ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน Major Histocompatibility Complex (MHC) กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทย สายพันธุ์เหลืองหางขาว

นางสาวคีญาภัทร์ กองร้อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2556

THE RELATIONSHIP OF HEMATOLOGICAL VALUES AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENE PATTERNS WITH NEWCASTLE DISEASE ANTIBODISE IN THAI INDIGENOUS CHICKENS : LEUNG HANG KHAO

Keyapat Kongroi

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2013

ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน Major Histocompatibility Complex (MHC) กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์เล่มนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
ประธานกรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ

(ผศ. ดร.ยุพิน ผาสุข)
กรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คีญาภัทร์ กองร้อย : ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน Major Histocompatibility Complex (MHC) กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว (THE RELATIONSHIP OF HEMATOLOGICAL VALUES AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENE PATTERNS WITH NEWCASTLE DISEASE ANTIBODY IN THAI INDIGENOUS CHICKEN : LEUNG HANG KHOW) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์, 84 หน้า.

การเลี้ยงไก่พื้นเมืองไทยทั่วไปยังพบว่ามักจะประสบปัญหาโรคนิวคาสเซิลถึงแม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนป้องกันเนื่องจากไก่แต่ละตัวจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันโรคแตกต่างกันจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน Major Histocompatibility complex (MHC) กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว เพื่อเป็นแนวทางการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยให้ต้านทานโรคนิวคาสเซิลดีขึ้น ได้ทำการศึกษาหาค่าทางลักษณะทางโลหิตวิทยาในไก่พื้นเมืองไทยคละเพศจำนวน 153 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดและซีรั่มของไก่ที่อายุ 4 และ 7 เดือน นำมาตรวจวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาได้ค่าเฉลี่ยพื้นฐานดังนี้ ปริมาณเม็ดเลือดแดง 1.4-4.2×10^6 cells/ml ปริมาณเม็ดเลือดขาว 5.8-37.9×10^3 cells/ml ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 21.0-51.8 %ml/dL ปริมาณฮีโมโกลบิน 7.4-18.8 %g/dL ปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย 110.2-146.5 fl ปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย 33.0-59.1 pg และความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย 29.9-43.0 %g/dL และตรวจพบว่าค่า titer มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับค่าโลหิตวิทยา ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน จะมีค่า titerในไก่กลุ่มที่มีภูมิคุ้มกัน ต่ำ กลาง และสูง (63.15±23.47 421.77±28.04 และ 1525±131.92 ตามลำดับ) มีความสัมพันธ์กับจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte (71.00±2.46 69.79±0.81 และ 67.72±1.29 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาว ตามลำดับ) ไปในทางลบ แต่ความสัมพันธ์ของค่า titer ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil (25.17±2.34 27.76±0.86 และ 29.41±1.05 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาว ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P≤0.05 ดังนั้นจำนวน lymphocyteและ heterophils มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล คือไก่ในกลุ่มที่มี titer สูงจะมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณ lymphocytes แต่จะมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณ heterophil

ศึกษาถึงอิทธิพลของยีน MHC class IIและ microsatellite ในตำแหน่งที่ LEI0258 ต่อลักษณะความสามารถในการต้านทานโรค และลักษณะน้ำหนักตัวไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และศึกษารูปแบบ allele genotype ของทั้งสองตำแหน่ง โดยทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวจำนวน 125 ทำการศึกษา allele genotype ของ LEI0258 และ single nucleotide

polymorphism ของยีน MHC class II ด้วยเทคนิค PCR และ PCR sequencing ตามลำดับ ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำหนักตัวและค่า titer ของไก่ที่อายุ 4 และ 7 เดือน ใช้ general linear model ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง genotype ของ microsatellite และ SNPs ของยีน MHC class II ผลการศึกษาพบว่า LEI0258 มี 6 allele คือ A (205 bp) B (249 bp) C (307 bp) D (321 bp) E (345 bp) และ F (420 bp) และมีทั้งหมด 11 genotype คือ AB AC BC BD CC CD CE CF DD DEและ EF ส่วนยีน MHC class II พบ SNPs ทั้งหมด 16 ตำแหน่งคือ C125T A126T C128T A131G G136T C209G C242T A243T C244T C250T A254T A274G A282T C360T A361G และ G720T ส่วนผลการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับการเจริญเติบโตและค่า titer พบว่า genotype BD DE และ CD มีความสัมพันธ์กับค่า titer ต่อการต้านทานโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน ส่วนยีน MHC พบความสัมพันธ์ของ SNP ตำแน่งที่ 3 (C128T) กับน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความสัมพันธ์ของตำแหน่ง SNPs กับลักษณะของระดับ titer พบความความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ตำแหน่งที่ 6 (C209G) 11 (A254T) และ 12 (A274G) ผลการศึกษาสรุปได้ว่า ยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันโรคจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นยีนเครื่องหมายในประชากรไก่พื้นเมือง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา ศิญาภัทร์ ภาชัยอยู่
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

KEYAPAT KONGROI : THE RELATIONSHIP OF HEMATOLOGICAL VALUES AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENE PATTERNS WITH NEWCASTLE DISEASE ANTIBODIES IN THAI INDIGENOUS CHICKENS : LEUNG HANG KHAO. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. BANCHORN LIKITDECHAROTE, Ph.D., 84 PP.

MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX/NEWCASTLE DISEASE/THAI INDIGENOUS CHICKEN/

Newcastle disease is the most important disease causing great loss of life in Thai indigenous chicken farming even with the regular vaccination practices due to varying individual capability in immune response. A study of the relationship of the hematological values and the Major Histocompatibility Complex (MHC) gene with Newcastle disease will give more information to help with the approach to selection and breeding for disease resistance in the future. The hematological values and antibodies titer were tested from blood and sera of 153 chickens at 4 and 7 month of age and analyzed. The average hematological results were: total RBC 1.4-4.2×10^6 cells/ml, total WBC 5.8-37.9×10^3 cells/ml, pack cell volume or hematocrit 21.0-51.8 %ml/dL, hemoglobin 7.4-18.8 %g/dL, mean corpuscular volume 110.2-146.5 fL, mean corpuscular hemoglobin 33.0-59.1 pg and mean corpuscular hemoglobin concentration 29.9-43.0 %g/dL. It was found that chickens at 4 months of age with low, medium and high antibodies (63.15±23.47, 421.77±28.04 and 1525±131.92) showed a significant negative relationship to the lymphocyte (71.00±2.46, 69.79±0.81 and 67.72±1.29% WBC respectively) and a significant positive relationship to the

heterophil (25.17±2.34, 27.76±0.86 and 29.41±1.05% WBC respectively) at P≤0.05.

A study of the effects of Major Histocompatibility Complex (MHC) class II, and microsatellite LEI0258 on the ability of disease resistance and bodyweight of Thai Indigenous chickens, and the pattern of both loci in 125 chickens was conducted. Blood samples were collected for Microsatellite-based and SNP analyses. PCR and PCR sequencing were used to classify the allele of LEI0258, and the SNPs of MHC class II gene, respectively. Bodyweight was recorded at the age of 4 and 7 months. Titers of Newcastle disease at the age of 4 and 7 months were tested using ELISA. Six alleles of LEI0258 were classified as A (205 bp), B (249 bp), C (307 bp), D (321 bp), E (345 bp) and F (420 bp). Sixteen SNPs were identified at C125T, A126T, C128T, A131G, G136T, C209G, C242T, A243T, C244T, C250T, A254T, A274G, A282T, C360T, A361G and G720T. A significant relationship between genotype and growth as well as the titer was detected for the BD, DE and CD against Newcastle disease at the age of 7 months. A significant association between SNP and bodyweight was found at the SNP 3 (C128T). An association between SNP and titer was found at the SNP 6 (C209G), 11 (A254T) and 12 (A274G). These results suggest that these loci have significant relationship with bodyweight and disease resistance and that the loci may be used as gene markers for the future selection of Thai indigenous chickens.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology Student's Signature Keyapat Kongroi

Academic Year 2013 Advisor's Signature B. L

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ให้โอกาสทางการศึกษา และให้ความรู้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้การอบรมสั่งสอนและให้คำแนะนำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวกองร้อย ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้าในการใช้ชีวิตการเรียนในระดับบัณฑิตศึกษาของข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คีญาภัทร์ กองร้อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 ไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว 6
2.2 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก 7
2.3 ความสัมพันธ์ของภูมิคุ้มกันกับค่าโลหิตวิทยาในสัตว์ปีก 8
2.4 การแปลผลความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงในสัตว์ปีก 10
2.5 การแปลผลความผิดปกติของเม็ดเลือดขาวในสัตว์ปีก 11
2.6 ค่าชีวเคมีเลือดในสัตว์ปีก 18
2.7 Major Histocompatibility Complex (MHC) ในการต้านทานโรคในสัตว์ปีก 19
2.8 Major Histocompatibility Complex (MHC) ในสัตว์ปีก 19
2.9 โครงสร้างยีน MHC (Gene Structure of MHC) 20
2.10 การสร้างโมเลกุลของ MHC 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.11 กลไกการพัฒนาเชิงโมเลกุลเพื่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในไก่ (B-cell และยีนที่ควบคุมการทำงานในการสร้าง อิมมูโนโกลบูลิน : Immunoglobulin (Ig) 21

2.12 การควบคุมการสร้างอิมมูโนโกลบูลินในระดับ Transcription และTranslation 24

2.13 MHC และยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคต่อการป้องกันโรคในสัตว์ปีก 26

2.14 ตำแหน่งและหน้าที่ของยีน major histocompatability complex (MHC) 26

2.15 อิทธิพลของยีน MHC ต่อลักษณะความสามารถในการต้านทานโรคและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจอื่น ๆ 27

3 วิธีดำเนินการวิจัย 30

3.1 สัตว์ทดลอง การจัดการอาหาร และข้อมูล 30

3.1.1 สัตว์ทดลอง 30

3.1.2 ข้อมูล 31

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด 31

3.2.1 เก็บซีรั่ม 31

3.2.2 เก็บเลือดสด 31

3.3 การตรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกัน (Titer) 31

3.4 ค่าโลหิตวิทยา 32

3.5 ค่าชีวเคมีเลือด 34

3.6 การสกัดดีเอ็นเอ 36

3.7 การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ 37

3.8 การศึกษารูปแบบของยีน MHC class II 37

3.8.1 primer microsatellite LEI0258 37

3.8.2 MHC class II exon 2 37

3.9 วิเคราะห์ตัวอย่าง DNA จากวิธี PCR โดยใช้ Primer microsatellite LEI0258 38

3.10 การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน MHC class II จากวิธี PCR โดย agarose gel Electrophoresis 38

3.11 การศึกษา SNP ของยีน MHC class II ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 39

3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 41

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.12.1 ข้อมูลค่าทางโลหิตวิทยา และชีวเคมีเลือด 41

3.12.2 อิทธิพลของยีน MHC class II ต่อการเจริญเติบโตและค่าไตเตอร์ อิทธิพลของยีน MHC class II ต่อการเจริญเติบโตและค่าไตเตอร์โลหิตวิทยาในไก่อิทธิพลพื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเมื่ออายุ 4 และ 7 เดือน 41

4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล 42

4.1 ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในไก่พื้นเมืองไทย 42

4.2 ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว 49

4.3 ความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน MHC กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว 52

4.4 ความถี่ allele จาก LEI0258 ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 52

4.5 จำนวน SNPs ความถี่ allele และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC 57

4.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของ MHC gene ต่อลักษณะการเจริญเติบโต 60

4.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของ MHC gene ต่อลักษณะการต้านทานโรค 64

5 สรุปและข้อเสนอแนะ 68

รายการอ้างอิง 72

ภาคผนวก 79

ประวัติผู้เขียน 84

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 อายุไก่ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อนิวคาสเซิล ในไก่พื้นเมือง เปรียบเทียบกับไก่เชิงเศรษฐกิจพันธุ์โร๊ดไอแลนด์เรด บาร์พลีมัธร๊อค ลูกผสมพื้นเมืองกับโร๊ดไอแลนด์เรดและลูกผสมพื้นเมืองกับบาร์พลีมัธร๊อค ที่อายุ 6 สัปดาห์ 12

2.2 เปอร์เซ็นของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด lymphocytes heterophils basophils และ eosinophils จากการทำวัคซีนที่แตกต่างกัน 13

2.3 ค่าโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทย 15

2.4 องค์ประกอบทางพันธุกรรมไก่ 16

2.5 โครงสร้างและการทำงานของ MHC ในไก่ (B complex) 23

2.6 สรุปผลการศึกษาอิทธิพลของยีน MHC class II ที่มีต่อความสามารถในการต้านทานโรคและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ 28

3.1 โปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 30

3.2 รายงานผลการตรวจเม็ดเลือด 34

4.1 ค่าทางโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 4 เดือนเพศผู้และเพศเมีย 43

4.2 ค่าทางโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 7 เดือนเพศผู้และเพศเมีย 44

4.3 ค่าชีวเคมีเลือดของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 4 เดือนเพศผู้และเพศเมีย 45

4.4 ค่าชีวเคมีเลือดและอีเล็คโตรไลท์ของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 7 เดือนเพศผู้และเพศเมีย 45

4.5 โลหิตวิทยาเปรียบเทียบ (mean ± SE) ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่ชนพันธุ์ไทยและไก่ชนพันธุ์เวียดนาม 47

4.6 โลหิตวิทยาเปรียบเทียบ (mean ± SE) ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวไก่พื้นเมืองไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 48

4.7 ความสัมพันธ์ของกลุ่มระดับภูมิคุ้มกันต่อค่า Titer Lymphocyte และ Heterophil ในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน 50

4.8 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Titer ต่อค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีเลือด ในไก่พื้นเมืองไทย ที่อายุ 4 เดือน 51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 ความถี่อัลลีลจาก LEI0258 ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 53

4.10 ความถี่ genotype จาก LEI0258 ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 54

4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล LEI0258 microsatellite กับค่า titer และน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน 55

4.12 อิทธิพลของ genotype ต่อค่า titer และ น้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ และ 7 เดือน 56

4.13 จำนวน SNP ที่พบ ความถี่ของ SNP และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC 58

4.14 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของน้ำหนักตัว ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน 60

4.15 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของค่า log (10) Titer ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน 66

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 6

2.2 ลำดับการพัฒนาของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์เปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกไปเป็นเซลล์ที่สร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ 9

2.3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ lymphocyte, granulocyte และ monocyte จากการติดเชื้อพาราสิต นิวคาสเซิล และกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างพาราสิตกับนิวคาสเซิล..... 14

2.4 ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ต่อการต้านทานโรค หลอดลมอักเสบ (IBDV) ตรวจโดยใช้วิธี ELISA ที่อายุ 6 และ 8 วัน. 17

2.5 ระดับที่ลดลงหรือการตายของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte) ใน 6 กลุ่มการทดลองที่ทำวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบ 18

2.6 การสร้างโมเลกุล MHC class I และ class II. 24

3.1 หลักการตรวจ Indirect ELISA ในการตรวจหา Newcastle antibody titer..... 32

3.2 ขนาด PCR product BLB exon2..... 39

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกันต่อระดับการผลิตในสัตว์ที่มีอิทธิพลมาจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน 63

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MHC	=	Major Histocompatibility Complex
ABS	=	Antigen binding site
SPN_S	=	Single nucleotide polymorphism
APC_S	=	Antigen presenting cells
NDV	=	Newcastle disease virus
HEV	=	Haemorrhagic enteritis virus
SRBC	=	Sheep red blood cells
GLU	=	Glucose
CHOL	=	Cholesterol
AMY	=	Amylase
URIC	=	Uric acid
BUN	=	Blood Uria nitrogen
CREA	=	Creatinine
SOD	=	Sodium
POTAS	=	Potassium
CAL	=	Calcium
BW	=	Body Weight
Lym	=	Lymphocyte
Het	=	Heterophil
H : L ratio	=	Heterophil to Lymphocyte ratio
RBC	=	Red blood cell
HGB	=	Hemoglobin
WBC	=	White blood cell

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

HCT	=	Hematocrit
MCV	=	Mean Corpuscular Volume
MCH	=	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	=	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

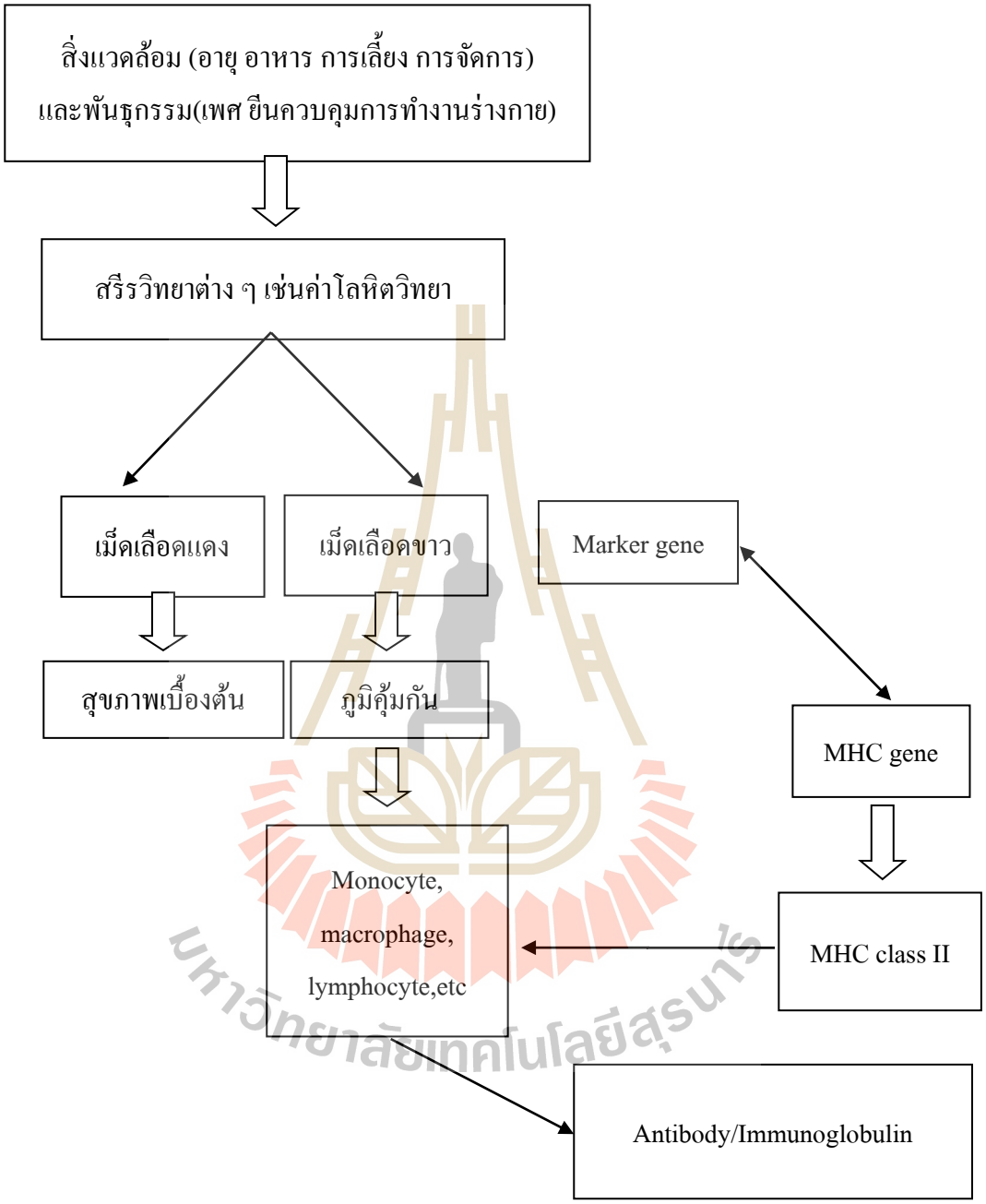
ในสังคมไทยมีการเลี้ยงไก่พื้นเมืองทั่วไปเพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำหรับบริโภคภายในครัวเรือนเป็นสำคัญในรูปแบบการเลี้ยงปล่อย ให้หาอาหารกินเองตามธรรมชาติ ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นไก่พื้นเมืองที่ได้รับความนิยมในการเลี้ยง เนื่องจากเป็นไก่พื้นเมืองพันธุ์ไก่ชน ซึ่งมีรูปร่างใหญ่และยาว เจริญเติบโตดี และแม่พันธุ์ไข่ดก ประกอบกับปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาสนใจดูแลสุขภาพมากขึ้นด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นของเนื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว คือ เนื้อแน่น รสชาติดี คลอเรสเตอรอลต่ำ เป็นทางเลือกที่ดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค แต่พบว่าหนึ่งในปัญหาสำคัญในการเลี้ยงไก่พื้นเมืองคือ การระบาดของโรคติดต่อ เนื่องจากหลายสาเหตุคือ ขาดการควบคุมและป้องกันโรคที่ดีในฟาร์มขนาดเล็กระดับชาวบ้าน และถึงแม้ว่ามีการใช้วัคซีนป้องกันโรค แต่ยังไม่สามารถป้องกันโรคได้ดีเนื่องจากไก่พื้นเมืองยังมีการตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคไม่สม่ำเสมอ พบว่าโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากในไก่พื้นเมืองคือ โรคนิวคาสเซิล ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย โดยไก่ที่ป่วยจะแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารซึ่งบางรายมีอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย โรคนี้พบว่าเป็นได้กับไก่ทุกอายุ แต่ในลูกไก่จะมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง บางรายงานพบว่าสูงถึง 100% (Horninget et al., 2003; Alders and Peter, 2001) จากปัญหาดังกล่าว การคัดเลือกสายพันธุ์ไก่ที่มีระดับภูมิคุ้มกันที่ดี มีความต้านทานโรคสูง อาจเป็นแนวทางในการลดปัญหาด้านสุขภาพและโรคติดต่อในระบบการเลี้ยงได้ พบว่านอกจากสุขภาพไก่ที่สมบูรณ์แข็งแรงแล้ว พันธุกรรมยังมีบทบาทในการควบคุมความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคหรือการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน ซึ่งยีนที่ควบคุมความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันคือ เอ็มเอชซี (MHC หรือ Major Histocompatibility gene complex) ซึ่ง MHC ในสัตว์ปีกเรียกว่า B system หรือ B complex (กฤษณา, 2548; Msoffe et al., 2002) ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก (นภาธร, 2543; Pinchuk, 2002) โดยกลุ่มยีนดังกล่าวมีบทบาทที่ชัดเจนต่อความสามารถในการต้านทานโรคในไก่ ยีนนี้มีรูปแบบที่หลากหลายและแตกต่างกันโดย MHC ยีนมีความสำคัญในการต้านทานโรคในสัตว์ปีก เช่น โรคมาเร็ก โรคนิวคาสเซิล โรคหลอดลมอักเสบ (Nitishet et al., 1998) เป็นต้น จากความคล้ายคลึงกันในส่วนของ MHC class II ระหว่างไก่กับมนุษย์ว่ามีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรค รวมทั้งได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เพราะ MHC

class II มีรูปแบบที่ครอบคลุมและมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T helper cell ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ Rifu et al. (2007) พบว่า ยีน MHC มีศักยภาพในการที่นำมาพัฒนาเป็น genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกไก่ให้มีลักษณะการต้านทานโรคที่ดี แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายีน MHC ยังมีความหลากหลายของ single nucleotide polymorphism; SNPs ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในสัตว์สายพันธุ์ที่ต่างกันและมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะที่แตกต่างกันยีนดังกล่าวจึงเหมาะสมที่จะศึกษาและใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์ในการช่วยคัดเลือกไก่เพื่อให้มีความสามารถในการต้านทานโรคให้สูงขึ้นและใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความสามารถในการต้านทานโรคในไก่ได้เช่นกัน ส่วนอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลตรงต่อการสร้างภูมิต้านทานโรคคือความสมบูรณ์แข็งแรงของสุขภาพไก่ การศึกษาค่าโลหิตวิทยากับระดับภูมิคุ้มกัน ร่วมด้วยค่าโลหิตวิทยาร่วมกับระดับภูมิคุ้มกันในการตรวจวัดค่าไตเตอร์ จะช่วยลดระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำในการประเมินผลทางสุขภาพของสัตว์

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล ว่าอาจมีตัวชี้วัดทางโลหิตวิทยาใดบ้างที่มีส่วนร่วมในการต้านทานโรคนิวคาสเซิล ซึ่งสามารถใช้ประเมินผลร่วมกับการวัดระดับภูมิคุ้มกันได้ และศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน MHC กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ผลที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการวางแผนเพื่อใช้ในการพัฒนาการปรับปรุงแบบแผนการคัดเลือกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองให้มีความต้านทานต่อโรคระบาดซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตสัตว์เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากไก่พื้นเมืองโดยมีการมุ่งสู่การเลี้ยงแบบเกษตรอินทรีย์ และเป็นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น มุ่งเน้นการสร้างรายได้ให้สูงขึ้นแก่เกษตรกรรายย่อยหรือสามารถขยายการผลิตไก่พื้นเมืองสู่ตลาดทั้งภายในและต่างประเทศต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปความเกี่ยวข้องในแผนงานวิจัย



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 ศึกษาเพื่อหาค่าเฉลี่ยมาตรฐานเบื้องต้นของค่าโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีเลือดในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

1.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

1.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน MHC กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ได้ค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้นของเลือดในไก่พื้นเมืองไทย

1.3.2 ค่าโลหิตวิทยามีความสัมพันธ์กับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทย

1.3.2 รูปแบบของยีน MHC มีความสัมพันธ์กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

หาค่าเฉลี่ยเบื้องต้นของค่าโลหิตวิทยา ชีวเคมีและอีเล็คโตรไลท์ ของเลือดไก่ ระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล และรูปแบบยีน MHC ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบของยีน MHC กับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว แยกและคละเพศ ที่อายุ 4 และ 7 เดือน จำนวน 153 ตัวจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปีกกบินทร์บุรีที่ได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลตามโปรแกรมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำผลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของค่าทางโลหิตวิทยากับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล และความสัมพันธ์ของรูปแบบของยีน MHC กับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลของไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวรายตัว

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ค่าเฉลี่ยเบื้องต้นของค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีเลือดใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้อ้างอิงในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

1.5.2 สามารถใช้ค่าโลหิตวิทยาประเมินสภาวะภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยที่ได้รับวัคซีน

1.5.3 สามารถใช้ MHC gene เป็นเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์เพื่อช่วยในการบ่งชี้ไก่ โดยจะสามารถระบุตัวไก่ที่มีความสามารถในการต้านทานโรค

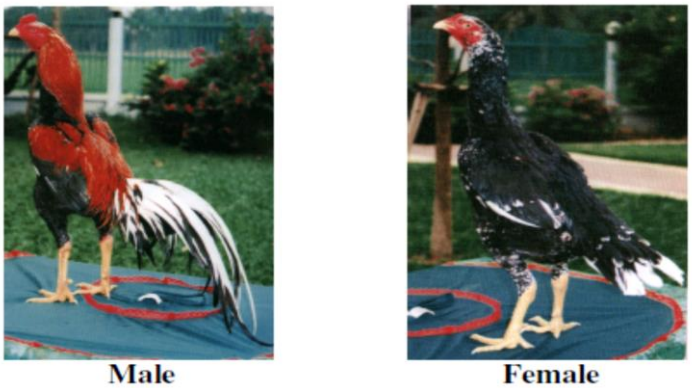
1.5.4 สามารถใช้ค่าโลหิตวิทยาร่วมกับรูปแบบยีน MHC ใช้ประโยชน์สำหรับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยให้มีความสามารถต้านทานโรคให้ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ไก่พื้นเมืองไทยมีต้นกำเนิดมาจากไก่ป่า (Red Jungle Fowl) ถูกนำมาเลี้ยงไว้เป็นฝูงเล็ก ๆ เพื่อการบริโภคภายในครัวเรือนเรื่อยมา และพบว่ามีความหลากหลายอย่างมากระหว่างไก่สายพันธุ์นี้ โดยกรมปศุสัตว์ได้จำแนกไก่พื้นเมืองไทยเป็นสี่สายพันธุ์ ดังนี้คือ เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ แดง และชีซึ่งนักวิชาการกรมปศุสัตว์ได้ทำการศึกษาเพื่อสร้างฝูงพื้นฐานขึ้น 4 ฝูงตามที่กล่าวมา เพื่อเป็นตัวแทนของไก่พื้นเมืองทั้ง 4 สายพันธุ์ และจะได้ทำการจดทะเบียนไว้ในฐานะเป็นพันธุ์ต่อไป เป้าประสงค์ในการเก็บรักษาไก่กลุ่มนี้ไว้เพื่อรักษาสายพันธุ์จากการทำการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ในศูนย์วิจัยของกรมปศุสัตว์ (Division of Animal Husbandry, 2003) เพื่อให้ได้พันธุ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในวงวิชาการและคงคุณสมบัติที่ดีของไก่พื้นเมืองไว้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับเกษตรกรในชนบท และเป็นฐานสำหรับต่อยอดในการผลิตไก่ลูกผสมพื้นเมืองในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้ไก่พื้นเมืองเป็นพ่อพันธุ์ทั้งในปัจจุบันและอนาคตไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นไก่สายพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการยกย่องว่าเป็นไก่นักสู้ที่มีความสามารถในการต่อสู้จึงได้มีการนำไก่สายพันธุ์นี้มาใช้ในกีฬาไก่ชนอย่างแพร่หลายในอดีตที่ผ่านมา มีถิ่นกำเนิดที่จังหวัดพิษณุโลกเป็นแหล่งกำเนิดไก่พันธุ์เหลืองหางขาวพันธุ์ดีสายเลือดแท้เป็นไก่ขนาดกลาง น้ำหนักตัวเฉลี่ยเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้ 3.50 กิโลกรัม เพศเมีย 2.00 กิโลกรัมขึ้นไปมีกล้ามเนื้อที่ใหญ่และแน่นเต็ม เช่น หน้าอกกว้าง และโคนขาใหญ่



Male Female

ภาพที่ 2.1 ลักษณะไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว (Division of Animal Husbandry, 2003)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเลี้ยงไก่พื้นเมืองมีปัญหาในการระบาดของโรคเข้ามาเป็นปัจจัยหลักในการขยายประชากร โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease) เป็นโรคระบาดไก่ที่ร้ายแรงที่สุด มีระบาดทั่วไป (Naila et al., 2001; Seal et al., 1999) โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดหนึ่ง (Paramyxovirus) การติดต่อของโรคเป็นไปรวดเร็วมากติดต่อกันโดยตรงในไก่ป่วยที่อยู่ใกล้ชิดกัน กินน้ำและอาหารร่วมกัน ติดไปกับอุปกรณ์การเลี้ยงไก่ คนและสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว ตลอดจนนก หนูและแมลงวัน ก็เป็นตัวนำโรคได้ จากการชำแหละไก่ที่ป่วยและตายด้วยโรคนี้ (Barman, 2002) ภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลที่ได้รับมาจากแม่ไก่นั้นมีความสามารถในการปกป้องลูกไก่ได้ระดับภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อโรคนิวคาสเซิลที่ถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก คือ ร้อยละ 27-40 ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับภูมิคุ้มกันที่พบในแม่ไก่ (Hamal et al., 2006) ภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลจากแม่ในลูกไก่จะถูกสลายลงตั้งแต่ไก่แรกฟัก พบว่าภูมิคุ้มกันจากแม่ในลูกไก่จะถูกรบกวนด้วยการเพิ่มจำนวนของไวรัสในวัคซีน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการให้วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็นในไก่ที่อายุ 1 วัน จะเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะที่หรือภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการป้องกันลูกไก่ที่มีภูมิที่ได้รับจากแม่ต่อโรคนิวคาสเซิลในระยะแรก ส่วนการให้วัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมันที่อายุ 1 วัน จะประสบความสำเร็จในการป้องกันโรคได้จากแม่ไก่ที่ได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล (นิวัตรและจิโรจ, 2548; Alexander and Jones, 2001)

2.2 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก

ภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันตามพันธุกรรม ถึงแม้ว่าจะเป็นสัตว์ปีกเหมือนกันแต่ต่างพันธุ์กันก็มีความต้านทานโรคที่ไม่เหมือนกัน เนื่องมาจากสายพันธุ์หรือพันธุกรรมมีบทบาทในการควบคุมความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล ในการแสดงออกของโรคที่เกิดขึ้นนั้นมักจะขึ้นอยู่กับความสามารถของสัตว์ ที่จะสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่มีการควบคุมโดยกลุ่มยีนที่ควบคุมความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันคือ เอ็มเอชซี (MHC หรือ Major histocompatibility gene complex) ซึ่ง MHC ในสัตว์ปีกเรียกว่า B complex ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก ซึ่งการทดลองของ เชิดชัยและบัญญัติ (2526) พบว่าไก่พื้นเมืองมีความสามารถในการต้านทานโรคนิวคาสเซิลทั้งก่อนการให้วัคซีนและหลังการให้วัคซีน สูงกว่าในไก่พันธุ์โร๊ดไอแลนด์เรด บาร์พลีมัธร๊อค ลูกผสมพื้นเมืองกับโร๊ดไอแลนด์เรดและลูกผสมพื้นเมืองกับบาร์พลีมัธร๊อค ซึ่งเป็นผลทางด้านพันธุกรรม

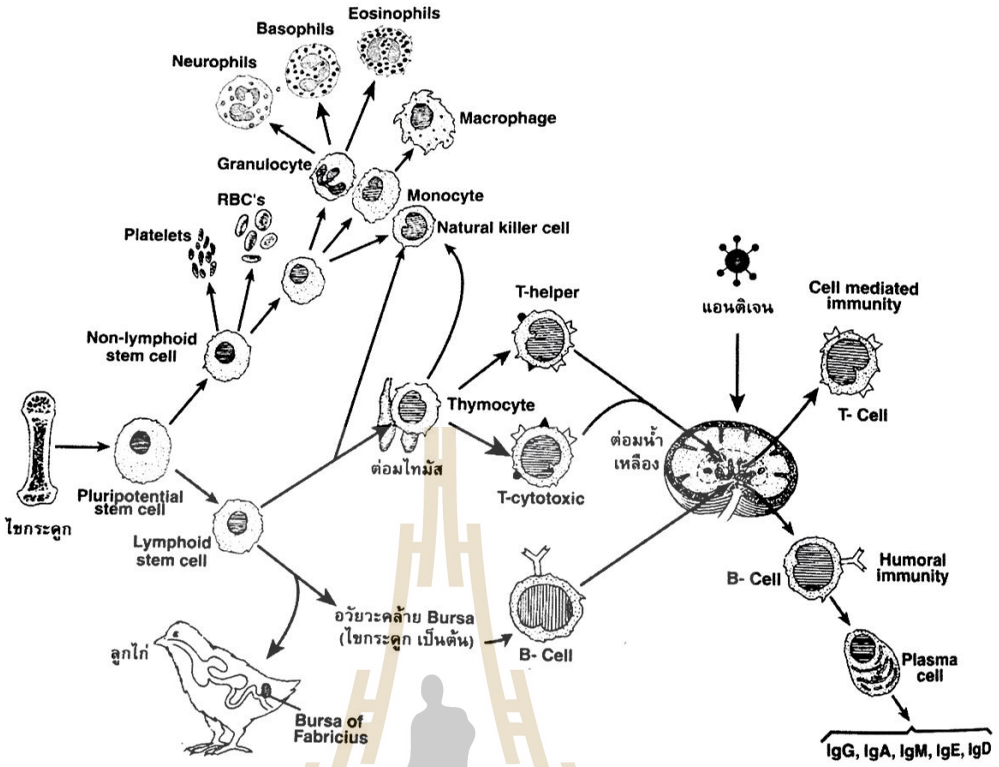
การตอบสนองแบบไม่จำเพาะขึ้นอยู่กับการป้องกันการติดเชื้อของสัตว์แต่ละตัวในช่วงแรกที่ได้รับเชื้อโรค โดยการตอบสนองหลักเกิดจาก Natural Killer cells (NK cells) และเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytizing cells) เช่น มาโครฟาจ และ เฮตเตอร์โรฟิล (heterophil) ในสัตว์ปีกทำหน้าที่คล้ายนิวโทรฟิล ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะพบเฮตเตอร์โรฟิลมีปริมาณมากเป็นอันดับที่ 2 ในไก่ทำหน้าที่

เป็น phagocytic cell โดยใช้เอนไซม์ที่มีอยู่ในไลโซโซม (lysozome) ในการย่อยสิ่งแปลกปลอม กลไกการป้องกันโรคเกิดได้จากการตอบสนองทางด้านเซลล์และสารน้ำ ซึ่งการตอบสนองทั้งสองแบบเป็นการทำงานจาก T helper (Th) cell โดยจะไปจับกับชิ้นส่วนเปปไทด์ที่โมเลกุลของ class II major histocompatibility complex (MHC class II) บนผิวของ antigen presenting cells (APCs) โดย MHC class II ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนให้ helper T cell โดย class II antigen ต้องเป็น exogenous antigen คือ แอนติเจนที่สร้างจากภายนอกเซลล์และถูกนำเข้ามาในเซลล์ โดยเซลล์จะเก็บกินแอนติเจนและย่อยให้เป็นเปปไทด์ เพื่อนำเสนอให้แก่ CD4+ T cell หรือ helper T cell ดังนั้นเซลล์ใดก็ตามที่มีความสามารถในการนำแอนติเจนเข้าสู่เซลล์ได้ ถือเป็นเซลล์ที่นำเสนอ class II antigen ซึ่งได้แก่ เซลล์กลืนกิน (Phagocytic cell) ที่มีความสามารถในการเก็บกินแอนติเจนได้

2.3 ความสัมพันธ์ของภูมิคุ้มกันกับค่าโลหิตวิทยาในสัตว์ปีก

โลหิตวิทยา เป็นศาสตร์สาขาหนึ่งทางด้านชีววิทยา ที่ศึกษาเกี่ยวกับเลือด อวัยวะที่เกี่ยวกับการสร้างเม็ดเลือด โรคที่เกี่ยวกับเลือดและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับร่างกายเลือดเป็นของเหลวที่มีลักษณะพิเศษที่ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือดละลายอยู่ในส่วนของพลาสมา โดยเม็ดเลือดแดงจะประกอบด้วยฮีโมโกลบิน (ที่มีโมเลกุลของออกซิเจนจับอยู่ทำให้เม็ดเลือดมีสีแดง) ในโมเลกุลของฮีโมโกลบินจะมีเหล็กจับอยู่กับโปรตีน ซึ่งทำหน้าที่จับกับออกซิเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ เม็ดเลือดขาวช่วยในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกร่างกายในการวิเคราะห์ผลทางโลหิตวิทยาเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน มีเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดในไขกระดูกสามารถเจริญพัฒนาเป็นเม็ดเลือดได้ทุกชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2.2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.2 ลำดับการพัฒนาของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์เปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกเป็นเซลล์ที่สร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ (ที่มา : ไพศาล, 2548)

เซลล์ส่วนหนึ่งจะเจริญเป็นเซลล์เม็ดเลือดต่าง ๆ ในขณะ ที่เซลล์อีกส่วนหนึ่งยังคงสภาพเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและรักษาระดับประชากร โดยการแบ่งเซลล์ ในการการพัฒนาของ lymphoid cell และ myeloid stem cell พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ มีบทบาทเกี่ยวเนื่องกับระบบภูมิคุ้มกัน ค่า lymphocyte และ heterophil มีความสัมพันธ์กับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เนื่องจากค่า lymphocyte เป็นเซลล์หลักในระบบภูมิคุ้มกัน ที่ก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมลิมโฟไซต์มี 2 กลุ่ม คือ B-cell พัฒนาเป็นพลาสมาเซลล์ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดี และ T-cell แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ CD4 cell เป็นเซลล์ที่สามารถตรวจจับแอนติเจนที่นำเสนอร่วมกับ class II MHC ทำหน้าที่เป็นเซลล์ช่วยเหลือการตอบสนอง ของ B และ T-cell ส่วน CD8 cell เป็นเซลล์ที่ตรวจจับแอนติเจนที่นำเสนอร่วมกับ ส่วนเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ มีบทบาทในการช่วยเหลือเท่านั้น โดยทำหน้าที่ฟาโกไซโทซิส class I MHC ทำหน้าที่เป็น T cytotoxic cell ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ เช่นเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะ ค่า heterophil มีความเกี่ยวเนื่องกับค่า lymphocyte และ antibody titer ได้อย่างชัดเจนที่สุด เพราะจะตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นสารเคมีอย่างรวดเร็ว ถูกกระตุ้นโดยไซโทไคน์ที่หลั่งจากแมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์แรกที่เดินทางเข้ามาสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ โดยการเพิ่มจำนวนของ

heterophil จึงสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อของร่างกาย ความสัมพันธ์ของ lymphocyte และ heterophil (H : L ratio) ส่วนระบบ HPA axis นั้นจะเกิดขึ้นเมื่อได้รับผลกระทบต่อความเครียดในระยะเวลานานทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณจากไฮโพทาลามัสและการทำงานของต่อมใต้สมองซึ่งเป็นระบบที่เกิดขึ้นเป็นกลไกหลักซึ่งเป็นพื้นฐานโดยการทำงานของ HPA system นั้นส่งผลให้เกิดการหลั่งของ corticotrophin releasing hormone เพื่อกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่ง adrenocorticotrophic hormone เพื่อควบคุมให้ต่อมหมวกไตชั้นนอกหลั่ง glucocorticoid โดยในสัตว์ปีกนั้นจะเป็นชนิด corticosterone (CORT) เป็นหลัก และพบว่าการหลั่งของ CORT ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของ vasopressin โดยการเสริมฤทธิ์ให้กับ CRH ทำให้หลั่ง ACTH เพิ่มมากขึ้นนอกจากนี้การกระตุ้นดังกล่าวยังทำให้เกิดการกระตุ้น pro-opiomelanocortin ให้เกิดการสร้างและหลั่ง β-endophin เพื่อต่อต้านและบรรเทาการตอบสนองต่อความเครียดโดยยับยั้งการหลั่งของ CRH ซึ่งผลสุดท้ายการหลั่งของ CORT จะเป็นผลทำให้เกิดการตื่นตัวเพื่อเตรียมพร้อมต่อสภาวะแวดล้อม (Squire, 2003) ภาวะความเครียดนั้นทำให้เกิดการหลั่ง CORT ระดับสูงแต่คงอยู่ในระยะเวลาสั้น ซึ่งผลของ CORT และ ACTH จะมีผลต่อเซลล์เป้าหมายหลายตำแหน่ง เช่น ต่อมหมวกไต ต่อมไทมัส ม้ามต่อมเบอร์ซา และมีผลในการกดการทำงานและทำให้มีการลดจำนวนของ lymphocyte แต่เพิ่มจำนวนของ hetrophil และ heterophil ในกระแสเลือด (Daghir, 1995) ดังนั้น H : L ratio จึงเป็นตัวบ่งชี้ที่ถาวรจากความเครียดที่เกี่ยวข้องกับการได้รับ การบาดเจ็บหรือ รอบการสืบพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงฤดูกาล (Carol et al., 2000) ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวอายุ 7 เดือน ค่า titer มีอิทธิพลต่อค่าชีวเคมีเลือด คือ creatinine และ sodium อิทธิพลนี้มักจะมาจากอาหารที่ไก่ได้รับเข้าไปในร่างกายซึ่งหลักฐานที่สนับสนุนความสัมพันธ์ของค่า antibody titer ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับค่าโลหิตวิทยา ดังเช่นการศึกษาของ Sebastian and Helana (2011) และ Sunday et al. (2011)

2.4 การแปลผลความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงในสัตว์ปีก

ค่าปกติของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของสัตว์ปีกประมาณ 35-55 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของไก่ต่ำกว่า 35 เปอร์เซ็นต์บ่งชี้ว่าเกิดภาวะโลหิตจาง (แต่ขึ้นอยู่กับอายุและเพศของสัตว์ปีกนั้น ๆ) ส่วนกรณีที่ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของสัตว์ปีกสูงกว่า 55 เปอร์เซ็นต์บ่งชี้การเกิดภาวะขาดน้ำ (Dehydration) หรือภาวะที่มีการสร้างเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติ (Polycythemia) เป็นต้น

ค่าลักษณะที่ศึกษาจากเม็ดเลือดแดง คือ ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (Red blood cell (RBC) count) จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ แข็งแรงของสัตว์ทั่วไปค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (HGB %g/dL) เปอร์เซ็นปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT %ml/dL) ค่าเฉลี่ย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปริมาณเม็ดเลือดแดง (MCV fL), ค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินในเม็ดเลือด (MCH pg) และ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเม็ดเลือด (MCHC g/dL) โดยค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เป็นค่าที่ใช้ประเมินเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุดและใช้วิธีตรวจที่รวดเร็วโดยเครื่อง hematocrit centrifuge ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที 5 นาที ถ้าค่า HCT น้อยกว่าค่ามาตรฐานถือว่าเกิดภาวะโลหิตจาง

ค่า HCT จะเพิ่มขึ้นในกรณี

1. ในเพศผู้ โดยเฉพาะช่วงผสมพันธุ์
2. ไก่ที่มีอายุมากจะมีค่า HCT สูงขึ้น
3. ภาวะขาดน้ำมีผลทำให้ค่า HCT สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
4. การขาดวิตามินบี 2 เนื่องจากกระบวนการเจริญเติบโตเต็มวัยของเม็ดเลือดแดงช้าลง (delay maturation) ทำให้เม็ดเลือดแดงมีขนาดโตกว่าปกติ

ค่า HCT ลดลงในกรณี

1. ในช่วงการวางไข่ของเพศเมีย
2. ขาดธาตุเหล็ก
3. ภาวะโลหิตจางจากปรสิต
4. ภาวะเสียเลือด

2.5 การแปลผลความผิดปกติของเม็ดเลือดขาวในสัตว์ปีก

โดยปกติเม็ดเลือดขาวของสัตว์ปีกจะมีความแปรปรวนไปตามชนิดของสัตว์แต่ละชนิด ดังนั้นในการเตรียมค่าหรือช่วงของค่าโลหิตวิทยาจึงมีความสำคัญ โดยค่าที่นำมาประเมินความผิดปกติต้องได้จากสัตว์ปีกที่มีสุขภาพดี

โดยทั่วไปค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดถ้าหากสูงกว่า 10,000 เซลล์/มิลลิลิตร บ่งชี้ว่ามีระดับเม็ดเลือดขาวสูง (Leukocytosis) แต่อาจขึ้นอยู่กับชนิดสัตว์ปีก อายุ และสภาวะทางสรีรวิทยา เช่น สัตว์อาจจะอยู่ในสภาวะเครียด การติดเชื้อทั้งแบบเฉพาะที่ หรือการติดเชื้อแบบกระจาย การบาดเจ็บ การอักเสบ หรือได้รับสารพิษ เป็นต้น ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดสูงขึ้น แม้ว่าเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิลในสัตว์ปีกจะไม่มี Myeloperoxidase และ Alkaline phosphatase แต่มีเอนไซม์ Lysosome แทนในกระบวนการ Phagocytosis เช่นเดียวกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่จากการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์พบว่าเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดนี้ทำหน้าที่ในการอักเสบเหมือนกัน ยกตัวอย่างการประเมินค่าโลหิตวิทยาจากเม็ดเลือดขาว ดังนี้

- การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิล บ่งชี้ถึงความรุนแรงในกระบวนการอักเสบภายในร่างกาย พบว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิลมักมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และพยาธิ

- การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิลและการลดลงของเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ บ่งชี้ถึงภาวะที่ไก่เกิดความเครียด
- การลดลงของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิล มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัส
- การเพิ่มสูงขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล บ่งชี้การติดพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหาร
- การเพิ่มสูงขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดแบโซฟิล มีความสัมพันธ์กับการแพ้และการอักเสบในระยะแรกได้

การทดลองของเชิดชัยและบัญญัติ (2526) ในการศึกษาความต้านทานโรคนิวคาสเซิล ในไก่พื้นเมืองเปรียบเทียบกับไก่เชิงเศรษฐกิจพันธุ์โร๊ดไอแลนด์เรด บาร์พลีมัธร๊อค ลูกผสมพื้นเมืองกับโร๊ดไอแลนด์เรดและลูกผสมพื้นเมืองกับบาร์พลีมัธร๊อค ที่อายุ 6 สัปดาห์ โดยให้เชื้อพิษนิวคาสเซิลโดยการหยอดตาจนกระทั่งไก่ตาย ผลพบว่าไก่พื้นเมืองมีความสามารถในการต้านทานเชื้อนิวคาสเซิลนานกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความแตกต่าง $P \geq 0.05$ ผลดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อายุไก่ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อนิวคาสเซิล แบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลองคือ ไก่พื้นเมืองเปรียบเทียบกับไก่เชิงเศรษฐกิจพันธุ์โร๊ดไอแลนด์เรด บาร์พลีมัธร๊อค ลูกผสมพื้นเมืองกับโร๊ดไอแลนด์เรดและลูกผสมพื้นเมืองกับบาร์พลีมัธร๊อค ที่อายุ 6 สัปดาห์

พันธุ์ไก่	จำนวนวันที่มีชีวิต
ไก่พันธุ์พื้นเมือง	11.4
ไก่พันธุ์โร๊ดไอแลนด์เรด	8.2
ไก่พันธุ์บาร์พลีมัธร๊อค	8.0
ไก่พันธุ์ลูกผสม พื้นเมืองกับโร๊ดไอแลนด์เรด	9.1
ไก่พันธุ์ลูกผสมพื้นเมืองกับบาร์พลีมัธร๊อค	8.3

ที่มา : เชิดชัยและบัญญัติ (2526)

การศึกษาของ Graczyk et al. (2008) ศึกษาผลของ เซลล์เม็ดเลือดขาวต่อวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล โดยทำการทดลองในไก่ฟ้าแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง

G1 = NDV

G2 = NDV+SRBC

G3 = NDV+HEV

G4 = NDV+HEV+SRBC

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(HEV = Haemorrhagic enteritis virus, SRBC = Sheep red blood cells)

ชนิดของเม็ดเลือดขาวที่ทำการตรวจสอบในสัตว์ปีกในกลุ่มควบคุม lymphocytes มีมากกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น (~70%) จำนวน heterophils, basophils และ eosinophils เท่ากับ 20 4 และ 2% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปอร์เซ็นของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด lymphocytes heterophils basophils และ eosinophils จากการทำวัคซีนที่แตกต่างกันใน 4 กลุ่มการทดลอง (Graczyk et al., 2008)

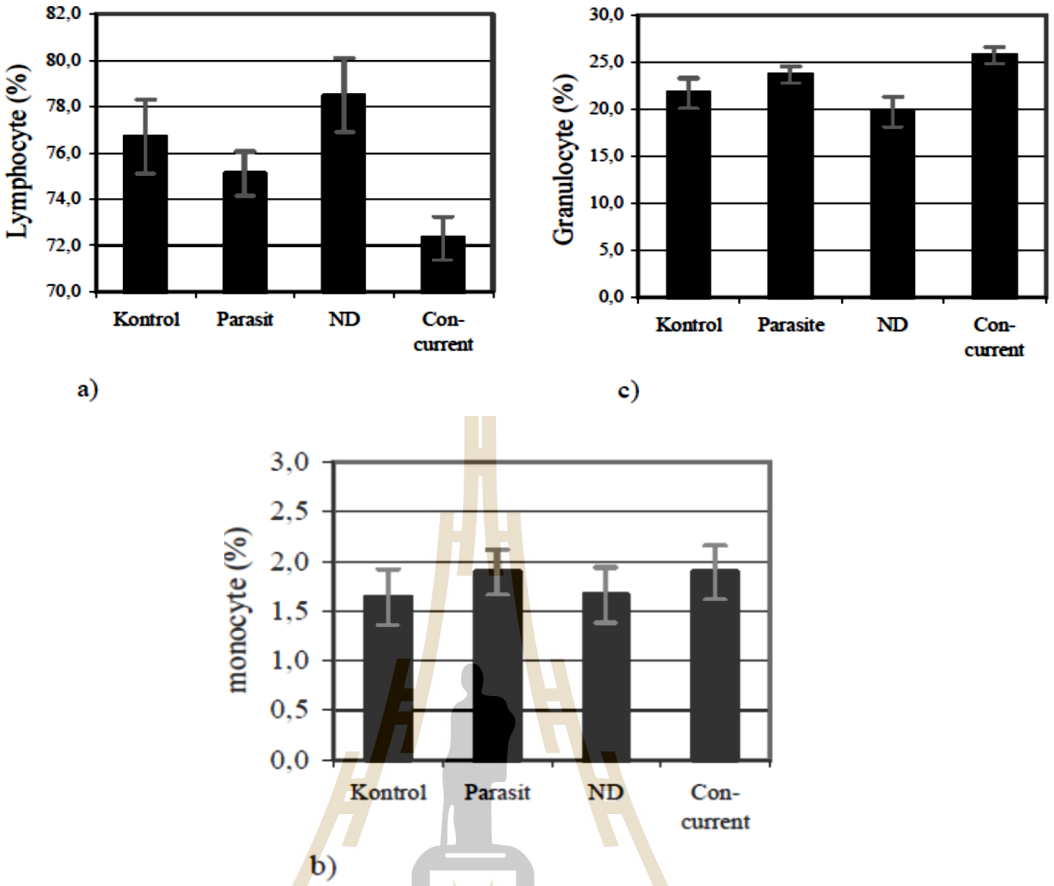
Group	Lymphocytes %	Heterophils %	Eosinophils %	Basophils %	Monocytes %
NDV	70.66±11.09	22.66± 11.02	2 ±1.67	4.16± 3.71	0.5± 0.54
NDV+SRBC	59±14.96	33.66±16.05	1±1.55	6±2.96	0.33±0.81
NDV+HEV	65.5± 6.02	22.5± 5.82	5.33± 3.98	5.33± 5.12	1.33 ±1.96
NDV+HEV +SRBC	65.16± 5.15	24.33± 6.25	2.66± 3.07	7.66± 3.14	0.16± 0.41

การทดลองของ Hansen and Kamilla (2003) ศึกษาระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ปีกที่สัมพันธ์กับโรคนิวคาสเซิลในการติดเชื้อปาราสิตในไก่ แสดงผลค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันของชนิดเม็ดเลือดขาวในไก่ โดยให้มีการติดเชื้อเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ดังนี้คือ

G1 = Control
G2 = ติดเชื้อพาราไซต์
G3 = ติดเชื้อนิวคาสเซิล
G4 = ติดเชื้อร่วมกันระหว่างพาราไซต์และนิวคาสเซิล

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง lymphocyte granulocyte และ monocyte พบว่าจำนวนของ lymphocyte มีจำนวนสูงในกลุ่มที่ติดเชื้อนิวคาสเซิลและจะต่ำในกลุ่มที่ติดเชื้อร่วมกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ lymphocyte, granulocyte และ monocyte จากการติดเชื้อพาราสิตนิวคาสเซิล และกลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างพาราสิตกับนิวคาสเซิล (Hansen and Kamilla, 2003)

Suchint et al. (2004) ได้ศึกษาค่าโลหิตวิทยา อีเลคโตรไลต์และชีวเคมีโลหิตของไก่พื้นเมือง (Gallus domesticus) ที่เลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งค่าที่กล่าวมานี้มีความสำคัญในการวินิจฉัยอาการผิดปกติทางคลินิก และอาการจากโรคต่าง ๆ โดยใช้ไก่พื้นเมืองสุขภาพดีจำนวน 40 ตัว (เพศเมียและเพศผู้ชนิดละ 20 ตัว) และค่าอิเลคโตรไลต์และค่าชีวเคมีโลหิตในไก่พื้นเมืองจำนวน 18 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 8 ตัว) ไก่ที่ได้มาจากจังหวัด ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และนครราชสีมา ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น และเม็ดเลือดขาวชนิดอิโอซิโนฟิล ของไก่พื้นเมืองเพศผู้สูงกว่าเพศเมีย ($P< 0.05$) ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของไก่เพศเมียมีค่าสูงกว่าเพศผู้ ($P< 0.05$) ผลดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ค่าโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทย (Suchint et al., 2004)

Parameter	Sex		Total (n=40)	Range
	Male (n=20)	Female (n=20)		
Hemoglobin (g/dl)	9.27±1.42*	8.52±0.85	8.89±1.20	8-10
Total RBC (x10^{6}µl)	2.32±0.31*	2.19±0.26	2.26±0.29	2-3
PCV (%)	33.55±4.72	30.80±3.96	32.18±4.46	28-37
MCV (fl)	147.87±18.43	141.39±19.17	144.63±18.61	126-163
MCH (pg)	40.26±5.16	39.11±4.42	39.69±4.96	35-45
MCHC (g/dl)	27.93±4.56	27.79±1.77	27.86±3.37	24-31
Total WBC (x10^{4}µl)	2.05±0.39	2.05±0.53	2.04±0.45	1.6-2.5
Heterphil (%)	25.40±5.12	22.00±8.78	23.70±7.21	16-31
Lymphocyte (%)	60.30±5.33	67.05±11.49*	63.68±9.36	54-73
Eosinophil (%)	7.35±2.91*	4.30±3.59	5.83±3.53	2-9
Monocyte (%)	4.35±3.15	4.05±3.39	4.20±3.20	1-7
Basophil (%)	2.70±2.13	2.60±2.16	2.65±2.09	1-5
H : L ratio	0.43±0.12	0.36±0.21	0.40±0.17	0.23-0.57

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ย ±SD ภายในแถวระหว่างเพศ ค่าความแตกต่างทางสถิติ (P< 0.05)

การศึกษาของ Juul-Madsen et al. (2002) ศึกษาความสัมพันธ์ของ Major Histocompatibility Complex กับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีนต่อโรคหลอดลมอักเสบ (Infetious Bursal Disease Virus; IBDV) ตรวจสอบในไก่ 3 สายพันธุ์มีความแตกต่างของ B haplotype 4 ชนิด โดย B19 haplotype มีการแสดงออกในไก่ทั้ง 3 สายพันธุ์

Line 1 BW1: Red Jungle Fowl (Gallus gallus 6.25% × White Leghorn 93.75%)

Line 131 B131: Meat-type chicken (White Cornish 50% × White Leghorn 50%)

Line 21 B21: White Leghorn 100%

การแบ่งกลุ่มการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 2.4

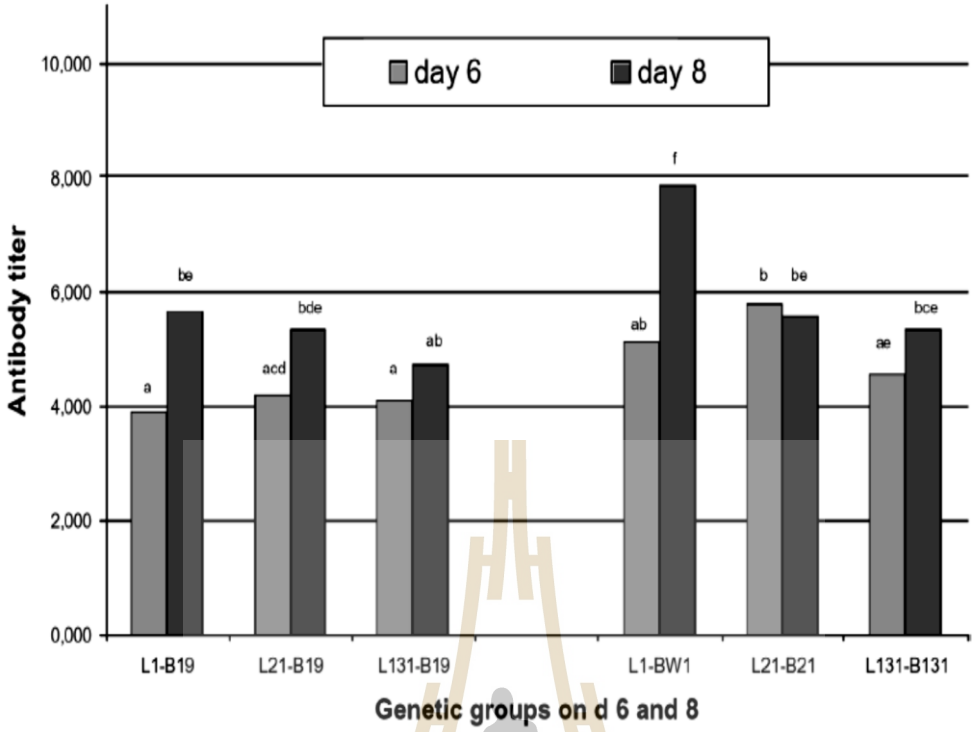
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางพันธุกรรม ของไก่ทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง (Juul-Madsen et al., 2002)

Genetic group	Line	MHC genotype
L1-BW1	1	BW1/BW1
L1-B19	1	B19/B19
L131-B131	131	B131/B131
L131-B19	131	B19/B19
L21-B21	21	B21/B21
L21-B19	21	B19/B19

MHC มีผลต่อการตอบสนองต่อ IBDV antigen ตรวจวัดโดยวิธี ELISA วัดจำนวนของ MHC class II molecules ต่อ MHC class II-positive lymphocyte พบว่า การเปรียบเทียบค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ต่อการต้านทานโรคหลอดลมอักเสบในไก่อายุ 6 และ 8 วัน ของทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง พบว่ามีระดับภูมิต้านทานโรคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) ในกลุ่ม L1-B19 และ L1-BW1 haplotype ซึ่งเป็นไก่ลูกผสมพื้นเมือง โดยในกลุ่มอื่นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังแสดงในภาพที่ 2.4

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

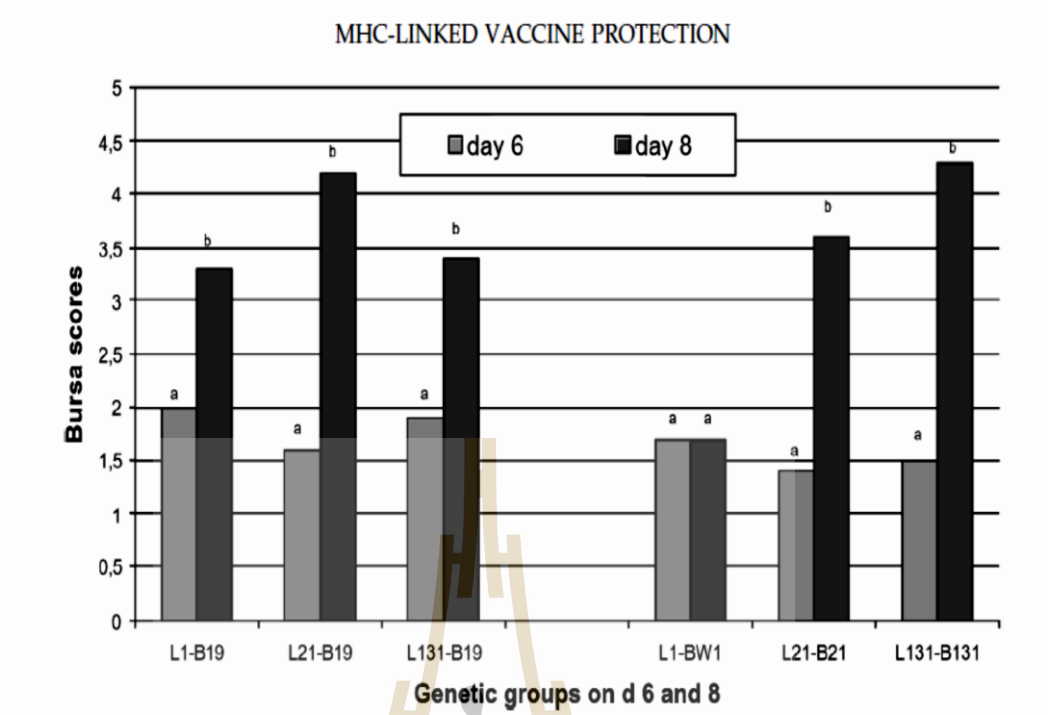


ภาพที่ 2.4 ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ต่อการต้านทานโรค หลอดลมอักเสบ (IBDV) ตรวจโดยใช้วิธี ELISA ที่อายุ 6 และ 8 วัน (Juul-Madsen et al., 2002)

หมายเหตุ : a b c d e f ค่าความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

พบว่าระดับที่ลดลงหรือการตายของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต่อมเบอร์ซ่าในไก่อายุ 6 และ 8 วัน พบว่าปริมาณ lymphocyte เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มการทดลอง ยกเว้นกลุ่ม L1-BW1 ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.5 ระดับที่ลดลงหรือการตายของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte) ใน 6 กลุ่มการทดลองที่ทำวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบ (Juul-Madsen et al., 2002)

หมายเหตุ : a b ค่าความแตกต่างทางสถิติ ($P< 0.05$)

ซึ่งจากรูปภาพที่ 2.4 และ 2.5 ผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่า ระดับภูมิคุ้มกันโรคที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย

2.6 ค่าชีวเคมีเลือดในสัตว์ปีก

1. Uric acid บอกการทำงานของไตสัตว์ปีกUric acid เป็นของเสียในรูปไนโตรเจนของสัตว์ปีกจะสูงขึ้นเมื่อสัตว์ปีกนั้นเป็นโรคที่มีผลต่อไต (normal range 2-11 mg/dl)

2. Blood glucose ปริมาณกลูโคสในเลือดสัตว์ปีกปกติจะสูงกว่าของแมวและสุนัข และจะสูงมากขึ้นถ้าได้รับความเครียดสัตว์ปีกจะไม่ค่อยพบว่าเป็นเบาหวานนอกจากจะพบว่ามีปริมาณกลูโคสสูงถึง 900 mg/dl และจะมีอันตรายเมื่อพบว่าต่ำกว่า 150 mg/dl

3. Cholesterol เป็นไขมันที่ได้มาจากอาหารและร่างกายสร้างขึ้นเองบางส่วน ไก่เพศผู้มักมีกิจกรรมที่ใช้ร่างกายสูง รวมทั้งความต้องการพลังงานสูงในการดำรงชีวิต ทำให้มีระดับ cholesterol ต่ำ (Bahman et al., 2011) คอเลสเตอรอล เป็นทั้งสาร สเตอรอยด์ลิพิดและ แอลกอฮอล์ พบใน เยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ คอเลสเตอรอลส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกาย จะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (spinal cord) สมอง และ ผนังหลอดเลือดแดง (atheroma)

คอเลสเตอรอลมีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ มันเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ร่างกายจะมีการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลเมื่อเซลล์ได้รับคอเลสเตอรอลเพียงพอแล้วการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase จะถูกยับยั้งทำให้การสร้างขึ้นมาใหม่ของคอเลสเตอรอลในเซลล์ลดลงและคอเลสเตอรอลที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่ต่างๆเช่นที่ผิวหนังจะถูกเปลี่ยนเป็นวิตามินดีและคอเลสเตอรอลที่ตับจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำดีช่วยในการทำให้ไขมันแตกตัวและดูดซึมไขมันและคอเลสเตอรอลยังสามารถได้รับจากอาหารที่กินเข้าไปแต่จะไม่พบในพืชซึ่งไม่มีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลแต่น้ำมันพืชบางชนิดที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงหรือการบริโภคอาหารที่มีพลังงานสูงอาจกระตุ้นการสร้างคอเลสเตอรอลในร่างกายได้

4. Amylase การตรวจวัด amylase ในซีรัมและปัสสาวะจะช่วยประกอบการวินิจฉัยภาวะตับอ่อนอักเสบแบบเฉียบพลัน

2.7 Major Histocompatibility Complex (MHC) ในการต้านทานโรคในสัตว์ปีก

สัตว์ปีกเป็นสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่ ดังนั้นจึงมีการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าไปทำลายตัวอ่อนได้เป็นอย่างดี โดยในไข่นั้นจะมีเยื่อหุ้ม chorioallentoic หุ้มตัวอ่อนอยู่ นอกจากนี้ยังมีแอนติบอดีบางตัวที่สามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกโดยผ่านทางไข่แดง ขณะที่ลูกไก่ยังอยู่ในรังไข่เมื่อไข่ผ่านมายังท่อนำไข่ทั้ง IgM และ IgA ที่อยู่ในสารคัดหลั่งบริเวณท่อนำไข่จะรวมเข้ากับอัลบูมิน เมื่อตัวอ่อนเจริญเติบโตก็จะกินเข้าไปในรูปของ amniotic fluid ส่วน IgG ลูกไม่สามารถดูดซึมจากไข่แดงเข้าสู่กระแสเลือดได้ แต่แอนติบอดีในลูกไก่จะลดลงในช่วง 10-20 วัน หลังฟักเป็นตัว

ได้มีการยืนยันมากมายว่ายีน MHC เป็นยีนหลักที่ใช้ในการควบคุมการต้านทานโรค ไวรัส แบคทีเรีย และปาราสิต โดย MHC จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์ และการต้านทานโรค ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ จากการศึกษายีน MHC ในไก่สามารถยืนยันได้ว่าโรคที่ถูกควบคุมจากยีนต้านทานโรค เช่น โรคมาเร็ก โรคนิวคาสเซิล และโรคหลอดลมอักเสบ เป็นต้น

2.8 Major Histocompatibility Complex (MHC) ในสัตว์ปีก

Major Histocompatibility Complex (MHC) เป็นกลุ่มของยีนบนโครโมโซม ประกอบด้วยหมู่ยีนหลายชนิดที่กำหนดให้มีการสร้าง Histocompatibility antigen ชนิด glycoprotein ซึ่งอยู่ที่ผิวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวของกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยนำเสนอแอนติเจนให้แก่ T cell ทำให้ T cell สามารถแยกแยะระหว่าง self และ non-self โดย

MHC ในไก่ถูกเรียกว่าระบบ B complex บนโครโมโซมตำแหน่งที่ 16 (Boonyanuwat et. al. 2006) สามารถจำแนกได้ทั้งหมด 4 class คือ

Class I (B-F) gene product แทนด้วย F antigen จะมีการแสดงออกส่วนมากที่เซลล์ของร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด และ erytrocytes โดย F antigen มีส่วนประกอบทางเคมีแบบโพลีเปปไทด์ พบว่าโมเลกุล F มีความสัมพันธ์กับ β_2- microglobulin ในไก่ MHC class I สามารถนำเสนอเปปไทด์ให้กับ T-cell ชนิด $CD8^+$T-cell หรือ cytotoxic T lymphocyte (CTL) โดยการนำเสนอเปปไทด์บน MHC นั้นต้องทำการย่อยโปรตีนออกเป็นท่อนๆ โดยแอนติเจนโปรตีนที่จะเข้าสู่วิถีของ class I ต้องเป็น endogenous antigen หรือแอนติเจนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์นำเสนอแอนติเจนเอง ตัวอย่างของแอนติเจนโปรตีนนี้ได้แก่ จุลชีพก่อโรคที่ติดเชื้อเข้าเซลล์และเพิ่มจำนวนในเซลล์โดยเฉพาะไวรัส หรือการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติของเซลล์นั้นเอง เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์ที่สร้างหรือนำเสนอ class I antigen ได้แก่ เซลล์ทุกเซลล์ในร่างกายที่มีนิวเคลียส

Class II (B-L) gene product พบว่ามีความสำคัญมากในการผลิต MHC ในไก่ เพราะสารชีวเคมีและการกระจายตัวภายในเนื้อเยื่อมีการแสดงออกคล้ายกับ H-2I ในหนู และ HLA-D ในมนุษย์ โดย L antigen มักจะมีการนำเสนออยู่บนเซลล์ที่เป็น non-lymphoid cell ซึ่งอยู่ที่ Bursa of Frabricius เช่น Thymus cells, B-lymphocytes, Activated T-lymphocytes และ Macrophages เป็นต้น MHC class II ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนให้ helper T cell โดยที่ class II antigen ต้องเป็น exogenous antigen คือ แอนติเจนที่สร้างจากภายนอกเซลล์และถูกนำเข้ามาในเซลล์ โดยเซลล์จะเก็บกินแอนติเจนแล้วย่อยให้เป็นเปปไทด์ เพื่อนำเสนอให้แก่ $CD4^+$T-cell หรือ helper T cell ดังนั้นเซลล์ใดก็ตามที่มีความสามารถในการนำแอนติเจนเข้าสู่เซลล์ได้ ถือเป็นเซลล์ที่นำเสนอ class II antigen ซึ่งได้แก่ เซลล์กลืนกิน (phagocytic cell) ที่มีความสามารถในการเก็บกินแอนติเจนได้จากหลักการของ MHC class I และ class II จุลชีพก่อโรค

Class III gene product หรือ class III antigen มักพบได้ในสัตว์สปีร์ชีอื่น แต่ในไก่ยังไม่ได้มีการอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับการทำงาน เพียงแต่ได้มีการพิสูจน์ว่ามีความสัมพันธ์ในระดับ hemolytic serum และ MHC เท่านั้น

Class IV (B-G) gene product มักมีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดแดง พบได้ใน cythrocyte platelets และ intestinal cell เป็นต้น (Bloom and Bacon, 1985) แต่ไม่พบในซีรัม หรือพลาสมา

2.9 โครงสร้างยีน MHC (Gene Structure of MHC)

เมื่อไม่นานมานี้เองได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านโมเลกุลระดับยีนมาศึกษายีน MHC ของไก่ สามารถจำแนกได้ 3 class ด้วยกันคือ class I II และ IV พบว่าใน class II มีความคล้ายคลึง

กันระหว่างไก่และมนุษย์สูงถึง 55-65% แต่ความคล้ายคลึงกันของ class I มีแค่เพียง 35% ซึ่งความคล้ายคลึงกันของ MHC class I และ class II บนโครโมโซมอาจจะพบว่ามีความถี่ในการรวมกันของยีนระหว่าง B-F และ B-L น้อยมาก (Lamont, 1989)

2.10 การสร้างโมเลกุลของ MHC

การสร้างโมเลกุลของ MHC ถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะเดียวกับการสร้างโปรตีนโดยทั่วไป โดยมีการนำส่งออกมาที่พื้นผิวเซลล์ นั้นคือ mRNA จากนั้นจะถูก translated ที่ ribosome ทำให้ MHC ที่สร้างขึ้นเข้ามารวมตัวกับ N-linked high mannose oligosacchaside หลังจากนั้นจะถูกส่งเข้าไปใน Golgi เพื่อเปลี่ยนเป็น mannose ไปเป็นโมเลกุลที่มีความซับซ้อน ในที่สุด MHC ในสภาพของโปรตีนก็จะย้ายตัวเองไปยัง plasma membrane ผ่าน vesicular ต่อไป มีผลในระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะ หรือ แอนติบอดีนั้นเอง

2.11 กลไกการพัฒนาเชิงโมเลกุลเพื่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในไก่ (B-cell และยีนที่ควบคุมการทำงานในการสร้าง อิมมูโนโกลบูลิน : Immunoglobulin (Ig))

B-cell ที่ถูกสร้างและพัฒนาจากไขกระดูก เพื่อการพัฒนาเกิดจากการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น แอนติเจน หรือ ไซโตคายน์ ซึ่งจะส่งผลให้ยีนที่ควบคุมการสร้าง Ig เปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนอย่างเป็นระบบ ในการพัฒนาของ B-cell เกิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดของ lymphocyte คือ stem cell ที่สร้างจากไขกระดูก ส่วนหนึ่งไปแสดงผลยังต่อมไธมัส เพื่อพัฒนาไปเป็น T-cell อีกส่วนหนึ่งยังคงอยู่ในไขกระดูก เพื่อพัฒนาไปเป็น B-cell(Antibody) เนื่องจาก Ig เป็นโปรตีนซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการทางชีวเคมีทั้งปริมาณและคุณภาพแต่ความสามารถพิเศษของ Ig คือ การทำปฏิกิริยาจับเกาะ อย่างจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจน ซึ่งนำไปสู่ความแข็งแรงที่ยึดระหว่างกันและกัน เรียกว่า “Ab affinity” และพบว่าการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Ab จาก Ag เดิมหลาย ๆ ครั้ง ทำให้ Ab มี affinity สูงขึ้นเนื่องจาก lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวอย่างมากในครั้งแรก ส่วนหนึ่งได้เปลี่ยนแปลงไปเป็น memory cell แล้วถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์และสร้าง Ab ที่มี affinity สูงมากขึ้นในครั้งต่อไป ในกระบวนการพัฒนา B-cell เพื่อให้เกิด antibody-secreting cell และ memory cell พบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวถูกกระตุ้นโดยแอนติเจนเดิมเป็นครั้งที่ 2 หรือ 3 เซลล์จะสามารถสร้าง Ig ที่มี affinity maturation ในรูปแบบของ somatic maturation ที่ v-region ใน memory cell ทำให้ประสิทธิภาพในการจับเกาะกับแอนติเจนเดิมได้ดีขึ้น ได้มีการยืนยันมากมายว่ายีน MHC เป็นยีนหลักที่ใช้ในการควบคุมการต้านทานโรค ไวรัส แบคทีเรีย และปาราสิต โดย MHC จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์ และการ

ต้านทานโรค ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ จากการศึกษายีน MHC ในไก่สามารถยืนยันได้ว่าถูกควบคุมจากยีนต้านทานโรค เช่น โรคมาเร็ก โรคนิวคาสเซิล และโรคหลอดลมอักเสบ เป็นต้น

ยีนของระบบ MHC เป็นแบบ polymorphism นั้นคืออยู่ในลักษณะ “multiple alleles” ในแต่ละตำแหน่งของยีน และยังมีลักษณะเป็น “multiple genes” คือมีหลายยีนร่วมกันแสดงลักษณะ ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านโมเลกุลระดับยีนมาศึกษายีน MHC ของไก่ สามารถจำแนกได้ 3 class ด้วยกันคือ class I II และ IV พบว่าใน class II มีความคล้ายคลึงกันระหว่างไก่และมนุษย์สูงถึง 55-65% แต่ความคล้ายคลึงกันของ class I มีแค่เพียง 35% ซึ่งความคล้ายคลึงกันของ MHC class I และ class II บนโครโมโซมอาจจะพบว่ามีความถี่ในการรวมกันของยีนระหว่าง B-F และ B-L น้อยมาก (Lamont, 1989) จากความคล้ายคลึงกันในส่วนของ MHC class II ระหว่างไก่กับมนุษย์ว่ามีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรค รวมทั้งได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เพราะ MHC class II มีรูปแบบที่ครอบคลุมและมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T helper cell ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยมีรูปแบบของ exon 2 ของ MHC class II gene เป็นส่วนที่เปลี่ยนรหัสเริ่มต้นภายนอกเซลล์ของ บริเวณ antigen binding site (ABS) พบว่ามีการตรวจสอบในส่วนนี้กันอย่างแพร่หลายเพราะมี alleles จำนวนมากมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด จึงเหมาะที่จะใช้เป็นส่วนศึกษาในการจำแนกเบส MHC class II ในไก่ได้ (Rifu et al., 2007) เพื่อให้มองเห็นภาพของยีนในระบบ MHC ในไก่ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงอธิบายลักษณะยีนตามตำแหน่งและหน้าที่การทำงานดังนี้

1. MHC genes ของไก่ที่อยู่บนโครโมโซมในคู่ที่ 16 ซึ่งเป็น microchromosome (Li et al., 1997) กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วยยีนอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง คือ BF BL และ BG ยีนทั้ง 3 ตำแหน่งนี้จะทำหน้าที่ในการผลิต antigen ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ในตำแหน่ง BF จะผลิต antigen class I พบได้ในเนื้อเยื่อทั่วไปและ erythrocytes ส่วน ตำแหน่ง BL จะผลิต antigen class II gene สามารถจำแนกได้จากบนเซลล์ที่เป็น non-lymphoid cell ซึ่งอยู่ที่ Bursa of Frabricius ใน Thymus cell, B-lymphocytes, Activated T-lymphocytes, Macrophages และ Dendritic cells ส่วน BG นั้นจะผลิต antigen classIV พบได้ใน erythrocyte, platelets, intestinal cell และ arguablg lymphocytes (Pink et al., 1977) สำหรับยีน MHC class II นั้น เป็นยีนที่มีหน้าที่ encode โปรตีนที่มีหน้าที่ในการนำ antigen ไปยัง helper T cell เพื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อโรคที่จะเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับระบบการต้านทานโรคในสัตว์ (Chen et al., 1997) การแสดงออกของ MHC antigen เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่า B-complex เป็นตัวควบคุมการทำงาน โดยจะเข้าไปกำหนดระดับซีรัม และ histocompatibility antigen ซึ่งจะเกิดทั้งในส่วนของ B-F และ B-L alleles สาเหตุที่มีความเหมาะสมที่จะบรรจุอยู่ในซีรัมทั้ง anti-F และ anti-G antibodies เพราะพบว่ามีความชัดเจนในระบบภูมิคุ้มกันของไก่จากเซลล์เม็ดเลือดในการผลิตแอนติบอดี โดยสิ่งที่เกิดขึ้นระหว่าง B-L และ B-F ในการรวมและเชื่อมต่อกัน

(linkage) ให้เกิดการคงอยู่ของ B complex antigen ในเม็ดเลือด จึงเป็นไปได้ที่จะมีการสรุปว่าเป็นการ crossing over โดยเกิดขึ้นระหว่างโลกัส B-L, B-F และ B-G sequence ของทั้ง 3 loci ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 โครงสร้างและการทำงานของ MHC ในไก่ (B complex)

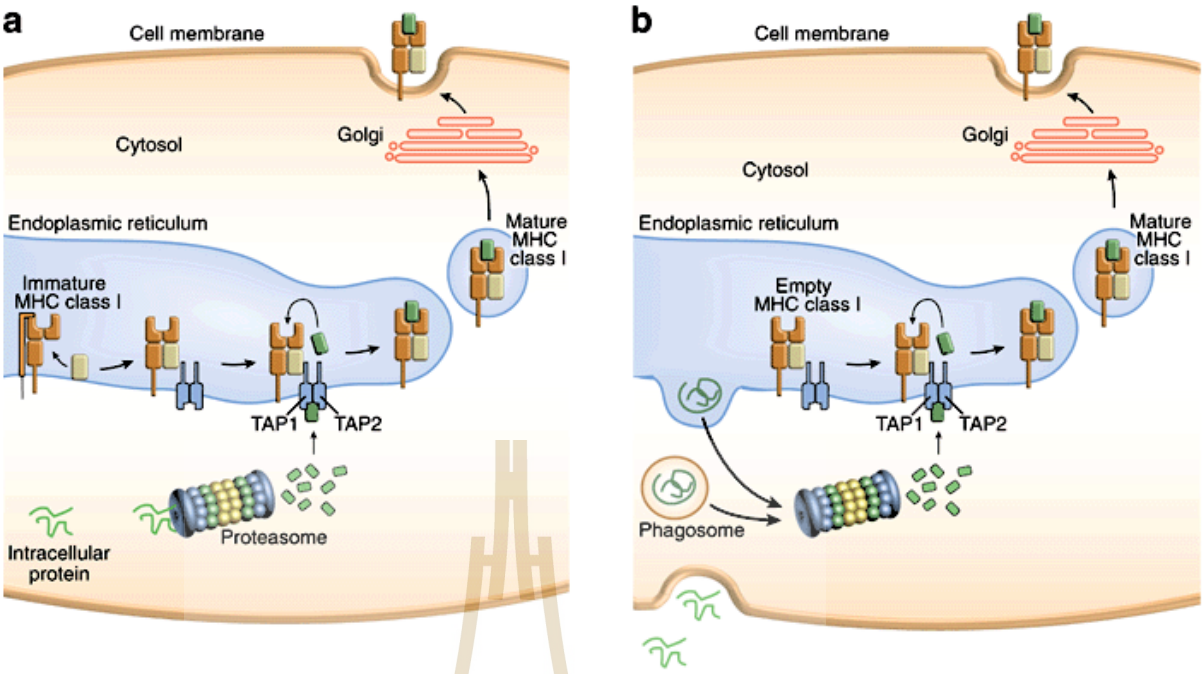
Function	**Regions**		
Region determined by crossing over	**B-L (class II)**	**B-F (class I)**	**B-G (class IV)**
Presence of antigen on RBC	-	+	+
Rejection of allograft	?	+	-
GvH reaction	+	++	-
Immune response	+	?	-
Erythropoiesis	-	-	+
Adjuvant activity	-	-	+

หมายเหตุ : - + ++ คือ การกำหนดระดับความสำคัญ;? คือ ไม่ทราบความสำคัญ

ที่มา : Hala et al. (1981)

เนื่องจากการแสดงออกของโมเลกุล MHC ที่ปรากฏบนผิวของเซลล์ต่างๆ คือตัวกำหนดว่า T-cell จะทำปฏิกิริยาเพื่อเข้าทำลายแอนติเจน พบว่าโมเลกุล CD8 บน T-cyl คือโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับเกาะได้กับโมเลกุล MHC class I ในขณะที่ CD4 บน T-helper จะเกาะได้กับ MHC class II เท่านั้น การควบคุมการแสดงออกของยีน MHC และการสร้างโมเลกุล จึงเป็นขั้นตอนเพื่อทำให้ระบบภูมิคุ้มกันผ่าน T-cell ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การสร้างโมเลกุลของ MHC ถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะเดียวกับการสร้างโปรตีนโดยทั่วไปที่มีการนำส่งออกมาที่พื้นผิวเซลล์ นั้นคือ mRNA จะถูก translated ที่ ribosome ที่เกาะติดกับ endoplasmic reticulum (ER) ทำให้ MHC ที่ถูกสร้างเคลื่อนตัวเข้าสู่ ER เพื่อรวมตัวเข้ากับ N-linked high mannose oligosaccharide หลังจากนั้นจะถูกส่งเข้าไปที่ Golgi เพื่อเปลี่ยน mannose ไปเป็นโมเลกุลที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ในที่สุด MHC ในสภาพของโปรตีนก็จะย้ายตัวเองไปยัง plasma membrane ผ่าน vesicular ต่อไป สรุปได้ดังนี้ (ภาพที่ 2.6a และ 2.6b)



ภาพที่ 2.6 การสร้างโมเลกุล MHC class I และ class II

ที่มา : Abbas et al. (2000)

2.12 การควบคุมการสร้างอิมมูโนโกลบูลินในระดับ Transcription และTranslation

1. การควบคุมในระดับ transcription โดย promoter และ enhancer ในกรณีของ promoter ก็คือ ตำแหน่ง 5' อยู่ติดกับยีนที่ถูก transcribed ซึ่งอยู่หน้า V genes จุดเริ่มต้นการเกิด transcription โดย RNA-polymerase ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบสำคัญของ DNA sequence ในส่วนนี้คือ "conserved octanucleotide" ซึ่งเป็นตำแหน่งของ DNA - binding protein ส่วน enhancer คือ DNA sequence ที่ทำหน้าที่เพิ่มอัตราการเกิด transcription ของ linked gene โดย enhancer มักจะเป็น tissue-specific นั้นคือมีความเฉพาะต่อเนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นพิเศษ ในเรื่องของยีนที่สร้างภูมิคุ้มกัน หรือ อิมมูโนโกลบูลินนั้นเอง

2. อัตราการเกิด turnover ของ mRNA มีผลโดยตรงต่อการ translation และ จำนวนอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ที่สร้างขึ้นมา พบว่า B-cell ที่ถูกกระตุ้นจากแอนติเจนให้เกิดการสร้างอิมมูโนโกลบูลินโดยกระบวนการเติมแต่งอิมมูโนโกลบูลินให้สมบูรณ์ จากการสร้างโมเลกุลของIg เกิดขึ้นที่ไรโบโซม ซึ่งเกาะติดอยู่กับ endoplasmic reticulum (ER) กลายเป็น rough ER เมื่อโมเลกุลสร้างสำเร็จแล้วก็จะตัด peptide ทางด้าน 5' ออกไป การรวมตัวของ heavy chain และ light chain รวมถึง N-linked glycosylation ก็เกิดขึ้นใน ER นี้ทั้งหมด เมื่อตัดแต่งเพิ่งเติมแล้วก็จะถูกนำส่งเข้าที่ Golgi vesiclesเพื่อนำเสนอในรูปของ bound-Ig หรือ secreted-Ig ผ่านกระบวนการ pinocytosis แบบย้อนกลับ

นอกจากนี้การนำเอา J-chain ซึ่งใช้ในการเชื่อม Ig ของ IgA และ IgM เป็น dimer และ pentamer ที่ถูกดำเนินการในระดับ post-translation ด้วย

3. อิมมูโนโกลบูลิน โมเลกุลถูกควบคุมโดยโปรตีนในแต่ละช่วงของการพัฒนาเซลล์ ส่วนประกอบของ Ig ที่ถูกสร้างในไซโทพลาสถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับระดับการพัฒนาของ B-cell อย่างไรก็ตาม B-cell ยังมีโมเลกุลเครื่องหมายบนผิวเซลล์ (surface markers) อีกมากมายสร้างขึ้นมาในแต่ละช่วงการพัฒนาเซลล์เพื่อทำหน้าที่ให้สมบูรณ์ ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่กระตุ้นหรือควบคุมการทำงานของเซลล์ในช่วงการพัฒนาดังกล่าว

การนำเสนอแอนติเจนของ MHC class I และ class II ให้กับ T-cell เนื่องจาก T-cell ทำงานเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมอย่างมรข้อจำกัด กล่าวคือ สิ่งแปลกปลอมนั้นๆจะต้องเป็นโมเลกุล peptide สายสั้นๆ ซึ่งนำเสนอโดยเซลล์ผ่านทางระบบ MHC ดังนั้นเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนเรียกว่า antigen presenting cell (APC) หรือ accessory cells จึงมีหน้าที่ดำเนินการปรับรูปแบบของแอนติเจนให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะนำเสนอให้กับ T-cell พบว่าการนำเสนอดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่สามารถสร้าง MHC class I หรือ class II ซึ่งจะทำการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนให้เข้าไปในเซลล์ 2 รูปแบบ

1. Endogenous synthesis of antigen คือ แอนติเจนที่สร้างจากยีนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปอยู่ภายในเซลล์ เช่น ไวรัส หรือ microbe อื่นๆ ซึ่งถูกนำเสนอผ่านทาง MHC class I ให้กับ T-cyl มีโมเลกุลรับรู้คือ CD8 โปรตีนจากแอนติเจนเหล่านี้จะถูกส่งต่อมาให้ proteasome ซึ่งทำหน้าที่ปรับโครงสร้างให้กลายเป็น peptide สายสั้นและนำเข้าสู่ ER ที่ตำแหน่งนี้เอง α-chain และ β2-microglobulin ถูกสร้างมารวมตัวกัน นำ peptide แอนติเจนออกสู่ภายนอกเซลล์ทาง exocytotic ผ่าน golgi เข้าสู่ vesicle และนำเสนอให้กับ T-cyl (CD8+) ในที่สุด

2. Endocytosis of extracellular antigen คือ แอนติเจนที่เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่อยู่ภายนอกเซลล์ แต่ได้เคลื่อนเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ และถูกตัดแต่งแปลงสภาพให้มีขนาดพอเหมาะที่จะนำเสนอผ่าน MHC class II ให้กับ T-helper ซึ่งมีโมเลกุล CD4 รับรู้ โดยเซลล์ในกลุ่มนี้ค่อนข้างมีจำนวนจำกัดและทำงานเพิ่มจำนวนโดยการตอบสนองจากการกระตุ้นของ cytokine หรือปัจจัยอื่นๆ เพื่อที่จะสร้าง MHC และโมเลกุลอื่น ๆ ออกมาจำนวนมาก ทำให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ APC ในกลุ่มนี้ทำงานแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์

- Mononuclear phagocytes phagocytosis จะทำหน้าที่แปรรูปแอนติเจนจากแบคทีเรียหรือพยาธิต่างๆ โดยตัวของมันเองจะปล่อย IFN-γ ออกมากระตุ้นเซลล์ในกลุ่มเดียวกันทำงานได้อย่างดีขึ้น

- B-lymphocyte เป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูง เพราะมี Ig อยู่บนผิวเซลล์อยู่แล้ว จึงมักทำหน้าที่เป็น APC มีการจับเกาะกับแอนติเจนสูง ทำให้เกิด endocytosis เพื่อเปลี่ยนมาเป็น peptide เพื่อนำเสนอให้กับ T-helper ต่อไป

- Dendritic cell ทำหน้าที่เป็น APC ทางผิวหนังหรือเยื่อบุอวัยวะต่าง

2.13 MHC และยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคต่อการป้องกันโรคในสัตว์ปีก

MHC มีอิทธิพลอย่างมากต่อการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรค (Dorf, 1981) ตัวอย่างของ MHC ในการตอบสนองภูมิคุ้มกันในไก่ประกอบไปด้วยการตอบสนองทางด้านสารน้ำ (Humoral immune response) โดยการใช้สารเคมีในการป้องกันแอนติเจน (Antigen) และส่วนประกอบของแอนติเจนตามธรรมชาติ ในการศึกษาเรื่องนี้เพื่อยืนยันว่ายีน MHC มีอิทธิพลในการต้านทานโรค รวมทั้งภูมิคุ้มกันอัตโนมัติ ไวรัส แบคทีเรีย และปาราสิต จึงสามารถเชื่อมั่นได้ว่าโครโมโซมของ MHC มีความสัมพันธ์ในการต้านทานโรคในไก่ เช่น โรคมาเร็ก โรคนิวคาสเซิล โรคหลอดลมอักเสบ โรค Lymphoid leukosis และ autoimmune thyroiditis เป็นต้น

- B locus ในไก่เป็นส่วนสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย พบว่า MHC ในไก่มีขนาด 92 kb ซึ่ง B locus มี 19 ยีน และ MHC sequence ทั้งหมดพบว่ามีความสำคัญในการใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุวิศวกรรมเพื่อใช้ในการต้านทานเชื้อโรค พบว่า 2 ตำแหน่งของยีน class I และ class II โดยถือว่าส่วนของ B-F/B-L ของ B locus และ Rfp-Y locus ใช้เป็นเครื่องหมายของ MHC

- วิธีการที่นิยม คือ SNP (single nucleotide polymorphism) ด้วยเทคนิค Single Strand Conformation (SSCP) และ PCR-RFLP ซึ่งเทคนิค Single Strand Conformation (SSCP) เป็นการตรวจหาโพลีมอร์ฟีซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอ (point mutation) โดยอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะหรือมี conformation ที่จำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจัดเป็นโครงสร้างขั้นทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอีเล็กโตรโฟรีซิส ในสภาพ non denaturing polyacrylaminde gel ต่างกัน

2.14 ตำแหน่งและหน้าที่ของยีน major histocompatability complex (MHC)

กลุ่มยีน MHC ในไก่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 16 ซึ่งเป็น microchromosome (Li et al., 1997) กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วยยีนอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง คือ BF BL และ BG ยีนทั้ง 3 ตำแหน่งนี้จะทำหน้าที่ในการผลิต antigen ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ในตำแหน่ง BF จะผลิต antigen class I ส่วน ตำแหน่ง BL

และ BG นั้นจะผลิต antigen class II และ IV ตามลำดับ (Pink et al., 1977) สำหรับยีน MHC class II นั้น เป็นยีนที่มีหน้าที่ encode โปรตีนที่มีหน้าที่ในการนำ antigen ไปยัง helper T cell เพื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อโรคที่จะเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับระบบการต้านทานโรคในสัตว์ (Chen et al., 1997)

ยีน MHC class II เป็นยีนหนึ่งที่มีความหลากหลายของรูปแบบ (Haeri et al., 2005; และ Livant et al., 2001) และรูปแบบที่แตกต่างกันนี้ก็มีบทบาทต่อลักษณะความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้แตกต่างกัน (Lamont, 1998) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ จึงทำให้ ยีน MHC class II จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะในการนำมาประยุกต์เป็นเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการบ่งชี้ว่าสัตว์ที่มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่ดี อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ยีนดังกล่าวมีรูปแบบที่หลากหลาย จึงจำเป็นต้องศึกษาว่ารูปแบบใดที่จะมีผลทำให้สัตว์มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคดีที่สุด

2.15 อิทธิพลของยีน MHC ต่อลักษณะความสามารถในการต้านทานโรคและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจอื่นๆ

มีการศึกษาถึงอิทธิพลของยีน MHC class II ที่มีผลต่อความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันโรคอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.6

จากตารางที่ 2.6 จะเห็นได้ว่า มีการศึกษาของ Fariba Izadi Shavakand (2011), Han et al. (2013), Gholamreza et al. (2013), Lwelamira et al. (2008), Liu et al. (2009) และ Li et al. (2012)พบว่า ยีน MHC class II มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรค ยีนนี้มีรูปแบบที่แตกต่างกันไป บางรูปแบบมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่ชัดเจน

นอกจากนั้น จากการศึกษาของ Lwelamira et al. (2008) ได้แสดงให้เห็นว่า ยีน MHC class II บางรูปแบบยังมีผลต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักตัว ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่า ยีนดังกล่าวนอกจากจะมีผลต่อความสามารถในการต้านทานโรคในไก่แล้วยังมีผลต่อการการเจริญเติบโตอีกด้วย จากการศึกษาทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า ยีน MHC class II นั้นเป็นยีนที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาประยุกต์เป็น candidate gene marker ที่ใช้ในการช่วยคัดเลือกลักษณะความสามารถในการต้านทานโรคในไก่พื้นเมืองได้ และยังอาจจะมีผลต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษา อิทธิพลของยีนดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาช่วยบ่งชี้ไก่พื้นเมืองในลักษณะความสามารถในการต้านทานโรค เพื่อใช้ควบคู่ไปกลับการคัดเลือกและปรับปรุงลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตอื่นๆ เช่น ผลผลิตไข่ อัตราการเจริญเติบโตเป็นต้น

ตารางที่ 2.6 สรุปผลการศึกษาอิทธิพลของยีน MHC class II ที่มีต่อความสามารถในการต้านทานโรคและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

References	พันธุ์ไก่/โรค	ผลการศึกษา
Fariba Izadi Shavakand (2011)	ไก่ 8 สายพันธุ์ (n=210) Luhmann Brown Classic (LB) Lohmann White ISL (LB) Agassiz Cross (AC) Silkies (SK) Taiwanese Cross (TC) Yellow Wai-Chau (YW) Shiqi (SQ) Yellow Shiqi (YSQ) (Innat immune system)	ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของ MHC gene (LEI0258) ผล : พบ allele ทั้งหมด 22 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับ innat immune system
Han et al. (2013)	Chinese indigenous chicken (n=1,617) (Genetic resistance)	ศึกษาความหลากหลายจาก microsatellite locus LEI0258 ในไก่พื้นเมือง ผล : พบ allele ทั้งหมด 22 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับ MHC gene
Gholamreza et al. (2013)	Iranian indigenous chicken (n= 242) (Immune responses)	ศึกษาความหลากหลายของ LEI0258 microsatellite ในไก่พื้นเมือง ผล : พบ allele ทั้งหมด 25 ตำแหน่ง มี 8 allele ที่พบในไก่ทั้งสามกลุ่มจากการทดลอง คือ 205 261 295 307 357 369 393 และ 443 bp
Li et al. (2012)	Shandong indigenous chicken (n= 300) (Newcastle Disease)	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภูมิ คุ้มกัน และ MHC B-F gene ในไก่พื้นเมืองของประเทศจีน ผล: พบตำแหน่ง SNPs ทั้งหมด 65 ตำแหน่ง : พบลักษณะภูมิคุ้มกันต่อโรค ND ที่ตำแหน่ง SNPs 48 69 127 149 192 196 220 และ 232 ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.6 สรุปผลการศึกษาอิทธิพลของยีน MHC class II ที่มีต่อความสามารถในการต้านทานโรคและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (ต่อ)

References	พันธุ์ไก่/โรค	ผลการศึกษา
Lwelamira et al. (2008)	Tanzania chicken ecotypes (n= 173) (Newcastle Disease vaccine)	ศึกษาความสัมพันธ์ของ LEI0258 microsatellite alleles กับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนป้องกันโรค ND ผล : พบ allele ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือ 205 215 234 307 321 และ 345 bp : allele 205 และ 307 bp มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนป้องกันโรค ND : allele 307 bp มีความสัมพันธ์กับ BW
Liu et al. (2009)	Chinese Beijing-You และ White Leghorn (n=250) (โรคไข้หวัดนก; AI และนิวคาสเซิล; ND)	ศึกษาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง SNPs ใน exon 2 ของ MHC B-F gene ต่อลักษณะภูมิคุ้มกันโรค ผล : พบตำแหน่ง SNPs ทั้งหมด 55 ตำแหน่ง : SNPs 6 ตำแหน่งที่ loci 69 218 220 221 223 และ 235 มีความสัมพันธ์ภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล : SNPs 3 ตำแหน่งที่ loci214 217 และ 232 มีความสัมพันธ์ภูมิคุ้มกันโรคไข้หวัดนก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง การจัดการอาหาร และข้อมูล

3.1.1 สัตว์ทดลอง ไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวคละเพศจำนวน 153 ตัว (เพศเมีย 83 ตัว และ เพศผู้ 70 ตัว) อายุ 1 วันจนถึง 7 เดือนในสภาพเลี้ยงปล่อย คือ มีโรงเรือนนอนและมีพื้นที่ให้ทำกิจกรรมต่างๆ ให้วัคซีนป้องกันโรคตามโปรแกรมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แสดงในตารางที่ 3.1 และมีการจัดการการให้อาหาร คือ

- ไก่อายุ 0-3 สัปดาห์ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 21%
- ไก่อายุ 4-6 สัปดาห์ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 19 %
- ไก่อายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไป โปรตีนไม่ต่ำกว่า 17 %

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อายุไก่	ชนิดวัคซีน	วิธีการให้วัคซีน
7 วัน	นิวคาสเซิลลาโซตา (เชื้อเป็น) หลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน H120	หยอดตา/หยอดจมูก 1-2 หยด
28 วัน	นิวคาสเซิลลาโซตา (เชื้อเป็น)	หยอดตา 1-2 หยด
5 สัปดาห์	ฝีดาษ/อหิวาต์ไก่	ฉีดกล้ามขา/แทงปีก
8 สัปดาห์	นิวคาสเซิลลาโซตา (เชื้อเป็น) หลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน H120	หยอดตา/หยอดจมูก 1-2 หยด
12 สัปดาห์	นิวคาสเซิลลาโซตา (เชื้อเป็น) หลอดลมอักเสบติดต่อสเตรน H120	หยอดตา/หยอดจมูก 1-2 หยด
หมายเหตุ หลังจากการทำวัคซีน ND, IB+ND, ฝีดาษ และอหิวาต์ สลับกันทุก 8 สัปดาห์ ในไก่พ่อแม่พันธุ์		

ที่มา : โครงการสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.2 ข้อมูล ทำการติดรหัสประจำตัวไก่ เพื่อความสะดวกในการเก็บข้อมูลรายตัว โดยข้อมูลรายตัวที่จะใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีน MHC ได้แก่ ข้อมูลน้ำหนัก ข้อมูลระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลที่อายุ 4 เดือน และ 7 เดือน

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด ใช้วิธีเก็บตัวอย่างเลือด 2 วิธี ดังนี้

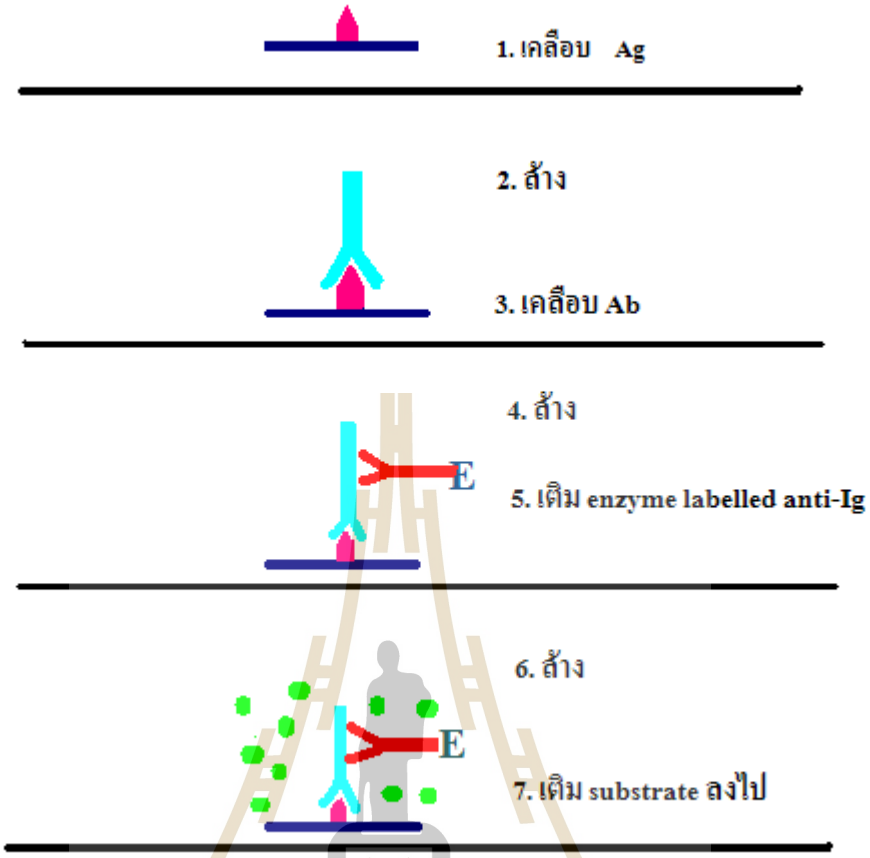
3.2.1 เก็บซีรั่ม เพื่อใช้ตรวจระดับภูมิต้านทานโรคนิวคาสเซิลและตรวจหาค่าชีวเคมี โดยเก็บเลือดใส่หลอดบรรจุ (micro tube) ทิ้งระยะเวลาไว้ให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการดูดเก็บซีรัมที่ได้ใส่ในหลอด micro tube เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาค่าแอนติบอดีต่อ โรคนิวคาสเซิล โดยวิธี ELISA โดยใช้ ELISA Kit (Biochek)

3.2.2 เก็บเลือดสด เพื่อนำไปศึกษาหาค่าทางโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน MHC โดยเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดผสมอยู่ (EDTA) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

3.3 การตรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกัน (Titer)

การวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกัน จากการทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล ด้วยวิธี ELISA (Biochek, 2008) ดังนี้ เป็นวิธีการตรวจหา antibody ต่าง ๆ มีหลักการคือ ให้ antibody ที่ต้องการตรวจทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งทราบชนิดแล้วและติดอยู่บนผิวของ solid phase และใช้ anti-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง การย่อย substrate จะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณ antibody ในสิ่งส่งตรวจ หลักการดังแสดงในภาพที่ 3.1

1. เพลททดสอบ (Test Plate Antigen) ที่ถูกหุ้มด้วย Newcastle Antigen ทำปฏิกิริยากับ Chicken Antibody (Serum) ได้เป็น Antigen-Antibody Complex
2. เติม anti-chicken IgG peroxidase conjugate เพื่อให้ Antigen-Antibody Complex คงอยู่
3. เติมซับสเตท (Chromagen) เกิดการทำปฏิกิริยากับ peroxidase enzyme ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับของแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิล ในซีรัม
4. เติม Stop Solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วอ่านค่าไตเตอร์ด้วย ELISA plate reader ที่ 405-410 nm



ภาพที่ 3.1 หลักการตรวจ Indirect ELISA ในการตรวจหา Newcastle antibody titer

3.4 ค่าโลหิตวิทยา

จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ แข็งแรงของสัตว์ทั่วไปค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hgb %g/dL) เปอร์เซ็นปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hct %ml/dL) ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดง(MCV fL) ค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินในเม็ดเลือด (MCH pg) และ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเม็ดเลือด (MCHC g/dL) โดยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ HYCEL® (บริษัท ไบโอเทคนิคัล, 2547) ด้วยวิธี Impedance โดยเลือดที่ถูกเจือจางแล้วให้ไหลผ่านช่อง Aperture โดยมีกระแสไฟฟ้าคงที่ผ่าน เมื่อเม็ดเลือดไหลผ่านช่อง Aperture จะทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าและเครื่องจะนำสัญญาณที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์และแสดงผลเป็นจำนวนนับและขนาดของเม็ดเลือดแดง

ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (Total RBC no.cells×10^6/mL) และปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total WBC no. cells×10^3/mL) ตรวจหาโดยวิธีการนับเม็ดเลือดด้วย Hemocytometer (Campbell 1995, Pierson 2000)

เครื่องวัดเลือดอัตโนมัติ HYCEL

HYCLE เป็นเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดชนิดอัตโนมัติ รายงานผลได้ 18 พารามิเตอร์ เป็นการตรวจนับเม็ดเลือดด้วยวิธี IMPEDANCE โดยนำเลือดที่ถูกเจือจางแล้วให้ไหลผ่านช่อง APERTURE (ขนาด 80 μ สำหรับ WBC และ 60 μ สำหรับ RBC) โดยมีกระแสไฟฟ้าคงที่ผ่าน เมื่อเม็ดเลือดไหลผ่านช่อง APERTURE จะทำให้เกิดสัญญาณทางไฟฟ้าและเครื่องจะนำสัญญาณที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์และแสดงผลเป็นจำนวนนับและขนาดของทั้งเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง

หลักการเจือจาง (Dilution)

เครื่องดูดเลือดตัวอย่างประมาณ 32 μl แล้ว เลือดส่วนเกินที่อยู่ภายในและภายนอกเข็มจะถูกล้างออกด้วย Diluent บน Sink Cuvetle ต่อจากนั้นจึงทำการเจือจางเลือดดังกล่าวดังนี้

- การเจือจางครั้งแรก : ใช้ Diluent 7 ml. เจือจางกับเลือดในอัตราส่วน 1:220
- การเจือจางครั้งที่ 2 : ใช้เลือดที่เจือจางครั้งแรกปริมาตร 49.8 μl เจือจางด้วย Diluent 8 ml. ในอัตราส่วน 1 : 160
- สำหรับการนับเม็ดเลือดขาว (WBC) และวัดฮีโมโกลบิน จะใช้เลือดที่ถูกเจือจางครั้งแรกผสมกับน้ำยา Lysing 8 ml. ใน WBC Counting Chamber ในอัตราส่วน 1 : 250
- การเจือจางครั้งสุดท้าย : สำหรับการนับเม็ดเลือดแดง (RBC) และเกร็ดเลือด (Plt) จะใช้เลือดที่ถูกเจือจางครั้งที่ 2 มาเจือจางใน RBC Counting Chamber ในอัตราส่วน 1 : 35,200
- เมื่อเครื่องเสร็จสิ้นกระบวนการทำ Dilution แล้วจะนำ Diluent มาเติมใน Dilution Cuvette ไว้

หลักการนับ (Counts)

การนับจำนวนเม็ดเลือด เครื่องจะดำเนินการเป็น 2 ช่วง ในแต่ละช่วงเครื่องจะนับ Dilution จาก WBC Chamber เพื่อนับเม็ดเลือดขาวเป็นปริมาตรทั้งหมด 180 μl และในเวลาเดียวกันก็จะนับเม็ดเลือดแดงจาก Dilution จาก RBC Chamber เป็นปริมาตร 100 μl ในแต่ละช่วงการนับเครื่องยังใช้การนับโดยการสุ่มตัวอย่างครั้งละ 2 วินาที ดังนั้นในแต่ละช่วงของการนับ เครื่องจะสุ่มนับได้ช่วงละ 4 ครั้ง เมื่อครบ 2 ช่วง จะเป็นการสุ่มนับทั้งหมด 8 ครั้ง โดยเครื่องจะใช้ผลจากการสุ่มนับทุกครั้งมาคำนวณทางสถิติเพื่อหาความเบี่ยงเบนในการนับ ในกรณีที่เวลาของการนับทั้งสองช่วง รวมกันแล้วเกินกว่าเวลามาตรฐานเครื่อง เครื่องจะทำการ Backflush เพื่อทำความสะอาด Aperture โดยอัตโนมัติ หลังจากเครื่องเสร็จสิ้นกระบวนการแล้วจะรายงานผลทางจอภาพ

ตารางที่ 3.2 รายงานผลการตรวจเม็ดเลือด

Parameter	Abbreiation	Traditional Units
White Blood cell	WBC	x 10^3 / mm^3
Lymphocytes	Lym	x 10^3 / mm^3
Middle cell size	Mid	x 10^3 / mm^3
Granulocytes	Grn	x 10^3 / mm^3
Red Blood cell	RBC	x 10^3 / mm^3
Hemoglobin	HGB	g/dl
Mean Corpuscular volume	MCV	fL
Red Distribution width	RDW	%
Platelets	PLT	x 10^3 / mm^3
Mean Platelet volume	MPV	fL
Platelet Distribution width	PDW	%
Lymphocytes	Lym	%
Middle cell size	Mid	%
Granulocytes	Grn	%
Hematocrit	HCT	%
Plateletcrit	PCT	%
Mean Corpuscular hemoglobin	MCH	Pg
Mean Corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	g/dl

3.5 ค่าชีวเคมีเลือด

การวัดค่ากลูโคส (mg/dL) คอเลสเตอร์รอล (mg/dL) อะมัยเลส(U/L, µl in 1 minute/L) และค่ายูริคแอซิด (mg/dL) ใช้เครื่อง Reflotron® ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดแบบ Dry-Chemistry (พิทัย กาญบุตร, 2544)

เครื่องตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด Reflotron®

Reflotron® เป็นเครื่องสำหรับตรวจวัดระดับสารชีวเคมีในเลือดที่ผลิตโดยบริษัท Boehringer mannheim, Germany เป็นเครื่อง กึ่งอัตโนมัติ (semi-automated) ชนิดน้ำยาแห้ง (dry-chemistry system) กล่าวคือไม่ใช้น้ำยาเคมีเหลว (liquid reagent) ในการตรวจวัดและอาศัยหลักการสะท้อนและ

ดูดกลืนแสงของสาร (light reflection and absorption) เครื่อง Reflotron® สามารถตรวจวัดระดับสารชีวเคมีได้ในตัวอย่างทั้งที่เป็นเลือดรวม (whole blood) ซีรัมและพลาสมานอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดในปัสสาวะได้ด้วยส่วนหลักในการทำงานของเครื่องที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบเป็นแบบ **Reaction part (Reagent carrier strip)**เป็นแถบพลาสติกที่ประกอบด้วยแผ่นบรรจุน้ำยาแห้ง (dry reagents) ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารเคมีเฉพาะในตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดโดยแถบหนึ่งๆจะใช้กับการทดสอบเดียวและเป็นแถบเฉพาะสำหรับสารที่ต้องการตรวจวัดแต่ละชนิดแยกกันแถบน้ำยานี้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วน

1. Plasma separating layer เป็นส่วนที่ทำด้วยวัสดุใยแก้ว ทำหน้าที่กรองเอาเม็ดเลือดออกไว้แล้วปล่อยให้ส่วนพลาสมาผ่านแล้วไหลไปเก็บในส่วน plasma reservoir ต่อไปในส่วนนี้อาจมีแผ่นสารเคมีเสริมพิเศษ (auxiliary reagents) บางชนิดด้วยแล้วแต่ชนิดการตรวจวัด

2. Plasma reservoir เป็นส่วนที่ทำด้วยวัสดุใยแก้วเช่นกันทำหน้าเก็บกักพลาสมาที่ผ่านการกรองแล้วไว้เพื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยาแห้งต่อไป

3. Reagent layer(s) เป็นส่วนที่บรรจุน้ำยาแห้งที่จะใช้ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ต้องการตรวจวัดในพลาสมาในส่วนนี้ยังประกอบด้วยสารที่เป็น indicator ซึ่งเป็นตัวสำคัญที่จะถูกทำให้เปลี่ยนเป็นสารสีโดยผลผลิตของปฏิกิริยาที่ตรวจวัดระหว่างน้ำยาแห้งกับสารที่ต้องการวัดส่วนนี้อาจประกอบด้วยแผ่นน้ำยาแห้งหลายแผ่นขึ้นกับชนิดการตรวจวัด

4. Magnetic tape เป็นแถบแม่เหล็กที่บรรจุด้วยข้อมูลและรหัสคำสั่งต่างๆที่ใช้กับเครื่องและจำเป็นในการตรวจวัดและประมวลผลการตรวจวัดได้แก่

- รหัสบอกชนิดของการตรวจวัด
- ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตรวจวัด
- ความยาวคลื่นของแสงที่ใช้ในการตรวจวัด
- factor ที่ใช้ในการคำนวณเพื่อเปลี่ยนหน่วยการตรวจวัดระหว่าง SI unit กับ conventional unit

หลักการตรวจวัด

เมื่อหยดเลือดรวมลงบนส่วน plasma separating mat ของแถบน้ำยาแห้งแล้วเฉพาะส่วนพลาสมาเท่านั้นจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองใยแก้วลงไปเก็บกักไว้ในส่วน plasma reservoir เพื่อรอการทดสอบต่อไปเมื่อใส่แถบน้ำยานั้นเข้าไปในเครื่องส่วน measuring chamber เครื่องจะเริ่มอ่านข้อมูลจำเพาะของการทดสอบและคำสั่งอื่นๆจากแถบแม่เหล็กด้านล่างของแถบน้ำยาแห้งแล้วเริ่มทำงานตามลำดับกล่าวคือส่วน reagent layer จะถูกกดให้ทับลงบนส่วน plasma reservoir เพื่อให้น้ำยาแห้งทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวัดในพลาสมาหลังการเกิดปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตเป็นสารที่สามารถเปลี่ยน indicator จากสารที่ไม่มีสีเป็นสารที่มีสี (dye complex) ทั้งนี้ปริมาณ หรือความ

เข้มข้นของสารที่ตรวจวัดได้จะแปรตามความเข้มของสารสีที่เกิดขึ้นเมื่อครบเวลาที่ตรวจวัดแล้วส่วน detection parts จะเริ่มทำงานโดย LED จะให้แสงตามความยาวคลื่นแสงที่จำเพาะกับการทดสอบออกมากระจายอยู่ในส่วน ulbricht sphere ที่มีผิวด้านในฉาบเป็นมันวาวสะท้อนแสงได้ดีโดยที่แสงส่วนหนึ่งจะสะท้อนไปตกกระทบบน reference detector (Dn) โดยตรงซึ่งจะวัดความเข้มแสงที่ตกกระทบเป็น I0 และมีค่าความเข้มเท่ากับแสงที่เปล่งออกจาก LED ส่วน measuring detector (D) จะทำหน้าที่วัดความเข้มของแสงที่สะท้อนกลับมาจากส่วน test area ซึ่งอยู่ด้านล่างของ Ulbricht sphere โดยวัดค่าความเข้มของแสงเป็น I ซึ่งค่า I นี้จะมีค่าน้อยกว่า I0 เสมอเนื่องจากสารสีที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีบนบริเวณ test area จะสามารถดูดกลืนแสงบางส่วนไว้ได้ก่อนที่จะสะท้อนแสงกลับออกไปตกบน measuring detector ขณะเดียวกันเครื่องก็จะคำนวณค่าreflectance; R ของสีที่เกิดขึ้นจากอัตราส่วนของ I และ I0 จากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายเครื่องจะคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดได้

3.6 การสกัดดีเอ็นเอ

3.6.1 Red Blood cell lysis

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเลือดโดยใช้น้ำยาสกัดสำเร็จรูป (Genomic DNA Mini Kit) โดยนำตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอด EDTA tube ใช้ปริมาตร 150 µl ใส่ในหลอด micro centrifuge tube เติม 600 µl ของ Lysis Buffer ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 7 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ใช้ Micropipette ดึงของเหลวส่วนบนทิ้งไป เติม 100 µl ของ Lysis Buffer อีกครั้งหนึ่ง นำไป vortexให้ตะกอนแตกตัวจนหมด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ3,000 rpm 5 นาทีเทส่วนใส่ทิ้ง

3.6.2 Cell Lysis

เติม Proteinase K 20 µl นำไป vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม GB buffer 200 µl นำไป vortex ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60ºc เป็นเวลา 15 นาที (เตรียม Elution buffer 100 µl ต่อตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ 60ºc)

3.6.3 DNA Binding

เติม Ethanol 96-100% 250 µl นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที เตรียม GD colume collection tube นำสารผสมในหลอดตัวอย่างใส่ลงไปใน GD colume collection tube ปิดฝาให้สนิท นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวส่วนล่างออก

3.6.4 Wash

เติม W1 buffer ปริมาณ 400 µl นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง เติม Wash buffer 600 µl นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลว

ด้านล่างทิ้ง นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ให้ GD colume collection tube แห้ง จากนั้นย้าย GD colume collection tube มาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 µl อันใหม่ เติม 100 µl Elition buffer ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน GD colume collection tube ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดึงส่วนใส่ที่เป็น DNA ใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่ นำ DNA ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ

3.7 การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็น โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดโดยในที่นี้เราจะใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder โดยใช้ DNA จากจำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 1 ไมโครลิตร ใช้ 1% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกดีเอ็นเอ ใน 2% TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย EtBr 0.5 µg/ml ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างสีของ EtBr ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ gel ไปส่องด้วย UV-Source เพื่อดูแถบ DNA ใน gel

3.8 การศึกษารูปแบบของยีน MHC class II

ศึกษารูปแบบของยีน MHC class II ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ คือ

3.8.1 primer microsatellite LEI0258 (Boonyanuwat et al., 2006, Fulton et al., 2006, Lwelamira et al., 2008 และ Suzuki et al., 2010)

LEI0258 forward and reverse primers (5′-CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG-3′) และ (5′ -AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC- 3′)

3.8.2 MHC class II exon 2 (Boonyanuwat et al., 2006 และ Liu et al., 2009)

BLβI exon 2 PCR forward and reverse primers (5′ -GTGCCCGCAGCGTTCTTC- 3′) และ (5′ -TCCTCTGCACCGTGAAGG- 3′)

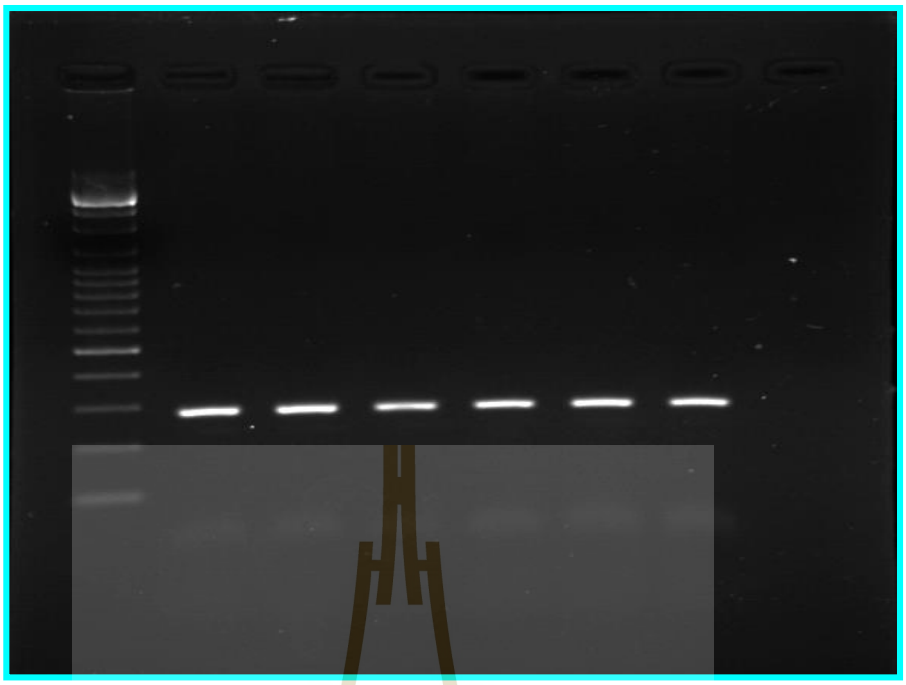
ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบยีนด้วยการทำ sequencing ในส่วนของ BLβI exon 2 PCR sequencing ที่ได้นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างในส่วน exon 2 หาความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีไตเตอร์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันกับ SNPs alleles วิเคราะห์ด้วย ANOVA ทดสอบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of variance และตัวสถิติ F ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Release 10) (SPSS, Inc., Chicago, IL)

3.9 วิเคราะห์ตัวอย่าง DNA จากวิธี PCR โดยใช้ Primer microsatellite LEI0258

ศึกษารูปแบบของยีน MHC class II ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer microsatellite LEI0258
(5′-CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG- 3′) และ (5′ -AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC- 3′) โดยวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 25 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 71°C 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72°C 2 นาที และจบด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C 10 นาที (Juul-Madsen et al., 2006) PCR ที่ได้มีขนาด 205 bp และทำการการตรวจสอบ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดโดยในที่นี้จะใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder โดยใช้ DNA จากวิธี PCR จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 1 ไมโครลิตร ใช้ 2% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกดีเอ็นเอ ใน 1% TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide 0.5 µg/ml ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างสีส่วนเกินของ Ethidium bromide (EtBr) ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ gel ไปส่องด้วย UV-Source โดยใช้เครื่อง Genedoc เพื่อดูแถบ PCR produce ใน gel มีขนาด 205 bp

3.10 การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน MHC class II จากวิธี PCR โดย agarose gel electrophoresis

PCR ที่ได้มีขนาด 275 bp และทำการการตรวจสอบ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดโดยในที่นี้เราจะใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder โดยใช้ DNA จากวิธี PCR จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 1 ไมโครลิตร ใช้ 2% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกดีเอ็นเอ ใน 1% TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide 0.5 µg/ml ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างสีของ Ethidium bromide (EtBr) ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ gel ไปส่องด้วย UV-Source โดยใช้เครื่อง Genedoc เพื่อดูแถบ PCR produce ใน gel มีขนาด 275 bp ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขนาด PCR product BLB exon2, 275 bp

3.11 การศึกษา SNP ของยีน MHC class II ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

การศึกษาความหลากหลายจีโนไทป์ของยีน MHC class II ในกลุ่มตัวอย่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว 153 ตัว โดยวิธี PCR (Qian et al. 2008) และ นำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ (DNA Technology Laboratory) และส่งตรวจหาลำดับเบส (1st BASE) ทุกตัวอย่าง แล้วหาความแตกต่างของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST2.2.22 (National Center for Biotechnology Information) BLAST หรือ Basic Local Alignment Search Tool โดยในการทำวิจัยนี้ใช้ blastn สำหรับค้นหาข้อมูลของ nucleotide จากฐานข้อมูล โดยเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสมาตรฐาน (Gene Bank accession NM-001044679.1) ใช้ข้อมูลของ nucleotide ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไปเพื่อศึกษา polymorphism ของ single nucleotide polymorphisms โดยได้เลือกตัวอย่างที่มีค่า Similarity ตั้งแต่ 85% ขึ้นไปกับลำดับเบสมาตรฐาน แล้วหาความถี่ของจีโนไทป์ ใน SNPs ตำแหน่งต่าง ๆ โดยเริ่มจากผลการวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม BLAST2.2.22 ที่เปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสมาตรฐาน (Gene Bank accession EU591737) กับลำดับเบสของตัวอย่าง แล้วจัดรูปแบบให้เหมือนกับผลการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสมาตรฐาน กับลำดับเบสของตัวอย่างให้อยู่รูปของไฟล์ Fasta นำเข้าโปรแกรม Clustal W2 เพื่อหาตำแหน่งของ SNPs ทำการ code sequence แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีน MHC class II ต่อค่าไตเตอร์ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ก่อนที่จะมีการทำ Multiple alignment เพื่อดูตำแหน่ง SNPs เนื่องจากการส่งตรวจ PCR produce sequence แบบสองสายทั้ง Forward และ Reverse primers ต้องมีการเชื่อมต่อ sequence ทั้งสองสาย ดังขั้นตอนนี้

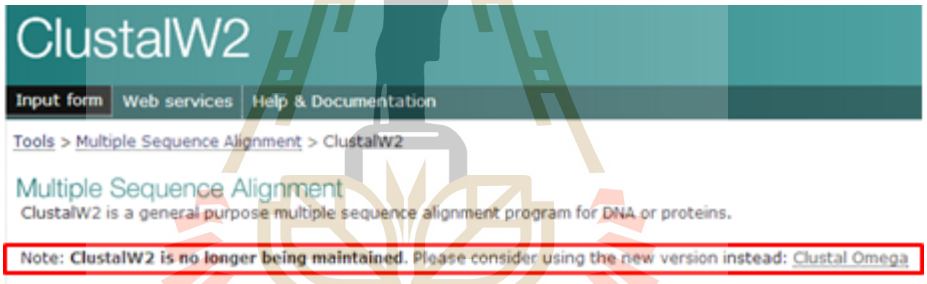
- Edit sequence โดยการตัด N (Noncoding) ลำดับดีเอ็นเอนี้อาจบรรจุข้อมูล ดีเอ็นเอขยะ (junk DNA) ของทั้งเส้น Forward และ Reverse primers ออก

- ทำการ BLAST เส้น Forward DNA sequence และ Reverse DNA sequence ที่ทำ complement แล้ว โดยเลือกเส้นหลักที่มี Similarity สูงที่สุด

- ทำ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W2 เพื่อหาตำแหน่งของ SNPs

ขั้นตอนการทำ Clustal W2 คือ

Step 1 เข้าไปที่โปรแกรม Clustal W2 เลือก DNA sequences แล้ว คัดลอก fasta fine sequence ไปวางไว้



Step 2 กด Submit รอผล

Step 3 กด result summary

Step 4 กด Start JalView ทำ Multiple alignment ดูตำแหน่ง SNPs

```
1st_BASE_689626_L136_BLBR          GTGGGGAAATTTGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 169
1st_BASE_695734_L19_BLBR.ab1       GTGGGGAAATTTGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCG-GCAAG----- 167
1st_BASE_664412_L137_BLBF          GTGGGGAAATTTGTGGCTGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 170
1st_BASE_695770_L74_BLBR           GTGGGGAAATTTGTGGCTGATACACC-GCTGGGTGAGCG-TCAAG----- 170
1st_BASE_664372_L87_BLBR.ab1       GTGGGGAAACTCGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 165
1st_BASE_689619_L119_BLBR.ab1      GTGGGGAAATTTGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 165
1st_BASE_695730_L10_BLBR           GTGGGGAAATACGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-TCAAG----- 164
1st_BASE_695785_L96_BLBR           GTGGGGAAATACGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-TCAAG----- 169
1st_BASE_664304_L11_BLBR.ab1       GTGGGGAAATATGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCG-GCAGG----- 169
1st_BASE_695738_L23_BLBR           GTGGGGAAATTTGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 169
1st_BASE_689645_L165_BLBR.ab1      GTGGGGAAATACGTGGCCGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 169
gi|113206149|ref|NM_001044679.     GTGGGGAAATACGTGGCTGATACACC-GCTGGGTGAGCC-GCAAG----- 192
1st_BASE_664408_L133_BLBF          CTGTCGAAGTGCGCG-----TACTCCTGCCGGTTG------TAGA----- 174
                                    **  ***    * *     * * ** ** ** **       *
```

- ทำการ code sequence ตรงตำแหน่งที่คาดว่าเป็นตำแหน่ง SNPs

3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.12.1 ข้อมูลค่าทางโลหิตวิทยา และชีวเคมีเลือด

ที่ตรวจได้ แยกตามเพศและอายุที่ 4 และ 7 เดือน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS หาค่าเฉลี่ย ± Standard Error ของค่าแต่ละค่าแยกตามเพศและอายุ วิเคราะห์นัยสำคัญของอิทธิพลเนื่องจากเพศที่ต่างกันและอายุที่ต่างกัน ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ขึ้นไป วิเคราะห์หาความถี่ของ SNPs ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดย SNPs ใด มีความถี่ต่ำกว่า 3% ในกลุ่มตัวอย่างจะไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ในขั้นตอนต่อไป

3.12.2 อิทธิพลของยีน MHC class II ต่อการเจริญเติบโตและค่าไตเตอร์ โลหิตวิทยาในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเมื่ออายุ 4 และ 7 เดือน

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน MHC class II ต่อ น้ำหนักตัวไก่ที่อายุต่างๆ ตามที่ระบุข้างต้น และค่าไตเตอร์ ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเมื่ออายุ 4 และ 7 เดือน ด้วยตัวแบบ general linear model ประมาณค่าอิทธิพลของ SNPs ด้วยวิธี Ordinary least square โดยมีตัวแบบดังนี้

$$y = X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \varepsilon$$

โดย y คือ ค่าสังเกตสำหรับลักษณะที่ทำการศึกษาซึ่งได้แก่ ค่าน้ำหนักตัวไก่ที่อายุต่างๆ ค่าไตเตอร์เมื่ออายุ 4 และ 7 เดือน (ที่ทำการแปลงข้อมูลด้วย log เรียบร้อยแล้ว) β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ เพศ β_2 เป็นอิทธิพลเนื่องจาก genotype ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ X_1 X_2 คือ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ และแสดงการปรากฏของรูปแบบ genotype ในแต่ละค่าสังเกต (โดยเลือก genotype ที่มีความถี่มากกว่า 0.05) ตามลำดับ

ทดสอบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of variance และตัวสถิติ F ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Release 10) (SPSS, Inc., Chicago, IL)

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว เพื่อหาค่าเฉลี่ยเบื้องต้นของค่าทางโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีเลือด เพื่อช่วยประเมินสุขภาพไก่พื้นเมืองเบื้องต้นได้ ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล และศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน MHC กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว โดยจะทำการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน MHC class II และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของจีโนไทป์ของยีน MHC class II และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานโรค เพื่อจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์ไก่ที่มีความสามารถในการสร้างภูมิคันโรคที่ดีในไก่พื้นเมือง

4.1 ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในไก่พื้นเมืองไทย

ค่าทางโลหิตวิทยาในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวอายุ 4 และ 7 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 มีค่าทางโลหิตวิทยาเฉลี่ยแยกตามเพศ และค่าต่ำสุด สูงสุดแสดงในตาราง โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่พบว่าค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCV) ที่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้เพศเมียอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.001$) ปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่เพศผู้ที่มีแนวโน้มมากกว่าของไก่เพศเมีย ค่า MCV ในไก่พื้นเมืองมีค่าค่อนข้างสูง สามารถใช้วิเคราะห์ผลต่อสุขภาพไก่ได้ ถ้าค่า MCV น้อยกว่าค่าปกติ (เซลล์เม็ดเลือดแดงเล็ก) อาจเกิดโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก หรือความผิดปกติของเม็ดเลือด หรือค่า MCV มากกว่าปกติ (เซลล์เม็ดเลือดใหญ่) อาจเกิดมาจากความผิดปกติเกี่ยวกับตับ แต่ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่พบแนวโน้มความแตกต่างของค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่เพศผู้มากกว่าของไก่เพศเมีย แต่ยังอยู่ในช่วงค่ามาตรฐานของไก่พื้นเมืองเช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Suchint et al. (2004) และ Jain (1993) ที่ช่วง 126-163 และ 90-140 ตามลำดับ ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน

ตารางที่ 4.1 ค่าทางโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 4 เดือนเพศผู้และเพศเมีย

ค่าทางโลหิตวิทยา	เพศผู้ (n70)		เพศเมีย (n83)		P-value	รวม(n153)	
	MEAN±SE	RANGE	MEAN±SE	RANGE		MEAN±SE	RANGE
RBC	4.20±0.84	1.6-3.0	4.09±0.76	1.4-3.2	-	4.15±0.80	1.4-3.2
HCT	30.46±0.61	21.0-38.0	31.83±0.55	21.1-40.1	-	31.15±0.58	21.0-40.1
HGB	10.98±0.21	7.6-14.1	11.34±0.19	8.0-13.8	-	11.16±0.20	7.6-14.1
MCV	126.80±0.51 ***	118.3-137	123.30±0.46	115.9-146.5	≤0.001	125.05±0.49	115.9-146.5
MCH	45.78±0.42	39.2-52.1	44.21±0.37	38.9-59.1	-	45.00±0.40	38.9-59.1
MCHC	35.70±0.42	33.0-41.3	35.83±0.38	32.0-40.0	-	35.77±0.40	32.0-41.3
WBC	13.07±0.60	6.6-20.4	14.19±0.53	6.5-24.9	-	13.63±0.57	6.5-24.9
Lymphocyte	69.32±0.70	54.0-83.0	68.82±0.64	38.0-81.0	-	69.07±0.67	38.0-83.0
Heterophil	28.17±0.67	14.0-44.0	28.31±0.61	16.0-39.0	-	28.24±0.64	14.0-44.0
Monocyte	2.47±0.17	1.0-6.0	2.54±0.16	1.0-5.0	-	2.51±0.17	1.0-6.0
H : L ratio	0.42±0.01	0.17-0.82	0.24±0.01	0.20-0.74	-	0.42±0.01	0.17-0.82

หมายเหตุ : *** นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.001

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ค่าทางโลหิตวิทยาของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 7 เดือนเพศผู้และเพศเมีย

ค่าทางโลหิตวิทยา	เพศผู้ (n56)		เพศเมีย (n67)		P-value	รวม(n123)	
	MEAN±SE	RANGE	MEAN±SE	RANGE		MEAN±SE	RANGE
RBC	2.84±0.10	2.1-3.4	2.72±0.09	1.5-4.2	-	2.78±0.10	1.5-4.2
WBC	18.08±1.46	8.6-37.9	16.23±1.29	5.8-37.0	-	17.16±1.38	5.8-37.9
HCT	36.38±1.29	26.9-44.6	34.07±1.14	22.3-51.8	-	35.23±1.22	22.3-51.8
HGB	13.24±0.53	12.1-17.0	12.73±0.47	7.4-18.8	-	12.99±0.50	7.4-18.8
MCV	126.40±18.08	112.5-136.0	144.10±16.04	110.2-136.0	-	135.25±17.6	110.2-136.0
MCH	45.70±1.16	36.9-51.9	44.61±1.03	33.0-48.1	-	45.16±1.10	33.0-51.9
MCHC	36.25±0.81	32.0-43.0	36.11±0.72	29.9-41.7	-	36.18±0.77	29.9-43.0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ค่าชีวเคมีเลือดของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 4 เดือนเพศผู้และเพศเมีย

ค่าชีวเคมีเลือด	เพศผู้ (n70)		เพศเมีย (n83)		P-value	รวม(n153)	
	Mean±SE	Range	Mean±SE	Range		Mean±SE	Range
Glucose	201.30±5.05	98-295	194.92±4.53	106-289	-	198.11±4.79	98-295
Chol	137.80±4.55*	100-218	151.30±4.08*	100-277	≤0.05	144.55±4.32	100-277
Amylase	474.20±22.13	150-800	476.50±19.85	160-962	-	475.35±20.99	150-962
Uric acid	6.57±1.30	2.8-9.7	7.38±1.17	2.0-9.9	-	6.98±1.24	2.0-9.9

ตารางที่ 4.4 ค่าชีวเคมีเลือดของไก่พื้นเมืองไทยอายุ 7 เดือนเพศผู้และเพศเมีย

ค่าชีวเคมีเลือด	เพศผู้(n56)		เพศเมีย(n67)		P-value	รวม(n123)	
	Mean±SE	Range	Mean±SE	Range		Mean±SE	Range
Glucose	108.62±9.30	31-205	107.92±8.25	31-208	-	108.29±8.78	31-208
Chol	114.90±7.60**	100-249	147.40±6.74**	100-315	≤0.01	131.15±7.17	100-315
Amylase	339.20±25.81**	154-807	430.40±22.91**	187-788	≤0.01	384.80±24.36	154-807
Uric acid	5.37±0.25	2.6-8.7	5.01±0.22	2.7-9.0	-	5.19±0.24	2.6-9.0

หมายเหตุ : * นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.05 ** นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.01

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ค่าชีวเคมีเลือดในไก่พื้นเมืองไทย

ไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน มีค่าชีวเคมีเลือดเฉลี่ยแยกตามเพศ และค่าต่ำสุด สูงสุดแสดงในตารางที่ 4.3 โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ยกเว้นปริมาณ CHOLESTEROL ที่พบว่าไก่เพศผู้ต่ำกว่าเพศเมีย ($P \leq 0.05$) เนื่องจากไก่เพศผู้มักมีกิจกรรมที่ใช้ร่างกายสูง รวมทั้งความต้องการพลังงานสูงในการดำรงชีวิต

ไก่พื้นเมืองไทยอายุ 7 เดือนมีค่าชีวเคมีเลือดเฉลี่ยแยกตามเพศ และค่าต่ำสุด สูงสุดแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณ CHOLESTEROL และ AMYLASE ของไก่เพศเมียมากกว่าของเพศผู้ ($P \leq 0.001$)

ศึกษาเพื่อหาค่าเฉลี่ยเบื้องต้นของค่าโลหิตวิทยา และ ชีวเคมีเลือด แยกเพศ ที่อายุ 4 และ 7 เดือน ผลจากการศึกษา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประมาณช่วงของค่าเฉลี่ยในการศึกษาค่าโลหิตวิทยาดังนี้คือ ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย ความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิล เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และอัตราส่วนระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิลต่อเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ มีค่าเท่ากับ 1.4-3.2×10^6 cells/ml 7.6-14.1 %g/dL 21.0-40.1 %ml/dL 115.9-146.5 fl 38.9-59.1 pg 32.0-41.3 %g/dL 6.5-24.9 ×10^3 cells/ml 38.0-83.0 % 14.0-44.0 % 1.0-6.0 % และ 0.17-0.82 % ตามลำดับ ค่ากลูโคส โคเรสเตอรอล อะมัยเลส และกรดยูริกในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน มีช่วงของค่าเท่ากับ 98-295 mmol/l 100-277 mg/dL 150-962 mg/dL และ 2.0-9.9 mg/dL ไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน มีช่วงของค่าค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย ความเข้มข้นฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเฉลี่ย ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 1.5-4.2×10^6 cells/ml 7.4-18.8 %g/dL 22.3-51.8 %ml/dL 110.2-136.0 fl, 33.0-51.9 pg 29.9-43.0 %g/dL และ 5.8-37.9×10^3 cells/ml ตามลำดับ ค่ากลูโคส โคเรสเตอรอล อะมัยเลส และกรดยูริก มีช่วงของค่าเท่ากับ 31-208 mmol/l 100-315 mg/dL 154-807 mg/dL และ 2.6-9.0 mg/dL

อภิปรายผลการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวกับไก่สายพันธุ์ต่างๆ

พบว่าค่าที่ได้มีค่าเฉลี่ยของค่าโลหิตวิทยาที่แตกต่างกัน แต่ก็ยังอยู่ในช่วงเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน เนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม และอาหารที่ได้รับในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์ต่างๆ ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.5 โลหิตวิทยาเปรียบเทียบ (mean ± SE) ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่ชนพันธุ์ไทยและไก่ชนพันธุ์เวียดนาม

ค่าโลหิตวิทยา	ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว				ไก่ชนพื้นเมืองไทย[a]		ไก่ชนเวียดนาม[a]	
	4 เดือน		7 เดือน		เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
	เพศผู้ (n=70)	เพศเมีย (83)	เพศผู้ (n=56)	เพศผู้ (n=67)	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=15)
RBC	4.20±0.84	4.09±0.76	2.84±0.10	2.72±0.09	2.99±0.16	3.16±0.12	**2.79±0.14***	**2.04±0.10***
HCT	30.46±0.61	31.83±0.55	36.38±1.29	34.07±1.14	**40.10±1.10***	**35.70±0.70***	**38.90±1.00***	**29.70±0.90***
HGB	10.98±0.21	11.34±0.19	13.24±0.53	12.73±0.47	**12.90±0.40***	**11.40±0.20***	**12.20±0.30***	**8.90±0.40***
MCV	**126.80±0.51*****	123.30±0.46	126.40±18.08	144.10±16.04	**137.6±6.40***	**115.00±4.50***	144.30±8.40	152.50±12.10
MCH	45.78±0.42	44.21±0.37	45.70±1.16	44.61±1.03	**44.30±2.30***	**36.70±1.51***	45.30±2.80	46.10±4.20
MCHC	35.70±0.42	35.83±0.38	36.25±0.81	36.11±0.72	**32.20±0.70***	**31.90±0.60***	31.50±0.90	30.00±0.70
WBC	13.07±0.60	14.19±0.53	18.08±1.46	16.23±1.29	**11.81±1.04***	**21.04±1.69***	**18.42±1.86***	**17.32±1.37***
Lymphocyte	69.32±0.70	68.82±0.64	-	-	49.10±3.40	49.30±2.50	57.30±0.50	57.30±3.20
Heterphil	28.17±0.67	28.31±0.61	-	-	43.30±3.60	38.80±3.30	33.00±3.00	37.30±3.30
Monocyte	2.47±0.17	2.54±0.16	-	-	**1.80±0.20***	**2.50±0.20***	**6.30±1.30***	**3.30±0.60***
H : L ratio	0.42±0.01	0.24±0.01	-	-			-	-

หมายเหตุ : *** นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.01 * นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.05

a เฉลียว ศาลากิจ (2548)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.6 โลหิตวิทยาเปรียบเทียบ (mean ± SE) ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ค่าทางโลหิตวิทยา	ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว				ไก่พื้นเมืองไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Suchint et al., 2004)				Jain (1993)
	เพศผู้(n=70)	เพศเมีย(n=83)	รวม(n=153)		เพศผู้(n=20)	เพศเมีย (n=20)	รวม(n=40)		
	MEAN±SE	MEAN±SE	MEAN±SE	RANGE	MEAN±SE	MEAN±SE	MEAN±SE	RANGE	RANGE
RBC	4.20±0.84	4.09±0.76	4.15±0.80	1.4-3.2	2.32±0.31	2.19±0.26	2.26±0.29	2-3	2.5-3.5
HCT	30.46±0.61	31.83±0.55	31.15±0.58	21.0-40.1	33.55±4.72*	30.80±3.96	32.18±4.46	28-37	22.0-35.0
HGB	10.98±0.21	11.34±0.19	11.16±0.20	7.6-14.1	9.27±1.42*	8.52±0.85	8.89±1.20	8-10	7.0-13.0
MCV	126.80±0.51***	123.30±0.46	125.05±0.49	115.9-146.5	147.87-18.43	141.39±19.17	144.63±18.61	126-163	90.0-140.0
MCH	45.78±0.42	44.21±0.37	45.00±0.40	38.9-59.1	40.26±5.16	39.11±4.42	39.69±4.96	35-45	33.0-47.0
MCHC	35.70±0.42	35.83±0.38	35.77±0.40	32.0-41.3	27.93±4.56	27.79±1.77	27.86±3.37	24-31	26.0-35.0
WBC	13.07±0.60	14.19±0.53	13.63±0.57	6.5-24.9	2.05±0.39	2.05±0.53	2.04±0.45	1.6-2.5	1.2-3.0
Lymphocyte	69.32±0.70	68.82±0.64	69.07±0.67	38.0-83.0	60.30±5.33	67.05±11.49*	63.68±9.36	54-73	45.0-70.0
Heterophil	28.17±0.67	28.31±0.61	28.24±0.64	14.0-44.0	25.40±5.12	22.00±8.78	23.70±7.21	16-31	15.0-40.0
Monocyte	2.47±0.17	2.54±0.16	2.51±0.17	1.0-6.0	4.35±3.15	4.05±3.39	4.20±3.20	1-7	5.0 - 10.0
H:L ratio	0.42±0.01	0.24±0.01	0.42±0.01	0.17-0.82	0.43±0.12	0.36±0.21	0.40±0.17	0.23 - 0.57	-

หมายเหตุ : *** นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.01 * นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ P≤0.05

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.7 พบว่าผลการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้คือ ค่า titer มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับค่าโลหิตวิทยา ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน พบว่าค่า titer ในไก่กลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันในระดับ ต่ำ กลาง และสูง (63.15±23.47 421.77±28.04 และ 1525±131.92 ตามลำดับ) มีความสัมพันธ์กับ lymphocyte (71.00±2.46 69.79±0.81 และ 67.72±1.29 เปอร์เซ็นเม็ดเลือดขาว ตามลำดับ) ไปในทางลบ แต่ความสัมพันธ์ของค่า titer ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของจำนวน heterophil (25.17±2.34 27.76±0.86 และ 29.41±1.05 เปอร์เซ็นเม็ดเลือดขาว ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าปริมาณ lymphocyte และ heterophils มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่ -0.17 และ 0.18 ตามลำดับ

อภิปรายผลความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ไก่กลุ่มที่มี titer สูงจะมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณ lymphocytes แต่จะมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณ heterophil ทำให้สามารถใช้ค่าโลหิตวิทยาดังกล่าวช่วยเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการประเมินสภาวะภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลได้ ค่า heterophil ในไก่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม และตอบสนองการกระตุ้นของแอนติบอดี ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อของร่างกายได้ แต่จากประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือ สามารถใช้ค่าโลหิตวิทยาประเมินสภาวะภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยที่ได้รับวัคซีน คงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากผลที่ได้ยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าทั้งปริมาณ lymphocytes และปริมาณ heterophil เป็นผลโดยตรงจากระบบภูมิคุ้มกันเพราะสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของภูมิคุ้มกันกับปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ heterophil ที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำมาก รวมทั้งการแยกชนิดเม็ดเลือดในไก่ยังไม่มีเครื่องมือช่วยที่จะทำให้เกิดความแม่นยำยังคงใช้ระยะเวลานานในการตรวจนับ ดังนั้นในการประเมินภูมิคุ้มกันในไก่ในการใช้วิธี ELISA ยังคงเป็นวิธีที่คุ้มค่า คือ ประหยัดเวลา และแม่นยำ มีความจำเพาะต่อโรค ในการตรวจวิเคราะห์ได้ในปัจจุบันนี้

ตาราง 4.7 ความสัมพันธ์ของกลุ่มระดับภูมิคุ้มกันต่อค่า Titer, Lymphocyte และ Heterophil ในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน

Group of Titer (153)	Titer		Lymphocyte		Heterophil	
	male	**female**	**male**	**female**	**male**	**female**
Low (8)	64.19±20.48	62.10±26.45	73.00±2.16	69.00±2.79	25.00±2.04	25.33±2.63
0-100	**Total = 63.15±23.47**		**Total = 71.00±2.46**		**Total = 25.17±2.34**	
Medium (91) 101-800	438.18±28.50	405.35±27.57	69.93±0.82	69.64±0.79	27.46±0.87	28.06±0.84
	Total = 421.77±28.04		**Total = 69.79±0.81**		**Total = 27.76±0.86**	
High (54) >800	1694±146.76	1356±117.08	67.76±1.43	67.67±1.14	29.91±1.16	28.91±0.93
	Total = 1525±131.92		**Total = 67.72±1.29**		**Total = 29.41±1.05**	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตาราง 4.8 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Titer ต่อค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีเลือด ในไก่พื้นเมืองไทย ที่อายุ 4 เดือน

	Titer	RBC	WBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Lym	Het	Mono	H:L	BW
Titer	1.00												
RBC	0.04	1.00											
WBC	0.12	0.02	1.00										
HGB	0.09	0.08	0.20*	1.00									
HCT	0.05	0.03	0.18*	0.91**	1.00								
MCV	0.09	-0.01	-0.08	-0.44**	-0.41**	1.00							
MCH	0.13	0.01	-0.01	-0.16*	-0.50**	0.47**	1.00						
MCHC	0.09	0.11	0.03	-0.03	-0.25**	-0.03	0.47**	1.00					
Lym	-0.17*	-0.01	0.01	-0.21**	-0.19*	0.11	0.03	-0.01	1.00				
Het	0.18*	0.04	0.06	0.18*	0.14	-0.11	0.02	0.01	-0.86**	1.00			
Mono	0.00	-0.13	-0.09	0.05	0.04	0.08	0.07	-0.19*	0.10	-0.37**	1.00		
H:L	0.19*	0.04	0.03	0.20*	0.20*	-0.12	0.01	0.08	-0.95**	0.97**	-0.28**	1.00	
BW	-0.01	0.04	-0.04	-0.13	-0.13	0.13	0.10	-0.02	0.03	0.03	0.02	0.00	1.00

หมายเหตุ : RBC = Red blood cell , WBC = White blood cell , HGB = Hemoglobin , HCT = Hematocrit , MCV = Mean Corpuscular Volume , MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin , MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, Lym = Lymphocyte , Het = Heterphil , Mono = Monocyte, H:L = H:L ratio , BW = Body Weigh

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 ความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน MHC กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

พบว่ายีน MHC มีศักยภาพในการประยุกต์เป็น gene marker สำหรับการช่วยในการคัดเลือกไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวในฝูงของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ให้มีความสามารถในการต้านทานโรคและการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งเป็นประเด็นที่ศึกษาเพื่อต่อยอดความสัมพันธ์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จากสมมุติที่ตั้งขึ้นมาเพียงศึกษาความสัมพันธ์กับการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล เพื่อพัฒนาลักษณะทางการเจริญเติบโตควบคู่ไปกับลักษณะการต้านทานโรคในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว การศึกษานี้ จึงได้ ศึกษาประเด็นที่สำคัญ คือ จำนวนรูปแบบของยีนที่พบในฝูงไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว การศึกษาความถี่ของ genotype ของยีนนี้ เพื่อบอกถึงความสามารถในการเพิ่มความถี่ของยีนในบางรูปแบบที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ และ การศึกษาถึงความสัมพันธ์และระดับของอิทธิพลของยีนดังกล่าวกับ ลักษณะที่สนใจ เพื่อระบุว่ายีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็น gene marker ได้หรือไม่

4.4 ความถี่ allele จาก LEI0258 ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ผลจากการศึกษาความถี่อัลลีลจาก LEI0258 สามารถจำแนกอัลลีลได้ 6 ตำแหน่งคือ 205 249 307 321 345 และ 420 bp ดังแสดงในตารางที่ 4.9 สอดคล้องกับการศึกษาของ Lwelamira et al. (2008) ที่พบอัลลีล 5 ตำแหน่งคือ อัลลีลที่ 205 215 234 307 321 และ 345 bp การศึกษาของ Han et al. (2013) พบตำแหน่งอัลลีลที่เหมือนกับการศึกษาในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว คืออัลลีลที่ 205 249 307 321 345 และ 420 bp การศึกษาของ Gholamreza et al. (2013) ที่พบอัลลีล 5 ตำแหน่ง คือ อัลลีลที่ 205 307 321 345 และ 420 bp และการศึกษาของ Fariba Izadi (2011) ที่พบอัลลีล 5 ตำแหน่งคือ อัลลีลที่ 205 249 307 321 และ 420 bp พบความถี่ genotype จาก LEI0258 ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวจำนวน 128 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 4.10 จากความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล กับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลและน้ำหนักตัวที่อายุ 4 และ 7 เดือน ผลการศึกษาพบว่าอัลลีลที่ 321 bp มีความสัมพันธ์กับค่า titer ในการต้านทานโรคนิวคาสเซิล และอัลลีลที่ 205 bp มีอิทธิพลต่อน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ผลการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Lwelamira et al. (2008) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของอัลลีล LEI0258 ต่อการตอบสนองต่อค่าแอนติบอดีและน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมือง พบความถี่อัลลีล 6 ตำแหน่งคือ 205 215 234 307, 321 และ 345 bp พบว่าอัลลีลที่ 205 และ 307 bp มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อค่าแอนติบอดีในการต้านทานโรคนิวคาสเซิล ($P \leq 0.001$) และที่อัลลีล 307 bp พบความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัว ($P \leq$

0.007) ที่อายุ 16 สัปดาห์ ความถี่ของอัลลีลแบบ homozygous และ heterozygous ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ Kuchi เท่ากับ 0.118 และ 0.882 (n=85) ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษาในส่วนของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่ต้องการประเมินโอกาสในการคัดเลือกลักษณะในการต้านทานโรคและความสามารถในการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวว่ามีมากน้อยเพียงใด จากผลที่ได้นี้มีโอกาสในการเป็นไปได้ในการคัดเลือกไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวในลักษณะการต้านทานโรค แต่ในการคัดเลือกลักษณะนี้ไปมีผลกระทบในทางลบต่อการเจริญเติบโตในไก่ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการวางแผนผสมพันธุ์สัตว์จึงมีความจำเป็นในการคัดเลือกไก่กลุ่มนี้เพื่อให้ไก่ยังคงสามารถต้านทานโรคจากสิ่งแวดล้อมได้ดีควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมกับช่วงอายุไก่ด้วย

ตารางที่ 4.9 ความถี่อัลลีลจาก LEI0258 ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

Allele	Frequencies	Pop
A (205 bp)	0.070	21
B (249 bp)	0.101	30
C (307 bp)	0.399	119
D (321 bp)	0.188	56
E (345 bp)	0.174	52
F (420 bp)	0.067	20

*** Pop = number of populations sharing the allele.**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 ความถี่ genotype จาก LEI0258 ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

Genotypes	Frequency	Individual (n = 128)
AB	**0.033**	**5**
AC	**0.040**	**6**
BC	**0.047**	**7**
BD	**0.040**	**6**
CC	**0.201**	**30**
CD	**0.094**	**14**
CE	**0.134**	**20**
CF	**0.080**	**12**
DD	**0.067**	**10**
DE	**0.074**	**11**
EF	**0.047**	**7**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล LEI0258 microsatellite กับค่า titer และน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน (n=128)

Trait	Allele (bp)	4 m			7 m		
		β	SE	Significant	β	SE	Significant
Titer	A (205 bp)	0.319	0.194	0.103	-0.013	0.138	0.926
	B (249 bp)	-0.144	0.158	0.363	-0.085	0.110	0.444
	C (307 bp)	0.122	0.156	0.434	-0.156	0.105	0.142
	D (321 bp)	0.226	0.149	0.791	-0.237	0.105	**0.026***
	E (345 bp)	-0.032	0.122	0.791	0.033	0.083	0.691
	F (420 bp)	0.083	0.148	0.577	-0.058	0.102	0.575
Body weight	A (205 bp)	-55.060	64.218	0.393	-251.668	124.906	**0.047***
	B (249 bp)	13.500	52.338	0.797	-27.374	101.477	0.788
	C (307 bp)	12.325	51.484	0.811	-100.354	94.908	0.293
	D (321 bp)	5.230	49.282	0.916	-116.582	94.905	0.222
	E (345 bp)	12.389	40.362	0.759	-63.656	74.620	0.396
	F (420 bp)	-38.874	48.959	0.429	-158.999	92.044	0.087

หมายเหตุ : * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ของ genotype ต่อค่า titer และน้ำหนักตัว โดยพบว่า genotype ตำแหน่งที่ BD DE ($P \leq 0.05$) และ CD ($P \leq 0.01$) มีความสัมพันธ์กับค่า titer ต่อการต้านทานโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 อิทธิพลของ genotype ต่อค่า titer และ น้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ และ 7 เดือน (n=128)

Genotype	4 m		7 m	
	Titer	**Body weight**	**Titer**	**Body weight**
AB	2.721±0.237	1.220±78.194	3.724±0.166	2.259±151.616
β	0.199±0.309	-7.546±101.873	-0.174±0.207	1.396±189.416
AC	0.013±0.214	1.176±70.686	3.721±0.149	2.194±136.288
β	0.491±0.291	-51.678±96.105	-0.178±0.194	-63.604±177.385
BC	2.526±0.196	1.282±64.740	3.740±0.133	2.441±121.707
β	0.005±0.278	54.114±91.613	-0.158±0.182	183.498±165.916
BD	2.663±0.212	1.220±70.086	**3.429±0.147***	2.372±149.318
β	0.141±0.289	-81.144±95.538	-0.470±0.192	114.223±187.230
CC	2.643±0.095	1.265±31.325	3.751±0.065	2.472±59.727
β	0.121±0.218	37.470±71.853	-0.148±0.139	213.580±127.052
CD	2.859±0.139	1.273±45.976	**3.491±0.095****	2.288±86.357
β	0.337±0.241	44.742±79.935	-0.408±0.156	30.165±142.032
CE	2.699±0.117	1.235±38.574	3.652±0.075	2.346±68.624
β	0.178±0.229	7.376±75.505	-0.247±0.145	88.456±131.932
CF	2.820±0.150	1.251±49.478	3.618±0.099	2.334±89.958
β	0.299±0.247	-12.843±81.413	-0.280±0.157	76.319±143.694
DD	2.891±0.164	1.209±54.132	3.529±0.103	2.376±93.948
β	0.369±0.256	-18.943±84.389	-0.370±0.160	118.049±146.471
DE	2.712±0.156	1.289±51.633	**3.825±0.115***	2.515±105.037
β	0.190±0.251	60.748±82.769	-0.074±0.169	257.049±153.819
EF	2.522±0.196	1.228±64.740	3.899±0.123	2.258±112.373
β	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หมายเหตุ : * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.05$

** แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.01$

$B = 0$ แสดงการไม่มีอิทธิพลร่วม

4.5 จำนวน SNPs ความถี่ allele และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC

เพื่อนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า ยีน MHC จะมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็น marker assisted selection (MAS) ให้กับไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้หรือไม่นั้น ในเบื้องต้นการศึกษาในเรื่องจำนวน SNPs ที่พบ รูปแบบ และความถี่ของ SNP ดังกล่าวมีความสำคัญในแง่การประเมิน polymorphism อันเป็นคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งของการเป็น gene marker ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ยีน MHC มีศักยภาพที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็น MAS ได้ ทั้งนี้เนื่องจากฝูงไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวที่ใช้ในการศึกษานี้ พบว่ายีน MHC มี SNP จำนวน 16 ตำแหน่ง (แสดงในตารางที่ 4.13) คือ C125T A126T C128T A131G G136T C209G C242T A243T C244T C250T A254T A274G A282T C360T A361G และ G720T โดยบางตำแหน่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำก่อนหน้าที่ เช่น ตำแหน่งที่ A126T และ C128T ในงานของ Li *et al.* (2012), Liu *et al.* (2009) ซึ่งศึกษายีนดังกล่าวในประชากรไก่พื้นเมืองจีน ก็พบ SNP ตำแหน่งดังกล่าวเช่นกัน การพบ SNP ของยีนดังกล่าวในตำแหน่งที่เหมือน หรือแตกต่างกัน ในประชากรไก่สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน บ่งชี้ถึงความหลากหลาย ที่มีจุดร่วม ของพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยและจีน

นอกจากนี้ จากตารางที่ 4.13 จะเห็นว่าทุกตำแหน่งมีความแตกต่างกันของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์มาก เมื่อมีการทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium ก็พบว่าตำแหน่งจีโนไทป์ทุกตำแหน่งเบี่ยงเบนออกจากสมดุล โดยทฤษฎี การเบี่ยงเบนออกจาก Hardy-Weinberg Equilibrium นั้นมีสาเหตุมาจาก การคัดเลือก การอพยพ และการผสมพันธุ์แบบไม่สุ่ม เมื่อพิจารณาปัจจัยดังกล่าว ในประชากรไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ที่ใช้ในการศึกษา พบว่า ประชากรนี้ เป็นประชากรที่ไม่มีการคัดเลือก เจตนาของการรวบรวมฝูงไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวของกรมปศุสัตว์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คือเพื่อเก็บเป็นแหล่งพันธุกรรม ดังนั้นการที่ ทุกตำแหน่งมีการเบี่ยงเบนออกจาก Hardy-Weinberg Equilibrium นั้นอาจเกิดจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไก่พื้นเมืองมีความสามารถในการต้านทานโรคและความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.13 จำนวน SNP ที่พบ ความถี่ของ SNP และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC จากจำนวนไก่ทั้งหมด 125 ตัว

SNPs	Allele/ Genotype	frequency	SNPs	Allele Genotype	Frequency	SNPs	Allele Genotype	frequency	SNPs	Allele Genotype	frequency
SNPs1	T	0.932	SNPs2	T	0.972	SNP3	T	0.944	SNP4	G	0.968
C125T	C	0.068	A126T	A	0.028	C128T	C	0.056	A131G	A	0.032
	TT	0.904		TT	0.968		TT	0.944		GG	0.960
	TC	0.056		TA	0.008		TC	0.000		GA	0.016
	CC	0.040		AA	0.024		CC	0.056		AA	0.024
SNPs5	G	0.952	SNP6	C	0.884	SNP7	T	0.920	SNP8	A	0.684
G136T	T	0.048	C209G	G	0.116	C242T	C	0.080	A243T	T	0.316
(n=125)	GG	0.944		CC	0.864		TT	0.880		AA	0.592
	GT	0.016		CG	0.040		TC	0.080		AT	0.184
	TT	0.040		GG	0.096		CC	0.040		TT	0.224
SNPs9	C	0.712	SNP10	C	0.536	SNP11	A	0.840	SNP12	A	0.508
C244T	T	0.288	C250T	T	0.464	A254T	T	0.160	A274G	G	0.492
(n=125)	CC	0.672		CC	0.488		AA	0.784		AA	0.496
	CT	0.080		CT	0.096		AT	0.112		AG	0.024
	TT	0.248		TT	0.416		TT	0.104		GG	0.480

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.13 จำนวน SNP ที่พบ ความถี่ของ SNP และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC จากจำนวนไก่ทั้งหมด 125 ตัว (ต่อ)

SNPs	Allele/ Genotype	frequency	SNPs	Allele Genotype	Frequency	SNPs	Allele Genotype	frequency	SNPs	Allele Genotype	frequency
SNPs13	A	0.940	SNP14	T	0.968	SNP15	G	0.948	SNP16	T	0.936
A282T	T	0.060	C360T	C	0.032	A361G	A	0.052	G720T	G	0.064
	AA	0.928		TT	0.952		GG	0.928		TT	0.936
	AT	0.024		TC	0.032		GA	0.040		TG	0.000
	TT	0.048		CC	0.016		AA	0.032		GG	0.064

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของ MHC gene ต่อลักษณะการเจริญเติบโต

การศึกษาอิทธิพลของ SNPs แต่ละตำแหน่ง ต่อลักษณะการเจริญเติบโต พบว่า SNPs ที่พบทั้ง 16 ตำแหน่งนั้น มีเพียงตำแหน่งที่ 3 (C128T) เท่านั้นที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.1$ กับลักษณะน้ำหนักที่ 4 (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของน้ำหนักตัว ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน

Genotype		**Bodyweight (g.)**	
(n=125)		**4 (month)**	**7 (month)**
SNP1 (C125T)	C125C	1235 (76.71)	2534 (360.26)
	T125C	1251 (64.82)	1987 (304.40)
	T125T	1269 (16.13)	2215 (75.72)
SNP2 (A126T)	A126A	1269 (98.67)	2611 (466.50)
	A126T	1074 (171.37)	2207 (810.18)
	T126T	1268 (15.52)	2205 (73.36)
SNP3 (C128T)	C128C	**1260 (15.54)***	2213 (74.21)
	T128T	1375 (63.85)	2244 (304.82)
SNP4 (A131G)	A131A	1232 (99.10)	2457 (467.00)
	G131A	1235 (121.22)	2460 (571.20)
	G131G	1268 (15.65)	2205 (73.74)
SNP5 (G136T)	G136G	1265 (15.79)	2216 (73.46)
	G136T	1265 (122.20)	1288 (568.50)
	T136T	1301 (76.72)	1564 (356.94)
SNP6 (C209G)	C209C	1276 (16.35)	2212 (77.97)
	C209G	1187 (77.45)	2301 (369.36)
	G209G	1210 (48.98)	2208 (233.59)
SNP7 (C242T)	C242C	1213 (76.53)	2332 (359.16)
	C242T	1239 (54.42)	1866 (255.40)
	T242T	1271 (16.31)	2241 (76.56)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของน้ำหนักตัว ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน (ต่อ)

Genotype		**Bodyweight (g.)**	
(n=125)		**4 (month)**	**7 (month)**
SNP8 (A243T)	A243A	1259 (19.94)	2176 (93.84)
	A243T	1281 (35.73)	2189 (168.20)
	T243T	1272 (32.55)	2340 (153.21)
SNP9 (C244T)	C244C	1266 (18.76)	2206 (88.00)
	C244T	1246 (54.30)	1957 (254.68)
	T244T	1274 (30.99)	2324 (145.34)
SNP10 (C250T)	C250C	1273 (21.89)	2213 (103.56)
	C250T	1299 (49.33)	2098 (233.34)
	T250T	1251 (23.73)	2245 (112.23)
SNP11 (A254T)	A254A	1276 (17.21)	2270 (81.05)
	A254T	1251 (45.58)	2000 (214.69)
	T254T	1212 (47.26)	2035 (222.61)
SNP12 (A274G)	A274A	1291 (21.57)	2308 (102.09)
	A274G	1303 (99.06)	2502 (468.70)
	G274G	1239 (21.98)	2106 (103.98)
SNP13 (A282T)	A282A	1259 (15.73)	2179 (74.16)
	A282T	1389 (97.96)	2765 (461.67)
	T282T	1345 (69.17)	2633 (326.02)
SNP14 (C360T)	C360C	1340 (120.65)	2740 (570.16)
	C360T	1182 (85.66)	2301 (404.79)
	T360T	1268 (15.64)	2203 (73.92)
SNP15 (A361G)	A361A	1382 (85.09)	2790 (399.70)
	A361G	1249 (76.18)	2527 (357.81)
	G361G	1263 (15.81)	2182 (74.24)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของน้ำหนักตัว ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน (ต่อ)

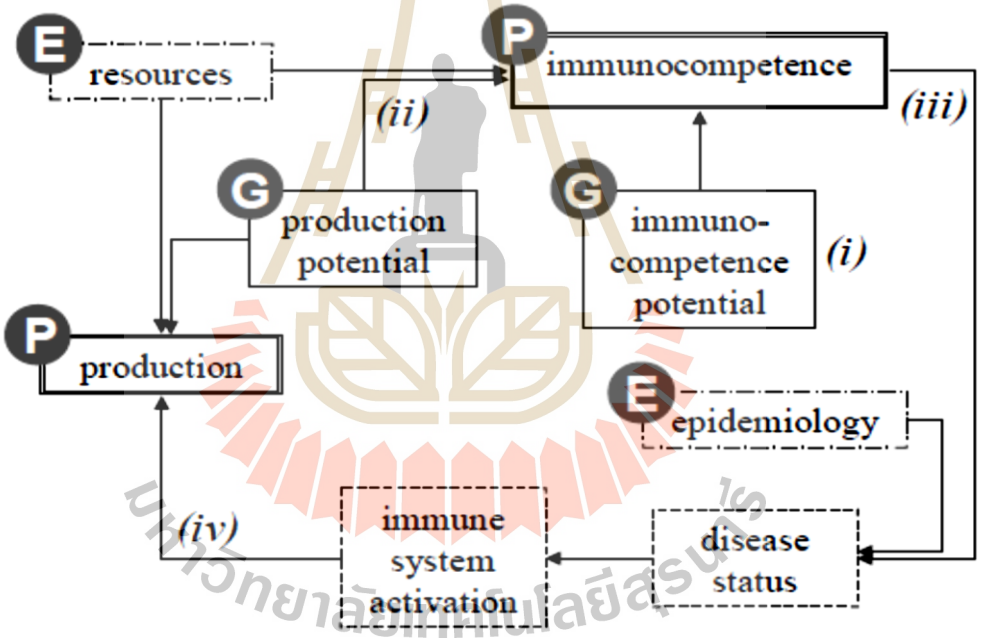
Genotype		**Bodyweight (g.)**	
(n=125)		**4 (month)**	**7 (month)**
SNP16	G720G	1334 (60.20)	2223 (285.55)
(G720T)	T720T	1262 (15.71)	2215 (74.52)

หมายเหตุ : * หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความแตกต่าง *P<0.1*

การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Pinard – van der Laan (2002) โดยศึกษาถึงผลของการคัดเลือกการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันต่อน้ำหนักตัว ในไก่ White Leghorn ในรุ่นที่ 4 จำนวน 200 ตัว พบว่าผลการคัดเลือกไก่จากการตอบสนองต่อการต้านทานโรคนิวคาสเซิลต่อน้ำหนักตัว ในไก่ที่อายุ 9 และ 17 สัปดาห์ คือ 1042.4±11 และ 1661.5±18.7 กรัม (*P<0.01*) ตามลำดับ และในขณะเดียวกัน ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Lamont (1998) ซึ่งพบว่า MHC genotype ซึ่งควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีผลเกี่ยวเนื่องต่อลักษณะทางการผลิต เช่น น้ำหนักตัว อัตราการผสมติด อัตราการฟัก และผลผลิตไข่ เป็นต้น ด้วย นอกจากนี้ การศึกษาของ Rauw et al. (1998) และ Twinkle Jasmine Masilamani (2003) พบว่า การคัดเลือกให้มีลักษณะการผลิตสูง เช่น การคัดเลือกไก่ให้มีน้ำหนักตัวสูง มีผลกับความสัมพันธ์ในทางลบกับประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน จากที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นงานวิจัยที่สนับสนุนผลการศึกษาในครั้งนี้ และเป็นประเด็นที่ชี้ให้เห็นว่า ยีน MHC นั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่ด้วย

อนึ่งสำหรับเหตุผลที่ยีน MHC มีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่นั้น พบว่า Non-MHC linked resistance มีบทบาทในการควบคุมลักษณะการเจริญเติบโต เช่น Growth hormone (GH) (Kuhnlein et al., 1997) ซึ่ง GH เป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจาก somatroph cell จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (pituitary gland) โดยฮอร์โมนนี้มีการทำงานทางกายภาพ เช่น การเจริญเติบโต, ซ่อมแซมเนื้อเยื่อของร่างกาย, การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า GH มีผลต่อการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันทั้งในด้านเซลล์และสารน้ำ โดยมีการนำเสนอที่จำเพาะเจาะจงบนผิวเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน แม้ว่า GH จะไม่ได้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนา T-cell และเซลล์ของระบบคุ้มกันโดยปกติ แต่มันสามารถไปเพิ่มความสามารถของ T-cell และ Thymic ในช่วงที่เกิดความเครียดได้ (Welniak et al., 2002) ในไก่พบว่า GH มีผลต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แต่ในหน้าที่หลัก GH มีบทบาทต่อการเจริญเติบโต และการ

เผาผลาญอาหาร มีการแสดงออกที่เด่นชัดที่ยีน IGF-I ในไก่ที่โตเต็มที่จะไปเพิ่มการแสดงออกของยีน GHR mRNA (Kuhn et al., 2002) โดยหลักฐานของความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกันต่อระดับการผลิตในสัตว์ที่มีอิทธิพลมาจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.1 นอกจากนี้โดยทฤษฎีแล้วพบว่า การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถเชื่อมต่อกับระบบประสาทส่วนกลาง โดยอาจกระตุ้นการพัฒนาพฤติกรรม หรือการปลดปล่อยฮอร์โมนมาจาก Hypothalamus และ Pituitary hormones โดยการหลั่งฮอร์โมน เช่น Adrenocorticotropic hormone (ACTH) และ Thyrotropin จากเซลล์ที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน มีความสำคัญ ในการเพิ่มการควบคุมการสังเคราะห์ Gluconeogenesis จาก glycogen, fatty acid และ amino acid ในการไปลดการสะสมโปรตีนในกล้ามเนื้อ และไปสนับสนุน gluconeogenesis และ การสังเคราะห์ acute-phase glycoprotein เป็นต้น (Pieter and Stephen, 2000)



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกันต่อระดับการผลิตในสัตว์ที่มีอิทธิพลมาจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

หมายเหตุ : ยีนหลัก **(G)**, สิ่งแวดล้อม **(E)**, ลักษณะปรากฏ **(P)**, ภูมิต้านทานปกติที่มีอิทธิพลมาจากศักยภาพในการผลิต ***(ii)*** และ ภาวการณ์ต้านทานโรคในสัตว์มีอิทธิพลมาจากภูมิต้านทานปกติ ***(iii)*** กลไกความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในทางปศุสัตว์จากกระบวนการทางศักยภาพในการพัฒนาพันธุกรรมจากภูมิคุ้มกัน ***(i)*** ต่อ ความสามารถในลักษณะทางการผลิตจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ***(iv)***

ที่มา : Pieter and Stephen (2000)

4.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของ MHC gene ต่อลักษณะการต้านทานโรค

การศึกษาอิทธิพลของ SNPs แต่ละตำแหน่ง ต่อลักษณะการต้านทานโรค พบว่า SNPs ที่พบทั้ง 16 ตำแหน่งนั้น มีตำแหน่งที่ 6 (C209G) 11 (A254T) และ ตำแหน่งที่ 12 (A274G) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะในการต้านทานโรคที่ 4 และ 7 เดือน ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.15

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2012) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางภูมิคุ้มกัน และ MHC B-F gene ในไก่พื้นเมือง Shadong สายพันธุ์ Wenshang Barred (LH), Laiwu Black (LWH) และ Jining Bairi chicken (BR) สายพันธุ์ละ 100 ตัว พบตำแหน่ง SNPs 65 ตำแหน่ง โดย SNPs มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางภูมิคุ้มกันทั้งสามสายพันธุ์ พบว่ามีตำแหน่งที่เหมือนกับการศึกษาของ Li *et al.* (2012) คือ 126 (T G A) และ 128 (C T) สรุปผลการศึกษาพบว่าลักษณะภูมิคุ้มกันต่อแอนติบอดีไตเตอร์ ต่อการต้านทานโรคนิวคาสเซิล (ND) ที่ตำแหน่ง 48 69 127 149 192 196 220 และ 232 ($P<0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Liu et al. (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs ใน exon 2 ของ MHC B-F gene ต่อลักษณะการต้านทานโรคในไก่ Chinese Beijing-You และ White Leghorn จำนวน 250 ตัว ในไก่แต่ละสายพันธุ์ พบตำแหน่ง SNPs 55 ตำแหน่ง โดย SNPs ที่มีตำแหน่งที่เหมือนกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2009) คือตำแหน่งที่ 126 (G T) และ 128 (C T) ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ สรุปผลจากการศึกษาของ Liu et al. (2009) พบ SNPs 6 ตำแหน่งที่ loci 69 218 220 221 223 และ 235 มีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรคนิวคาสเซิล และพบ SNPs 3 ตำแหน่งที่ loci 214, 217 และ 232 มีความสัมพันธ์กับการต้านทานต่อโรคไข้หวัดนก ($P<0.05$) การศึกษาของ Guo et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ MHC BLB2 gene exon 2 ในไก่พื้นเมืองพันธุ์ Hebei จำนวน 2000 ตัว (ตัวผู้ 200 ตัว และตัวเมีย 1800 ตัว) พบตำแหน่ง SNPs 69 ตำแหน่ง สรุปผลจากการศึกษาของ Guo et al. (2012) พบว่าในส่วนของตำแหน่งที่ 4-20 30-37 51-64 84-96 104-114 117-129 170-189 224-242 253-261 และ 263-273 เป็นส่วนที่มีความสัมพันธ์กับการทำงานในกระบวนการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และ MHC class IIB gene ยังได้มีการศึกษาในปลา *Cynoglossus semilaevis* ต่อการต้านทานโรค *vibrio anguillarum* เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่มีลักษณะอาการเกิดเป็นแผลหลุมบนผิวหนัง จำนวน 200 ตัว ซึ่งเป็นการศึกษาของ Du et al. (2011) พบตำแหน่ง SNPs 72 ตำแหน่ง มีตำแหน่งที่เหมือนกับการศึกษาของ Du et al. (2011) คือตำแหน่งที่ 124-126 (GGA AGA GAG) 242-243 (TG TT GG) 250-253 (ACCA ACGC AGCC GGAC ACGG) 254-256 (TGC TGG GTT) แต่ก็มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบน Exon2 ของยีน TLR4 กับลักษณะการต้านทานโรคในไก่ 15 สายพันธุ์ พบตำแหน่ง SNPs 2 ตำแหน่ง คือ G114A และ G142 A แต่พบว่า SNPs ที่พบบน

TLR4 gene ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งหรือผลกระทบต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในไก่ (Liu et al., 2011)

จากที่กล่าวมาจะสังเกตได้ว่าตำแหน่ง SNP ที่พบความสัมพันธ์กับค่า titer ในงานต่างๆนั้นอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อพิจารณาจากตำแหน่ง SNP ที่พบในแต่ละงานก็มีความแตกต่างกัน (ดังได้กล่าวไว้ในหัวข้อเรื่อง จำนวน SNPs ความถี่ allele และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน MHC) ซึ่งเกิดจากความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของยีน MHC ของไก่ที่มีพันธุ์หรือสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอันเกิดเนื่องจากกระบวนการ crossing over เกิด DNA recombination และมีผลทำให้เกิดความแตกต่างกันในระดับเบส อันเป็นสาเหตุที่ทำให้พบ SNP ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน และทำให้พบนัยสำคัญในตำแหน่งที่แตกต่างกันด้วย

ผลการศึกษานี้เป็นการยืนยันว่ายีน MHC มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของไก่ และสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุกรรมของไก่ให้มีความสามารถในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในกรณีของการศึกษาในครั้งนี้ มิได้มีเจตนาเพื่อนำผลการศึกษาไปใช้ในการคัดเลือกไก่พื้นเมืองให้มีความสามารถในการต้านทานโรคให้มากขึ้น เพราะไก่พื้นเมืองมีความสามารถดังกล่าวในเกณฑ์ที่น่าพอใจอยู่แล้ว หากแต่ต้องการมุ่งเน้นว่า ในอนาคตถ้าต้องการพัฒนาพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองให้มีความสามารถในด้านการเจริญเติบโตให้มากขึ้น ให้พึงระวังว่าจะทำให้ความสามารถในด้านการต้านทานโรคลดน้อยลง หรือสูญเสียไปในที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของค่า log (10) Titer ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน

Genotype		**log (10) Titer**	
(n=125)		**4 (month)**	**7 (month)**
SNP1 (C125T)	C125C	2.46 (0.22)	3.77 (0.14)
	T125C	2.77 (0.19)	3.72 (0.12)
	T125T	2.72 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP2 (A126T)	A126A	2.56 (0.29)	3.77 (0.14)
	A126T	1.98 (0.50)	3.72 (0.12)
	T126T	2.72 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP3 (C128T)	C128C	2.66 (0.19)	3.73 (0.12)
	T128T	2.71 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP4 (A131G)	A131A	2.55 (0.29)	3.77 (0.18)
	G131A	2.66 (0.35)	3.42 (0.22)
	G131G	2.71 (0.05)	3.63 (0.03)
SNP5 (G136T)	G136G	2.71 (0.05)	3.62 (0.03)
	G136T	2.92 (0.35)	3.67 (0.23)
	T136T	2.65 (0.22)	3.72 (0.14)
SNP6 (C209G)	C209C	2.74 (0.05)	3.62 (0.03)
	C209G	2.84 (0.22)	3.65 (0.15)
	G209G	**2.41 (0.14)***	3.71 (0.09)
SNP7 (C242T)	C242C	2.69 (0.22)	3.74 (0.14)
	C242T	2.92 (0.15)	3.65 (0.10)
	T242T	2.69 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP8 (A243T)	A243A	2.73 (0.06)	3.61 (0.04)
	A243T	2.63 (0.10)	3.65 (0.07)
	T243T	2.72 (0.09)	3.67 (0.06)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (± SE) ของค่า log (10) Titer ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน (ต่อ)

Genotype		**log (10) Titer**	
(n=125)		**4 (month)**	**7 (month)**
SNP9 (C244T)	C244C	2.72 (0.05)	3.62 (0.04)
	C244T	2.76 (0.16)	3.73 (0.10)
	T244T	2.66 (0.09)	3.60 (0.06)
SNP10 (C250T)	C250C	2.12 (0.06)	3.66 (0.04)
	C250T	2.76 (0.14)	3.64 (0.09)
	T250T	2.68 (0.07)	3.59 (0.04)
SNP11 (A254T)	A254A	2.72 (0.05)	3.60 (0.03)
	A254T	2.80 (0.13)	3.65 (0.08)
	T254T	2.50 (0.14)	**3.80 (0.08)***
SNP12 (A274G)	A274A	**2.70 (0.06)*****	3.61 (0.04)
	A274G	1.53 (0.27)	3.67 (0.19)
	G274G	2.77 (0.06)	3.64 (0.04)
SNP13 (A282T)	A282A	2.72 (0.05)	3.62 (0.03)
	A282T	2.12 (0.28)	3.83 (0.18)
	T282T	2.73 (0.20)	3.72 (0.13)
SNP14 (C360T)	C360C	2.94 (0.35)	3.65 (0.23)
	C360T	2.78 (0.25)	3.72 (0.16)
	T360T	2.70 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP5 (A361G)	A361A	2.83 (0.25)	3.59 (0.16)
	A361G	2.78 (0.22)	3.72 (0.14)
	G361G	2.70 (0.05)	3.62 (0.03)
SNP16 (G720T)	G720G	2.62 (0.18)	3.74 (0.11)
	T720T	2.71 (0.05)	3.62 (0.03)

หมายเหตุ : * หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความแตกต่าง $P<0.1$

** หมายถึง มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความแตกต่าง $P<0.05$

*** หมายถึง มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความแตกต่าง $P<0.01$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน MHC กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว ตามสมมติฐานที่ตั้งไว้คือ ค่าโลหิตวิทยาและรูปแบบยีน MHC มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้มาซึ่งข้อสรุปและข้อเสนอแนะแยกเป็นสามประเด็นหลักได้ดังนี้

ค่าเฉลี่ยเบื้องต้นของค่าโลหิตวิทยา และ ชีวเคมีเลือด

แยกเพศ ที่อายุ 4 และ 7 เดือน ผลจากการศึกษา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประมาณช่วงของค่าเฉลี่ยในการศึกษาค่าโลหิตวิทยา จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้คือ

1. พบว่าช่วงของค่าโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีเลือดมีช่วงต่ำสุดและสูงสุด ที่ค่อนข้างกว้าง ทั้งนี้เนื่องมาจากไก่พื้นเมืองฝูงนี้ยังไม่ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ให้มีลักษณะที่คงที่นั้นเอง พบว่าค่าเฉลี่ยโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีเลือด มีค่าเฉลี่ยที่สอดคล้องกับการศึกษาของงานวิจัยต่างๆ แต่พบว่าการศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำสุด สูงสุดกว้างกว่าไก่สายพันธุ์ต่างประเทศ อาจเนื่องมาจากไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และยังไม่ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์มาใช้ประโยชน์เฉพาะทางทั้งในด้านการคัดเลือกและการอนุรักษ์สายพันธุ์ร่วมกันได้

2. ค่าคอเลสเตอรอลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์หางขาวมีค่าช่วงต่ำสุด ค่อนข้างต่ำ (100-315 mg/dL) เมื่อเปรียบเทียบกับไก่เนื้อสายพันธุ์การค้าที่ 129-297 (Clincal Diagnostic division, 1990) และมีค่าเฉลี่ยแยกเพศไม่แตกต่างจากไก่พื้นเมืองสายพันธุ์อื่นมากนัก เช่นการศึกษาของ Sunday et al. (2011), Suchint et al. (2004) และ Abdi et al. (2006)

ค่าโลหิตวิทยามีความสัมพันธ์กับระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

พบว่าผลการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้คือ ค่า titer มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับค่าโลหิตวิทยา ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 เดือน พบว่าปริมาณ lymphocyte และ heterophils มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล คือ ไก่กลุ่มที่มี titer สูงจะมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณ lymphocytes แต่จะมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณ heterophil

ข้อเสนอแนะ จากประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือ สามารถใช้ค่าโลหิตวิทยาประเมินสภาวะภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยที่ได้รับวัคซีน คงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากผลที่ได้ยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าทั้งปริมาณ lymphocytes และปริมาณ heterophil เป็นผลโดยตรงจากระบบภูมิคุ้มกันเพราะสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของภูมิคุ้มกันกับปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ heterophil ที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำมาก รวมทั้งการแยกชนิดเม็ดเลือดในไก่ยังไม่มีเครื่องมือช่วยที่จะทำให้เกิดความแม่นยำ ยังคงใช้ระยะเวลานานในการตรวจนับ ดังนั้นในการประเมินภูมิคุ้มกันในไก่ในการใช้วิธี ELISA ยังคงเป็นวิธีที่คุ้มค่า คือ ประหยัดเวลา และแม่นยำ มีความจำเพาะต่อโรคในการตรวจวิเคราะห์ได้ในปัจจุบันนี้

รูปแบบยีน MHC มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว

ผลการศึกษาพบว่าอัลลีลที่ 321 bp มีความสัมพันธ์กับค่า titer ในการต้านทานโรคนิวคาสเซิล และอัลลีลที่ 205 bp มีอิทธิพลต่อน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน ($P \leq 0.05$) ความสัมพันธ์ของ genotype ต่อค่า titer และน้ำหนักตัว พบว่า genotype ตำแหน่งที่ BD DE ($P \leq 0.05$) และ CD ($P \leq 0.01$) มีความสัมพันธ์กับค่า titer ต่อการต้านทานโรคนิวคาสเซิลในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 7 เดือน พบว่ายีน MHC มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะการต้านทานโรคและน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว โดยผลต่อลักษณะดังกล่าวแสดงผลที่อายุต่างกัน ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่อายุ 4 และ 7 เดือน ต่อลักษณะการเจริญเติบโต พบว่า SNPs ที่พบทั้ง 16 ตำแหน่งนั้น มีเพียงตำแหน่งที่ 3 (C128T) ที่มีผลต่อลักษณะการเติบโตอย่างมีนัยสำคัญที่ ($P<0.1$) ส่วนลักษณะการต้านทานโรค พบว่ามีตำแหน่งที่ 6 (C209G) และ 11 (A254T) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.1$ และ ตำแหน่งที่ 12 (A274G) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ ที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะในการต้านทานโรค จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า

1. MHC gene มีความหลากหลายของ SNPs รูปแบบความถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลที่แตกต่างกันในประชากรไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว แตกต่างจากไก่สายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้ทำการตรวจเอกสารมาข้างต้นมานั้น อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์ที่แตกต่างกัน ซึ่งความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์นั้นมีผลต่อประสิทธิภาพของยีนที่แตกต่างกัน โดยความหลากหลายของสายพันธุ์อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่แตกต่างหรือผิดปกติของสัตว์สายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากจีโนมของสัตว์มีทั้งส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ซึ่งสามารถพบได้ในสัตว์ทุกตัว ทุกสายพันธุ์ หรือทุกสปีชีส์ และยังมีส่วนที่มีลำดับเบสแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งส่วนดังกล่าวอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน จึงเป็นสาเหตุให้เกิด

ความแตกต่างจากงานวิจัยอื่น ในลักษณะของการต้านทานโรคและน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

2. ผลจากการคัดเลือกลักษณะในการต้านทานโรค (MHC gene) ต่อน้ำหนักตัว พบว่าการคัดเลือกลักษณะในการต้านทานโรค ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของ MHC genotype ซึ่งควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอยู่ แต่ MHC gene ไปมีผลเกี่ยวเนื่องต่อลักษณะทางการผลิต เช่น น้ำหนักตัว อัตราการผสมติด อัตราการฟัก และผลผลิตไข่ เป็นต้น ผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการคัดเลือกให้มีลักษณะการผลิตสูง เช่น การคัดเลือกไก่ให้มีน้ำหนักตัวสูง มีผลกับความสัมพันธ์ในทางลบกับประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน (negative correlation)

3. การประเมินศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากรไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว จากข้อมูลที่ระบุความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการบริหารจัดการสายพันธุ์ การคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในประชากรตามธรรมชาติ และการดำรงรักษาพันธุ์ที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง MHC gene ซึ่งเป็น SNPs แต่ละตำแหน่งกับลักษณะการต้านทานโรคและน้ำหนักตัว ควรจะนำตำแหน่ง SNPs ทั้ง 16 ตำแหน่ง มาศึกษาควบคู่กันเพื่อประมาณค่าอิทธิพลของ SNPs แต่ละตำแหน่ง เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาไปเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในอนาคต

ข้อเสนอแนะ MHC gene มีผลต่อลักษณะการต้านทานโรคและน้ำหนักตัวในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว จึงคาดว่ามีความสามารถในการนำยีนดังกล่าวมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ช่วยในการคัดเลือกในประชากรไก่พื้นเมือง ดังนั้นในการศึกษาหรือพัฒนาเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกทางพันธุกรรมในการต้านทานโรค เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ลดค่าใช้จ่ายจากการใช้วัคซีนและลดการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่าง ๆ ผลที่ได้จากการศึกษาที่สำคัญอีกอย่างคือพบว่าลักษณะการต้านทานโรค เป็น negative correlation กับลักษณะการผลิต เนื่องมาจากนักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ความสำคัญในการคัดเลือกสัตว์จากอัตราการเจริญเติบโต มากกว่าที่จะคัดเลือกสัตว์จากความสามารถในการต้านทานโรค ชี้ให้เห็นว่าการคัดเลือกทางพันธุกรรมควบคู่กันระหว่างความสามารถในการต้านทานโรคกับน้ำหนักตัวจะทำให้ความสามารถในการผลิตอยู่ในระดับมาตรฐานและยังทำให้ไก่มีความสามารถในการต้านทานโรคได้ดียิ่งขึ้น การศึกษา SNPs จึงน่าจะเป็นวิธีการยั่งยืนเพื่อที่จะทำให้เกิดความมั่นใจที่จะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมในการใช้เป็น เครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ สิ่งที่คาดหวังในอนาคตคือ ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในไก่หลาย ๆ สายพันธุ์ในประเทศไทย เช่นไก่สายพันธุ์การค้าหรือไก่ลูกผสมพื้นเมือง จากตำแหน่ง SNPs ที่ค้นพบจากการศึกษาว่ามีตำแหน่ง SNPs ตำแหน่งใดที่เหมือนและ

แตกต่างกันของ MHC gene กับการต้านทานโรคและน้ำหนักตัว เพื่อให้มีประโยชน์สูงสุดในการใช้ SNPs เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกไก่ในลักษณะของการต้านทานโรคกับลักษณะทางการผลิต และยังมีประเด็นที่ควรจะศึกษาเพิ่มเติมในการพบความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยากับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล อาจจะนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับรูปแบบยีน MHC เพื่อที่จะทดสอบความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างภูมิคุ้มกันกับค่าโลหิตวิทยาว่าเป็นจริงหรือไม่ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กฤษณา จรรยาพูน (2548). **พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาการภูมิคุ้มกัน**. พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์แอนนาออฟเซต. ขอนแก่น

เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ (2526). การศึกษาความต้านทานโรคของไก่พื้นเมืองและความต้านทานต่อโรคนิวคาสเซิล. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. **แก่นเกษตร 16**. หน้า 45-50.

นภาธร ชื่นบาน (2543). **เอช แอล เอ**. พิมพ์ที่ บริษัทพีพีเอส ซายน์เทคนิคัล จำกัด. เขตบางกอกน้อย. กรุงเทพฯ. หน้า 85-104.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ (2548). การเปรียบเทียบโปรแกรมการให้วัคซีนนิวคาสเซิลในไก่กระทง. **สัตวแพทยสาร 56**. หน้า 32-40.

พิทัย กาญบุตร (2544). **คู่มือการใช้ Reflotron เครื่องตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดแบบ Dry-Chemistry**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ไพศาล สิทธิกรกุล (2548). **วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย**. บริษัท พิมพ์ดี จำกัด. กรุงเทพ.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (2000). **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: WB Saunders.

Abdi-Hachesoo, B., Talebi, A., Asri- Rezaei S. and Basaki M. (2013). Sex related differences in biochemical and hematological parameters of adult indigenous chickens in Northwest of Iran. **J Anim Sci Adv.** 3(10): 512-516.

Alder R. and Peter S. (2001). Controlling Newcastle Diseasein Village ChickensA Field Manual. From **www.poultry.kvl.dk-research-publications-misc-chapter_4**.

Alexander, D.J. and Jones, R.C. (2001). **Newcastle disease. In: Poultry Diseases. 5th ed. Jordan**, F.T.W., Pattison, M., Alexander D. and Faragher T. WB Saunders, London. P. 257-271.

Barman L. R. (2002). An epidemiological and experimental study of Newcastle Disease Virus in Village chickens of Bangladesh. From **www.poultry.kvl.dk-research.**

Bahman Abdi H., Alireza T. and Siamak A. R. (2011). Comparative Study on Blood Profiles of Indigenous and Ross-308 Broiler breeders. **Global Veterinaria 7 (3)**: 238-241.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Biochek. 2008. **Better diagnostics for better result**.

Bloom S. E., and L. D. Bacon (1995). Linkage of the major histocompatibility (B) complex and the nucleolar organizer in the chicken. **J. Heredity.** 76:146.

Boonyanuwat, K., Thummabutra, S., Sookmanee, N., Vatchavalkhu, V., Siripholvat, V. and Mitsuhashi, T. (2006). Influences of MHC Class II haplotypes on Avian influenza traits in Thai indigenous chicken. **Journal of Poultry Science**. 43: 120-125.

Bounous, D. I. and N. L. Stedman. (2000). **Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey.** In B.F.Feldman, J.G.Zinkl and N.C.Jain, Schalm's Veterinary Hematology. Fifth edition. 1147-1154, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Maryland USA.

Campbell, T.W (1995). **Avian Hematology and Cytology.** Second edition. Iowa State University Press. Ames. Iowa 50014.

Carol, M. V., Icolev E. A, Vidv L. and Theresl A. B. (2000). **Stress, Corticosterone and Heterophil to Lymphocyte ratio in Free-living adelie .** The Condor 102.392-400.

Chen, Y., Lillehoj, H.S., Hsu, C.H., Carpenter, S.L. and Lamont, S.J. (1997). Functional characterization of a chicken major histocompatibility complex class II |3 gene promoter. **Immunogenetics**. 45, 242-248.

Clinical Diagnostic Division. (1990). **Veterinary Reference Guide, Eastman Kodak Company, Rochester.** New York.

Division of Animal Husbandry. (2003). **Characteristics of Thai indigenous chicken.** Division of Animal Husbandry. Department of Livestock Development.Bangkok. Thailand. 55 pp.

Daghir, N.J. (1995). **Nutrient reguirements of poultry at high temperatures. In: Poultry Production in Hot Climates (Ed. N. J. Daghir)**. University Press, Cambridge, MA. p. 112.

Dorf, M. E. (1981). **The role of the major histocompatibility Complex HA immunobiology Garland Press**. New York, NY.

Du M., Chen S., Liu Y. and Yang J. (2011). MHC polymorphism and disease resistance to vibrio anguillarum in 8 families of half-smooth tongue sole (Cynoglossus semilaevis). **BMC Genetics.** 12:78.

Fariba I. S. 2011. A molecular genetic survey of immune response genes and biodiversity of industrial and non-industrial chicken. **A thesis submitted in partial fulfillment of the**

requirement for the degree of doctor of Philosophy in the faculty of Graduate studies (Animal Science). The University of British Columbia.

Fulton J.E., Helle R., Juul-Madsen., Christopher M. A. ., Amy M. M. .,James A. Arthur ., Neil P. O'Sullivan ., Robert L. and Taylor Jr. (2006). Molecular genotype identification of the Gallus gallus Major Histocompatibility complex. **Immunogenetics** 58: 407–421.

Gholamreza N., Atefeh E. and Neda B. (2013). LEI0258 Microsatellite Variability in Khorasan, Marandi, and Arian Chickens. **Biochem Genet** , 51:341–349.

Graczyk, S., Wieliczko, A., Pliszczak, K. A. and Janaczyk B. (2008). Radial Segmentation of Blood Lymphocytes Nuclei in Pheasanta Vaccinated against Newcastle Disease and Haemorrhagic Enteritis. **ACTA Vet.** 77: 625-630.

Guo X. L., Zheng H., Li X., Ying L., Gu Z., Zheng C., Wei Z., Wang J., Zhou R. and Li L. (2012). Genetic variation of major histocompatibility complex BLB2 gene exon 2 in Hebei domestic chicken. **Veterinary Science.** 92: 76–79.

Haeri M., Read L. R., Wikie B. N. and Sharif S. (2005). Identification of peptides associated with chicken major histocompatibility complex class II molecules of B21 and B19 haplotypes. **Immunogenetics.** 56, 854–859.

Hala K., Boyd R. and Wick G. (1981). Chicken Major Histocompatibility Complex and Disease. **J. Immunol**. 14, 607-61.

Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y. and Erf G. F. (2006). Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg white and chicks in meat lines of chickens. **Poul. Science.** 85: 1364-1372.

Hansen S. B. and Kamilla B. (2003). Avian immune response in relation to Newcastle disease in parasite infected chickens. **MSc thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University.** Denmark.

Harr. K. E. (2002). Clinical chemistry of companion avian species. A review. **Vet. Clin**. Path., 31: 140-151.

Horning G., Rasmussen S., Permin A. and Bisgaard M., (2003). Investigation on the influenceOf helminth parasites on vaccination of chickens against Newcastle Disease virus under village condition. Trop. **Animal Health Prod.** 35: 415-424.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ibrahim Albokhadaim, Thnaian Althnaian and S. M. El-Bahr. (2012). Investigation of Selected Biochemical Parameter of Local Chickens with Different Age and Sex in Al-ahsa, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 15 (17): 827-832.

Jain, N. C. (1993). **Essential of Veterinary Hematology, Lea& Febiger.** Philadelphia.

Juul-Madsen H. R., Dalgaard T. S., Røntved C. M., Jensen K. H., and Bumstead N. (2006). Immune Response to a killed Infectious Bursal Disease Virus Vaccine in Inbred Chicken Lines with different Major Histocompatibility Complex Haplotypes. **Poultry Science**. 85:986–998.

Kuhn, E. R., Vleurick, L., Edery, M., Decuypere, E. and Darras, V. M. (2002). Internalisation of the chicken growth hormone receptor complex and its effect on biological functions. Comparative biochemistry and physiology. Part B, **Biochemistry and molecular biology**. 132: 299-308.

Kuhnlein, U., Ni, L., Weigend, S., Gavora, J. S., Fairfull, R. W. and Zadwomy, D. (1997). DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: Response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics.** 28: 1161-1167.

Lakshmanan N., Gavora J.S. and Lamont S.J. (1997). Major histocompatibility complex class II DNA polymorphisms in chicken strains selected for Marek's disease resistance and egg production or for egg production alone. **Poult. Sci.** 76:1517-1523

Lamont S. J. (1989). The chicken Major Histocompatibility Complex in disease resistance and poultry breeding. **J. Dairy Sci.** 72: 1328-1333.

Lamont S. J. (1998). The chicken major histocompatibility complex and disease. **Rev. sci. tech.** Off. int. Epiz.17 (1), 128-142.

Li L, Johnson LW and Ewald SJ. (1997). Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chicken. **Animal Genetics.** 28: 258-267.

Li F. W., LU Y., Lei Q. X., Zhou Y.,Han H. X., Li G. M., Wu B., Cao D. G. and Wang S. B. (2012). Association between Immune Trait and MHC B-F Gene in Shandong Indigenous Chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. 11 (19): 3481-5593.

Liu Y., Guo B. C., Guo Shun H., Qin L., Qi X. and Guo H. C. (2011). Genetic variation at Exon2 of TLR4 gene and its association with resistant traits in chicken. **African Journal of Biotechnology.** Vol. 10(42): 8260-8266.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Liu L. B., Wu C. M., Wen J., Chen J. L., Zheng M. Q. and Zhao G. P. (2009). Association of SNPs in exon 2 of the MHC B-F gene with immune traits in two distinct chicken populations: Chinese Beijing-You and White Leghorn. **Acta Agriculturae Scand Section A.** 59: 4-11.

Livant EJ, Zheng D, Johnson LW, Shi W, Ewald SJ. (2001). Three new MHC haplotypes in broiler breeder chickens. **Animal Genetics**. 32**;** 123–131.

Lwelamira J., Kifaro G. C., Gwakisa P. S. and Msoffe P. L. M., (2008). Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response against newcastle disease virus vaccine and body weight in two Tanzania chicken ecotypes. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 7 (6), pp. 714-720.

Msoffe P.L.M., Mtambo M.M.A., Minga U.M., Gwakisa P.S., Mdegela R.H. and Olsen J.E. (2002). Productivity and Natural Disease Resistance Potential of Free-ranging Local chicken Ecotypes in Tanzania. **Livestock Research for Rural Development 14 (3).**

Naila C., M. Farooq, F. R. Durrani, A. Asghar and Pervez. (2001). Prevalence and Economic Ramification of Newcastle Diseasein Backyard Chicken in Charsadda, NWFP, Pakistan. **Journal of Biological Sciences**. 1 (5): 421-424.

Nitish S., Chisato K., Masahide N. and Yoshio Y. (1998). Immunocompetences in Two Pairs of B Congenic Chicken Lines. Jpn. **Poult. Sci.** 35: 211-219.

Okeudo N. J., Okoli I. C. and Igwe G. O. F. (2003). Hematological Charcteristics of Ducks (Cairina moschata) of Southeastern Nigeria. **Tropicultura**. 21 (2), 61-65.

Pampori Z. A. and S. Iqbal. (2007). Haematology, Serum Chemistry and ElectrocardiographicEvaluation in Native Chicken of Kashmir, Int. **J. of Poul. Sci.** 6 (8): 578-582.

Pierson F.W. (2000). **Laboratory Techniques for Avian Hematology, in B.F.Feldman, J.G. Zinkl and N.C. Jain, Schalm's Veterinary Hematology.** Fifth edition. 1145-1146, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Maryland USA.

Pieter W. K. and Stephen C. B. (2000). **Relationships between genetic change and infectious disease in domestic livestock.** BSAS occasional publication. birdflubook.com.

Pinard-van der Laan. (2002). Immune modulation: the genetic approach. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 87: 199-205.

Pinchuk George (2002). **Immunology.** The McGraw-Hill companies, Inc. USA.

Pink J.R.L., Droege W., Hala K., Miggiano V.C. & Ziegler A. (1977). A three-locus model for the chicken majorhistocompatibility complex. **Immunogenetics**. 5; 203-216.

Qian-Fu Gan, Lu-Pei Zhang, Jun-Ya Li, Guan-Yu Hou, Heng-De Li, xue Gao, Hong-Yan Ren, Jin-Bao Chen and Shang-Zhong xu . (2008). Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. **J Appl Genet.** 49: 251-255.

Rauw, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N. and Grommers, F.J. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. **Livestock Production Science**. 56:15-33.

Riddell C. (2012).Comparative Anatomy, Histology and Physiology of the Chicken (online), Department of Pathology,Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, CANADA S7N 0W0**,** :**http://cal.vet.upenn.edu/projects/poultry/syllabus/page37_44.htm**

Rifu X., Kui L., Guohong C., Hui X., Bayangzong Q., Changchun L. and Bang L. (2007). Characterization of Genetic Polymorphism of Novel MHC B-LB II Alleles in Chinese Indigenous Chickens. **Journal of Genetics and Genomics.** 34(2): 109-118.

Sebastian Nowaczewski and Helena Kontecka. (2011). Haematological indices, size of erythrocytes and haemoglobin saturation in broiler chickens kept in commercial conditions. **Animal Science Papers and Reports**. vol. 30 , no. 2, 181-190.

Seal B.S., King D.J. & Sellers H.S. (1999). The avian response to Newcastle disease virus.Dev .Comp. **Immunol.** 24(2-3): 257-268.

Simaruk S., Orawan C. and Worapol A. (2004). Hematological, electrolyte and serum biochemical values of Thai indigenous chicken (Gallus domesticus) in northeastern Thailand. **Songklanakarin J. Sic. Technol.** 26(3): 425-430.

Suchint S., Orawan C. and Worapol A. (2004). Hematological, electrolyte and serum biochemical values of Thai indigenous chicken (Gallus domesticus) in northeastern, Thailand. **Songklanakarin J. Sic. Technol.** 26(3): 425-430.

Sunday O. P., Hollinshead H. G., Ikhide G. I., Brilliant O. A. and Christian O. N. (2011). Haematological studies on frizzled and naked genotypes of Nigerian native chickens. **Trop Anim Health Prod**. 43: 631-638.

Suzuki K., Matsumoto T., Kobayashi E., Uenishi H., Churkina I., Plastow G., Yamashita H., Hamasima N., and Mitsuhashi T. 2010. Genotypes of chicken major histocompatibility complex B locus associated with regression of Rous sarcoma virus J-strain tumors. **Poultry Science**. 89:651–657.

Twinkle Jasmine Masilamani. (2003). IDENTIFICATION OF GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH MAREK'S DISEASE RESISTANCE IN CHICKENS. **A thesis submitted to McGill University in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science.** Department of Animal Science McGill University Montreal Canada.

Weigend S., Matthes S., Solkner J. and Lamont, S. J. (2001). Resistance to Marek's disease virus in white leghorn chickens: effects of avian leukosis virus infection genotype, reciprocal mating and major histocompatibility complex. **Poultry Science**. 80: 1064-1072.

Welniak L. A., Sun R. and Murphy W. J. (2002). The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. **Journal of Leukocyte Biology**. 71; 381-387.

Weigend S. and Lamont S. J. (1999). Analysis of MHC Class II and Class IV Restriction Fragment Length Polymorphism in Chicken Lines Divergently Selected for Multitrait Immune Response. **Poultry Science**. 78:973–982.

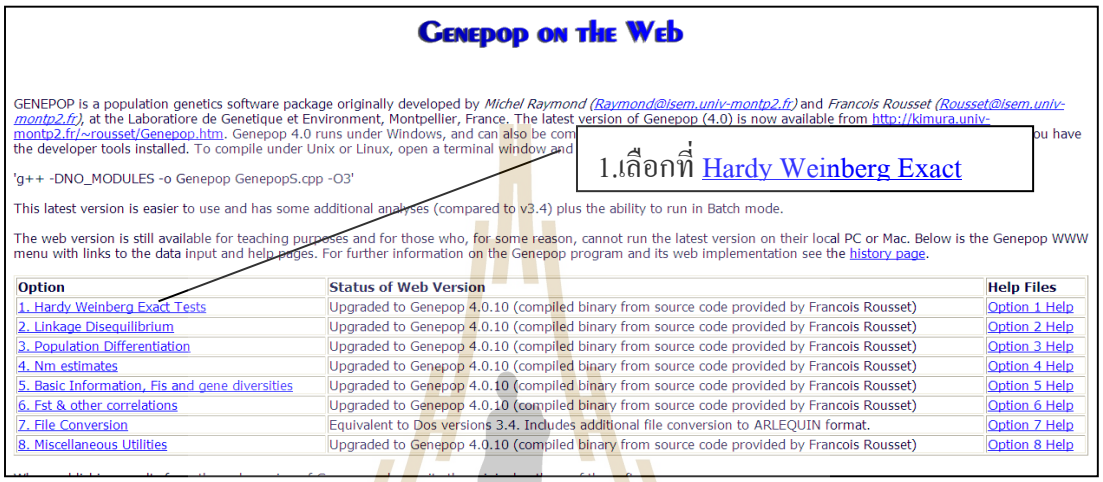
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

วิธีการใช้โปรมแกรม Gene pop on The wep

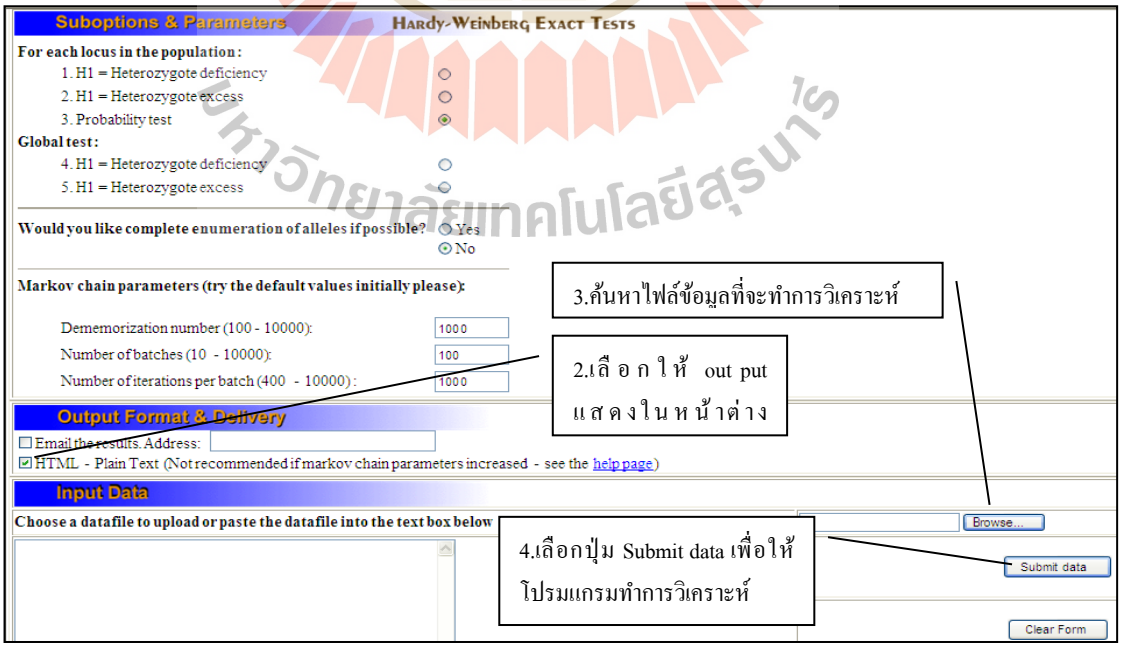
1. การหาทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium

1.1 เข้าไปที่ http://genepop.curtin.edu.au/ แล้วเลือกไปที่ Hardy Weinberg Exact Tests



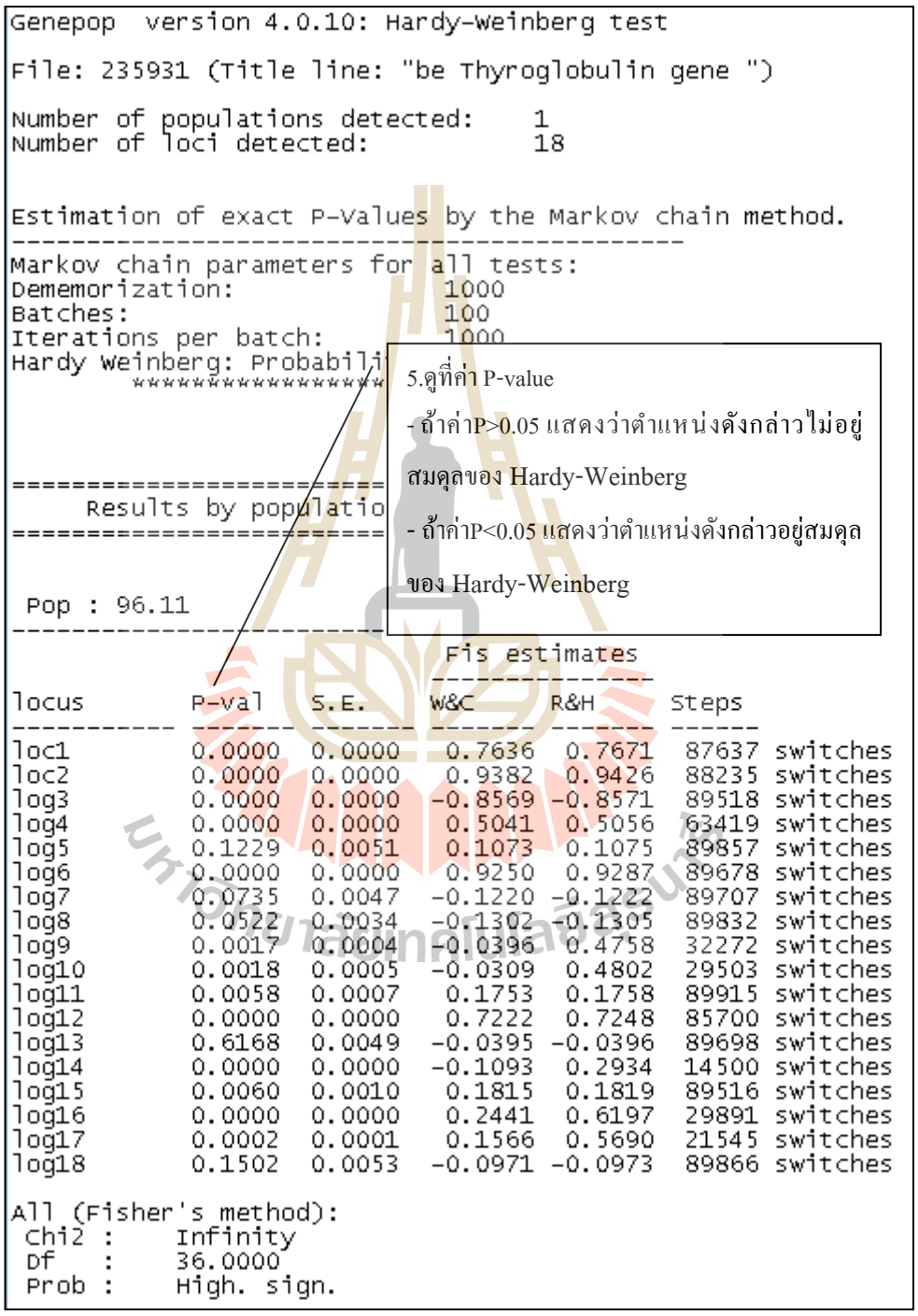
ภาพที่ 1 แสดงการเข้าไปยัง Hardy Weinberg Exact Tests

1.2 แล้วโปรมแกรมจะแสดงหน้าต่างใหม่ และเลือกตามขั้นตอนดังภาพ



ภาพที่ 2 แสดงการเลือกใช้เมนูของ Hardy Weinberg Exact Tests

1.3 Out put ที่ได้จากทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium จากโปรมแกรม GENEPOP



```
Genepop  version 4.0.10: Hardy-Weinberg test

File: 235931 (Title line: "be Thyroglobulin gene ")

Number of populations detected:    1
Number of loci detected:           18


Estimation of exact P-Values by the Markov chain method.
--------------------------------------------------
Markov chain parameters for all tests:
Dememorization:                 1000
Batches:                        100
Iterations per batch:           1000
Hardy Weinberg: Probabili
        ********************


==========================
     Results by populatio
==========================


 Pop : 96.11
--------------------------

                                Fis estimates
                                --------------
locus       P-val    S.E.       W&C      R&H      Steps
----------- -------- -------- -------- -------- ------
loc1        0.0000   0.0000    0.7636   0.7671   87637 switches
loc2        0.0000   0.0000    0.9382   0.9426   88235 switches
log3        0.0000   0.0000   -0.8569  -0.8571   89518 switches
log4        0.0000   0.0000    0.5041   0.5056   63419 switches
log5        0.1229   0.0051    0.1073   0.1075   89857 switches
log6        0.0000   0.0000    0.9250   0.9287   89678 switches
log7        0.0735   0.0047   -0.1220  -0.1222   89707 switches
log8        0.0522   0.0034   -0.1302  -0.1305   89832 switches
log9        0.0017   0.0004   -0.0396   0.4758   32272 switches
log10       0.0018   0.0005   -0.0309   0.4802   29503 switches
log11       0.0058   0.0007    0.1753   0.1758   89915 switches
log12       0.0000   0.0000    0.7222   0.7248   85700 switches
log13       0.6168   0.0049   -0.0395  -0.0396   89698 switches
log14       0.0000   0.0000   -0.1093   0.2934   14500 switches
log15       0.0060   0.0010    0.1815   0.1819   89516 switches
log16       0.0000   0.0000    0.2441   0.6197   29891 switches
log17       0.0002   0.0001    0.1566   0.5690   21545 switches
log18       0.1502   0.0053   -0.0971  -0.0973   89866 switches

All (Fisher's method):
 Chi2 :    Infinity
 Df   :    36.0000
 Prob :    High. sign.
```

5.ดูที่ค่า P-value

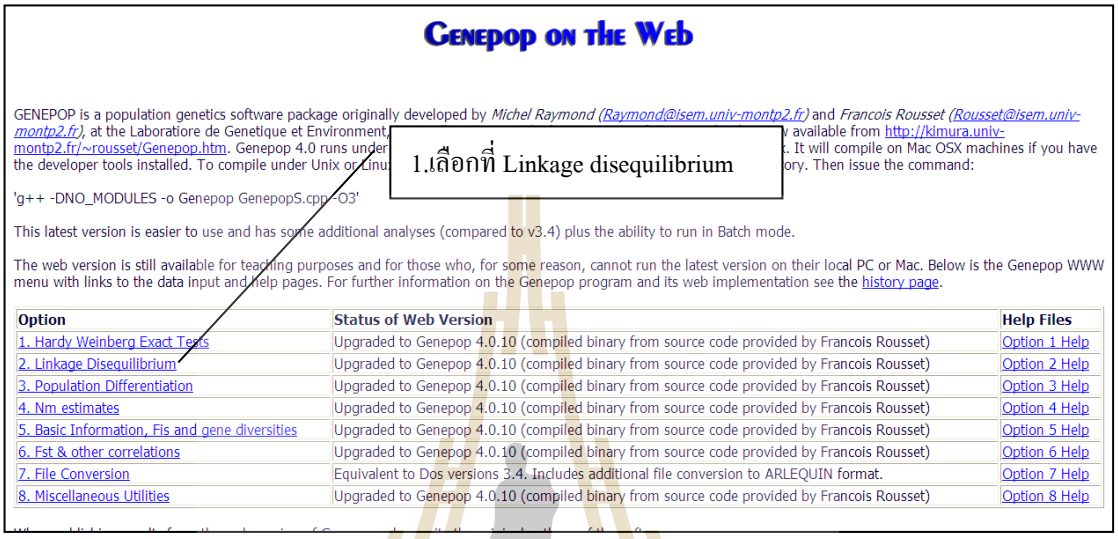
- ถ้าค่าP>0.05 แสดงว่าตำแหน่งดังกล่าวไม่อยู่สมดุลของ Hardy-Weinberg

- ถ้าค่าP<0.05 แสดงว่าตำแหน่งดังกล่าวอยู่สมดุลของ Hardy-Weinberg

ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบ Hardy Weinberg

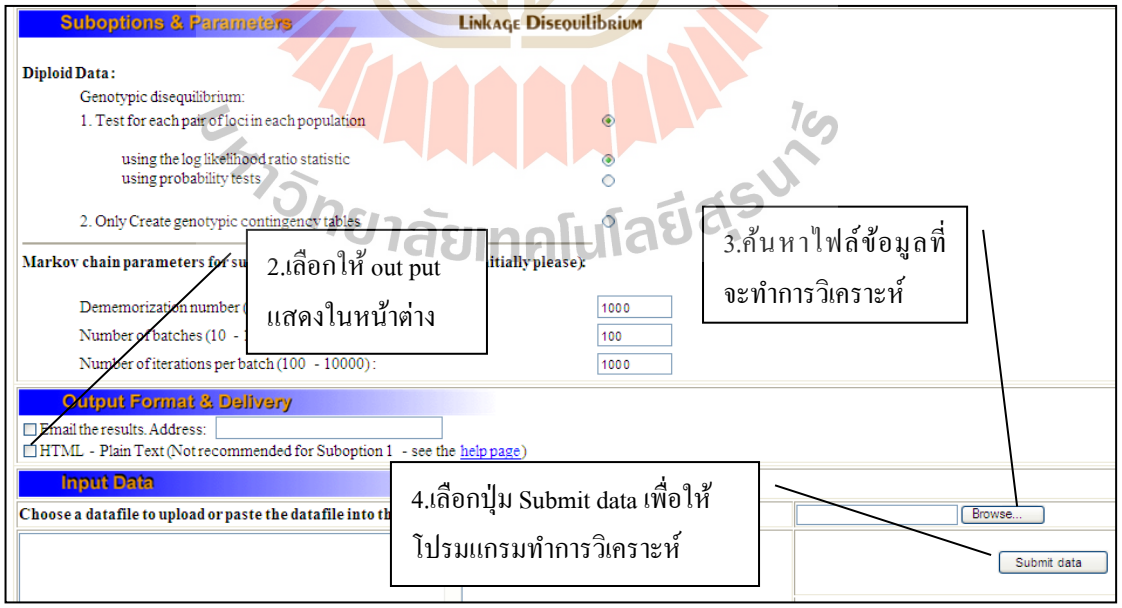
2. การทดสอบ Linkage disequilibrium

2.1 เข้าไปที่ http://genepop.curtin.edu.au/ แล้วเลือกไปที่ Linkage Disequilibrium



ภาพที่ 4 แสดงการเข้าไปยัง Linkage Disequilibrium เพื่อทำการทดสอบ

2.2 แล้วโปรมแกรมจะแสดงหน้าต่างใหม่ และเลือกตามขั้นตอนดังภาพ



ภาพที่ 5 แสดงการเลือกใช้เมนูของ Linkage Disequilibrium

2.3 Out put ที่ได้จากทดสอบ Linkage disequilibrium จากโปรมแกรม GENEPOP

Genepop version 4.0.10, Genotypic linkage disequilibrium

Fil ...bulin gene ")

Num

Num

Max

5.ดูที่ค่า P-value

- ถ้าค่าP>0.05 แสดงว่าทั้งสองตำแหน่งไม่อยู่ Linkage disequilibrium เดียวกัน

- ถ้าค่าP<0.05 แสดงว่าทั้งสองตำแหน่งอยู่ Linkage disequilibrium เดียวกัน

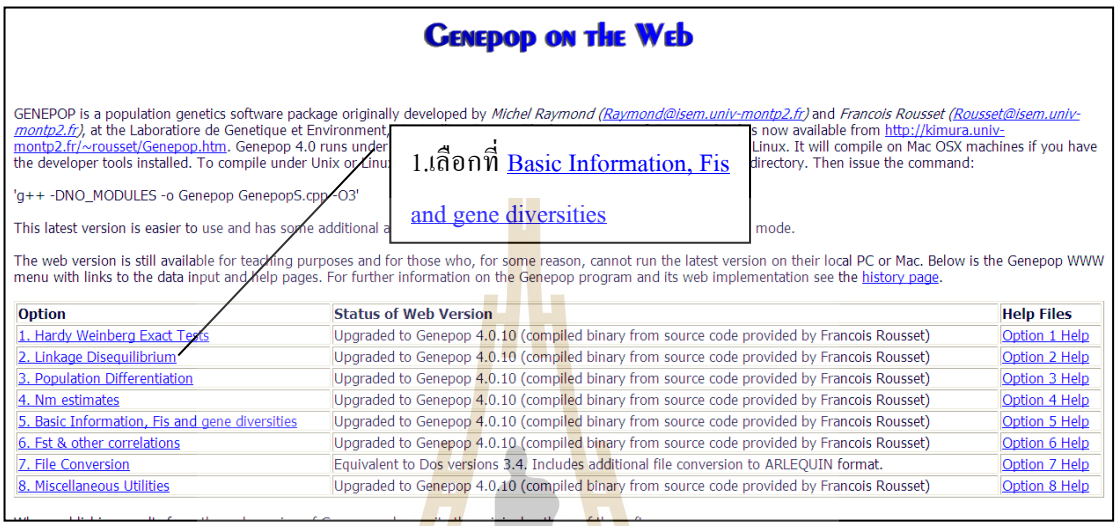
Pop	Locus#1	Locus#2	P -Value	S.E.	Switches
96.11	loc1	loc2	0	0.000000	62867
96.11	loc1	log3	0.000290	0.000172	39738
96.11	loc2	log3	0.002520	0.000584	31189
96.11	loc1	log4	0.154900	0.004117	46019
96.11	loc2	log4	0.059480	0.003387	34309
96.11	log3	log4	1.000000	0.000000	24240
96.11	loc1	log5	0.951230	0.002018	78176
96.11	loc2	log5	0.484170	0.008034	68585
96.11	log3	log5	0.082080	0.003267	58209
96.11	log4	log5	0.000000	0.000000	68416
96.11	loc1	log6	0.000000	0.000000	65249
96.11	loc2	log6	0.000000	0.000000	48361
96.11	log3	log6	0.000070	0.000054	37366
96.11	log4	log6	0.004060	0.000750	48906
96.11	log5	log6	0.123060	0.006149	73427
96.11	loc1	log7	0.348300	0.008389	76764
96.11	loc2	log7	0.494410	0.008472	66244
96.11	log3	log7	0.021830	0.001531	55725
96.11	log4	log7	0.000000	0.000000	66748
96.11	log5	log7	0.000000	0.000000	82887
96.11	log6	log7	0.003310	0.000963	71503

ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบ Linkage Disequilibrium

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

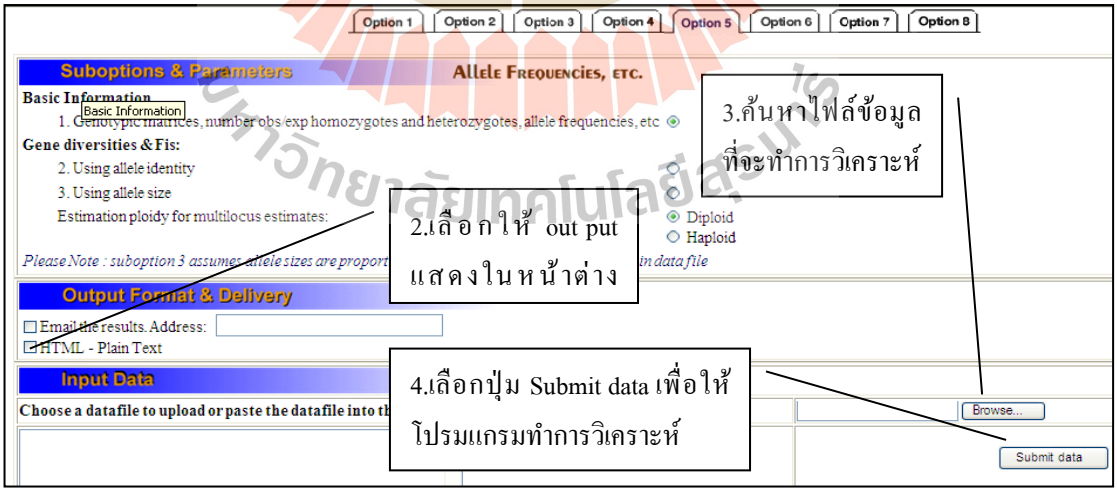
3. การความถี่จีโนไทป์

3.1 เข้าไปที่ http://genepop.curtin.edu.au/ แล้วเลือกไปที่ Basic Information, Fis and gene diversities



ภาพที่ 7 แสดงการเข้าไปยัง Basic Information, Fis and gene diversities เพื่อหาความถี่จีโนไทป์

3.2 แล้วโปรมแกรมจะแสดงหน้าต่างใหม่ และเลือกตามขั้นตอนดังภาพ



ภาพที่ 8 แสดงการเลือกใช้เมนูของ Basic Information, Fis and gene diversities

3.3 Out put ที่ได้จากหา ความถี่จีโนไทป์ จากโปรมแกรม

```
Fis: computed as in Weir & Cockerham (1984);
also as in Robertson & Hill (1984).
============================================
  Detailed analyses
============================================

 Pop: 96.11    Locus: loc1
--------------------------------------------

     Genotypic matrix:
         2   4

       ________
     2 108
     4  21  60

    Genotypes  Obs.      Expected
     2 , 2      108     74.1804
     4 , 2      21      88.6393
     4 , 4      60      26.1804


    Expected number of homozygotes   : 100.3607
    Observed number of homozygotes   : 168
    Expected number of heterozygotes: 88.6393
    Observed number of heterozygotes: 21



    Allele frequencies and Fis:
    ------------------------------------------------------------
                                                    Fis
                                                    ---------------
    Allele    Sample count      Frequency    W&C        R&H
     2            237              0.6270    0.7636
     4            141              0.3730    0.7636
    Tot           378                        0.7636     0.7671
```

ภาพที่ 9 แสดงผลความถี่จีโนไทป์ของ SNPs ตำแหน่งต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวคีญาภัทร์ กองร้อย เกิดเมื่อวันที่ 3 พฤศจิกายน พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เริ่มการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนอนุบาลวัชรชัย อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนวิทยานุกูลนารี อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2549 และศึกษาต่อระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี