที่ติดเชื้อ *E. tenella* และ *Newcastle* ให้ผลลบต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ทุกวิธีที่ใช้ทดสอบไม่แตกต่างกัน ส่วนซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *L. sabrazesi* ให้ผลบวกแสดงถึงการมีปฏิกริยาข้ามกับ *P. gallinaceum* ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA แต่ไม่พบปฏิกริยาข้ามในการทดสอบด้วย IFA และจากการวินิจฉัยยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างตรวจพบเฉพาะ *L. sabrazesi* เท่านั้น

ผลการตรวจตัวอย่างภาคสนามจากฟาร์มไก่ 2 ฟาร์มที่มีประวัติการระบาดของโรคมาลาเรีย การตรวจหาเชื้อในกระแสเลือด และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี IFA และ ELISA ปรากฏว่าวิธี IFA ให้ผลบวกต่อการทดสอบสูงสุด (85.7-100%) ส่วนการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบาง และการทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ให้ผลใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.3)

การวิเคราะห์และประเมินผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี IFA และ ELISA จากซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ (PI) และไม่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* (NI) คำนวณหาค่า Sensitivity, Specificity, Accuracy, Predictive value positive test และ Predictive value negative test ของการทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับผลการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดเป็นเกณฑ์ ผลปรากฏว่าการทดสอบด้วยวิธี IFA มี Sensitivity 96.15%, Specificity 100%, Accuracy 100%, Predictive value positive test 100% และ Predictive value negative test 90.91% ส่วนวิธี ELISA มี Sensitivity 100%, Specificity 100%, Accuracy 100%, Predictive value positive test 100% และ Predictive value negative test 100%

ขณะที่การวิเคราะห์และประเมินผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี IFA และ ELISA จากซีรัมไก่ทดลองทั้ง 3 กลุ่มอายุที่ได้รับเชื้อ ปริมาณ 10^1 , 10^3 และ 10^6 infected rbc เมื่อคำนวณค่า Sensitivity, Specificity, Accuracy, Predictive value positive test และ Predictive value negative test ของการทดสอบครั้งนี้ พบว่าการทดสอบด้วยวิธี IFA มี Sensitivity 56.45%, Specificity 100%, Accuracy 59.7%, Predictive value positive test 100% และ Predictive value negative test 15.6% ส่วนวิธี ELISA มี Sensitivity 78.37%, Specificity 83.33%, Accuracy 80.6%, Predictive value positive test 85.3% และ Predictive value negative test 75.75%

จากผลการวิเคราะห์หาความไวและความจำเพาะของการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ด้วยวิธี ELISA และ IFA แสดงให้เห็นได้ว่าวิธีทั้งสองให้ผลที่น่าพอใจ และเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียในไก่ แม้ว่าเชื้อในกระแสเลือดลดต่ำมากและจนกระทั่งตรวจไม่พบเชื้อตลอดการทดลอง สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียในไก่โดยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดบางย้อมสียิมซ่าโดยตรง พบว่ามีความเหมาะสมดีเช่นกัน เว้นแต่ใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยค่อนข้างช้า

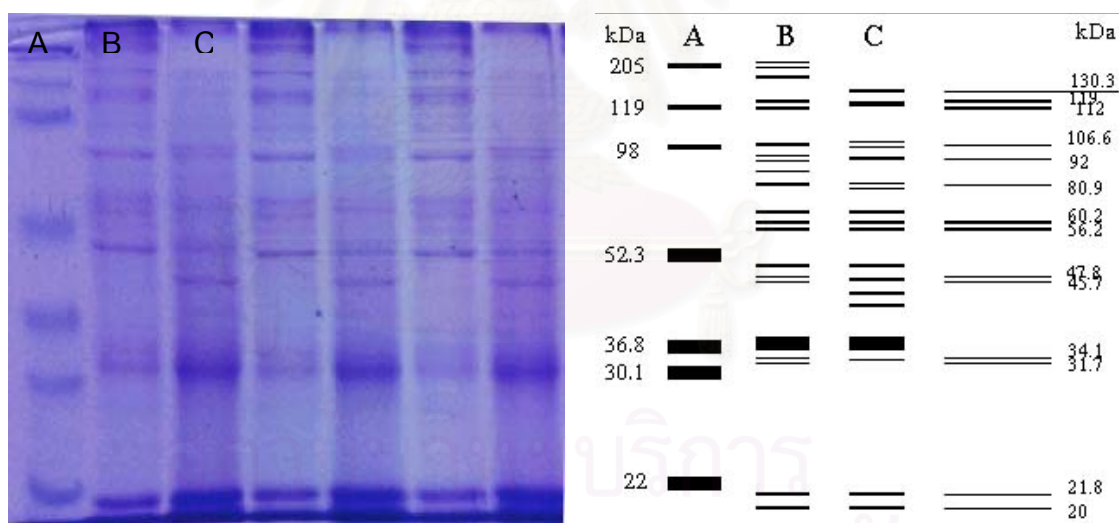
ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบผลของการตรวจหาเชื้อ *P. gallinaceum* จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า 10% และการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี IFA กับวิธี ELISA

ตัวอย่างซีรัม	จำนวน	% ไก่ที่ให้ผลบวก		
		ฟิล์มเลือดบางย้อมสี (%)	IFA (%)	ELISA (%)
ไก่อายุ 10 วันที่ได้รับเชื้อ <i>Pg</i>				
-10 infected rbc	30	100	100	60
-10 ³ infected rbc	30	100	100	10
-10 ⁶ infected rbc	30	100	100	20
ไก่อายุ 20 วันที่ได้รับเชื้อ <i>Pg</i>				
-10 infected rbc	30	100	100	40
-10 ³ infected rbc	30	100	100	40
-10 ⁶ infected rbc	30	100	100	50
ไก่อายุ 30 วันที่ได้รับเชื้อ <i>Pg</i>				
-10 infected rbc	30	0	50	30
-10 ³ infected rbc	30	0	30	30
-10 ⁶ infected rbc	30	0	33	45
ซีรัมอ้างอิงที่ติดเชื้อ <i>Pg</i> (PI)	26	50	100	96.15
ซีรัมอ้างอิงที่ไม่ติดเชื้อ <i>Pg</i> (NI)	10	0	0	0
ซีรัมติดเชื้อ <i>E. tenella</i>	18	0	0	0
ซีรัมติดเชื้อ Newcastle	10	0	0	0
ซีรัมติดเชื้อ <i>L. sabraezesi</i>	4	0	0	100
ซีรัมไก่ฟาร์มที่พบ <i>Pg</i>	67	52.24	94.03	55.22
- Farm TC	34	32.4	85.7	26.5
- Farm SS	33	72.7	100	84.9

4.6 การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดี จากซีรัมไก่ติดเชื้อมด้วยวิธี Western blot analysis

4.6.1 การแยกโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE

ผลการแยกโปรตีนแอนติเจนของ crude *Pg* antigen และโปรตีนของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue เมื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่กับโปรตีนมาตรฐาน ผลปรากฏว่าพบแถบโปรตีนของ crude *Pg* antigen จำนวน 18 แถบ ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน มีน้ำหนักโมเลกุล 130.3, 119, 106.6, 98, 92, 80.9, 78.5, 69.5, 60.2, 56.2, 50.1, 47.8, 42.6, 39.3, 36.8, 31.7, 21.8 และ 20 kDa ส่วนแถบโปรตีนของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ จำนวนที่พบมี 21 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 205, 202, 169.8, 119, 112, 98, 92, 90.1, 86, 80.9, 69.5, 60.2, 56.2, 50.1, 47.8, 45.7, 36.8, 34.1, 31.7, 21.8 และ 20 kDa เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของเชื้อ *P. gallinaceum* และแถบโปรตีนของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 130.3, 106.6, 78.5, 42.6 และ 39.3 kDa ปรากฏเฉพาะใน crude *Pg* antigen แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 205, 202, 169.8, 112, 90.1, 86, 45.7 และ 34.1 kDa ปรากฏเฉพาะในโปรตีนของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ (รูปที่ 4.30 และตารางที่ 4.4)



(ก)

(ข)

รูปที่ 4.30 แถบโปรตีนของ crude *Pg* antigen และเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ ทำการแยกโดยวิธี

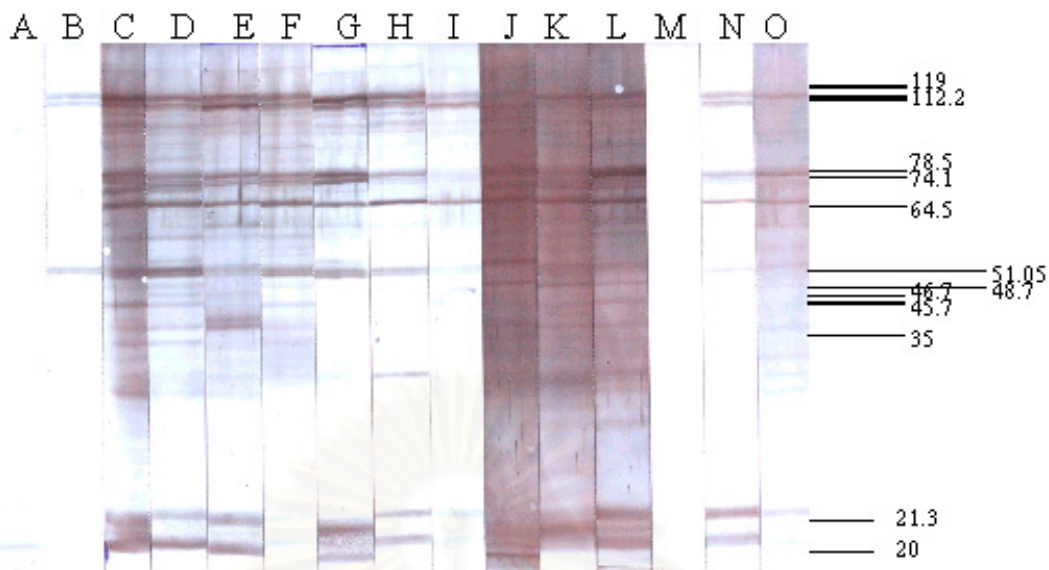
SDS-PAGE (ก) แถบโปรตีนในเจลที่ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue

(ข) ไดอะแกรมแสดงแถบโปรตีน

A = Protein marker B = เม็ดเลือดแดงไก่ปกติ C = crude *Pg* antigen

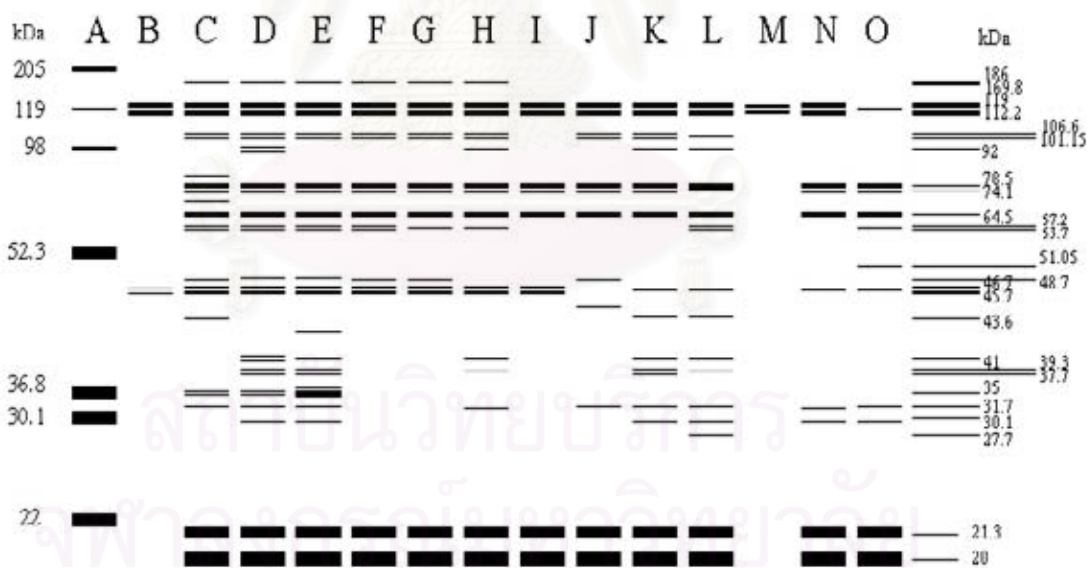
4.6.2 การทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis

การทดสอบแถบโปรตีนของ crude *Pg* antigen ในเจลที่แยกได้โดยวิธี SDS-PAGE และนำมา blot ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี Western blot และทดสอบกับซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1/100 โดยซีรัมดังกล่าวคัดเลือกจากตัวอย่างซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ให้ผลบวกสูงต่อการตรวจสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี IFA และ ELISA ในระดับความเข้มข้น 1/156225-1/78125 ซึ่งจำแนกได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะการติดเชื้อ คือ ซีรัมอ้างอิงของไก่ที่ติดเชื้อ ซีรัมไก่ทดลอง (ไก่เนื้อที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือด) และซีรัมไก่ที่ติดเชื้อในภาคสนาม ผลปรากฏว่าตรวจพบจำนวนแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมแตกต่างกันไป สำหรับแถบโปรตีนที่พบว่ามียุทธศาสตร์ต่อการทดสอบมีน้ำหนักโมเลกุล 186, 169.8, 106.6, 101.1, 78.5, 74.1, 57.2, 53.7, 48.7, 46.7, 41, 37.7, 31.7, 21.3 และ 20 kDa (ตารางที่ 4.4) โดยพบว่ามีเพียง 6 แถบโปรตีนเท่านั้นที่ซีรัมของไก่ทั้ง 3 ประเภทให้ผลบวกต่อการทดสอบตรงกัน คือแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 และ 37.7 ส่วนซีรัมไก่ปกติที่นำมาทดสอบ พบว่ามีแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบที่แตกต่าง มีน้ำหนักโมเลกุล 119, 112.2, 46.7 และ 45.7 kDa ขณะที่แถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *E. tenella* พบได้ 2 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 119 และ 112.2 kDa แถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *Newcastle* พบได้ 9 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 119, 112.2, 78.5, 74.1, 64.5, 46.7, 31.7, 30.1, 21.3 และ 20 kDa แถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *L. sabraezesi* พบได้ 13 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 119, 78.5, 74.1, 64.5, 57.2, 51.05, 46.7, 36.8, 33.8, 31.7, 30.1, 21.3 และ 20 kDa ฉะนั้นจากการทดสอบนี้พบว่าแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* มีน้ำหนักโมเลกุล 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 และ 37.7 kDa ซึ่งแตกต่างแถบโปรตีนที่พบจากการติดเชื้ออื่นๆ (รูปที่ 4.31 และรูปที่ 4.32)



รูปที่ 4.31 แถบโปรตีนแอนติเจนของ crude Pg antigen ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบกับซีรัมไก่ด้วยวิธี Western blot

- A = Protein Marker
- B = ซีรัมอ้างอิงไม่ติดเชื้อ (NI)
- C-F = ซีรัมอ้างอิงติดเชื้อ Pg (PI)
- G-I = ซีรัมไก่ทดลองที่ฉีดเชื้อ Pg
- J-L = ซีรัมไก่ติดเชื้อ Pg ในแหล่งระบาศ
- M = ซีรัมไก่ติดเชื้อ *E. tenella*
- N = ซีรัมไก่ติดเชื้อ Newcastle
- O = ซีรัมไก่ติดเชื้อ *L. sabrazezi*



รูปที่ 4.32 ไดอะแกรมแสดงแถบโปรตีนแอนติเจนของ crude Pg antigen ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบกับซีรัมไก่ด้วยวิธี Western blot

- A = Protein Marker
- B = ซีรัมอ้างอิงไม่ติดเชื้อ (NI)
- C-F = ซีรัมอ้างอิงติดเชื้อ Pg (PI)
- G-I = ซีรัมไก่ทดลองที่ฉีดเชื้อ Pg
- J-L = ซีรัมไก่ติดเชื้อ Pg ในแหล่งระบาศ
- M = ซีรัมไก่ติดเชื้อ *E. tenella*
- N = ซีรัมไก่ติดเชื้อ Newcastle
- O = ซีรัมไก่ติดเชื้อ *L. sabrazezi*

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. gallinaceum* และเม็ดเลือดแดงปกติของไก่ที่ทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และด้วยวิธี Western blot analysis ที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีในซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ

น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	SDS-PAGE			ซีรัมที่นำมาทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis						
	Std. protein	Crude <i>Pg ag</i>	Normal rbc	NI	PI	Test sample	Field	<i>E. tenella</i>	Newcastle	<i>L. sabrazezi</i>
205	+		+							
202			+							
186					+	+				
169.8			+		+	+				
130.3		+								
119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112			+	+	+	+	+	+	+	
106.6		+			+	+	+			
101.1					+	+	+			
98	+	+	+			+				
92		+	+		+		+			
86			+		+					
80.9		+	+							
83					+					
78.5		+			+	+	+		+	+
74.1					+	+	+		+	+
69.5		+	+							
64.5					+		+		+	+
60.2		+	+							
57.2					+	+	+			+
56.2		+	+							
53.7					+	+	+			
52.3	+									
51.05										+
50.1		+	+							
48.7					+	+	+			
47.8		+	+							
46.7				+	+	+	+		+	+
45.7			+	+	+	+				
43.6					+		+			
42.6		+			+	+	+			
41					+	+	+			
39.3		+			+		+			
37.7					+	+	+			
36.8	+	+	+		+					+
35					+					
34.1			+							
33.8										+
31.7		+	+		+	+	+		+	+
30.1	+				+		+		+	+
27.7							+			
22	+									
21.8		+	+							
21.3					+	+	+		+	+
20		+	+		+	+	+		+	+

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง วิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการติดเชื้อ อัตราการตาย ภาวะโลหิตจาง และการตรวจหาระดับแอนติบอดีในไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA, ELISA และโปรตีนแอนติเจนของเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot analysis ในไก่เนื้อ คณะแพศ พันธ์ Arbor acres จำนวน 120 ตัว 3 กลุ่มอายุ คือ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มละ 40 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว ได้รับการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดปริมาณ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ ติดตามผลทุก 3 วัน ติดต่อกันเป็นเวลานาน 30 วัน ปรากฏว่าไก่กลุ่มอายุ 10 และ 20 วัน กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อทุกกลุ่มมีการติดเชื้อ 100% ไก่อายุ 10 วันที่ได้รับเชื้อ อัตราการตาย 73.33% สูงกว่าไก่อายุ 20 วัน ซึ่งมีอัตราการตาย 40.0% ภาวะโลหิตจางของไก่ทั้ง 2 กลุ่มอายุคล้ายคลึงกัน ปรากฏชัดในวันที่ 12 ถึงวันที่ 24 หลังจากได้รับเชื้อ ค่าเฉลี่ย PCV ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 24% ไก่กลุ่มควบคุมอายุ 10 และ 20 วัน ไม่พบเชื้อตลอดการทดลอง อัตราการตายอยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่ปรากฏภาวะโลหิตจาง ไก่อายุ 30 วัน ทุกกลุ่มย่อยไม่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด ค่าเฉลี่ย PCV อยู่ในเกณฑ์ปกติ ไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อมีการตายเกิดขึ้น 10-20% ใกล้เคียงกัน

การทดสอบหาระดับแอนติบอดีในไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี IFA สไลด์แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบเตรียมจากเลือดที่มีระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง 80% ผลการทดสอบหามาตรฐานของการทดลองจาก checkerboard titration ของซีรัมอ้างอิงที่ติดเชื้อ จำนวน 26 ตัวอย่าง และไม่ติดเชื้อ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้ซีรัมที่ระดับความเข้มข้น 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625 และ 1/78125 และ FITC 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 และ 1/100000 พบว่าซีรัมอ้างอิง และ FITC มี optimum dilution ที่ 1/625 และ 1/100 ตามลำดับ ในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* จากซีรัมของไก่ทดลอง อายุ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มย่อยต่างๆที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าทางเส้นเลือดและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อทุกตัวอย่าง ซีรัมไก่ไขในฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย และซีรัมของไก่ที่ติดเชื้ออื่นๆ ผลปรากฏว่าซีรัมของไก่อายุ 10 และ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยให้ผลบวกต่อการทดสอบ 100% ระดับของแอนติบอดีที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ 1/625-1/15625 ตั้งแต่วันที่ 9 หลังจากที่ได้รับเชื้อ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง สอดคล้องกับผลการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด สำหรับไก่อายุ 30 วัน ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อในไก่ทุกกลุ่มย่อย แต่ซีรัมของกลุ่มที่ได้รับเชื้อให้ผลบวกต่อการทดสอบ 30-85% ระดับแอนติบอดีไม่เกิน 1/3125 ส่วนไก่กลุ่มควบคุมทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าซีรัมให้ผลบวกต่อการทดสอบ 10-30% ระดับแอนติบอดีต่ำ 1/625 ตลอดการทดลอง ผลการตรวจไก่ภาคสนามจากแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย 67 ตัวอย่าง

ที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด 52.24% พบว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA สูงถึง 94.03 % และการทดสอบกับซีรัมไก่ที่ติดเชื้อมี พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ *Leucocytozoon sabraezesi* (0/4), *Eimeria tenella* (0/18) และ เชื้อไวรัส Newcastle (0/10)

การวิเคราะห์และประเมินผลการทดสอบด้วยวิธี IFA ของซีรัมไก่อ้างอิง (PI) และซีรัมไก่ทดลองอายุ 10, 20 และ 30 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับการฉีดเชื้อปริมาณต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับ การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสี พบว่าดัชนีชี้วัดของการทดสอบซีรัมอ้างอิงด้วยวิธี IFA มี Sensitivity 96.15%, Specificity 100%, Accuracy 100%, Predictive value positive test 100%, และ Predictive value negative test 90.91% ในขณะที่ผลการทดสอบด้วยวิธี IFA ของซีรัมไก่ทดลองทุกกลุ่มอายุ ที่ได้รับปริมาณเชื้อต่าง ๆ นั้น ดัชนีชี้วัดของการทดสอบด้วยวิธี IFA มี Sensitivity 56.45%, Specificity 100%, Accuracy 59.7%, Predictive value positive test 100% และ Predictive value negative test 15.6%

ในการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA แอนติเจน ที่ใช้ในการทดลองเป็น crude *Pg* antigen เตรียมจากการปั่นแยกเชื้อด้วยวิธี Ficoll-hypaque discontinuous gradients ที่แรงเหวี่ยง 2,057xg ซ้ำ 2 ครั้ง การทดสอบหามาตรฐานของการทดลอง ด้วยวิธี ELISA จาก checkerboard titration ของ crude *Pg* antigen 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 และ 1/25600 ซีรัมอ้างอิงที่ติดเชื้อ จำนวน 3 ตัวอย่าง และไม่ติดเชื้อ จำนวน 3 ตัวอย่าง เจือจาง 1/10, 1/100, 1/1000 และ 1/10000 และ peroxidase conjugated 1/30000 วัดค่า Absorbance ที่ 405 นาโนเมตร ผลปรากฏว่า optimum dilution ของ crude *Pg* antigen มี อัตราส่วน 1/100-1/1600 ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ 1/400 (ความเข้มข้นของโปรตีน 17.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) optimum dilution ของ ซีรัมอ้างอิง 1/100 และค่า cut off ที่ OD 0.307

ผลการใช้วิธี ELISA ทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในซีรัมของ ไก่ทดลอง อายุ 10, 20 และ 30 วัน กลุ่มย่อยต่างๆที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าเส้นเลือดและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อทุกตัวอย่าง ซีรัมไก่ในฟาร์มที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย 67 ตัวอย่าง และซีรัมของ ไก่ที่ติดเชื้อมี ปรากฏว่าซีรัมของไก่อายุ 10 และ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยให้ผลบวกต่อการทดสอบ ไก่ อายุ 10 วัน กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^6 และ 10^3 infected rbc ซีรัมให้ผลบวกต่อการทดสอบ ตั้งแต่วันที่ 12 หลังจากได้รับเชื้อ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองค่าเฉลี่ย OD 0.410 และ 0.386 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc มีค่าใกล้เคียงหรือต่ำกว่าค่า cut off ตั้งแต่วันที่ 18 ของการทดลองเป็นต้นไป ซีรัมของไก่อายุ 20 วัน กลุ่มย่อย 2-4 ที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 , 10^3 และ 10^0 infected rbc ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ตั้งแต่วันที่ 9 หลังจากได้รับเชื้อ โดยกลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10 และ 10^3 infected rbc ให้ผลบวกต่อการทดสอบเกือบตลอดการทดลอง สำหรับ ซีรัมของไก่กลุ่มย่อยที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc นั้นค่าเฉลี่ย OD ส่วนใหญ่ให้ผลลบต่อการทดสอบ

ยกเว้นวันที่ 9, 24 และ 30 หลังจากได้รับเชื้อ ส่วนซีรัมไก่อายุ 30 วัน ที่ได้รับเชื้อให้ผลลบต่อการทดสอบเกือบตลอดการทดลอง ผลการทดสอบซีรัมไก่ภาคสนามในแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ปรากฏว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบ 55.22% (37/67) ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกับที่ตรวจพบเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบางย้อมสี 52.24% (35/67) ส่วนซีรัมของไก่ที่มีการติดเชื้ออื่น พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ *Leucocytozoon sabrazesi* (4/4) แต่ไม่มีปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อบิด *Eimeria tenella* (0/18) และเชื้อไวรัส Newcastle (0/10)

การวิเคราะห์และประเมินผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของซีรัมอ้างอิง และซีรัมไก่ทดลอง ทั้ง 3 กลุ่มอายุ ทุกกลุ่มย่อยที่ได้รับการฉีดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า พบว่าดัชนีชี้วัดของการทดสอบซีรัมอ้างอิง มี Sensitivity 100%, Specificity 100%, Accuracy 100%, Predictive value positive test 100% และ Predictive value negative test 100% แตกต่างจากดัชนีชี้วัดของการทดสอบของซีรัมไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อที่มี Sensitivity 78.37%, Specificity 83.33%, Accuracy 80.6%, Predictive value positive test 85.3% และ Predictive value negative test 75.75%

เมื่อเปรียบเทียบผลของดัชนีชี้วัดในการทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA จะเห็นได้ว่าการทดสอบที่ใช้ซีรัมอ้างอิงให้ผลแตกต่างจากการทดสอบที่ใช้ซีรัมจากไก่ทดลองทั้ง 3 อายุที่ได้รับเชื้อปริมาณต่างๆ ซีรัมไก่กลุ่มอ้างอิงมีดัชนีชี้วัดของการทดสอบด้วยวิธี ELISA สูงกว่าวิธี IFA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง sensitivity และ Predictive value negative test ในขณะที่ซีรัมของไก่ทดลองนั้นดัชนีชี้วัดของการทดสอบด้วยวิธี IFA มี Specificity และ Predictive value positive test สูงกว่าวิธี ELISA แต่มี Sensitivity, Accuracy และ Predictive value negative test ต่ำกว่าการทดสอบด้วยวิธี ELISA มาก

การศึกษาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot analysis ใช้ crude *Pg* antigen นำมาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue ผลปรากฏว่าโปรตีนของ crude *Pg* antigen และเม็ดเลือดแดงไก่ปกติถูกแยกออกเป็น 18 และ 21 แถบ ตามลำดับ แถบโปรตีนที่แตกต่างกันและพบได้เฉพาะใน crude *Pg* antigen มีน้ำหนักโมเลกุล 130.3, 106.6, 78.5, 42.6 และ 39.3 kDa และแถบโปรตีนที่พบได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ มีน้ำหนักโมเลกุล 205, 202, 169.8, 112, 90.1, 86, 45.7 และ 34.1 kDa เมื่อใช้แถบโปรตีนของ crude *Pg* antigen ที่ได้จากวิธี SDS-PAGE นำมาทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis โดยใช้ซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ซึ่งให้ผลบวกสูงต่อการทดสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี IFA และ ELISA (1/156225-1/78125) เจือจาง 1/100 ผลปรากฏว่าพบแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมทุกตัวอย่าง มีน้ำหนักโมเลกุล 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 และ 37.7 kDa ส่วนแถบโปรตีนแอนติเจนที่มีปฏิกิริยาข้ามพบได้ใน ซีรัมไก่

ปกติ 4 แถบ ซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *E. tenella* 2 แถบ ซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ Newcastle 9 แถบ และซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ *L. sabrazesi* 13 แถบ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาและทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไก่อายุน้อยมีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่า และระดับเชื้อในกระแสเลือดและอัตราการตายสูงกว่าไก่อายุมากกว่าที่ติดเชื้อในปริมาณเท่ากัน ไก่อายุ 10 และ 20 วัน มีโอกาสติดเชื้อและตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ 100% เท่ากัน แต่ความไวต่อเชื้อแตกต่างกัน เนื่องจากไก่อายุ 10 วัน มีน้ำหนักตัวเพียง 154 กรัม ขณะเริ่มต้นการทดลอง จึงมีอัตราการตายสูง 73.33% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ ไก่อายุ 20 วัน ที่มีน้ำหนักตัว 320 กรัม อัตราการตาย 40.0% ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากไก่ซึ่งมีอายุน้อย และน้ำหนักน้อยนั้น มีความต้านทานต่ำ เชื้อมีโอกาสเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ง่ายกว่า และสามารถแบ่งตัวภายในเม็ดเลือดแดงได้รวดเร็วกว่าไก่ที่มีอายุมากหรือมีน้ำหนักมาก ระดับเชื้อที่พบในกระแสเลือดจึงมีปริมาณมาก ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายเป็นจำนวนมาก ไก่ไม่อาจสร้างเม็ดเลือดแดงทดแทนได้ทันจึงมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อและการตายสูง (Garnham, 1966) ส่วนไก่กลุ่มอายุ 30 วัน ขณะเริ่มต้นการทดลองมีน้ำหนักตัว 790 กรัม มีอัตราการตายใกล้เคียงกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อ ทั้งที่ไม่ปรากฏเชื้อในกระแสเลือด การตายของไก่กลุ่มนี้จึงน่าจะเกิดจากสาเหตุอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความเครียดที่อาจเกิดจากความไม่เหมาะสมของกรงที่ใช้เลี้ยงสัตว์ซึ่งมีพื้นที่ค่อนข้างจำกัด เนื่องจากการทดลองครั้งนี้กรงที่ใช้เลี้ยงไก่มีขนาด $2.5 \times 2.5 \times 1$ เมตร ซึ่งเท่ากับ 0.625 ตารางเมตร ต่อตัว ตามปกติอัตราส่วนของพื้นที่ดังกล่าวนั้น ควรเลี้ยงไก่เนื้ออายุ 30 วัน ได้ไม่เกิน 8 ตัว เป็นระยะที่ไก่มีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมากและมีความเครียดสูง (คู่มือการเลี้ยงไก่ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด, 2543) นอกจากนี้สภาพของไก่เนื้อที่เลี้ยงตามธรรมชาติควรมีพื้นเรียบและมีวัสดุรองพื้น ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงบนพื้นกรงตะแกรงลวดจึงมีผลต่อการทรงตัว ไม่สามารถเหยียบพื้นได้เต็มที่ จำเป็นต้องปรับตัวมาก การพักผ่อนของไก่ไม่เพียงพอ เกิดความเครียดง่าย และไวต่อการติดเชื้ออื่นร่วม นอกจากนี้การตายของไก่บางตัวอาจมีผลมาจากการทดลองโดยตรงที่มีการเจาะเลือดหลายครั้ง (ทุก 3 วัน) ส่งผลให้ไก่เกิดความเครียดสูงมากยิ่งขึ้น

การทดลองครั้งนี้ไก่เนื้อทุกกลุ่มใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงชนิดเชื้อเข้าเส้นเลือดดำ ในไก่อายุ 10 และ 20 วัน เชื้อมีระยะฟักตัว 3-27 วัน ซึ่งเร็วกว่าไก่เนื้อที่ได้รับการฉีดเชื้อเข้าทางผิวหนัง (ปิยะนันท์, 2542) เชื้อสามารถฟักตัวในไก่อายุ 10 วันได้เร็วกว่าในไก่อายุ 20 วัน โดยจะปรากฏในกระแสเลือดได้ในเวลาที่เร็วกว่า และระดับของเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงอย่างรวดเร็ว ทำให้ไก่ตายเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (Garnham, 1966)

การศึกษาค้นคว้านี้สอดคล้องกับหลายรายงาน (Garnham, 1966 ; El-Nahal, 1966 ; Soni and Cox, 1974 ; ปิยะนันท์, 2542 ; สุวรรณี, 2543b) ที่พบว่าระยะพักตัว อัตราการติดเชื้อ ระดับเชื้อในกระแสเลือด และอัตราการตาย ผันแปรตาม ขนาด อายุสัตว์ ปริมาณเชื้อที่ได้รับ และ route of infection ไก่ที่โตเต็มที่มักมีความต้านทานต่อเชื้อสูง มักไม่รุนแรง โอกาสตายน้อย ทั้งการติดเชื้อตามธรรมชาติและในห้องทดลอง (ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ปิยะนันท์, 2542 ; สุวรรณี, 2543b ; ดำเนิน, 2544 ; El-Nahal, 1966 ; Smyth, 1994) ไก่ที่ติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงมีความไวต่อเชื้อสูงกว่าการติดเชื้อระยะ sporozoite ซึ่งเป็นระยะติดต่อโดยธรรมชาติจากยุง (Soulby, 1982) นอกจากนี้ไก่สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงในอุตสาหกรรมมีความไวแตกต่างกันและมีความไวสูงกว่าไก่ป่า (Garnham, 1966) และเพศเมียมีความไวต่อการติดเชื้อสูงกว่าเพศผู้ ซึ่งในการศึกษาค้นคว้านี้ไก่เนื้อที่ใช้ คละเพศ ผลการทดลองจึงอาจแตกต่างจากการทดลองที่ใช้ไก่เพศใดเพศหนึ่ง (Levine, 1985)

การทดลองครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาอาการของไก่ที่ติดเชื้อ เว้นแต่ภาวะโลหิตจางซึ่งเป็นอาการหนึ่งที่สำคัญและปรากฏบ่อย โดยพบว่าไก่เนื้ออายุ 10 วัน มีภาวะโลหิตจางน้อยกว่าไก่อายุ 20 วัน ทั้งนี้เนื่องจากไก่อายุ 10 วัน มีความต้านทานน้อย ร่างกายไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ดี การติดเชื้อและระดับเชื้อขึ้นสูงอย่างรวดเร็ว ไก่แสดงอาการป่วย และอัตราการตายสูง ในขณะที่ไก่อายุ 20 วัน แม้ว่าจะมีอัตราการติดเชื้อเท่ากัน แต่ระดับเชื้อในกระแสเลือดต่ำกว่า แสดงอาการป่วยน้อยกว่า และอัตราการตายต่ำกว่า พบว่าไก่มีภาวะโลหิตจางสูงจํานวนกว่านั้น อาจเนื่องจากในระยะแรกร่างกายของไก่ยังไม่สามารถสร้างเม็ดเลือดที่ถูกทำลายได้ทัน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าระยะก่อนสิ้นสุดการทดลองนั้น ค่า PCV เริ่มขึ้นสูงในระดับหนึ่ง เคยมีบางรายงานได้ศึกษาภาวะโลหิตจางในไก่เนื้อทั้งจากภาคสนามและจากการทดลองโดยประเมินจากค่า PCV พบว่าไก่เนื้อจากภาคสนามมีค่า PCV 11.6% (ชัยศิริ และคณะ, 2539) และจากการทดลองไก่เนื้อมีค่า PCV 15.0-24.0% (ดำเนิน, 2544)

ไก่อายุ 10 วันบางตัว และไก่อายุ 20 วัน ทุกกลุ่มย่อยที่รับเชื้อ *P. gallinaceum* เชื้อปรากฏอยู่ในกระแสเลือดและขึ้นสูงเป็นระยะหนึ่ง ต่อมาระดับเชื้อลดต่ำลงเรื่อยๆ และในระยะ 3-9 วัน ก่อนสิ้นสุดการทดลอง ไก่อายุ 10 วัน 26.67% (จำนวน 8/30 ตัว) และไก่อายุ 20 วัน 60% (จำนวน 18/30 ตัว) ตรวจพบเชื้อระดับต่ำมากหรือตรวจไม่พบ การที่ไก่อายุ 20 วัน มีอัตรารอดสูง และระดับเชื้อลดต่ำหรือตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดนั้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อไก่ที่ได้รับเชื้อมีอายุมากขึ้นมีความต้านทานต่อเชื้อสูง ทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้แม้ว่าจะไม่สมบูรณ์ก็ตาม บางรายงานกล่าวว่าเชื้อจํานวนน้อยๆ ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงสามารถกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า premunition ได้ (Garnham, 1966) จากการศึกษาดูทางชีววิทยา โดยใช้วิธี IFA และ ELISA ทดสอบหาระดับ

แอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ผลการทดสอบด้วยวิธี IFA ปรากฏว่าไก่เนื้ออายุ 10 วันที่ได้รับ การฉีดเชื้อ 10^{10} และ 10^6 infected rbc นั้น ซีรัมของไก่ทุกตัวให้ผลบวกต่อการทดสอบ ตั้งแต่วันที่ 9 เป็นต้นไป เช่นเดียวกับไก่กลุ่มอายุ 20 วัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการปรากฏของเชื้อในกระแสเลือด ของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม ทุกตัว และมีความสัมพันธ์กับภาวะเลือดจางเช่นกัน สำหรับไก่อายุ 30 วัน ที่ได้รับ เชื้อแต่เชื้อไม่ปรากฏในกระแสเลือดนั้น การทดสอบให้ผลบวกในระดับต่ำและผันแปรสูง แต่ผลที่ ปรากฏสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมทุกกลุ่มอายุ การที่ระดับแอนติบอดีขึ้นสูงในไก่กลุ่มอายุ 10 และ 20 วัน ในขณะที่เชื้อปรากฏอยู่นั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจากภาวะ premunition ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น ซึ่ง ภาวะนี้มักพบได้ในการติดเชื้อโปรโตซัว (Garnham, 1966) โดยระดับภูมิคุ้มกันจะขึ้นสูงในขณะที่เชื้อ ปรากฏในสัตว์ระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามถ้าระดับภูมิคุ้มกันลดต่ำลง เชื้อในกระแสเลือดจะสามารถ เพิ่มปริมาณสูงขึ้น จนกระทั่งเกินความสามารถของร่างกายที่จะต่อต้านหรือทำลายเชื้อได้สูงพอ แม้ว่าภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่ก่อสร้างขึ้นได้ระดับหนึ่ง และถ้าไม่สูงพอเชื้อยังคงเพิ่มจำนวนได้มากและ รวดเร็ว อาจเข้าไปทำลายเม็ดเลือดแดงจนกระทั่งไก่ไม่สามารถสร้างเม็ดเลือดแดงได้ทัน ดังนั้นใน การติดเชื้อบางอย่างและบางขณะ ระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นและตรวจพบจากการทดสอบดังเช่น การศึกษา นี้ อาจเป็นประโยชน์เฉพาะในด้านการตรวจวินิจฉัยเท่านั้น (Smith *et al.*, 1961 ; Todorovic *et al.*, 1968 ; Lykins *et al.*, 1971) สำหรับดัชนีชี้วัดที่ประเมินในครั้งนี้เป็นการศึกษา เฉพาะซีรัมไก่กลุ่มอ้างอิงและไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำนั้น ยังไม่ได้มีการ ประเมินผลจากภาคสนามที่อาจมีการติดเชื้อชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วม ซึ่งอาจพบปฏิกิริยาข้าม กับเชื้ออื่นๆที่ยังไม่ได้ทำการศึกษานอกเหนือจากเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยที่ดัชนีชี้วัด ของการทดสอบในไก่ทดลองด้วยวิธี IFA นั้น แม้ว่ามี Specificity สูง แต่ sensitivity และ accuracy ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบด้วยวิธี ELISA

อย่างไรก็ตามในการศึกษาเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธี ELISA ครั้งนี้ แม้ว่าผลการวิเคราะห์ดัชนีชี้วัดของการทดสอบของซีรัมไก่ทดลองประเมินว่าให้ผลที่ดีกว่า IFA ทั้ง sensitivity, accuracy, และ predictive negative value test แต่การทดลองครั้งนี้มีข้อที่นำ สังกเหตุหลายประการโดยเฉพาะ crude *Pg* antigen ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งมีการปนเปื้อนของ นิวเคลียสจำนวนหนึ่ง แม้ผลของการทดสอบปรากฏเด่นชัดและค่อนข้างดี ซึ่งจะเห็นได้จากการใช้วิธี western blot analysis เมื่อนำมาทดสอบกับซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* สามารถตรวจพบ แถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อได้ แต่แอนติเจนที่เตรียมจาก crude *Pg* antigen อาจไม่สมบูรณ์นัก เพราะหลังจากที่ทำให้เชื้อแตกสลายด้วย sonicator เมื่อนำส่วนของ supernatant มาใช้ในการ ทดสอบนั้น ผู้ทำวิทยานิพนธ์ไม่ได้ทำการศึกษารวบรวมของตะกอนว่ามีเชื้อคงอยู่ในตะกอนมากน้อย เพียงใด นอกจากนี้สารละลายที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจนครั้งนี้เป็นเพียง PBS ที่ไม่ได้เติม tween-

20 หรือสารละลายอื่นซึ่งเป็น detergent ที่ทำให้เซลล์ของเชื้อแตกสลายได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นเชื้อส่วนหนึ่งอาจถูกกำจัดไปในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจน

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วย ELISA ของการศึกษาคั้งนี้ พบว่าไก่อายุ 10 วัน ที่ได้รับเชื้อ 10^2 และ 10^3 infected rbc ให้ผลต่อการทดสอบ ตั้งแต่วันที่ 12 จนถึงสิ้นสุดการทดลองค่อนข้างดี ในขณะที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ระดับแอนติบอดีค่อนข้างต่ำและพบได้เพียงระยะสั้นๆ เช่นเดียวกับไก่อายุ 20 วัน ที่ระดับแอนติบอดีให้ผลบวกตั้งแต่วันที่ 9 และต่อเนื่อง ไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^2 ให้ผลบวกตลอดการทดลอง และกลุ่มที่ได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc มีเพียงบางระยะที่ให้ผลลบ ในขณะที่ไก่ที่ได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ระดับแอนติบอดีต่ำ ให้ผลบวกบางวันเท่านั้น สำหรับไก่อายุ 30 วันที่ได้รับเชื้อ ให้ผลลบต่อการทดสอบ เช่นเดียวกับไก่กลุ่มควบคุมทุกกลุ่มอายุ

การทดสอบด้วยวิธี IFA และ ELISA เพื่อตรวจสอบภาวะการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ของไก่มีการศึกษาน้อยมาก สำหรับการศึกษานี้มีในนกจากต่างประเทศ แต่การทดลองดังกล่าว ได้ใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก *P. falciparum* ซึ่งเป็น monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสกุล *Plasmodium* ซึ่งไม่จำเพาะ species (Graczyk et al., 1993 ; Graczyk et al., 1994) สำหรับ Western blot analysis ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ทำการศึกษาคั้งนี้มีแถบโปรตีนจำนวน 6 แถบโปรตีน ที่มีความจำเพาะต่อ *P. gallinaceum* โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงปกติ หรือไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของเชื้อชนิดอื่น ซึ่งแถบโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวนี้ น่าจะนำมาศึกษา monoclonal antibody สำหรับการทดสอบเพื่อทำการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทยต่อไป แถบโปรตีนที่น่าสนใจที่สุดคือ 106.6, 101.1, 53.7, 48.7, 41 และ 37.7 kDa เนื่องจากเป็นแถบที่ให้ปฏิกิริยาที่เด่นชัด คาดว่าน่าจะมีปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีมากพอสำหรับเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาในขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

โรคมาลาเรียไก่มีความแตกต่างจากโรคมาลาเรียในคนหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ (ปิยะนันท์, 2542) จึงจำเป็นต้องศึกษาในตัวสัตว์ตลอดการทดลอง ซึ่งมีปัจจัยหลายประการเข้ามาเกี่ยวข้องโดยเฉพาะการผ่านเชื้อเพื่อให้เชื้อมีชีวิตรอด เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องให้การเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาการศึกษา ดังนั้นผู้ที่ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องมาลาเรียต้องมีการวางแผนอย่างดี ในการเตรียมการดูแลสัตว์ การศึกษาเกี่ยวกับตัวเชื้อ และยุงพาหะ เพื่อให้เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและความรุนแรง จากประสบการณ์ของผู้ทำวิทยานิพนธ์ในระยะแรกไม่มีประสบการณ์ในการทำงาน หลักการวางแผน ทั้งในแง่ของ ไก่ ยุง และเชื้อมาลาเรีย จึงทำให้ประสบกับอุปสรรคและปัญหาหลายครั้งของการทดลองย่อย ดังนั้นในกรณีที่มี

การศึกษาในอนาคต ผู้ประสงค์ที่จะทดลองเรื่องนี้ ควรจะเตรียมตัวให้มากพอสมควรซึ่งข้อที่ควรจะเสนอแนะมีดังต่อไปนี้

1. การทดลองจะต้องมีกรงและห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่เหมาะสม และปลอดภัย
2. ควรมีการวางแผนและทำการทดลองล่วงหน้าก่อนนำเสนอโครงร่างเพื่อให้การทดลองมีข้อบกพร่องน้อยที่สุด
3. ควรศึกษาเกี่ยวกับแอนติเจนที่ใช้เพิ่มเติมและควรทดสอบให้แน่ใจว่ามี validity ต่อการทดสอบที่ใช้
4. ควรศึกษา heterogenicity /polymorphism ของเชื้อซึ่งอาจมีผลต่ออัตราการติดเชื้อ ภาวะโลหิตจาง และภาวะภูมิคุ้ม
5. การศึกษาและการทดสอบระดับแอนติบอดีเพื่อการวินิจฉัยควรเข้าใจถึงหลักการของ sensitivity, specificity, accuracy, predictive positive value และ predictive negative value ให้ถ่องแท้ ก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในภาคสนาม โดยทดสอบ หลายๆ ครั้งจนกระทั่งแน่ใจว่าให้ผลดีอย่างแท้จริง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กนกนารถ ชูปัญญา. 2525. คู่มือการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เล่ม 1. โครงการตำรา-ศิริราช
คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 81-87.
- จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์. 2544. การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. ธนาเพลส แอนด์
กราฟฟิค จำกัด กรุงเทพฯ. 192 หน้า.
- ชัยศิริ มหันตชัยสกุล, ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และ ทศนีย์ ชมภูจันทร์. 2539. โรคมะลาเรียในไก่ที่พบใน
ประเทศไทย 1. การเกิดโรคมะลาเรียในไก่กระตังและการป้องกันรักษา. การประชุม
วิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 1
กุมภาพันธ์ หน้า 429-434.
- ชัยศิริ มหันตชัยสกุล. 2542. การระบาดของโรคมะลาเรียในไก่ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย. โรคมะลาเรีย
ในไก่เนื้อและไก่ไข่. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและ
สหกรณ์. หน้า 25-31.
- ชัยศิริ มหันตชัยสกุล. 2545. โรคสัตว์ปีกในเขตภาคกลางของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2533-2544.
การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 28 วันที่ 9-11 ตุลาคม 2545.
- ชิต ศิริวรรณ และ ชัยศิริ มหันตชัยสกุล. 2541. Highlight สุขภาพสัตว์. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพ
สัตว์แห่งชาติ. ปีที่ 7 ฉบับที่ 2 ประจำเดือน มีนาคม – เมษายน.
- ดำเนิน เสาะสืบงาม. 2544. ความไวของไก่อายุต่างๆที่ได้รับเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม และ
การรักษาด้วยยา อาทิสูเนต คลอโรควิน ด็อกซีไซคลิน ไพรมาควิน และอาทิสูเนตร่วมกับ
ไพร์มาควิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทวี สายวิชัย. 2542. การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียไก่ที่ระบาดในประเทศไทยโดยใช้ลำดับเบส
ของยีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิวิทยาทางสัตว
แพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทวี สายวิชัย, สุวรรณี นิธิอุทัย, พงษ์ หาดบุญทอนกร และ โกสุม จันทร์ศิริ. 2543. การจำแนกชนิด
ของเชื้อมาลาเรียในไก่ที่ระบาดในประเทศไทยโดยใช้ลำดับเบสของยีน small subunit
ribosomal RNA. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38
ระหว่างวันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. หน้า 140.

- ทัศนีย์ ชมภูจันท์, ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และ ชัยศิริ มหันตชัยสกุล. 2538. การระบาดของโรคมาลาเรียในไถ่กระตัง. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. ปีที่ 4 ฉบับที่ 6 ประจำเดือน พฤศจิกายน - ธันวาคม.
- ทัศนีย์ ชมภูจันท์, สอนทนา มิระพันธ์, ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และ กิ่งดาว หมอแก้ว. 2539. โรคมาลาเรียในไถ่ที่พบในประเทศไทย II. การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย และพยาธิสภาพของโรคในไถ่กระตัง. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ หน้า 429-434.
- ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์. 2542. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไถ่กระตังที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และ ทัศนีย์ ชมภูจันท์. 2541. มาลาเรีย วิกฤตการณ์ใหม่ในไถ่. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. ปีที่ 7 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน พฤษภาคม - มิถุนายน.
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์. 2541. มาลาเรียไถ่ : เอกสารแจกประกอบการสัมมนาเกษตรกรผู้เลี้ยงไถ่ ในหัวข้อเรื่อง มองต่างมุมปัญหาไถ่ อะไรคือสาเหตุให้ผลผลิตตกต่ำ. วันที่ 10 พฤศจิกายน 2541 ณ ห้องไถ่ป็น โรงแรมรอยัลพลาซ่า จ.ฉะเชิงเทรา หน้า 1-17.
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์, ชัยศิริ มหันตชัยสกุล, ทัศนีย์ ชมภูจันท์, กิ่งดาว หมอแก้ว และ อนุชา สุขรัตน์. 2542a. ผลของการใช้ยาคลอโรควินและดีออกซีไซคลินรักษาโรคมาลาเรียในไถ่เนื้อ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ หน้า 445-452.
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์, พูลศักดิ์ บุญเรือง, อนุชา สุขรัตน์, กิ่งดาว หมอแก้ว, สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ และ ศิระวัส เหมือนแก้ว. 2542b. ผลของการใช้ยาคลอโรควินรักษาโรคมาลาเรียในไถ่เนื้อ. การประชุมสัมมนาวิชาการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 23-25 มิถุนายน 2542.
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์. 2543. โรคมาลาเรียในไถ่เนื้อและไถ่ไข่. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 53 หน้า.
- มานพ ม่วงใหญ่. 2540. พลาสมอดีียม เฮโมโปรเตียส และลิวโคไซโตซูน : วิทยาสัตว์ เพล็ดเดียวทางสัตวแพทย์. หน้า 174-191.
- วินัย จะแรมรัมย์, อภิรมย์ เจริญไชย, มานวิกา ผลภาค และ รุ่งสุดา ผูกพัน. 2542. รายงานสัตว์ป่วย : การระบาดของโรคมาลาเรียในไถ่พันธุ์สยาม-ญี่ปุ่น. สัตวแพทยสาร. ปีที่ 50 เล่มที่ 3 ประจำเดือนธันวาคม.

- สุตจิตต์ จุ่งพิวัฒน์, สุวรรณี นิธิอุทัย, ธิราชูทร์ ไผ่สีตะมวงคณ, บุญเลิศ ปรีชาตั้งกิจ และ รัฐพันธ์ พัฒน
รังสรรค์. 2539. ปรสิตในเลือดของนกป่า 9 ชนิดในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี.
วารสารสัตวป่าเมืองไทย. 5(2) : 127-133.
- สุตจิตต์ จุ่งพิวัฒน์, สุวรรณี นิธิอุทัย และ ธิราชูทร์ ไผ่สีตะมวงคณ. 2543. การสำรวจชนิดของยุงใน
แหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไก่อในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 ระหว่างวันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. หน้า 143.
- สุทธิศักดิ์ นพวิญญูวงศ์, สุธิดา วิริยาเมธาโรจน์ และ สมบูรณ์ แสงมณีเดช. 2545. ประสิทธิภาพของ
ยาไพโรมาควิน คลอโรควิน และดอกซีไซคลิน ในการรักษาโรคมาลาเรียไก่อ. การประชุม
วิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 28 วันที่ 9-11 ตุลาคม 2545.
- สุวรรณี นิธิอุทัย, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ ทวี สายวิชัย. 2543a. การพัฒนาเทคนิคในการตรวจหา
เชื้อมาลาเรียไก่อโดยใช้ปฏิกิริยาโพลีเมอเรสเชนรีแอกชั่น. หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชา
พยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวรรณี นิธิอุทัย, สุตจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และ ธิราชูทร์ ไผ่สีตะมวงคณ. 2543b. ยุงที่มีศักยภาพเป็นพาหะ
นำโรคมาลาเรียไก่อในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 ระหว่างวันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. หน้า 142.

ภาษาอังกฤษ

- Adini, A. and Warburg, A. 1999. Interaction of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes and
oocysts with extracellular matrix proteins. Parasitology. 119 : 331-336.
- Andreasen, C. B., and Latimer, K. S. 1989. Separation of avian heterophils from blood
using ficoll-hypaque discontinuous gradients. Avian Dis. 33 : 163-167.
- Carpenter, 1997. Enzyme-Linked Immunoassays. In : Manual of clinical laboratory
immunology. 5th ed. Rose, N. R., Conway de macario, E., Folds, J. D., Clifford,
L. H., and Nakamura, R. M. ed. ASM press. Washington D. C. 20-29.
- Congdon, L. L., Farmer, J. N., Longenecker, B. M., and Breitenbach, R. P. 1969. Natural
and acquired antibodies to *Plasmodium lophurae* in intact and bursaless
chickens. II. Immunofluorescent studies. J. Parasitol. 55(4) : 817-824.
- Coon, A. B., Creech, H. J. C., and Jones, R. N. 1941. Immunological properties of an
antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47 : 200-
202.

- Dooris, G. M., and McGhee, R. B. 1975. *Plasmodium gallinaceum* : Avian immunologic tolerance to serum antigens. Exp. Para. 37 : 105-107.
- EI-Nahal, H. S. 1966. Fluorescent antibody studies on infections with *Plasmodium gallinaceum*. Effect of splenectomy, during latency, on parasitemia and antibody titer. J. Parasitol. 52(3) : 570-572.
- Garnham, P. C. C. 1966. Gallinaceous species of Haemamoeba. In : Malarial parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific Publications. 588-618.
- Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. 1977. Fluorescent antibody technique. In : Method in Immunology. 3rd ed. W.A. Benjamin, Inc. USA. 428-431.
- Goodwin, M. A., Davis, J. F., and Brown, J. 1992. Packed cell volume reference intervals to aid in the diagnosis of anemia and polycythemia in young broiler chickens. Avian Diseases. 36 : 440-443.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., and Shiff, C.J. 1993. ELISA method for detecting anti-*P. relictum* and anti-*P. elongatum* antibody in infected duckling sera using *P. falciparum* antigens. J. Parasitol. 79(6) : 879-885.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Skjoldage, M. L., and Shaw, M. L. 1994. An ELISA for detecting anti- *Plasmodium spp.* Antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). J. Parasitol. 80(1) : 60-66.
- Hollingdale, M. R. and Kilejian, A. 1979. Purification of *Plasmodium lophurae* exoerythrocytic merozoites by an ion exchange column. J. Protozool. 26(4) : 616-619.
- Huff. C. G. 1965. Susceptibility to mosquitoes to avian malaria. Exp. Parasitol. 16 : 107-132.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during in the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 760-762.
- Laird, M. 1998. Avian malaria in the Asian tropical subregion. Springer-Verlag Singapore. Ltd. 1-97.
- Latimer, K. S., Kircher, I. M., and Andreasen, C. B. 1989. Separation of turkey heterophils from blood using two-step ficoll-hypaque discontinuous gradients. Avian Dis. 33 : 571-573.

- Ledue, T. B., and Garfin, D. E. 1997. Immunofixation and Immunoblotting. In : Manual of clinical laboratory immunology. 5th ed. Rose, N. R., Conway de macario, E., Folds, J. D., Clifford, L. H., and Nakamura, R. M. ed. ASM press. Washington D. C. 54-64.
- Levine, N.D. 1985. Apicomplexa : Plasmodium, Haemoproteus, Leucocytozoon and Related protozoa. In : Veterinary Protozoology. Iowa state University Press. Ames. 265-290.
- Lowry, O. H, Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Lykins, J., D., Smith, A.,R., Voss, E., W., and Ristic, M. 1971. Physical separation of three soluble malarial antigens from the serum of chickens infected with *Plasmodium gallinaceum* . Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 394-401.
- Makler, M. T., Palmer, C. J., and Ager, A. L. 1998. A review of practical techques for the diagnosis of malaria. Ann. Trop. Med. Parasitol. 92(4) : 419-433.
- Malden, C. N., Richard, E. A., and Leslie, E. C. 1979. Biology of fowl. In : Poultry Production. 12th ed. 16-57.
- Manawadu, B. R., and Voller, A.1978. Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72(5) : 456-462.
- McGhee, R. B. 1988. Major animal models in malaria research : Avian. In : Principal and practical of malariology. 2 : 1545-1575.
- Nakamura, R., M. and Bylund, D., J. 1997. Fluorescence Immunoassays. In : Manual of clinical laboratory immunology. 5th ed. Rose, N. R., Conway de macario, E., Folds, J. D., Clifford, L. H., and Nakamura, R. M. ed. ASM press. Washington D. C. 39-53.
- Ramirez, A. D., Rocha, E. M. M., and Krettli, A. U. 1991. In vitro development of exoerythrocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites in avian macrophages. J. Protozool. 38(1) : 40-44.
- Rocha, E. M. M., Hollingdale, M. R., Sina, B., Leland, P., Lopes, J.D., and Krettli, A. U. 1993. Common epitopes in the circumsporozoit proteins of *P. berghei* and *P. gallinaceum* identified by monoclonal antibodies to the *P. gallinaceum* circumsporozoit protein. J. Euk. Microbiol. 40(1) : 61-63.

- Schalm, O. W. 1986. Avian hematology. In : Schalm's veterinary hematology. 4th ed. Jain, N. C. ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 256-273.
- Smith, A. R., Iykins, J. D., Voss, E. W., and Ristic, M. 1969. Identification of an antigen and specific antibody in the sera of chickens infected with *Plasmodium gallinaceum*. J. Immunol. 103 : 6-14.
- Smyth, J. D. 1994. Bird malaria. In : Introduction to animal parasitology. 3rd ed. Cambridge University press, 133-135.
- Smith, R. D. 1995. Evaluation of diagnostic tests. In : Veterinary clinical Epidemiology : A problem-oriented approach. 2nd ed. CRC Press, Inc. Florida, USA. 31-52.
- Soni, J. L., and Cox, H. W. 1974. Pathogenesis of acute avian malaria. I. Immunologic reactions associated with anemia, splenomegaly, and nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23(4) : 577-585.
- Soni, J. L., and Cox, H. W. 1975a. Pathogenesis of acute avian malaria. II. Anemia mediated by a cold-active autohemagglutinin from the blood of chickens with acute *Plasmodium gallinaceum* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24(3) : 206-213.
- Soni, J. L., and Cox, H. W. 1975b. Pathogenesis of acute avian malaria. III. Antigen and antibody complexes as a mediator of anemia in acute *Plasmodium gallinaceum* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24(3) : 423-430.
- Soni, J. L., and Cox, H. W. 1975c. Pathogenesis of acute avian malaria. IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24(3) : 431-438.
- Soulsby, 1982. Suborder Haemosporina. In : Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed. William Clowes & Sons. London, U.K. 692-705.
- Springer, W., T. 1997. Other blood and tissue protozoa. In : Diseases of poultry. 10th ed. Calnek, B. W. ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. 903-904.
- Todorovic, R., Ferris, D. and Ristic, M. 1967. Immunogenic properties of serum antigens from chickens acutely infected with *Plasmodium gallinaceum*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 61(2) : 117-124.

- Todorovic, R., Ristic, M. and Ferris, D. 1968. Soluble antigens of *Plasmodium gallinaceum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62(1) : 51-57.
- Van Riper III, Atkinson, C. T., and Seed, T. M. 1994. *Plasmodium of birds*. In : Parasitic protozoa. 2nd ed. Kreier, J. P. ed. Academic Press, Inc. Vol. 7. 73-139.
- Voller, A., Bidwell, D., Huldtt, G., and Engvall, E. 1974. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull. W. H.O. 51 : 209-211
- Voller, A., Huldtt, G., Thors, C., and Engvall, E. 1975. New serological test for malaria antibodies. British medical journal. 1 : 659-661.
- Weber, K., and Osbern, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244(16) : 4406-4412.
- Zuckerman, A. 1969. Current status of the immunology of malaria and the antigenic analysis of *Plasmodium*. Bull. W. H.O. 40 : 55-66.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ผ 1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
10	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.81±1.54 ^a	58.6±26.84 ^b	37±32.9 ^b	18.0±19.0 ^b	4.36±6.8 ^a	0.2±0.44 ^a	0.0025±0.005 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
10 ³	0.0±0.0	0.21±0.63 ^a	10.91±10.95 ^a	58.5±13.5 ^b	37.0±33.51 ^b	14.66±17.0 ^{ab}	3.33±4.93 ^a	0.033±0.05 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.003±0.005 ^a
10 ⁶	0.0±0.0	0.312±0.47 ^a	33.3±27.84 ^b	45.8±26.93 ^b	58.33±28.0 ^b	45.33±4.73 ^c	45.66±11.93 ^b	47.0±0.0 ^b	33.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a

ตารางที่ ผ2 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
10	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.021±0.042 ^b	6.5±12.04 ^a	7.71±10.96 ^a	1.42±2.20 ^{ab}	0.14±0.30 ^a	0.012±0.03 ^a	0.01±0.031 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
10 ³	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.33±0.66 ^{ab}	40.8±27.57 ^b	18.0±17.87 ^b	1.60±3.57 ^{ab}	1.2±2.16 ^a	0.2±0.44 ^a	0.02±0.043 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0025±0.005 ^a
10 ⁶	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.812±1.13 ^b	16.0±24.7 ^a	3.044±5.83 ^a	10.44±18.98 ^b	38.87±40.89 ^b	21.0±31.33 ^b	8.02±16.25 ^b	1.25±2.49 ^b	0.0025±0.005 ^a

ตารางที่ ผ3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
10	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
10 ³	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
10 ⁶	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๗4 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0	0.81±1.54 ^a	58.6±26.84 ^b	37±32.9 ^b	18.0±19.0 ^b	4.36±6.8 ^b	0.2±0.44 ^a	0.0025±0.005 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
อายุ 20 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0	0.021±0.042 ^a	6.5±12.04 ^a	7.71±10.96 ^a	1.42±2.20 ^a	0.14±0.30 ^a	0.012±0.03 ^a	0.01±0.031 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
อายุ 30 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a

ตารางที่ ๗5 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	0.0±0.0	0.21±0.63 ^a	10.91±10.95 ^b	58.5±13.5 ^c	37.0±33.51 ^b	14.66±17.0 ^b	3.33±4.93 ^b	0.033±0.05 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0	0.003±0.005 ^a
อายุ 20 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.33±0.66 ^a	40.8±27.57 ^b	18.0±17.87 ^{ab}	1.60±3.57 ^a	1.2±2.16 ^{ab}	0.2±0.44 ^a	0.02±0.043 ^a	0.0±0.0	0.0025±0.005 ^a
อายุ 30 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a

ตารางที่ ผ6 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระดับเชื้อในกระแสเลือด (% Parasitemia) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	0.0±0.0	0.312±0.47 ^b	33.3±27.84 ^b	45.8±26.93 ^b	58.33±28.0 ^b	45.33±4.73 ^b	45.66±11.93 ^b	47.0±0.0 ^b	33.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
อายุ 20 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.812±1.13 ^a	16.0±24.7 ^a	3.044±5.83 ^a	10.44±18.98 ^a	38.87±40.89 ^b	21.0±31.33 ^a	8.02±16.25	1.25±2.49 ^a	0.0025±0.005 ^a
อายุ 30 วัน	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a

ตารางที่ ผ7 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	28.45±2.10 ^{ab}	30.25±1.35 ^{ab}	30.95±2.16 ^b	31.85±1.68 ^c	30.30±1.32 ^b	27.45±1.04 ^b	29.10±1.58 ^b	27.90±1.31	24.15±3.15	23.70±2.36	28.00±2.30
10	27.45±2.37 ^a	28.6±2.76 ^a	29.85±2.01 ^{ab}	28.00±2.83 ^b	21.33±3.88 ^a	22.0±0.84 ^a	22.66±7.63 ^{ab}	24.1±2.77	23.63±3.33	25.87±2.09	27.5±3.94
10 ³	29.65±2.46 ^b	29.25±2.02 ^a	29.15±1.45 ^{ab}	24.1±2.13 ^a	24.16±6.53 ^a	22.66±3.21 ^a	25.16±2.75 ^{ab}	22.16±2.36	20.83±1.04	29.0±1.32	29.5±1.32
10 ⁶	29.15±2.37 ^b	31.55±1.71 ^b	27.85±1.9 ^a	25.3±0.975 ^a	22.83±4.91 ^a	24.67±3.21 ^a	19.83±0.28 ^a	22.5±0.00	21.5±0.00	25.0±0.00	27.0±0.00

ตารางที่ ผ8 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	29.65±2.47 ^a	31.45±1.48 ^a	34.55±2.44 ^b	30.85±2.31	27.15±1.62	28.45±1.91 ^a	31.95±2.01 ^c	28.85±1.65 ^b	26.80±2.54 ^b	27.22±2.09 ^c	27.22±1.80 ^c
10	31.05±2.73 ^a	30.55±2.98 ^a	31.95±1.34 ^a	27.6±2.27	23.45±3.83	24.95±2.18 ^a	24.9±2.86 ^b	23.2±3.20 ^a	21.35±2.93 ^a	25.35±2.99 ^{bc}	26.75±1.99 ^{bc}
10 ³	29.05±1.94 ^a	29.6±2.77 ^a	30.25±3.16 ^a	23.55±2.79 ^a	22.3±4.89 ^a	25.5±4.53 ^{ab}	25.4±3.38 ^b	23.5±1.62 ^a	20.6±1.39 ^a	21.75±6.12 ^{ab}	23.75±4.25 ^{ab}
10 ⁶	29.6±2.16 ^a	29.8±2.06 ^a	31.5±2.38 ^a	24.87±2.75 ^a	23.71±3.66	23.0±3.59 ^a	20.71±4.18 ^a	20.58±3.4 ^a	18.4±3.8 ^a	18.38±0.95 ^a	21.13±3.47 ^a

ตารางที่ ๗๑ แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	27.80±2.79 ^a	29.40±2.85 ^a	31.80±3.33 ^a	34.45±3.94 ^b	30.05±3.09 ^a	28.85±3.12 ^{ab}	29.27±2.72 ^a	28.33±2.96 ^{ab}	27.25±3.85 ^a	27.00±3.31 ^b	25.81±2.17 ^{ab}
10	26.55±1.85 ^a	28.7±1.47 ^a	31.3±3.67 ^a	29.4±1.43 ^a	29.7±0.82 ^a	30.0±1.60 ^{bc}	33.16±3.33 ^b	31.63±6.01 ^b	25.93±4.36 ^a	27.78±4.84 ^b	27.71±3.24 ^b
10 ³	28.25±2.65 ^a	29.3±1.55 ^a	32.9±1.94 ^a	31.6±2.06 ^a	28.75±2.73 ^a	26.9±2.54 ^a	29.0±3.07 ^a	24.75±2.88 ^a	23.0±1.75 ^a	21.6±1.92 ^a	22.9±3.25 ^a
10 ⁶	27.85±2.79 ^a	28.17±3.29 ^a	30.67±3.94 ^a	29.94±3.47 ^a	30.5±3.69 ^a	31.83±3.37 ^c	32.67±3.06 ^b	28.56±4.10 ^{ab}	25.44±5.25 ^a	26.67±4.5 ^b	26.58±5.57 ^{ab}

ตารางที่ ๑๑ แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน
ของไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	28.45±2.10 ^a	30.25±1.35 ^{ab}	30.95±2.16 ^a	31.85±1.68 ^a	30.30±1.32 ^b	27.45±1.04 ^a	29.10±1.58 ^a	27.90±1.31 ^a	24.15±3.15 ^a	23.70±2.36 ^a	28.00±2.30 ^b
อายุ 20 วัน	29.65±2.47 ^a	31.45±1.48 ^b	34.55±2.44 ^b	30.85±2.31 ^a	27.15±1.62 ^a	28.45±1.91 ^a	31.95±2.01 ^b	28.85±1.65 ^a	26.80±2.54 ^a	27.22±2.09 ^b	27.22±1.80 ^{ab}
อายุ 30 วัน	27.80±2.79 ^a	29.40±2.85 ^a	31.80±3.33 ^a	34.45±3.94 ^b	30.05±3.09 ^b	28.85±3.12 ^a	29.27±2.72 ^a	28.33±2.96 ^a	27.25±3.85 ^a	27.00±3.31 ^b	25.81±2.17 ^a

ตารางที่ ผ11 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	27.45±2.37 ^a	28.6±2.76 ^a	29.85±2.01 ^a	28.00±2.83 ^a	21.33±3.88 ^a	22.0±0.84 ^a	22.66±7.63 ^a	24.1±2.77 ^a	23.63±3.33 ^{ab}	25.87±2.09 ^a	27.5±3.94 ^a
อายุ 20 วัน	31.05±2.73 ^b	30.55±2.98 ^a	31.95±1.34 ^a	27.6±2.27 ^a	23.45±3.83 ^a	24.95±2.18 ^b	24.9±2.86 ^a	23.2±3.20 ^a	21.35±2.93 ^a	25.35±2.99 ^a	26.75±1.99 ^a
อายุ 30 วัน	26.55±1.85 ^a	28.7±1.47 ^a	31.3±3.67 ^a	29.4±1.43 ^a	29.7±0.82 ^b	30.0±1.60 ^c	33.16±3.33 ^b	31.63±6.01 ^b	25.93±4.36 ^b	27.78±4.84 ^a	27.71±3.24 ^a

ตารางที่ ๗12 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	29.65±2.46 ^a	29.25±2.02 ^a	29.15±1.45 ^a	24.1±2.13 ^a	24.16±6.53 ^{ab}	22.66±3.21 ^a	25.16±2.75 ^a	22.16±2.36 ^a	20.83±1.04 ^{ab}	29.0±1.32 ^b	29.5±1.32 ^b
อายุ 20 วัน	29.05±1.94 ^a	29.6±2.77 ^a	30.25±3.16 ^a	23.55±2.79 ^a	22.3±4.89 ^a	25.5±4.53 ^a	25.4±3.38 ^a	23.5±1.62 ^a	20.6±1.39 ^a	21.75±6.12 ^a	23.75±4.25 ^a
อายุ 30 วัน	28.25±2.65 ^a	29.3±1.55 ^a	32.9±1.94 ^b	31.6±2.06 ^b	28.75±2.73 ^b	26.9±2.54 ^a	29.0±3.07 ^a	24.75±2.88 ^a	23.0±1.75 ^b	21.6±1.92 ^a	22.9±3.25 ^a

ตารางที่ ๑๓ แสดงค่าเฉลี่ยของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Packed cell volume, PCV) ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc ตามลำดับ

ไก่เนื้อ	0 DPI	3 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	15 DPI	18 DPI	21 DPI	24 DPI	27 DPI	30 DPI
อายุ 10 วัน	29.15±2.37 ^a	31.55±1.71 ^b	27.85±1.9 ^a	25.3±0.975 ^a	22.83±4.91 ^a	24.67±3.21 ^a	19.83±0.28 ^a	22.5±0.00	21.5±0.00	25.0±0.00	27.0±0.00
อายุ 20 วัน	29.6±2.16 ^a	29.8±2.06 ^{ab}	31.5±2.38 ^b	24.87±2.75 ^a	23.71±3.66 ^a	23.0±3.59 ^a	20.71±4.18 ^a	20.58±3.4	18.4±3.8	18.38±0.95	21.13±3.47
อายุ 30 วัน	27.85±2.79 ^a	28.17±3.29 ^a	30.67±3.94 ^b	29.94±3.47 ^b	30.5±3.69 ^b	31.83±3.37 ^b	32.67±3.06 ^b	28.56±4.10	25.44±5.25	26.67±4.5	26.58±5.57

ตารางที่ ฃ14 แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	.	0.3921 ± 0.2895 ^b	0.2623 ± 0.1178 ^a	0.2149 ± 0.1160 ^a	0.1983 ± 0.0911 ^a	0.2584 ± 0.1065 ^a	0.1770 ± 0.0494 ^a	0.1262 ± 0.0427	0.1655 ± 0.0895	0.1336 ± 0.0496	0.1887 ± 0.0371
10	.	0.3173 ± 0.3033 ^{ab}	0.2076 ± 0.0989 ^a	0.3097 ± 0.0959 ^a	0.4108 ± 0.1529 ^b	0.8875 ± 0.2632 ^b	0.5270 ± 0.1555 ^c	0.5602 ± 0.2494	0.7295 ± 0.2410	0.2870 ± 0.1269	0.6480 ± 0.1630
10 ³	.	0.2240 ± 0.1310 ^{ab}	0.2263 ± 0.1186 ^a	0.2556 ± 0.1553 ^a	0.3866 ± 0.1149 ^{ab}	0.8510 ± 0.0945 ^b	0.3660 ± 0.0472 ^b	0.4723 ± 0.1425	0.6953 ± 0.1028	0.3813 ± 0.2255	0.5633 ± 0.0479
10 ⁶	.	0.1479 ± 0.0606 ^a	0.2033 ± 0.0997 ^a	0.2288 ± 0.0774 ^a	0.3083 ± 0.1968 ^{ab}	0.6243 ± 0.3251 ^b	0.2743 ± 0.1226 ^{ab}	0.128	0.331	0.145	0.343

ตารางที่ ๑๕ แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 20 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	0.1282 ± 0.0500 ^a	0.0948 ± 0.0265 ^a	0.1104 ± 0.0423 ^a	0.1923 ± 0.1235 ^a	0.1429 ± 0.0533 ^a	0.1954 ± 0.0701 ^a	0.1000 ± 0.0305 ^a	0.1130 ± 0.0412 ^a	0.2062 ± 0.0984 ^a	0.0978 ± 0.0604 ^a	0.2822 ± 0.1870 ^a
10	0.1317 ± 0.0166 ^a	0.1077 ± 0.0215 ^{ab}	0.1733 ± 0.0809 ^b	0.3347 ± 0.1286 ^{ab}	0.3491 ± 0.1183 ^b	0.6007 ± 0.2091 ^b	0.2701 ± 0.0534 ^b	0.3947 ± 0.1084 ^c	0.9218 ± 0.1100 ^c	0.2859 ± 0.0809 ^c	0.6998 ± 0.1156 ^c
10 ³	0.1330 ± 0.0515 ^a	0.1061 ± 0.0309 ^{ab}	0.1289 ± 0.344 ^{ab}	0.3440 ± 0.1366 ^{ab}	0.3168 ± 0.1120 ^b	0.6482 ± 0.3144 ^b	0.3070 ± 0.1244 ^b	0.2836 ± 0.1565 ^{bc}	0.3942 ± 0.1292 ^b	0.1645 ± 0.0353 ^{ab}	0.4180 ± 0.0950 ^{ab}
10 ⁶	0.1586 ± 0.0302 ^a	0.1356 ± 0.0518 ^b	0.1394 ± 0.0344 ^{ab}	0.4196 ± 0.2544 ^b	0.2157 ± 0.0959 ^a	0.2104 ± 0.1802 ^a	0.1537 ± 0.0423 ^a	0.2696 ± 0.1320 ^b	0.4084 ± 0.3260 ^b	0.2267 ± 0.1118 ^{bc}	0.5427 ± 0.3549 ^{bc}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๘16 แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 0, 10, 10³ และ 10⁶ infected rbc ตามลำดับ

วันที่ได้ รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
0	0.3040 ± 0.2264 ^a	0.1432 ± 0.0549 ^b	0.1138 ± 0.0288 ^a	0.2131 ± 0.1069 ^a	0.1476 ± 0.0750 ^{ab}	0.1758 ± 0.1060 ^{ab}	0.2181 ± 0.1728 ^a	0.1002 ± 0.0258 ^a	0.2081 ± 0.1108 ^a	0.1158 ± 0.0751 ^a	0.2290 ± 0.1181 ^a
10	0.3592 ± 0.1131 ^a	0.0410 ± 0.0179 ^a	0.1135 ± 0.0235 ^a	0.2556 ± 0.0859 ^a	0.1433 ± 0.0763 ^{ab}	0.1492 ± 0.0595 ^a	0.1627 ± 0.1098 ^a	0.1682 ± 0.1725 ^a	0.2272 ± 0.0897 ^a	0.1081 ± 0.0504 ^a	0.3047 ± 0.1866 ^a
10 ³	0.3850 ± 0.1967 ^a	0.0286 ± 0.0166 ^a	0.1387 ± 0.0582 ^a	0.3064 ± 0.1909 ^a	0.0977 ± 0.0622 ^a	0.3297 ± 0.2490 ^{bc}	0.1298 ± 0.0906 ^a	0.0893 ± 0.0348 ^a	0.3085 ± 0.2592 ^a	0.1764 ± 0.0562 ^a	0.2500 ± 0.1486 ^a
10 ⁶	0.3330 ± 0.1348 ^a	0.1094 ± 0.0518 ^b	0.1915 ± 0.0745 ^b	0.3178 ± 0.1581 ^a	0.2034 ± 0.1454 ^b	0.3450 ± 0.1782 ^c	0.1447 ± 0.0544 ^a	0.0933 ± 0.0383 ^a	0.2510 ± 0.1792 ^a	0.1523 ± 0.1487 ^a	0.3960 ± 0.1217 ^a

ตารางที่ ผ17 แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่เนื้ออายุ 10, 20 และ 30 วัน ในไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
ไก่อายุ 10 วัน	.	0.3921 ± 0.2895 ^b	0.2623 ± 0.1178 ^a	0.2149 ± 0.1160 ^a	0.1983 ± 0.0911 ^a	0.2584 ± 0.1065 ^a	0.1770 ± 0.0494 ^a	0.1262 ± 0.0427	0.1655 ± 0.0895	0.1336 ± 0.0496	0.1887 ± 0.0371
ไก่อายุ 20 วัน	0.1282 ± 0.0500 ^a	0.0948 ± 0.0265 ^a	0.1104 ± 0.0423 ^a	0.1923 ± 0.1235 ^a	0.1429 ± 0.0533 ^a	0.1954 ± 0.0701 ^a	0.1000 ± 0.0305 ^a	0.1130 ± 0.0412 ^a	0.2062 ± 0.0984 ^a	0.0978 ± 0.0604 ^a	0.2822 ± 0.1870 ^a
ไก่อายุ 30 วัน	0.3040 ± 0.2264 ^a	0.1432 ± 0.0549 ^b	0.1138 ± 0.0288 ^a	0.2131 ± 0.1069 ^a	0.1476 ± 0.0750 ^{ab}	0.1758 ± 0.1060 ^{ab}	0.2181 ± 0.1728 ^a	0.1002 ± 0.0258 ^a	0.2081 ± 0.1108 ^a	0.1158 ± 0.0751 ^a	0.2290 ± 0.1181 ^a

ตารางที่ ฌ18 แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่อายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10 infected rbc

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
ไก่อายุ 10 วัน	.	0.3173 ± 0.3033 ^{ab}	0.2076 ± 0.0989 ^a	0.3097 ± 0.0959 ^a	0.4108 ± 0.1529 ^b	0.8875 ± 0.2632 ^b	0.5270 ± 0.1555 ^c	0.5602 ± 0.2494	0.7295 ± 0.2410	0.2870 ± 0.1269	0.6480 ± 0.1630
ไก่อายุ 20 วัน	0.1317 ± 0.0166 ^a	0.1077 ± 0.0215 ^{ab}	0.1733 ± 0.0809 ^b	0.3347 ± 0.1286 ^{ab}	0.3491 ± 0.1183 ^b	0.6007 ± 0.2091 ^b	0.2701 ± 0.0534 ^b	0.3947 ± 0.1084 ^c	0.9218 ± 0.1100 ^c	0.2859 ± 0.0809 ^c	0.6998 ± 0.1156 ^c
ไก่อายุ 30 วัน	0.3592 ± 0.1131 ^a	0.0410 ± 0.0179 ^a	0.1135 ± 0.0235 ^a	0.2556 ± 0.0859 ^a	0.1433 ± 0.0763 ^{ab}	0.1492 ± 0.0595 ^a	0.1627 ± 0.1098 ^a	0.1682 ± 0.1725 ^a	0.2272 ± 0.0897 ^a	0.1081 ± 0.0504 ^a	0.3047 ± 0.1866 ^a

ตารางที่ ฃ19 แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่อายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^3 infected rbc

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
ไก่อายุ 10 วัน	.	0.2240 ± 0.1310 ^{ab}	0.2263 ± 0.1186 ^a	0.2556 ± 0.1553 ^a	0.3866 ± 0.1149 ^{ab}	0.8510 ± 0.0945 ^b	0.3660 ± 0.0472 ^b	0.4723 ± 0.1425	0.6953 ± 0.1028	0.3813 ± 0.2255	0.5633 ± 0.0479
ไก่อายุ 20 วัน	0.1330 ± 0.0515 ^a	0.1061 ± 0.0309 ^{ab}	0.1289 ± 0.344 ^{ab}	0.3440 ± 0.1366 ^{ab}	0.3168 ± 0.1120 ^b	0.6482 ± 0.3144 ^b	0.3070 ± 0.1244 ^b	0.2836 ± 0.1565 ^{bc}	0.3942 ± 0.1292 ^b	0.1645 ± 0.0353 ^{ab}	0.4180 ± 0.0950 ^{ab}
ไก่อายุ 30 วัน	0.3850 ± 0.1967 ^a	0.0286 ± 0.0166 ^a	0.1387 ± 0.0582 ^a	0.3064 ± 0.1909 ^a	0.0977 ± 0.0622 ^a	0.3297 ± 0.2490 ^{bc}	0.1298 ± 0.0906 ^a	0.0893 ± 0.0348 ^a	0.3085 ± 0.2592 ^a	0.1764 ± 0.0562 ^a	0.2500 ± 0.1486 ^a

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๒๒ แสดงค่าเฉลี่ย OD 405 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของไก่อายุ 10, 20 และ 30 วัน เมื่อได้รับเชื้อ 10^6 infected rbc

วันที่ได้รับเชื้อ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
ไก่อายุ 10 วัน	.	0.1479 ± 0.0606 ^a	0.2033 ± 0.0997 ^a	0.2288 ± 0.0774 ^a	0.3083 ± 0.1968 ^{ab}	0.6243 ± 0.3251 ^b	0.2743 ± 0.1226 ^{ab}	0.128	0.331	0.145	0.343
ไก่อายุ 20 วัน	0.1586 ± 0.0302 ^a	0.1356 ± 0.0518 ^b	0.1394 ± 0.0344 ^{ab}	0.4196 ± 0.2544 ^b	0.2157 ± 0.0959 ^a	0.2104 ± 0.1802 ^a	0.1537 ± 0.0423 ^a	0.2696 ± 0.1320 ^b	0.4084 ± 0.3260 ^b	0.2267 ± 0.1118 ^{bc}	0.5427 ± 0.3549 ^{bc}
ไก่อายุ 30 วัน	0.3330 ± 0.1348 ^a	0.1094 ± 0.0518 ^b	0.1915 ± 0.0745 ^b	0.3178 ± 0.1581 ^a	0.2034 ± 0.1454 ^b	0.3450 ± 0.1782 ^c	0.1447 ± 0.0544 ^a	0.0933 ± 0.0383 ^a	0.2510 ± 0.1792 ^a	0.1523 ± 0.1487 ^a	0.3960 ± 0.1217 ^a

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๒21 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude *Pg* antigen

Antigen dilution	NI1	NI2	NI3	PI1	PI2	PI3
1/100	0.104	0.14	0.112	0.744	0.461	0.632
1/400	0.122	0.072	0.075	0.708	0.426	0.542
1/1600	0.069	0.034	0.052	0.613	0.419	0.423
1/6400	0.057	0.032	0.041	0.574	0.398	0.355
1/2560	0.037	0.018	0.025	0.489	0.344	0.297

ตารางที่ ๒22 ค่าเฉลี่ย OD ของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NI และ PI sera

serum dilution	NI1	NI2	NI3	PI1	PI2	PI3
1/10	0.317	0.323	0.376	0.847	0.756	0.508
1/100	0.122	0.072	0.075	0.708	0.542	0.426
1/1000	0.036	0.022	0.042	0.226	0.225	0.287
1/10000	0.017	0.007	0.015	0.079	0.102	0.127

ตารางที่ ๒23 ค่าเฉลี่ย OD ของ Non-infected sera (NI)

NI	OD	NI	OD
6.1	0.048	16.1	0.072
6.2	0.049	16.2	0.082
6.3	0.125	16.3	0.073
6.4	0.125	16.4	0.073
6.5	0.225	16.5	0.081

ตารางที่ ผ23 ค่าเฉลี่ย OD ของ *Pg* immune sera (PI)

PI	OD	PI	OD
19.2	0.357	31/5	0.398
18.2	0.334	20.1	0.607
27/1	0.337	8/2	0.504
15.2	0.434	8/4	0.618
20.2	0.445	8/7	0.672
20.3	0.418	8/9	0.523
18.1	0.287	8/10	0.522
18.3	0.607	21/1	0.535
19.3	0.454	21/2	0.551
16.2	0.365	21/3	0.733
22.3	0.568	10.2	0.874
22.2	0.580	10.3	0.518
22.1	0.470	10.4	0.645

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับ ELISA

Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	2.9	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการทำให้ Autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer : Coating buffer

Na_2CO_3	1.59	กรัม
NaHCO_3	2.93	กรัม
NaN_3 20%	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย 1N NaOH เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4 : Washing buffer

PBS, pH 7.4	1,000	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

1% BSA in PBS, pH 7.4 : Blocking solution

BSA	1	กรัม
PBS, pH 7.4	100	มิลลิลิตร

Citrate buffer

Citric acid	1.05	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ABTS solution

ABTS	15	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ABTS solution buffer

Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
ABTS solution	200	ไมโครลิตร
30% H ₂ O ₂	10	ไมโครลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีสำหรับ SDS-PAGE

Acrylamide-Bis-Acrylamide solution

Acrylamide	30	กรัม
N'N-methylene-bis-acrylamide	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ด้วยกระดาษกรอง Whatman ขนาดรู 0.45

ไมครอน เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10% SDS

SDS	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 : Running gel buffer

Tris	18.15	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 M HCl

เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------

เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8 : Stacking gel buffer

Tris	6.06	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 M HCl

เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร
--------------------	-----	-----------

เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

TEMED

ซื้อจากบริษัท Bio-Rad เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร
เตรียมใหม่ทุกครั้ง		

Electrode buffer, pH 8.3

Tris	3	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Sample buffer

0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8	1.875	มิลลิลิตร
SDS	0.69	กรัม
Glycine	3	มิลลิลิตร
0.1% Bromophenol blue	0.3	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	10	มิลลิลิตร
แบ่งเก็บใส่หลอดต่างๆ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

13.5% separating gel

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	100	ไมโครลิตร
Acrylamide-bis	4	มิลลิลิตร
10% Amm. Persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	มิลลิลิตร

5% stacking gel

น้ำกลั่น	2.9	มิลลิลิตร
1.5 M Tris, pH 8.8	1.45	มิลลิลิตร

10% SDS	50	ไมโครลิตร
Acrylamide-bis	0.8	มิลลิลิตร
10% Amm. Persulfate	25	ไมโครลิตร
TEMED	2.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	5	มิลลิลิตร

Stock 0.5% Coomassie brilliant blue R-250

Coomassie blue	0.5	กรัม
Absolute methanol	100	มิลลิลิตร
กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1		

Staining solution

Stock 0.5 % Coomassie blue	22.5	มิลลิลิตร
Absolute methanol	22.5	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	100	มิลลิลิตร

Destaining solution

Absolute methanol	90	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	200	มิลลิลิตร

Stock 0.5% Bromophenol blue

Bromophenol blue	0.05	กรัม
Methanol	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

ตารางที่ ผ 25 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

Broad range Molecular Weight Standard (Bio-Rad [®])	
Protein	Molecular Weight (daltons)
Myosin	205,000
β -galactosidase	119,000
Bovine serum albumin	98,000
Ovalbumin	52,300
Carbonic anhydrase	36,800
Soybean trypsin inhibitor	30,100
Lysozyme	22,000



รูปที่ ผ1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลและระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารเคมีสำหรับ Western blot

Transfer buffer

Tris	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Blocking solution (0.5% BSA in PBS, pH 7.4)

BSA	0.5	กรัม
PBS, pH 7.4	100	มิลลิลิตร

Washing buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)

PBS, pH 7.4	1,000	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

Substrate solution / Peroxidase (2,6-dichloroindophenol ; DCIP)

DCIP	0.2	กรัม
PBS, pH 7.4	10	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	10	ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Ficoll-Paque PLUS ความหนาแน่น 1.077 (Pharmacia)

Histopaque ความหนาแน่น 1.119 (SIGMA)

ABTS (SIGMA)

rabbit anti-chick IgG conjugate horseradish peroxidase enzyme (SIGMA)

FITC (ICN Pharmaceuticals)

Heparin (LEO)

Tween 20 (BDH)

Sodium bicarbonate (SIGMA)

BSA (SIGMA)

Acrylamide (SIGMA)

N'N-methylene-bis-acrylamide (Pharmacia)

SDS (Pharmacia)

Tris (Amresco)

Ammonium persulfate (SIGMA)

TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) (Bio-Rad)

Glycine (SIGMA)

Bromophenol blue (USB)

Mercaptoethanol (Pharmacia)

Coomassie Brilliant blue R-250 (Bio-Rad)

Methanol (Merck)

Sodium chloride (BDH)

Potassium chloride (Merck)

Potassium phosphate (Merck)

Sodium phosphate (SIGMA)

Ponceau S (SIGMA)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้

เครื่องแช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (UE650 ; Kelvinator)
 เครื่องปั่นเย็น (Varifuge 20 RS ; Heraeus sepatech)
 เครื่องปั่น (spectrafuge ; Labnet)
 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (PHM 83 Autocal pH meter ; Radiometer)
 เครื่องเขย่า (Nahita)
 เครื่อง Vortex (G-560E ; Scientific Industries)
 ELISA Reader (Titertek Multiskan MCC)
 ชุด Blot (Mini Trans-Blot ; BIORAD)
 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini-Protean 3 cell & Power pac 300 ; Bio-Rad)
 เครื่องกรองสาร (PHC 340 ; PHAMACIA)
 เครื่องชั่งแบบละเอียด (BP310S ; Sartorius)
 กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Olympus)
 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (BH2-RECA ; Olympus)
 Micropipettes (BIOHIT)
 microplate (F-96 maxisorp, NUNC)
 microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร
 หลอดปั่นกันกรวย (Centrifuge tube) 15 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชรี ทรงประโคน เกิดวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ โปรแกรมปรสิตรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2542



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย