การผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ที่มีคุณภาพ ด้านการศึกษาในหลอดทดลอง

นางสาวจีราพร บัวชู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2549

IN VITRO PRODUCTION OF SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS

Jeeraporn Buachoo

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

Suranaree University of Technology

Acadamic Year 2006

การผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ที่มีคุณภาพ ด้านการศึกษาในหลอดทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
ประธานกรรมการ

_____

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

_____

(รศ. ดร.ทัศนีย์ สุโกศล)
กรรมการ

_____

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

_____

(รศ. ดร.เสาวณีย์ รัตนพานี)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จีราพร บัวชู : การผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ที่มีคุณภาพ ด้านการศึกษาในหลอดทดลอง (*IN VITRO* PRODUCTION OF SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. น.สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์, 115 หน้า.

งานวิจัยการผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่มีคุณภาพ ด้านการศึกษาในหลอดทดลอง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ในการทดลองแรกเป็นการผลิตแอนติบอดีไข่แดงในรูปแบบต่างๆ คือ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder โดยการใช้ inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแม่ไก่ จากนั้นนำมาศึกษาปริมาณ total IgY และ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ non-specific extracted IgY, WSF non-specific IgY powder และ whole egg non-specific IgY powder โดยใช้วิธี ELISA พบว่า ไข่แอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ ที่ได้จากแม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีปริมาณ total IgY และ specific IgY มากกว่าไข่แอนติบอดีที่ได้จากแม่ไก่ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ในการทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในไข่แอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และศึกษาผลของ specific IgY ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. ผลการศึกษาพบว่า การใช้ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ไข่แอนติบอดีที่ได้จากแม่ไก่ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า specific IgY ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

JEERAPORN BUACHOO : *IN VITRO* PRODUCTION OF SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. BANCHORN LIKITDECHAROTE, Ph.D. 115 PP.

SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES/IMMUNOGLOBULIN Y (IgY)/ *S. ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS/WATER SOLUBLE FRACTION (WSF)/CROSS REACTIVITY

In this research on the *in vitro* production of specific egg yolk antibodies against *S. enterica* serovar Enteritidis, 2 experiments were conducted. The first experiment studied the production of specific egg yolk antibodies in different forms which were specific extracted IgY, WSF specific IgY powder and whole egg specific IgY powder by immunization with inactivated whole cell antigen of *S. enterica* serovar Enteritidis. A comparison of the total IgY and *S. enterica* serovar Enteritidis-specific IgY concentrations was made for immunized groups and non-immunized groups which were non-specific extracted IgY, WSF non-specific IgY powder and whole egg non-specific IgY powder by the ELISA method. The results showed that egg antibodies from immunized groups had significantly higher total IgY and specific IgY than non-immunized groups ($p<0.01$). In the second experiment, the efficacy of *S. enterica* serovar Enteritidis-specific IgY in varieties of egg antibodies which affected the *S. enterica* serovar Enteritidis growth inhibition was studied and also the cross reactivity that affected the *E. coli* and *Lactobacillus* sp. growth. The results showed that specific extracted IgY, WSF specific IgY powder and whole egg specific

IgY powder could inhibit the *S. enterica* serovar Enteritidis growth significantly when compared to the control group ($p<0.05$). On the other hand, the non-immunized egg antibodies had no effect on the growth of *S. enterica* serovar Enteritidis. Moreover, these specific IgY had no effect on the growth of *E. coli* and *Lactobacillus* sp. when compared to the control group.

School of Animal Production Technology

Academic Year 2006

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินการทดลองที่มีค่ายิ่งต่อวิทยานิพนธ์และการทำงานของข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ สุโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์และมีค่าต่อวิทยานิพนธ์และการทำงานของข้าพเจ้า ตลอดจนกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเขียนและตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการวางแผนการดำเนินการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร ที่กรุณาในการให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิยานันท์ อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ ดร.พิพัฒน์ เหลืองลาวัลย์ อาจารย์ ดร.สุนิศา เข็มผกา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเขียนและตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่บุคลากรฟาร์มสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องของการจัดการสัตว์ทดลอง และขอขอบคุณพี่บุคลากรประจำอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย โดยเฉพาะนางสาววัลภา ลาภภักดี นางสาวคีญาภัทร์ กองร้อย และนางสาวนิชนันท์ ชูเกิด เพื่อนและน้องที่คอยรับฟังปัญหา และเป็นกำลังที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่ให้ความรักความปรารถนาดี คอยห่วงใย เป็นกำลังใจ อีกทั้งยังเป็นที่ปรึกษาและเป็นแรงผลักดันที่สำคัญให้มีความตั้งใจและความอดทนในการทำงาน จนสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

จีราพร บัวชู

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญ.....จ

สารบัญตาราง.....ฎ

สารบัญภาพ.....ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฑ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....5

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....5

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....5

1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....5

1.6 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย.....6

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Salmonella* spp.....7

2.2 แหล่งที่พบเชื้อ *Salmonella* spp.....8

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อ.....8

2.4 พยาธิกำเนิดของเชื้อ.....9

2.5 การสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับวัคซีน.....9

2.5.1 ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ.....9

2.5.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ.....10

2.5.2.1 ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ.....10

2.5.2.1.1 ภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก.....11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 วิธีดำเนินการวิจัย.....33

3.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง.....33

3.1.2 การเตรียมเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis……..…….34

3.1.3 การเตรียม whole cell antigen ในการเตรียมวัคซีน.....35

3.1.4 การเตรียม whole cell antigen สำหรับใช้วิเคราะห์ ELISA……...35

3.1.5 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford……..36

3.1.6 การเตรียมวัคซีนและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในไก่.....38

3.1.7 การเก็บตัวอย่างไข่.....38

3.1.8 การแยกส่วนของ water soluble fraction ออกจากไข่แดง.....39

3.1.9 การทดสอบหาความเข้มข้นของ negative control และ positive control ที่เหมาะสมสำหรับการเริ่มทำ serial dilution……40

3.1.10 การทดสอบหาระดับ antibody titer ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis…….……42

3.1.11 การเตรียมไข่ไก่ในรูปแบบต่างๆ…….43

3.1.11.1 เตรียม whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder……....44

3.1.11.2 เตรียม WSF specific IgY powder และ WSF non specific IgY powder……....44

3.1.11.3 การเตรียม specific extracted IgY และ non specific extracted IgY…….……...44

3.1.11.3.1 การเปรียบเทียบวิธีการในการตกตะกอนแอนติบอดี…….45

3.1.11.3.1.1 ตกตะกอนด้วย AMS……45

3.1.11.3.1.2 ตกตะกอนด้วย12% PEG……..…45

3.1.11.3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE……..…46

3.1.12 การตรวจสอบปริมาณ total IgY โดยวิธี ELISA……..…...47

3.1.13 การทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis…….…48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.14 การวิเคราะห์ข้อมูล……...50

3.2 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....50

3.2.1 ระดับของ IgY antibody titer ใน WSF……..……50

3.2.2 ปริมาณแอนติบอดีที่มีใน whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder……...……..53

3.2.3 ปริมาณแอนติบอดีที่มีใน WSF specific IgY powder และ WSF non specific IgY powder……..…...54

3.2.4 ปริมาณแอนติบอดีที่มีใน specific extracted IgY และ non specific extracted IgY……...55

3.2.4.1 ผลการศึกษาวิธีการในการตกตะกอนแอนติบอดี IgY บริสุทธิ์ 56

3.2.4.2 ปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis……58

3.3 สรุปผลการทดลอง……59

4 การศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ในรูปแบบต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp……..……..…...60

4.1 คำนำ.....60

4.2 วัตถุประสงค์.....61

4.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....62

4.3.1 ศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณของ specific extracted IgY ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis……62

4.3.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย……62

4.3.1.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY……62

4.3.1.3 ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วย specific extracted IgY……..63

4.3.2 ศึกษาประสิทธิภาพของ WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis……63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย……63

4.3.2.2 การเตรียมสารละลาย WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ……64

4.3.2.3 ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อผสมร่วมกับ WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ……64

4.3.3 ศึกษาผลของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp……64

4.3.3.1 ศึกษาผลของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*……65

4.3.3.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย……65

4.3.3.1.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY..65

4.3.3.1.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* เมื่อผสมร่วมกับ specific extracted IgY……65

4.3.3.2 ศึกษาผลของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.....66

4.3.3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย……66

4.3.3.2.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY..66

4.3.3.2.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. เมื่อผสมร่วมกับ specific extracted IgY……67

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....67

4.5 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....67

4.5.1 ผลของประสิทธิภาพและปริมาณของ specific extracted IgY ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ……67

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ……..…75

4.5.2.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ WSF specific IgY powder……75

4.5.2.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ whole egg specific IgY powder…...77

4.5.3 ผลการศึกษาการใช้ไข่แอนติบอดีต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp……79

4.5.3.1 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*……...79

4.5.3.2 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.....80

4.6 สรุปผลการทดลอง.....81

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....83

รายการอ้างอิง.....87

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. แสดงข้อมูลจากการทดลอง.....99

ภาคผนวก ข. แสดงวิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง.....107

ประวัติผู้เขียน.....115

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 เชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่แยกได้จากคนและไก่สดแช่แข็ง ในระหว่างปี ค.ศ. 1972/1997……....3

2.1 ความเข้มข้นของ immunoglobulin ในส่วนต่างๆ ของไข่.....….....12

2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกันระหว่าง IgY ในสัตว์ปีก และ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม…….....17

2.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการต่างๆ…….……22

3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง whole cell antigen สำหรับเตรียมวัคซีน และสำหรับทำ ELISA…….38

3.2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgY ใน whole egg specific IgY powder และ whole egg non-specific IgY powder ……...54

3.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgYใน WSF specific IgY powder และ WSF specific IgY powder ……...……56

3.4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ specific IgY ใน specific extracted IgY ที่ได้จากการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12% PEG……..……..……59

สารบัญภาพ

แผนภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะรูปร่างเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....8

2.2 เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างระหว่าง IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ IgY ในสัตว์ปีก……..……14

2.3 ส่วนประกอบของไข่แดง……..……21

3.1 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin…….38

3.2 วิธีการแยกส่วนของ water soluble fraction……..…41

3.3 กราฟการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ negative control และ positive control การเริ่มทำ serial dilution…….....42

3.4 กราฟปริมาณความเข้มข้นของ purified chicken IgG สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ total IgY……...49

3.5 กราฟปริมาณความเข้มข้นของ purified chicken IgG สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ specific IgY…….51

3.6 การเปลี่ยนแปลงของระดับ IgY antibody หลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในแต่ละสัปดาห์.....52

3.7 แถบโปรตีนของ specific IgY ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE……57

4.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis..... 69

4.2 ผลการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ระดับความเข้มข้น 0.90 mg/ml ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis.....71

4.3 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ *S. enterica* serovar Typhimurium…….……..……...72

4.4 ผลการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7……...73

สารบัญภาพ (ต่อ)

แผนภาพที่ **หน้า**

4.5 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการใช้ WSF specific IgY powder ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis..... 77

4.6 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการใช้ whole egg specific IgY powder ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis.....79

4.7 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*……..….81

4.8 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp…….……..83

คำอธิบายคำย่อ

AMS	=	Ammonium sulfate
BCV	=	Bovine coronavirus
BGA	=	Brilliant green agar
BSA	=	Bovine serum albumin
BSE	=	Bovine Spongiform Encephalopathy
BRV	=	Bovine rotavirus
C	=	Constant domain
CBB	=	Coomassie brilliant blue
CDRs	=	Complementarity-determining regions
CFA	=	Colonization factor antigens
CFU	=	Colony – forming unit
CMI	=	Cellular immunity หรือ Cell-mediated immunity
E. coli	=	*Escherichia coli*
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
ETEC	=	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
Fab	=	Fragment, antigen binding
Fc	=	Fragment, crystallizing
FCA	=	Freund's complete adjuvant
FIA	=	Freund's incomplete adjuvant
FITC	=	Fluorescin isothiocyanate
H	=	Heavy chain

HCl	=	Hydrochloric acid
HMI	=	Humoral immunity หรือ antibody mediated immunity
HRV	=	Human rotavirus
Ig	=	Immunoglobulin
IgA	=	Immunoglobulin A
IgE	=	Immunoglobulin E
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
IgY	=	Immunoglobulin Y
KDa	=	Kilo Dalton
L	=	Light chain
LDL	=	Low-density lipoprotein
LPS	=	Lipopolysaccharide
LT	=	Heat-labile toxin
mg	=	Milligrams
ml	=	Milliliter
MRS agar	=	Lactobacillus MRS agar
MRS broth	=	Lactobacillus MRS broth
MW	=	Molecular weight
NA	=	Nutrient agar
NB	=	Nutrient broth
NK-cell	=	Natural killer cell
OD	=	Optical density
OMPs	=	Outer membrane proteins

PBS	=	Phosphate buffer saline
PBS-T	=	Phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20
PEG	=	Polyethylene glycol
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis
sIg	=	Surface immunoglobulin
ST	=	Heat-stable toxin
TSA	=	tryptic soy agar
TSB	=	tryptic soy broth
µg	=	Micrograms
µm	=	Micrometer
V	=	Variable domain
Vol	=	Volume
VRBG agar	=	Violet Red Bile Glucose agar

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาในการทำวิจัย

เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) เป็นเชื้อแบคทีเรีย ที่มีความสำคัญมากเพราะก่อให้เกิดโรคได้ทั่วไปทั้งในมนุษย์และสัตว์ ในสัตว์เชื้อจะก่อให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ ลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลันไปจนถึงเรื้อรัง (Carter and Collin, 1974) ในคนก่อให้เกิดอาการอย่างอ่อนของอาการอาหารเป็นพิษจนถึงอาการลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง (Lax et al., 1995) ซึ่งคนที่ติดเชื้อนี้มักเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ต่างๆ โดยเฉพาะเนื้อไก่ ซึ่งเป็นอาหารโปรตีนที่นิยมรับประทานมากที่สุดเพราะหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และเนื่องจากปัจจุบันการเลี้ยงไก่ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งเป็นอันดับหนึ่งในประเทศภาคพื้นเอเชีย แต่อย่างไรก็ตาม บางครั้งสินค้าเนื้อไก่แช่แข็งบางชุดจะประสบปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานความปลอดภัยของผู้บริโภค ส่วนใหญ่เกี่ยวกับการตรวจพบสารตกค้าง เช่น พวกยาฆ่าแมลงและการปนเปื้อนของพวกจุลินทรีย์ตัวก่อโรคที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าเนื้อไก่และไข่ไก่เป็นแหล่งสำคัญที่จะแพร่เชื้อนี้มาสู่คน (Varavithya et al., 1990 และ Misher et al., 1991)

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในไก่มีความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์เป็นอย่างมาก เพราะมนุษย์มีโอกาสรับเชื้อ *Salmonella* spp. เหล่านี้ จากเนื้อไก่และไข่ไก่ได้ตลอดเวลาและอาจทำให้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษโดยเฉพาะในเด็กและผู้สูงอายุ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ในปี ค.ศ. 1989 พบว่า อุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อ Salmonellosis ในออสเตรเลีย เยอรมัน และอังกฤษ ในระหว่างปี ค.ศ. 1972-1989 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เริ่มทวีความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยของมวลมนุษย์มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา โดยพบว่าโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มสูงขึ้นทุกปี ดังเช่นมีรายงานการแยกเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้มากกว่า 15% ของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมดที่แยกได้ในสหรัฐอเมริกา เริ่มจากพบเชื้อใน 8 มลรัฐในปี ค.ศ. 1985 จนถึง 23 มลรัฐในปี ค.ศ. 1990 (Mason and Ebel, 1992) และจำนวนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่แยกได้ในแคนาดาเพิ่มจาก

7.6% ของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมดในปี ค.ศ. 1980 จนถึง 11.5% ในปี ค.ศ. 1990 (Altexkruse et al.,1993) ทำให้รัฐบาลของประเทศต่างๆ เหล่านี้ต้องวางมาตรการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis อย่างเข้มงวด

ในประเทศไทย ศูนย์ทดสอบเชื้อซัลโมเนลลาและชิเกลลาแห่งประเทศ (National Salmonella and Shigella Center, NSSC) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ถูกส่งมาตรวจยืนยันที่ศูนย์ฯ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1972 จนถึงปี ค.ศ. 1993 พบว่า *S. enterica* serovar Enteritidis ที่แยกได้จากคนมีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา (Bangtrakulnonth et al., 1993) จากรายงานปี ค.ศ. 1972 ถึงปี ค.ศ. 1989 ที่พบเพียง 0.59% ของเชื้อ *Salmonella* spp. และในปี ค.ศ. 1996 พบเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มสูงขึ้นถึง 20.5% ซึ่งจากรายงานพบว่า *S. enterica* serovar Enteritidis เป็นซีโรวาร์ที่พบมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *S. enterica* serovar Enteritidis เป็นซีโรวาร์ที่แยกได้มากที่สุดจากเนื้อไก่สดแช่แข็ง โดยพบมากถึง 11-29% ในระหว่างปี ค.ศ. 1992-1996 (ตารางที่ 1.1) แม้ว่าจะมีแนวโน้มลดลงมาในปี ค.ศ. 1997 ก็ตาม (WHO, NSSC, 1998) และจากสถิติข้อมูลของกองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในระยะเวลาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993-1995 ได้ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโรคอาหารเป็นพิษจากหน่วยงานต่างๆ ทั่วประเทศ จำแนกได้เป็นเชื้อ *Salmonella* spp. ถึง 54.91% โดยพบว่าเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เป็นซีโรวาร์ที่พบมากเป็นอันดับหนึ่ง (อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ, 2539)

เป็นที่ทราบกันดีว่าอาหารที่มาจากเนื้อและผลิตภัณฑ์สัตว์ คือแหล่งกำเนิดของโรคนี้มาสู่มนุษย์ การไม่แสดงอาการป่วยของสัตว์ที่ติดเชื้อนี้ และวิธีการตรวจที่ยังไม่มีความไวพอเพียง ทำให้สัตว์พาหะเหล่านี้ยังคงเป็นแหล่งกระจายเชื้อโรคปนเปื้อนไปสู่สิ่งแวดล้อมและสัตว์ชนิดอื่น รวมทั้งมนุษย์ด้วย ทำให้เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขตลอดมา ส่วนทางด้านปศุสัตว์มีรายงานพบอัตราป่วยเนื่องจากโรคนี้ในไก่และสุกรสูงถึง 18% และ 6% ตามลำดับ (Annual report of National Institute of Animal Health, 1993) ดังนั้นโรคติดเชื้อดังกล่าวจากสัตว์สู่คนจึงนับว่าเป็นปัญหาสำคัญในประเทศที่เจริญแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกาและบางประเทศในทวีปยุโรป ได้กำหนดมาตรการ Hazard Analysis Critical Control Point : HACCP เพื่อควบคุมและตัดวงจรการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. เริ่มตั้งแต่การจัดการฟาร์ม โรงงานผลิตอาหารสัตว์ โรงฆ่าสัตว์ โรงงานแปรรูปและผลิตภัณฑ์อาหาร ส่วนประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์โดยเฉพาะเนื้อไก่ยังไม่ได้รับการปฏิบัติอย่างจริงจัง ซึ่งเนื้อไก่นั้นจัดเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนนับหมื่นล้านบาทต่อปี แต่ยังมีการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในอัตราค่อนข้างสูงอยู่เสมอ ตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์สินค้าประเภท

ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกนั้นจะต้องปลอดหรือปนเปื้อนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis น้อยกว่า 10^2 colony forming unit (CFU) ต่อตัวอย่างเนื้อที่ใช้ทดสอบ 25 กรัม (ประกาศสำนักงานกรรมการอาหารและยา, 2546)

ตารางที่ 1.1 เชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่แยกได้จากคนและไก่สดแช่แข็งในระหว่างปี ค.ศ. 1972-1997 (Bangtrakulnonth et al., 1993; WHO, NSSC, 1998)

ปี ค.ศ.	จำนวนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis /จำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด			
	คน	(%)	เนื้อไก่แช่แข็ง	(%)
1972-1989	266/44,718	(0.59)	*	*
1990	51/3,839	(1.33)	15/1,073	(1.40)
1991	107/3,648	(2.93)	43/815	(5.28)
1992	421/3,065	(13.73)	108/959	(11.26)
1993	471/3,284	(14.34)	159/949	(16.75)
1994	659/5,861	(11.24)	327/1,920	(17.03)
1995	877/6,644	(13.20)	593/2,010	(29.50)
1996	489/2,378	(20.56)	151/679	(22.23)
1997	304/2,771	(10.97)	110/774	(14.20)

* ไม่มีข้อมูล

จากที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์จึงต้องมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันโรค โดยมีการจัดการเฝ้าระวังฝูง การให้วัคซีนและยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเกิดโรค แต่เนื่องจากในสหภาพยุโรปได้มีการประกาศยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะบางตัวที่เคยอนุญาตให้ใช้ผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโต เช่น avoparcin ในปี ค.ศ. 1997 และยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะอีก 4 ชนิด ได้แก่ tylosin, spiramycin, bacitracin และ virginiamycin ในปี ค.ศ. 1998 เนื่องจากยาเหล่านี้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยาต้านจุลชีพในมนุษย์ (Wegener et al., 2000) ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงได้มีการพยายามที่จะหาสารทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น prebiotics ยกตัวอย่างเช่น oligosaccharides หรือ probiotics ที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Lactobacillus* sp. และการใช้สมุนไพร เช่น กระเทียม ฟ้าทะลายโจร และเปลือกทับทิม เป็นต้น และมีอีกแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้ป้องกันโรคเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ คือการใช้ สารภูมิต้านทานจากแอนติบอดีในไข่แดงของไก่ (egg yolk antibodies: IgY) ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาของ Owusu-Asiedu et al., (2003a) ซึ่งได้ทำการทดลองใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody เปรียบเทียบกับการใช้สารเสริมตัวอื่นๆ คือ zinc oxide, fumaric acid และยาปฏิชีวนะ พบว่าการใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody สามารถลดอัตราการตายที่เกิดจากเชื้อ

E. coli ในลูกสุกรได้และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารเสริมตัวอื่นๆ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ในการนำ egg yolk antibodies หรือ IgY มาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ

ในสัตว์ปีก เช่น ไก่ ห่าน และเป็ดนั้น จะมีการผลิตอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulins) 3 ประเภท คือ Immunoglobulin A (IgA), Immunoglobulin M (IgM) และ Immunoglobulin G (IgG) หรือที่เรียกว่า Immunoglobulin Y (IgY) (Sim et al. 2000) โดย immunoglobulins ทั้ง 3 ประเภท จะทำหน้าที่ในการจับกับ specific antigen เช่น แบคทีเรีย ไวรัส สารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และสารพิษ (toxin) ซึ่งแอนติบอดีหลักที่มีในซีรั่ม (serum) คือ IgY โดยในแม่ไก่นั้น IgY จากซีรั่มจะเคลื่อนย้ายผ่าน follicular epithelium ของรังไข่ เพื่อนำไปสะสมในไข่แดง ซึ่งจะมีการเคลื่อนย้ายในระยะ oogenesis เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ IgG จากแม่จะผ่านทางรกไปยังลูกหรือตัวอ่อนได้ (Sim et al., 2000) ในส่วนของ IgA และ IgM จะมีการสะสมเฉพาะในไข่ขาว โดยในไข่แดงจะมีปริมาณน้อยมาก

แม่ไก่ 1 ตัว ภายใน 1 ปี จะสามารถผลิต total IgY ได้ประมาณ 40 กรัม ในขณะที่ในกระต่าย 1 ตัว จะสามารถผลิต IgG จากซีรั่มได้ประมาณ 1.4 กรัม ซึ่งจะเห็นได้ว่าการผลิตแอนติบอดี IgY จากไข่ไก่จะได้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่าที่ได้รับจากซีรั่มกระต่ายถึงประมาณ 30 เท่า (Sim et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mine and Kovacs (2002) ที่พบว่า ไก่จะวางไข่ประมาณ 280 ฟองในหนึ่งปี และในไข่แดงหนึ่งฟองจะมีแอนติบอดี IgY ประมาณ 100-150 มิลลิกรัม มีผลทำให้ได้ total IgY ประมาณ 28-42 กรัมต่อปี จากไก่แต่ละตัว และมี antigen-specific IgY antibodies อยู่ในระหว่าง 2% และ 10% ของการผลิต IgY ทั้งหมด (Schade et al., 2001; Mine and Kovacs, 2002 และ Narat, 2003) ดังนั้นไข่ไก่จึงเป็นแหล่งในการผลิตแอนติบอดีที่ดี (Sim et al., 2000) นอกจากนี้วิธีการแยกและการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์ก็ไม่ยุ่งยาก (Akita and Nakai, 1992; 1993) ซึ่งแอนติบอดีที่แยกได้จากไข่แดงจะสามารถนำไปใช้เป็นสารภูมิต้านทานได้ โดยอาจเตรียมให้อยู่ในรูปของไข่ผงเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสามารถรับประทานได้ทันที ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพการใช้ไข่ผงเป็นสารภูมิต้านทาน โดยให้รับประทาน พบว่า IgY สามารถป้องกันการเกิดท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อ rotavirus ได้ทั้งในคนและสัตว์ (Sim et al., 2000) ป้องกันโรคติดเชื้อทางทันตกรรม (Otake et al., 1991 และ Hatta et al., 1997) ป้องกันโรค enteric colibacillosis (Yokoyama et al., 1992 และ Imberechts et al., 1997) และป้องกันโรค Salmonellosis (Peralta et al., 1994; Sunwoo et al., 1996 และ Yokoyama et al., 1998b)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้คือ เพื่อผลิตแอนติบอดีไข่แดง (specific egg yolk antibodies) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, water soluble fraction (WSF) specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder และนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพของความจำเพาะในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis รวมถึงศึกษาผลของปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro* method)

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแอนติบอดีไข่แดงที่อยู่ในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และผลของปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro* method)

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณของแอนติบอดีไข่แดงที่เหมาะสมในการนำมาใช้ประโยชน์

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 สามารถผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้

1.3.2 แอนติบอดีไข่แดงที่อยู่ในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp.

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Specific egg yolk antibodies, *S. enterica* serovar Enteritidis, Immunoglobulin Y (IgY), Water soluble fraction (WSF), Cross reactivity

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะผลิตแอนติบอดีไข่แดงในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ

ผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro* method)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 สามารถผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้

1.6.2 ทราบถึงประสิทธิภาพของแอนติบอดีไข่แดงในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp.

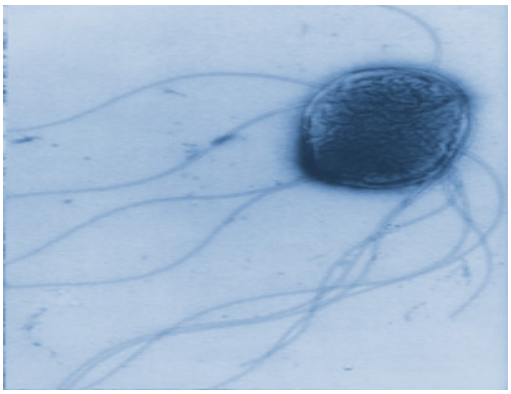
1.6.3 ทราบถึงปริมาณของแอนติบอดีไข่แดงที่เหมาะสมในการนำมาใช้ประโยชน์

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดที่สำคัญ โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่สามารถพบได้ทั่วโลก นอกจากนี้ยังเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคนหากยังสามารถพบได้ในสัตว์ทั่วๆ ไป เช่น สัตว์เลื้อยคลาน นก และแมลงต่างๆ โดยเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในอุจจาระของผู้ป่วย โดยการติดเชื้อจะเป็นในลักษณะของการกินอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงให้สุกหรืออาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ดังนั้นการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่อาหารและสิ่งแวดล้อมจึงถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมาก

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีความกว้าง 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 ยกเว้น *S. enterica* serovar Pullorum, *S. enterica* serovar Gallinarum และบางสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา เช่น *S.* enterica serovar Paratyphi A, *S. enterica* serovar Choleraesuis) สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สร้างกรดและก๊าซจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เจริญได้คือ 37-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดี แม้ในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไว้เท่านั้นและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่ เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อจะไม่ทนความร้อน โดยพบว่าถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง, ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ยกเว้น *S. enterica* serovar Senftenberg ที่ทนความร้อนได้ดีกว่าซีโรวาร์อื่นๆ 10-20 เท่า โดยต้องให้ความร้อนถึง 62 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จึงสามารถทำลายเชื้อได้ (Bangtrakulnonth, 2002)



แผนภาพที่ 2.1 ลักษณะรูปร่างเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด
ที่มา: (www.eiu.org/experiments/dispersion/pathogens.html)

2.2 แหล่งที่พบเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. จัดเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วโลก สามารถแยกเชื้อได้จากทางเดินอาหารของคนและสัตว์อีกหลายชนิดทั้งสัตว์เลือดอุ่นและสัตว์เลือดเย็น (Hirsh, 1999) โดยเฉพาะจิ้งจกและงู พบว่าเป็นสัตว์ที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ได้เสมอ โดยมักจะไม่แสดงอาการป่วยแต่สามารถแยกเชื้อได้ และบางครั้งอาจพบได้หลายซีโรวาร์ในสัตว์ตัวเดียวกัน นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานถึง 9 เดือน หรือมากกว่านั้น เมื่อปนเปื้อนอยู่ในดินที่ชื้นแฉะ น้ำ มูลสัตว์ หรืออาหารสัตว์ โดยเฉพาะส่วนประกอบที่ทำมาจากเลือดป่น กระดูกป่น หรือปลาป่น (Hirsh, 1999)

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อ

เชื้อในสกุล *Salmonella* ปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 2 species ตามที่ Center for Disease Control Prevention (CDC) ในสหรัฐอเมริกาได้แบ่งไว้ ดังนี้คือ

2.3.1 *S. enterica* ประกอบด้วย 6 subspecies (subsp.) ได้แก่ subspecies I (enterica), II (salamae), III a (arizonae), III b (diarizonae), IV (houtenae) และ VI (indica)

2.3.2 *S. bongori* มี 1 subspecies คือ subspecies V

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

2.4 พยาธิกำเนิดของเชื้อ

ตำแหน่งแรกของการติดเชื้อพบได้ที่ลำไส้โดยเฉพาะลำไส้เล็ก หลังจากเชื้อเกาะแนบ (adhere) กับเยื่อบุลำไส้เชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และสร้างสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียงเกิดกระบวนการอักเสบของลำไส้ จากนั้นเชื้อจะแพร่เข้าไปที่ชั้นในของผนังลำไส้และเข้าไปฝังตัวอยู่ในท่อน้ำเหลืองขนาดเล็ก (lymphoid organ) และอาจแพร่ต่อไปยังต่อมน้ำเหลืองของเยื่อยึด (mesenteric lymphnodes) ทำให้เกิดจุดเนื้อตายหรือฝีขนาดเล็ก ๆ ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้ไก่เกิดโรคแบบเรื้อรังและแพร่เชื้อตลอดเวลา ขณะเดียวกันเชื้อจะทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังลำไส้และแพร่เข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น รังไข่ ท่อนำไข่และมดลูก ซึ่งอวัยวะดังกล่าวจะเป็นแหล่งสำคัญที่เชื้อจะแพร่สู่ไข่ต่อไป

2.5 การสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับวัคซีน

ภูมิคุ้มกัน (immunity) ในสัตว์ปีกอยู่ในระบบน้ำเหลือง (lymphoid system) โดยแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ

ระบบต่อมน้ำเหลืองปฐมภูมิ (primary lymphoid system) ประกอบด้วย ต่อมเบอร์ซา (bursa of fabricious) เป็นอวัยวะที่มีตำแหน่งเกาะติดบนผนังด้านนอกของทวารรวม และต่อมไทมัส (thymus glands) เรียงรายอยู่บริเวณใต้ผิวหนังบริเวณคอ

ระบบต่อมน้ำเหลืองทุติยภูมิ (secondary lymphoid system) ประกอบด้วย ตับ ม้าม ต่อมฮาร์เดอเรียน (hardenrian's glands) ที่บริเวณตาของสัตว์ปีก ต่อมท่อมซิลบริเวณไส้ตัน (cecal tonsils) และต่อมน้ำเหลือง (peyer's patches) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในผนังลำไส้ (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2544)

2.5.1 ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immunity หรือ innate immunity)

ธรรมชาติของการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis จะผ่านช่องทางหลัก คือ ระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในบริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมี บทบาทแรกในการต่อต้านการติดเชื้อ ถึงแม้ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะไม่มีความสามารถในการจดจำหรือมีความจำเพาะต่อแอนติเจน แต่ก็สามารถจำกัดการเพิ่มปริมาณและการแพร่กระจายของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะประกอบไปด้วยกลไกทางฟิสิกส์ เช่น การลอกหลุดของเนื้อเยื่อที่มีจุลชีพเกาะอยู่ การเคลื่อนไหวของลำไส้เพื่อขับอุจจาระในภาวะปกติ การเคลื่อนไหวของลำไส้ที่มากกว่าปกติเมื่อเกิดการติดเชื้อในลำไส้ กลไกทางเคมี เช่น กรด HCl, fibronectin, glycolipid, lactoferrin,

lysozyme และ mucus ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหาร มีบทบาทในการป้องกันการจับกันระหว่างแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อ หรือทำลายแบคทีเรียโดยตรง กลไกทางชีวะ เช่น จุลชีพประจำถิ่น (normal flora) ที่สามารถขัดขวางการจับตัวของแบคทีเรียก่อโรคกับเนื้อเยื่อ หรือสร้างสารจำพวกกรด HCl, fibronectin, glycolipid, lactoferrin, lysozyme และ mucus ซึ่งสามารถขัดขวางการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค หากแบคทีเรียสามารถผ่านสิ่งกีดขวางดังกล่าวเข้ามาได้จะพบกับสิ่งกีดขวางอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อ เช่น phagocytic cell, natural killer (NK) cell, complement หรือ natural antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนนั้นๆ แต่ binding site ของแอนติบอดีนั้นมีความใกล้เคียงหรือจำเพาะกับแอนติเจนทำให้แอนติบอดีสามารถจับแอนติเจนนั้นได้ (Jeneway and Travers, 1994 และ Abbas et al., 2000)

2.5.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity หรือ adaptive immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันที่คาดหวังให้เกิดขึ้นหลังจากมีการทำวัคซีน มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงกว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เก็บกินได้ดีกว่าและสามารถจับกับแอนติเจนได้หนาแน่นกว่า) ประกอบไปด้วย ภูมิคุ้มกันแบบใช้แอนติบอดี (antibody mediated immunity หรือ humoral immunity : HMI) ซึ่งจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยใช้แอนติบอดีที่สร้างจาก B lymphocyte หรือ plasma cell และภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell–mediated immunity หรือ cellular immunity : CMI) ซึ่งจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยใช้ cytotoxic T lymphocytic NK cell และ phagocytic cell (macrophage, neutrophil) (Janeway and Travers, 1994 และ Abbas et al., 2000)

2.5.2.1 ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity)

เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อแอนติเจนแปลกปลอม โดยเมื่อมีแอนติเจนแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย แอนติเจนจะถูกเก็บกินโดย phagocytic cell และถูกย่อยสลายเป็น peptide ขนาดเล็กซึ่งจะมีการลำเลียงออกมานำเสนอบนผิวเซลล์ โดยจะติดอยู่กับ Major Histocompatibility Complex (MHC) class II ซึ่ง phagocytic cell ที่ถูกกระตุ้นจะมีการเพิ่มการแสดงออกของ MHC class II บน membrane ทำให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการทำงานของ helper T lymphocyte ($CD4^+$) เพิ่มขึ้น ทำให้ helper T lymphocyte มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและหลั่ง cytokines ให้กับ B lymphocyte ซึ่งในขณะนั้น B lymphocyte ได้มีการรับรู้แอนติเจนผ่าน surface immunoglobulin (slg) แล้ว ส่งผลทำให้ B lymphocyte มีการตอบสนองด้วยการแบ่งตัวและเปลี่ยนรูปร่างกลายเป็น plasma cell เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะ

ต่อแอนติเจน โดยปกติการตอบสนองต่อแอนติเจนโดยทั่วไปจะเกิดแอนติบอดีจำเพาะขึ้นทุก class คือ IgM, IgG และ IgA ซึ่งแอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อในกระแสเลือด ได้แก่ IgM และ IgG (Janeway and Travers, 1994; Abbas et al., 2000)

2.5.2.1.1 ภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก (mucosal immunity)

บริเวณเยื่อเมือกลำไส้ ซึ่งเป็นช่องทางในการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis จะปกคลุมด้วยสารคัดหลั่งที่มีแอนติบอดีอยู่ โดยแอนติบอดีส่วนหนึ่งมาจากกระแสเลือด อีกส่วนหนึ่งเป็น secretory antibody ที่สร้างมาจาก plasma cell ใต้เยื่อเมือกนั้น ๆ แต่เนื่องจากแอนติบอดีจากกระแสเลือดไม่มี secretory component จึงถูกทำลายโดยเอนไซม์บนเยื่อเมือก ดังนั้นแอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณดังกล่าวจึงเป็นเฉพาะ secretory IgA และส่วนน้อยเป็น IgM ทั้งนี้กลไกการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ชนิดพิเศษ คือ M cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะพื้นผิวค่อนข้างเรียบ แทรกตัวอยู่ระหว่าง epithelial cell ที่บุในลำไส้ด้านล่างของเซลล์ชนิดนี้จะเป็นบริเวณที่มี lymphocyte อยู่ เมื่อมีแอนติเจนผ่านมาในทางเดินอาหารจะถูก endocytosis โดย M cell และนำเสนอต่อ B lymphocyte ที่อยู่ข้างใต้ และเมื่อได้สัญญาณจาก helper T cell ที่อยู่ข้างเคียง B lymphocyte ก็จะกลายเป็น plasma cell และผลิต secretory IgA (sIgA) ที่มี J-chain ไปเกาะกับ secretory component ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณ mucosa เท่านั้น หลังจากนั้น sIgA จะถูกส่งผ่าน mucosal epithelial cell หลั่งสู่บริเวณ lumen ของลำไส้ (สันนิภา สุรทัตต์, 2545)

2.5.2.2 ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell mediated immunity)

เกิดจากการกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte (CD8) ด้วย peptide ของแอนติเจนที่ตำแหน่ง T cell receptor ซึ่งต้องนำเสนอผ่าน MHC class I ของเซลล์ที่ได้รับเชื้อจากแบคทีเรียที่มีชีวิต และจะต้องได้รับ cytokines ซึ่งเป็นสัญญาณจาก helper T lymphocyte จึงจะทำงานได้สมบูรณ์ เช่นเดียวกับ B lymphocyte

นอกจากนี้แบคทีเรียที่สามารถเข้าเซลล์ได้ เช่น เชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งถือเป็น endogenous antigen ก็สามารถกลายเป็น exogenous antigen ที่ถูก phagocytic cell เก็บกินและนำเสนอผ่าน MHC class II ทำให้เกิดการกระตุ้น helper T lymphocyte ซึ่งการทำงานของ helper T lymphocyte หลังได้รับการกระตุ้น ถือเป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ด้วย (สันนิภา สุรทัตต์, 2545) โดยภาพรวมของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คือ เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายจะถูกเก็บกินโดยกระบวนการ phagocytosis แบบ exogenous antigen โดย phagocytotic cell เช่น macrophage หลังจากนั้น macrophage จะทำการนำเสนอ peptide

ของแอนติเจนด้วยโปรตีนบนผิวเซลล์ คือ MHC class II ให้กับ helper T lymphocyte ทำให้ helper T lymphocyte มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและหลั่ง cytokines ให้กับ B lymphocyte และ cytotoxic T lymphocyte โดยที่เซลล์ทั้งสองได้มีการรับรู้แอนติเจนผ่าน receptor ของแต่ละเซลล์ก่อนหน้านี้แล้ว ทำให้เกิดการตอบสนองทาง HMI ในรูปของแอนติบอดี และ CMI ในรูปของ cytotoxic T lymphocyte ซึ่งการตอบสนองจะเด่นชัดในทางใดขึ้นอยู่กับรูปแบบของแอนติเจนว่าเป็นแอนติเจนชนิด exogenous หรือ endogenous (Janeway and Travers, 1994; Abbas et al., 2000 และ Sheela et al., 2003)

ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ซึ่งเป็น facultatively intracellular bacteria ที่สามารถเข้าเซลล์ได้ โดย macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย cytokines จาก helper T lymphocyte จะมีความสามารถในการกลืนกินและฆ่าแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ cytotoxic T lymphocyte ที่ผ่านการกระตุ้นจากแบคทีเรีย ก็จะสามารถทำลายเซลล์ที่มีแบคทีเรียอยู่ ทำให้แบคทีเรียออกมาอยู่นอกเซลล์แล้วถูกจับกินต่อ รวมทั้ง NK cell ก็สามารถทำลายเซลล์ที่มีแบคทีเรียอยู่ภายในได้เช่นกัน (Janeway and Travers, 1994 และ Abbas et al., 2000)

อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันแบบใช้แอนติบอดีก็มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ เนื่องจากในบางช่วงของวงจรชีวิต *S. enterica* serovar Enteritidis จำเป็นจะต้องออกมาบริเวณนอกเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถถูกทำลายด้วยแอนติบอดีได้ (Corrier et al., 1991)

2.6 Passive immunity ในสัตว์ปีก

ในระบบการไหลเวียนเลือดของสัตว์ปีกประกอบไปด้วย immunoglobulins หลักๆ 3 ประเภท ได้แก่ Immunoglobulin A (IgA), Immunoglobulin M (IgM) และ Immunoglobulin G (IgG) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านความเข้มข้น (ตารางที่ 2.1) โครงสร้างและการทำงานของ Immunologlobulin

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ immunoglobulin ในส่วนต่างๆ ของไข่

	IgY (IgG) mg/ml	IgM mg/ml	IgA mg/ml
Serum	~ 6	~ 1.3	~ 0.6
Yolk	~ 25	~ 0.02	~ 0.03
Clear part of egg	~ 0.03	~ 0.15	~ 0.15

ที่มา : Schade et al. (2001)

จากการศึกษาของ Leslie and Clem (1969) พบว่า IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกมีการทำงานที่คล้ายกัน แต่มีความแตกต่างในส่วนของโครงสร้างทางเคมี จึงมีการเรียก IgG ในซีรั่มของสัตว์ปีกที่มีการสะสมในไข่แดงว่า Immunoglobulin Y (IgY)

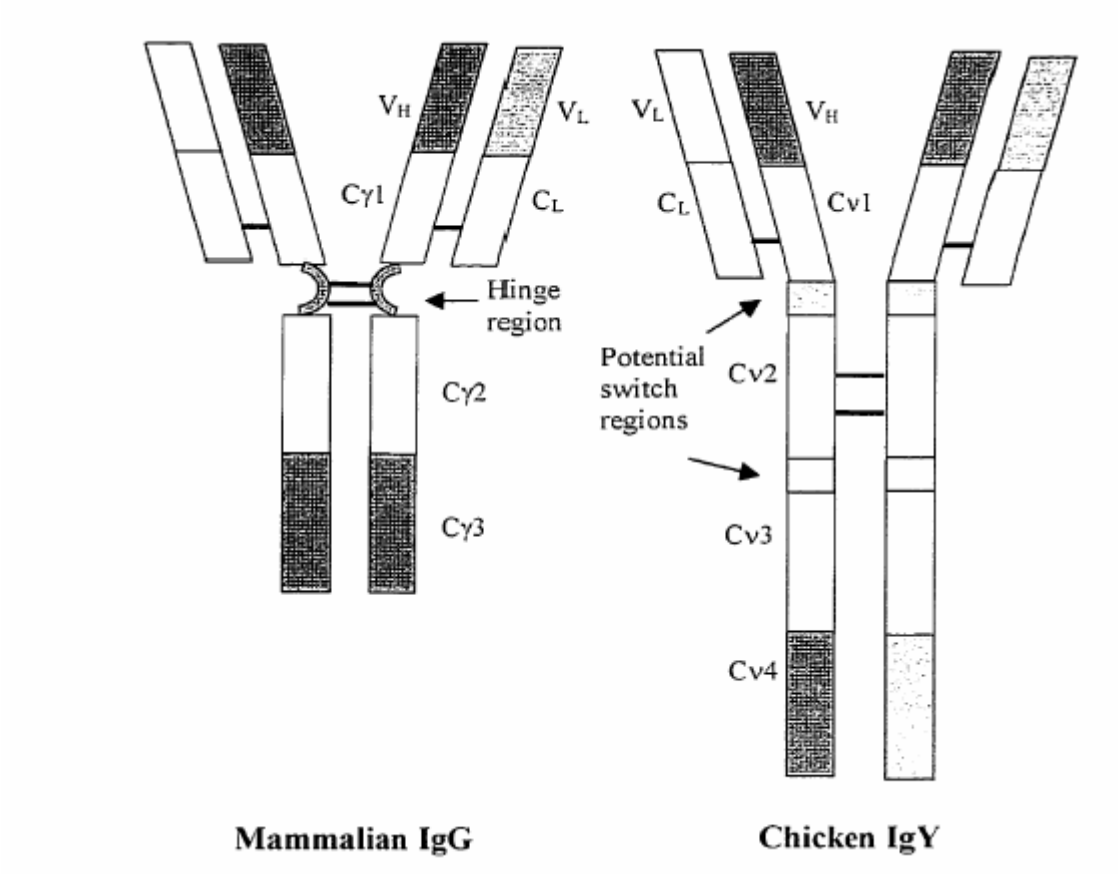
ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แอนติบอดีจากแม่จะเคลื่อนย้ายไปยังลูกโดยผ่านทางรกและการหลั่งน้ำนม ขณะที่ในสัตว์ปีกจะปรากฏในไข่เพื่อปกป้องลูกไก่ที่เพิ่งฟัก ซึ่ง specific antibody โดยเฉพาะ IgY จะถ่ายทอดจากซีรั่มไปยังไข่แดงและเข้าสู่การไหลเวียนเลือดของลูกไก่ผ่าน endoderm ของ yolk sac ซึ่งแอนติบอดีจะสะสมอยู่ใน egg follicle ที่เจริญเต็มที่ โดยจะอยู่รวมกับไข่ขาวและ egg albumin (Sim et al., 2000) ซึ่งความเข้มข้นของ IgM, IgA ในไข่ขาวและ IgY ในไข่แดง มีปริมาณ 0.03, 0.02 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไข่แดง (Schade et al., 2001) เมื่อเปรียบเทียบ IgY กับ plasma protein อื่น ๆ พบว่า IgY ที่มีการสะสมใน egg follicle จะมีการหลั่งจากระบบไหลเวียนเลือดของแม่ผ่านเข้าไปใน ovarian follicle เนื่องจากมีกลไกที่เฉพาะเจาะจงในการพัฒนาการเคลื่อนย้ายแอนติบอดีไปที่ ovarian follicle คือ dependent receptor และ ovarian IgY receptor ซึ่งมีอยู่ในกระแสเลือดของแม่ไก่ (Sim et al., 2000) ส่วน IgM และ IgA ปรากฏในการหลั่งของ oviduct ซึ่งเป็น acquired โดยไข่ที่ผ่านลงมายัง oviduct เป็นช่วงกระบวนการสร้างไข่ขาวและเป็นเวลาที่ไข่แดงอยู่ในรูปที่เจริญเต็มที่เคลื่อนออกจาก ovary และถูกล้อมรอบด้วย vitelline membrane ต่อมาภายหลัง immunoglobulin จะเคลื่อนย้ายไปยังลำไส้ของ embryo ผ่าน swallowed amniotic fluid หรือในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะถ่ายทอดภูมิคุ้มกันในรูปแบบ milk immunoglobulin ไปยังสัตว์แรกเกิด ดังนั้นแอนติบอดีในไข่จึงเป็น passive immunity ซึ่งก็คือกลไกในการปกป้องลูกที่เพิ่งฟักจากโรคต่าง ๆ ที่แม่ไก่สร้างขึ้น

2.7 Immunoglobulin Y (IgY)

2.7.1 โครงสร้างของ IgY

IgY ประกอบด้วย 2 สายของ Heavy (H) chain และ 2 สายของ Light (L) chain ที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide โดย IgY มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 180 kDa ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของ IgG (~ 150 kDa) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน H chain ของ IgY มี 1 บริเวณที่มีความแปรปรวน (variable domain; V) มี 4 บริเวณคงที่ (constant domains; C) และไม่มีบริเวณข้อพับ (genetic hinge) ซึ่งแตกต่างจาก IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมี 3 บริเวณคงที่และมีบริเวณข้อพับ โครงสร้างโมเลกุลของ IgY คล้ายกับ IgM และ IgE ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ประกอบด้วย 4 บริเวณคงที่ เมื่อมีการเปรียบเทียบลำดับใน C-region ระหว่าง IgG และ IgY พบว่า บริเวณ Cγ2 และ Cγ3 ของ IgG มีความแนบสนิทกัน (most closely related) มากกว่าส่วนของบริเวณ Cν3 และ Cν4 ของ IgY และส่วนของบริเวณ Cν2 ใน IgY ไม่มีใน γ chain ใน

IgG (แผนภาพที่ 2.2) บริเวณ Cv2 ในโครงสร้างของ IgY คือบริเวณที่มีการจับเกาะกันแน่น (condense) ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับบริเวณข้อพับ (hinge region) ในโครงสร้าง IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Burton et al., 1994 อ้างถึงใน Lee et al., 2002)



แผนภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้าง IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ IgY ในสัตว์ปีก
ที่มา : Lee et al. (2002)

ใน IgY บริเวณรอยต่อระหว่าง Cv 1 กับ Cv 2 และ Cv 2 กับ Cv 3 จะมีส่วนของ proline และ glycine อยู่ มีผลทำให้บริเวณดังกล่าวมีขีดจำกัดในการยืดหยุ่นได้ของโมเลกุล ซึ่งคล้ายกับบริเวณที่เรียกว่า “switch region” ใน immunoglobin ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Helm et al., 1991) โครงสร้างของ β-sheet ที่อยู่ภายในโมเลกุลของ IgY มีน้อยกว่าใน IgG ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของ IgY ถูกทำลายได้ง่ายกว่าโครงสร้างโมเลกุลของ IgG ในส่วนของแรงยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลระหว่าง H chain และ L chain เป็นแบบ non-covalent ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการยึดโครงสร้างของโปรตีนต่างๆ ไว้ด้วยกัน และพันธะยึดเหนี่ยวระหว่าง V region และ C region ใน L chain เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของ L chain ใน IgG มีความคงตัว แต่พันธะดังกล่าวไม่พบใน L chain ของ IgY จึงมีผลทำให้ความ

แข็งแรงภายในโมเลกุลของ IgY น้อยกว่าใน IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากคุณสมบัติของโครงสร้าง IgY เช่น ขนาดโมเลกุล (molecular size), ความยืดหยุ่น (flexibility), บริเวณต่าง ๆ ภายในโครงสร้าง (conformation domain) และการจับกันภายในโมเลกุล (intramolecular binding) มีผลต่อคุณสมบัติของโมเลกุล IgY ซึ่งทำให้ความคงตัวของโมเลกุล IgY น้อยกว่า IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Pilz et al., 1977 อ้างถึงโดย Sim et al., 2000 และ Shimizu et al., 1992)

2.7.2 คุณสมบัติของ IgY ทางด้านกายภาพและเคมี

ความทนทานของโครงสร้าง IgY มีน้อยกว่าใน IgG โดยมีการศึกษาในส่วนของความทนทานต่อกรด (acid) ความร้อน (heat) และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ทั้งนี้เนื่องจากมีการสันนิษฐานว่า ความคงตัวของโมเลกุลภายในโครงสร้าง IgY น้อยกว่าภายในโครงสร้างโมเลกุล IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.7.2.1 ความคงตัวของ IgY ต่อ pH และความร้อน

ความคงตัวของโครงสร้าง IgY ต่อสภาวะความเป็นกรดและด่างได้มีการศึกษา พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของ IgY จะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่ pH เท่ากับ 3.5 หรือต่ำกว่านั้น และจะสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานเมื่อ pH เท่ากับ 3.0 ซึ่งประสิทธิภาพการทำงานของ IgY จะลดลงอย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำ โดยเกิดจากการที่โครงสร้างของ IgY มีการเปลี่ยนรูปร่างไปและมีผลทำให้ส่วนของ Fab portion ถูกทำลาย ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับแอนติเจน (antigen–binding site) และภายใต้สภาวะความเป็นด่าง (alkaline condition) ประสิทธิภาพการทำงานของ IgY จะไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่ง pH เพิ่มขึ้นถึง 11 แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ประสิทธิภาพการทำงานของ IgY จะลดอย่างเห็นได้ชัดเมื่อ pH เท่ากับ 12 หรือสูงกว่านั้น

จากการศึกษาความคงตัวของ IgY ที่อุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าประสิทธิภาพการจับเกาะกับแอนติเจนของ IgY จะลดลงเมื่อมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Shimizu et al., 1988, 1992) และเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการจับเกาะกับแอนติเจนสูญเสียไป (Chang et al., 1999) และจากการศึกษาความคงตัวของ IgY ภายใต้ความดัน พบว่าที่ความดันสูงถึง 4000 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ IgY (Shimizu et al., 1994)

การแช่แข็ง (freezing) และการ freeze-drying ที่อุณหภูมิต่ำ จากการศึกษาของ Skrabanja et al. (1994) พบว่า มีผลต่อการทำลายโครงสร้างของ IgY น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าอาจจะมีโปรตีนบางส่วนที่มีการสูญเสียสภาพ เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ IgY ซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (aggregation) หรือการดูดซึม (absorption)

ของ IgY เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shimizu et al. (1988) ซึ่งพบว่าการ freezing และการ freeze-drying ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ IgY แม้ว่าจะมีการทำซ้ำหลายครั้ง และจากการศึกษาของ Chansarkar (1998) พบว่าการ freezing หรือการ freeze-drying จะมีผลต่อประสิทธิภาพการจับของ IgY ต่อแอนติเจนน้อยมาก แต่ความสามารถในการละลายได้ของ IgY จะลดลงภายใต้สภาวะที่มีความเป็นเกลือและความเข้มข้นของโปรตีนสูง

2.7.2.2 ความคงตัวของ IgY ต่อการย่อยจากเอนไซม์ proteolytic

IgY มีความทนทานต่อการถูกย่อยจากเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin แต่จะมีความไวต่อการถูกย่อยจากเอนไซม์ pepsin ซึ่งการย่อย IgY จากเอนไซม์ trypsin พบว่ายังสามารถรักษาประสิทธิภาพการทำงานในส่วนของ antigen-binding และ cell-agglutinating ได้ แม้ว่าบางส่วนของ polypeptide จะมีการสูญเสียสภาพไปแล้ว และสำหรับการย่อยจากเอนไซม์ chymotrypsin พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของ IgY ยังคงสูงอยู่ (Shimizu et al., 1988; Otani et al., 1991) และจากการศึกษาของ Hatta et al. (1993) พบว่า การที่ IgY ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin มีผลทำให้ neutralization titer ยังคงมีอยู่ถึง 39% และ 41% ตามลำดับ และเมื่อมีการนำ IgY ผสมร่วมกับเอนไซม์ pepsin ภายใต้ระยะเวลาบ่มและ pH ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้โครงสร้างของ IgY เปราะบางที่ pH ต่ำและประสิทธิภาพการทำงานของ IgY จะสูญเสียไป 91% ที่ pH 2 หลังจากบ่มนาน 1 ชั่วโมง และ 63% ที่ pH 4 หลังจากบ่มนาน 4 ชั่วโมง ซึ่ง IgY จะมีความสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ pepsin มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ pH และสัดส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อซับสเตรท โดยที่ pH 5 หรือสูงกว่านั้น IgY ยังสามารถทนต่อการย่อยจากเอนไซม์ pepsin ได้ ทำให้ยังมีประสิทธิภาพในการจับเกาะกับแอนติเจน (antigen-binding) และการเกาะกลุ่มของเซลล์ (cell-agglutinating) อย่างไรก็ตามที่ pH เท่ากับ 4.5 หรือต่ำกว่านั้น ประสิทธิภาพการทำงานของ IgY ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะสูญเสียไป (Shimizu et al., 1988)

2.7.3 คุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

ลักษณะโครงสร้างของ IgY มีผลต่อคุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีความแตกต่างกันระหว่าง IgY และ IgG โดย IgY จะมีเวเลนซีประมาณ 2.0 ทำให้มีขนาดของ antigen-binding site ขนาดใหญ่ และสามารถจับเกาะกับแอนติเจนได้อย่างแน่นหนา อย่างไรก็ตาม IgY จะสามารถทำให้เกิดการตกตะกอน (precipitating) หรือการจับกลุ่ม (agglutinating) ได้เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูง (Kubo et al., 1973 อ้างถึงโดย Sim et al., 2000) โครงสร้างของ IgY จะมีส่วน

ของแขน Fab 2 แขน ซึ่งวางในแนวของ steric hindrance ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จึงมีผลต่อการป้องกันการเกิด cross-linking ในกรณีที่มีการจับกับ epitope ขนาดใหญ่ 2 โมเลกุล

ความแตกต่างระหว่าง Fc region ของ IgY และ IgG คือ จำนวนของ carbohydrate chains, ความยืดหยุ่นของ switch region และจำนวนของบริเวณคงที่ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนำไปสู่ความแตกต่างระหว่าง IgY ขณะเกิดปฏิกิริยาต่อโมเลกุลของแอนติเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกันระหว่าง IgY ในไก่ และ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ปฏิกิริยา	IgY	IgG
มีผล (non-specific) ต่อการทำงานของ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	ไม่มี	มี
เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิด rheumatoid factor	ไม่มี	มี
มีผล (non-specific) ต่อการทำงานของ human anti-mouse IgG antibody	ไม่มี	มี
กระตุ้นการทำงานของระบบ complement ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	ไม่มี	มี
จับกับโปรตีน A หรือ G ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	ไม่มี	มี
จับกับส่วนของ Fc receptor ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	ไม่มี	มี

ที่มา: ดัดแปลงจาก Larsson et al. (1993)

2.8 การผลิต IgY

2.8.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต IgY

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแม่ไก่ด้วยแอนติเจน เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specific) สูงสำหรับนำไปใช้ต่อต้านแอนติเจนเป้าหมาย ซึ่งวิธีการที่นำมาใช้ในการกระตุ้นควรเป็นวิธีที่สามารถผลิตปริมาณแอนติบอดีได้ในปริมาณมากและมีความจำเพาะสูง ซึ่งมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอนติบอดี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการให้ไข่ของแม่ไก่และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแม่ไก่เป็นปัจจัยแรกที่มีความสำคัญต่อการผลิตแอนติบอดี เพื่อให้ได้ปริมาณมาก โดยพบว่า สายพันธุ์แม่ไก่, ระยะเวลาในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และคุณสมบัติของแอนติเจนหรือแอนจูแวนซ์ (adjuvant) เป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตไข่ จากการศึกษาของ Li et al. (1998) พบว่า แม่ไก่สายพันธุ์ Single Comb White Leghorn (SCWL) สามารถให้ไข่ได้มากกว่าแม่ไก่สายพันธุ์ Rhode Island Red (RIR) ถึง 2 เท่า แต่เนื่องจากความสามารถในการให้ไข่ของแม่ไก่อาจถูกกระทบจากความเครียด (stress) เนื่องมาจากการฉีดวัคซีน ดังนั้นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแม่ไก่ก่อนการให้ไข่จะสามารถลดผลกระทบจากการให้ไข่ของแม่ไก่ อันเนื่องมาจาก

ความเครียดจากการฉีดวัคซีนได้ (Schade et al., 1996) แม่ไก่ที่ดีที่นำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดีควรที่จะเป็นไก่พ่อแม่พันธุ์ เนื่องจากสามารถตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดีได้สูงมากกว่าแม่ไก่ที่นำมาใช้ทางการค้าสำหรับให้ไข่ สาเหตุเพราะแม่ไก่ดังกล่าวมีสุขภาพที่ดีกว่าแม่ไก่สายพันธุ์ผสม (Schade et al., 1996) นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากปริมาณของแอนติบอดีที่ตอบสนองมีผลเกี่ยวเนื่องโดยตรงมาจากความแปลกปลอมของ immunogen ที่ใช้สำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันและจากการศึกษาของ Hatta et al. (1997) พบว่า เปอร์เซ็นต์ของ specific IgY ใน total IgY จะอยู่ระหว่าง 5 (anti-insulin antibody) ถึง 28% (anti-mouse IgG antibody) และจากการใช้ bovine IgG และ lactoferrin เป็นแอนติเจน พบว่ามีปริมาณของ specific IgY ประมาณ 10-15% ของ total IgY (Akita et al., 1998 และ Li-Chan et al., 1998) จากงานวิจัยของ Bollen et al. (1996) ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเมื่อมีการใช้ adjuvants ประเภทต่างๆ พบว่า Freund 's complete adjuvant (FCA) มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ได้สูงกว่า Freund' s incomplete adjuvant (FIA) และ Hunter's TiterMax adjavant แต่เนื่องจาก FCA มีผลข้างเคียงที่ทำให้ผลผลิตไข่ลดลง และถ้าใช้ต่อไปในระยะยาวจะมีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อไก่ (Erhard et al., 1997 และ Bollen and Hau, 1999) นอกจากนี้วิธีที่ใช้ฉีดวัคซีนก็มีผลต่อการผลิตแอนติบอดี ซึ่งมีวิธีการฉีดวัคซีนหลายวิธี เช่น intramuscular (Akita and Nakai, 1993) subcutaneous (Svendsen et al., 1995) intrabursal และ intracoelomic (Elfaki et al., 1992) โดยการฉีดแบบ intramuscular เป็นการฉีดกระตุ้นบริเวณกล้ามเนื้อหน้าอก และการฉีดแบบ subcutaneous เน้นการฉีดกระตุ้นบริเวณคอ ซึ่งเป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้ในกรณีที่ไก่มีอายุน้อยและอายุมาก ตามลำดับ จำนวนครั้งที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันขึ้นอยู่ประเภทและปริมาณของแอนติเจน โดยพบว่า 2-4 ครั้ง สำหรับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็เพียงพอสำหรับการผลิต specific antibody ที่มีความจำเพาะสูงได้ โดยพบว่าระดับของแอนติบอดีจะปรากฏในสัปดาห์ที่ 5-6 หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกและจะอยู่ต่อไปตลอดประมาณ 1 ปี (Schade et al., 1996 และ Li-Chan et al., 2000)

2.8.2 เปรียบเทียบการผลิตระหว่าง IgY ในสัตว์ปีก และ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น กระต่าย, หนู, แกะ และแพะ ถูกใช้ในการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและมีความแรงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีสูง (high avidity) (War, 1982 อ้างถึงโดย Sim et al., 2000) แต่ในปัจจุบันได้มีการศึกษาโดยการนำเอาไก่เข้ามาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำไปใช้ในการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไข่ไก่มีประโยชน์หลาย ๆ ด้านที่ดีกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

แม่ไก่สามารถผลิตไข่ได้ปีละประมาณ 240 ฟอง ซึ่งจะมีปริมาตรไข่แดงประมาณ 15 มิลลิลิตรต่อฟอง ในขณะที่ปริมาณซีรั่มที่เก็บได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่าย 1 ตัว จะมีประมาณ 40 มิลลิลิตร โดยที่ 1 กรัมของไข่แดงจะมีปริมาณ IgY อยู่ประมาณ 10 มิลลิกรัม ขณะที่ 1 มิลลิลิตรของซีรั่มกระต่ายจะมี IgG ประมาณ 35 มิลลิกรัม ดังนั้นแม่ไก่และกระต่ายจะสามารถผลิตแอนติบอดีได้ปีละ 36 กรัม และ 1.4 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม่ไก่สามารถผลิตแอนติบอดีได้สูงกว่าการผลิตแอนติบอดีจากกระต่าย ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสัตว์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่ในสัตว์ใหญ่ เช่น วัว หรือม้า สามารถที่จะผลิตแอนติบอดีได้มากกว่าในแม่ไก่ (Larsson et al., 1993 และ Hatta et al., 1997)

การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ปีกนั้น คล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะมีขั้นตอนของการตอบสนอง คือ การตอบสนองครั้งแรก (primary response) จะมี titer ที่ต่ำและความแรงของการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนต่ำ (avidity) และจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการตอบสนองครั้งที่ 2 (secondary response) (Kokko and Karenkampi, 1992 และ Wolley and Landon, 1995)

Ikemori et al. (1993) และ Wolley and Landon (1995) ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบในเรื่องของความจำเพาะต่อแอนติเจน (specificity) และความแรงของการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน (avidity) พบว่าแอนติบอดีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูงกว่าและมีความแรงของการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนเท่ากันหรือต่ำกว่า เมื่อเทียบกับแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่ไก่

2.9 ประโยชน์ของ IgY

การผลิตแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีขั้นตอนการผลิต 3 ขั้นตอน คือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน การเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัดแอนติบอดี ในขณะที่การผลิตแอนติบอดีจากไข่สามารถได้รับแอนติบอดีจากไข่แดงแทนการเก็บเลือดที่ทำในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงการเก็บไข่มีการใช้แรงงานคนน้อยกว่าและมีสุขลักษณะ (hygienic) ที่ดีมากกว่าการเก็บตัวอย่างจากเลือด (Hatta et al., 1997) และปัจจัยสำคัญคือจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีมีจำนวนน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแอนติบอดีจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในปริมาณของตัวอย่างที่เท่ากัน นอกจากนี้การเจาะเลือดยังทำให้สัตว์เกิดความเครียดและไม่ถูกต่อหลักของ animal welfare (Gottstein and Hemmeler, 1985 อ้างโดย Sim et al., 2000)

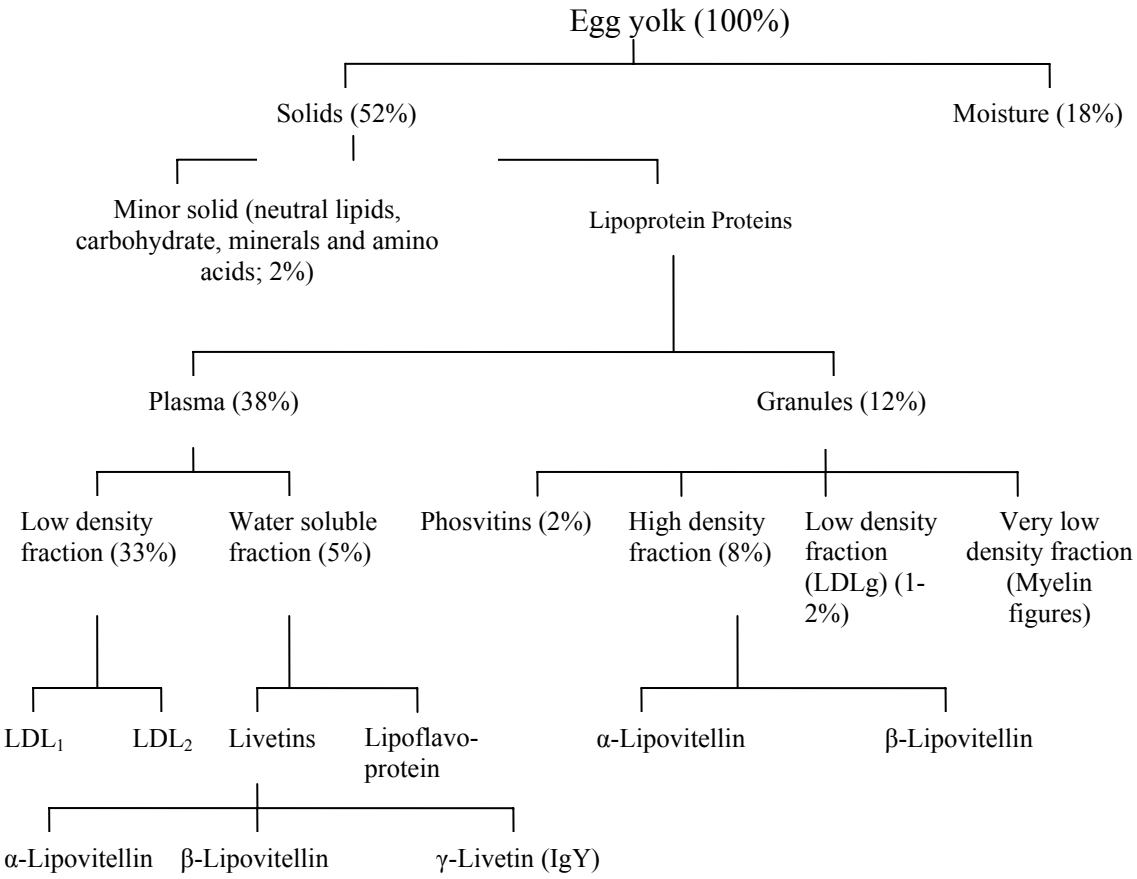
แม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในระยะเวลานาน เนื่องจากระดับของแอนติบอดีจะคงอยู่ได้นาน (Tsunemitsu et al., 1989 และ Kuroki et al., 1993) และไก่ยังสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนได้มากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่อง

จาก phylogenetic distance (Jensenius et al., 1981 อ้างถึงใน Sim et al., 2000) นอกจากนี้ IgY ยังมีความหลากหลายในการสร้างแอนติบอดี (restricted diversity) น้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้สามารถที่จะผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้มากกว่า (Reynaud et al., 1985; Song et al., 1985 อ้างถึงใน Sim et al., 2000)

2.10 การแยกและการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์

ส่วนของไข่แดงเมื่อนำมาทำการปั่นเหวี่ยงจะแยกออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ตกตะกอนเรียกว่า granules และส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบน เรียกว่า plasma (Sim et al., 2000) โดยส่วนของ granules จะประกอบไปด้วย 70% α- และ β- lipovitellins 16% phosvitin และ 12% low-density lipoprotein (LDL) โดยในไข่แดงจะมีส่วนของ plasma 78% ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของ lipid-free globulin protein, livetin (α-, β- และ γ-) ประมาณ 10.6% ของของแข็งในไข่แดง และ LDL โดย IgY คือส่วนของ γ- livetin ซึ่งอยู่รวมกับส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water-soluble protein; WSF) ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด คือ livetin (α-livetin และ β- livetin) และ lipoprotein ดังนั้นในการแยกส่วนของ IgY หรือ γ- livetin ออกจากส่วนอื่นๆ สามารถทำได้โดยการแยกเอาส่วนของ WSF ออกจากส่วนของ lipoprotein ในไข่แดง ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3 จากนั้นนำไปทำให้ได้แอนติบอดีบริสุทธิ์ (purified IgY) โดยแยกส่วนของ livetin ประเภทอื่นๆ ออกไป ซึ่งวิธีการแยกและการทำให้บริสุทธิ์นั้นไม่ได้ยุ่งยากซับซ้อน (Akita and Nakai, 1992; 1993) เนื่องจากว่า IgY มีส่วนประกอบหลักคือ γ- livetin ซึ่งจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าพวก α-livetin และ β-livetin ทำให้ง่ายในการแยก IgY ออกจากโปรตีนอื่นๆ (Sim et al., 2000)

เนื่องจากส่วนของ lipoprotein ที่อยู่ในไข่แดงจะรวมกันอยู่ที่ประจุไฟฟ้าต่ำ (Jenenius et al., 1981 อ้างโดย Sim et al., 2000) ทำให้มีงานวิจัยที่ใช้วิธีการเจือจางด้วยน้ำในการแยกส่วนของ lipoprotein ออกจากส่วนของ water insoluble fraction จากนั้นจึงนำไปทำการ centrifuge หรือ filtration เพื่อทำการแยกส่วนของ WSF ออกจากส่วน water insoluble fraction ในไข่แดง (Kwan et al., 1991 และ Akita and Nakai, 1992) ซึ่งในการแยกส่วนของ WSF ออกจากไข่แดงด้วยน้ำนั้น มีอยู่ 2 ปัจจัยที่จะต้องระมัดระวังคือ pH ที่ต้องปรับหลังจากการเจือจางด้วยน้ำและสัดส่วนในการเจือจาง (Akita and Nakai, 1992) ซึ่งจากการศึกษาของ Fichtail et al. (1993) พบว่า สามารถแยกส่วนของ IgY ออกจาก WSF ได้ 54% เมื่อมีการเจือจางด้วยน้ำที่ 10 เท่า และมีการปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 นอกจากนี้จากการศึกษาของ Akita and Nakai (1992) พบว่าสามารถแยกส่วนของ IgY ได้ถึง 93-96% เมื่อมีการเจือจางด้วยน้ำที่ 6 เท่า และมีการปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 จากนั้นนำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตามด้วยการนำไป centrifuge หรือ filtration



แผนภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบของไข่แดง

ที่มา: Stadelman and Owen (1986)

หลังจากที่มีการแยกส่วนของ WSF ที่มีส่วนของ livetin ผสมอยู่ออกจากส่วนของ egg granule ขั้นตอนต่อมาคือการแยก IgY ออกจากส่วนของ livetin ตัวอื่นๆ คือ α-livetin, β-livetin และ LDL ซึ่งมีอยู่หลายวิธีในการนำมาใช้ เช่น ultracentrifugation, organic solvent, precipitation of lipoprotein โดย polyethyleneglycol, precipitation โดยใช้ sodium dextran sulphate (Jenenius et al., 1981 อ้างถึงใน Sim et al., 2000), ultrafiltration (Akita and Nakai, 1992), ion exchange chromatography และ metal chelate interaction chromatography ซึ่งจากการศึกษาของ Akita and Nakai (1992) ได้มีการเปรียบเทียบ 4 วิธีการในการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์ ซึ่งแต่ละวิธีจะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันทั้งปริมาณของ IgY และ % purified IgY ที่ได้รับ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์ (purified IgY) ด้วยวิธีการต่าง ๆ

การทดสอบส่วนของ supernatant fluid	ปริมาณ IgY (%)	ความบริสุทธิ์ (%)	การทดสอบผลผลิตสุดท้าย	ปริมาณ IgY มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไข่แดง	ความบริสุทธิ์ (%)
Yolk	100				
WD-SN	91	31	WD-UF	9.8	94
PEG-SN	47	25	PEG-Alc	4.9	89
DS-SN	71	x	DS-As2	7.5	87
Xan-SN	72	32	Xan-As2	7.3	89

-Water dilution method (WD), 19% sodium sulphate (SN), Ultra-filtration (UF), Dextransulphate precipitation (DS), Xanthan method (Xan), polyethylene glycol (PEG) precipitation

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schade et al. (2001)

2.11 การทำงานของ IgY ในด้าน antimicrobial activity

2.11.1 Anti-viral effect

การก่อให้เกิดโรคของไวรัสเกิดจากไวรัสเข้าเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์โฮสต์ ยกตัวอย่างเช่น การเกิดโรค rotavirus ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการทำให้เกิดโรค gastroenteritis ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อของเซลล์บริเวณวิไล (villi) ในลำไส้เล็ก ทำให้ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ใน cytoplasm ของ enterocytes มีผลต่อการขัดขวางกลไกการเคลื่อนย้ายและการดูดซึมสารอาหารต่างๆ ภายในร่างกาย ทำให้เกิดอาการท้องเสีย โรค coronavirus เป็นการติดเชื้อในทางเดินอาหารเช่นเดียวกัน เมื่อเกิดโรคนี้ในผู้ใหญ่จะมีผลทำให้เกิดอาการหนาว เป็นไข้ และในทารกมีผลทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหาร ในกรณีที่เกิดในสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะจะเกิดขึ้นในสัตว์เล็ก มีผลต่อการทำลายส่วนของ epithelial cell และทำให้ความสามารถในการดูดซึมสารต่างๆ ลดลง

กลไกการทำงาน

แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่บริเวณผิวของไวรัส มีความสำคัญในการควบคุมการแพร่ขยายของจำนวนไวรัสในระหว่างการติดเชื้อ และป้องกันการกลับมาติดเชื้ออีกครั้ง โดยไวรัสจะมี receptor อยู่ที่บริเวณผิว เป็นตัวก่อให้เกิดการติดเชื้อ ซึ่ง receptor นี้จะเข้าไปจับเกาะส่วนของโมเลกุลเนื้อเยื่อของโฮสต์ ในกรณีที่มีแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากส่วนของ viral receptor จะมีผลทำให้สามารถเข้าไปจับกับเชื้อโรค ทำให้สามารถป้องกันการเกาะยึดของไวรัสกับเซลล์โฮสต์ได้ ในการ neutralization ส่วนของไวรัสด้วยแอนติบอดีอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกที่มีการจัดการไวรัสที่เกาะอยู่กับเซลล์ของโฮสต์ หรืออาจเกิดจากการที่แอนติบอดีเข้าไปยับยั้งการ

แพร่กระจายของไวรัส โดยไปจับกับส่วน epitope ของ plasma membrane และทำให้เกิดการตกตะกอนของไวรัส (Kuby, 1997)

2.11.2 Anti-bacterial effect

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาจจะมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงเพียงหนึ่งปัจจัย หรืออาจจะมากกว่านั้นก็ได้ แบคทีเรียหลายประเภทมี capsule เพื่อใช้ในการเกาะยึดกับส่วนของ mucosal cell ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกที่ก่อให้เกิดโรค (Bene and Schmidt, 1997) ตามด้วยการพัฒนาของ microcolonies และการเกิดโรค ซึ่งเซลล์แบคทีเรียจะมีส่วนของโมเลกุลบนผิวที่มีความสามารถในการเข้าไปเกาะยึดกับเซลล์ของโฮสต์ได้ (Brooks et al., 1998) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์ของโฮสต์ คือ ลักษณะผิวโครงสร้างของแบคทีเรีย เช่น pili, lipopolysaccharide (LPS) side chain (O antigen) และ M protein แต่ส่วนใหญ่ คือ pili ซึ่งมีลักษณะคล้ายขนเล็กๆ ยื่นออกมาจากบริเวณผิวของแบคทีเรีย (Bene and Schmidt, 1997) ยกตัวอย่าง *E.coli* จะมี type I pili ที่ใช้เป็นตัวเกาะกับ epithelial cell receptor โดย *E.coli* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องเสีย เกิดจากการที่ pili ของเชื้อไปเกาะที่บริเวณ epithelial cell ในลำไส้ (Brooks et al., 1998) นอกจากนี้ มีแบคทีเรียบางประเภท เช่น *Salmonella* spp. จะเข้าไปในเนื้อเยื่อโดยผ่าน junction ระหว่าง epithelial cell ที่บริเวณด้านในของเซลล์โฮสต์ หรือแบคทีเรียอาจจะแทรกอยู่ใน vacuole ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อของเซลล์ หรือ vacuole อาจจะถูกทำให้แตก ทำให้แบคทีเรียเกิดการแพร่กระจายเข้าไปใน cytoplasm (Brooks et al., 1998)

นอกจากนั้นแบคทีเรียอาจจะผลิตและปล่อยเอนไซม์ออกมา ซึ่งอาจจะเป็นตัวที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรค โดยเอนไซม์อาจจะไปทำให้เกิดการแตกสลายของ collagen, fibrin และส่วนประกอบของเซลล์ หรืออาจจะไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์ สารพิษจากแบคทีเรีย (toxin) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ exotoxins ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นและปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการทำให้เกิดพิษ ในขณะที่ endotoxins เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย exotoxins สามารถแบ่งออกได้เป็น entertoxins, neurotoxin และ cytotoxin ในส่วนของ entertoxins จะมีผลต่อทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับ heat-labile toxin (LT-I, LT-II), heat-stable toxin (ST) และ cholera toxin ในส่วนของ endotoxins ซึ่งหมายถึงส่วนของ lipopolysaccharide (LPS) ที่แยกได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบจะมี endotoxins อยู่ที่ outer membranes ซึ่ง endotoxins ของแบคทีเรียแต่ละประเภทจะแตกต่างกันออกไป (Bene and Schmidt, 1997)

กลไกการทำงาน

แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อบริเวณผิวของแบคทีเรีย จะเข้าไปทำการขัดขวางการเกาะยึดของแบคทีเรียกับผนังของลำไส้ เป็นการขัดขวางการเกิด colonization ทำให้โอกาสในการเกิดโรคลดลง (Imberechts et al., 1997) ยกตัวอย่างเช่น anti-F18ab fimbriae antibody จะเข้าไปจับกับ fimbriae ของ *E.coli* K88 เพื่อป้องกันการเกาะยึดของ *E.coli* ที่บริเวณ mucosal receptor (Jin et al., 1998) โดยจากการศึกษาของ Yokoyama et al. (1992) และ Jungling et al. (1991) พบว่า สามารถใช้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียเพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้ในสุกรเล็กได้ ทั้งนี้เนื่องจาก IgY จะเข้าไปยับยั้งการเกาะยึดระหว่าง *E.coli* กับส่วนของ mucus ที่อยู่ในลำไส้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการเกิดขบวนการ colonization ที่บริเวณลำไส้เล็ก

แอนติบอดีที่เกิดจากการให้แอนติเจน outer membrane proteins (OMPs) มีผลต่อการยับยั้งการเกิด colonization ของ *S. enterica* serovar Enteritidis และ *S. enterica* serovar Typhimurium โดยการเข้าไปจับยึดบริเวณผิวโปรตีนของแบคทีเรีย ซึ่งกลไกที่แอนติบอดีเข้าไปขัดขวางการเกาะกับเนื้อเยื่อโฮสต์ยังไม่ชัดเจน ซึ่งจากการศึกษาของ Yokoyama et al., 1998a; 1998b พบว่า OMPs ที่บริเวณผิวของเชื้อ *Salmonella* spp. ง่ายต่อการจดจำของแอนติบอดี เมื่อจับกันแล้วอาจจะนำไปสู่การทำลายคุณสมบัติของ OMPs ของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งมีผลทำให้ลดการเกิดโรคจากเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ เพราะไม่ทำให้เกิด colonization ในลำไส้

Streptococcus mutans จะมีการสังเคราะห์ polysaccharides ขนาดใหญ่ เช่น dextrans หรือ levans จาก sucrose ซึ่งเป็นตัวที่มีความสำคัญในการกระตุ้นการเกิดคราบหินปูนและฟันผุ (dental caries) โดย IgY ที่มีความจำเพาะกับส่วนของ insoluble glucans ที่อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ของ *S. mutans* จะสามารถยับยั้งการเกาะยึดของแบคทีเรียได้ ซึ่งการทดลองในมนุษย์นั้นยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Ma et al. (1987) และ Lehner et al. (1985) อ้างถึงใน Sim et al. (2000) พบว่า anti- *S. mutans* antibody จะเข้าไปจับกับส่วนของแอนติเจนบนผิวของแบคทีเรีย เพื่อป้องกันการเกาะยึดที่บริเวณฟัน และ opsonized bacteria อาจจะถูกทำลายโดยกลไกการป้องกันของโฮสต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Filler et al. (1991) พบว่า การจับกันของแอนติบอดีที่บริเวณพื้นผิวของ *S. mutans* อาจจะนำไปสู่การยับยั้งขบวนการ metabolism ที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ในการเกาะยึดและการ colonization ที่เกิดขึ้น

จากการศึกษาผลของการใช้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อการเกิดท้องเสียในสุกรแรกเกิดและในสุกรหย่านม พบว่า IgY จะถูกทำลายได้โดย pepsin ในลำไส้ (pH 2.3) ในสุกรที่อายุมาก ทำให้มี IgY จำนวนน้อยที่สามารถผ่านไปยังลำไส้ได้โดยไม่ถูก hydrolysis แต่ในสุกรเล็ก IgY สามารถ

ผ่านกระเพาะได้โดยไม่ถูกทำลายจากสภาพแวดล้อมภายในลำไส้ที่ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นมันจึงสามารถถูกดูดซึมได้ภายในลำไส้เล็กและมีการส่งผ่านไปยังระบบไหลเวียนเลือดได้ (Yokoyama, et al., 1993)

2.12 ผลการศึกษาการนำ IgY ไปใช้ประโยชน์ทางด้าน antimicrobial activity

2.12.1 Anti-rotavirus IgY

Rotavirus เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียในทารกและในสัตว์ที่มีอายุน้อย เช่น ในโคและในสุกร การติดเชื้อในเด็กเล็กและในสัตว์เกิดขึ้นเป็นประจำ ซึ่ง rotavirus จะมีโฮสต์จำนวนมาก โดยส่วนใหญ่จะสามารถแยกได้จากสัตว์แรกเกิดที่มีอาการท้องเสีย จากการศึกษาของ Sim et al. (2000) พบว่า human rotavirus สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคท้องเสียได้ในสัตว์แรกเกิดที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง ในกรณีของสุกร การติดเชื้อ rotavirus สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสุกรแรกเกิดและในสุกรหย่านม ในสุกรแรกเกิดจะมีการแสดงอาการแบบ subclinical อาจเนื่องมาจากการได้รับแอนติบอดีจากแม่ แต่ในสุกรหย่านมจะแสดงอาการมากกว่า

2.12.1.1 Anti- human rotavirus IgY

Human rotavirus (HRV) พบในปี 1973 (Sim et al., 2000) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในทารกและในเด็กเล็ก การติดเชื้อ HRV จะมีการติดเชื้อที่บริเวณ epithelial cell ในลำไส้และนำไปสู่การเกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง พร้อมกับการอาเจียน การทำวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HRV ไม่ประสบความสำเร็จ ทั้งนี้เนื่องจากการกระตุ้นการทำงานของแอนติบอดีภายในลำไส้ของทารกซึ่งระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์ (Sim et. al., 2000) ดังนั้นจึงได้มีการให้ oral passive immunity เพื่อเติมภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อ HRV ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการศึกษาถึงผลของการใช้ IgY ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ HRV ทั้งส่วนที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการและการนำไปใช้จริง

จากการศึกษาของ Hatta et al. (1993) มีการให้กิน anti-HRV IgY จากไข่ไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วย HRV เพื่อป้องกันการเกิดท้องเสียใน suckling mice พบว่า IgY สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ HRV ได้ โดยให้กิน IgY ก่อนที่มีการให้เชื้อพิษ (challenge) แก่หนูด้วยเชื้อ HRV เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ebina (1996) ซึ่ง พบว่า IgY จากไข่ไก่สามารถต่อต้าน HRV (Mo strain) ในการป้องกันการเกิดท้องเสียในหนูได้

2.12.1.2 Anti-bovine rotavirus IgY

Rotavirus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้มากในลูกโคแรกเกิด ได้มีรายงานการให้ภูมิคุ้มกันแบบ passive ของ IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ bovine rotavirus (BRV) เพื่อป้องกันการเกิดท้องเสียในสัตว์ เช่น ในหนูและโค โดยจากการศึกษาของ Kuroki et al. (1993; 1994) ได้มี

การใช้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ BRV serovar G6 และ G10 จากไข่ไก่ เพื่อป้องกันลูกโคที่อยู่ภายใต้สภาวะการติดเชื้อ BRV serovar G6 (strain Shimane) และ G10 (strain KK-3) โดยดัชนีที่ใช้วัด เช่น น้ำหนักตัว อัตราการตาย และการลดลงของ BRV titer ในมูล ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและลดจำนวนของลูกโคที่มีการปล่อยเชื้อไวรัส (shedding) BRV (G6) ในปริมาณมากได้ เมื่อมีการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.12.2 Anti-*Salmonella* IgY

Salmonella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั้งในสัตว์และในคน โดยทำให้เกิดอาการคล้ายอยากอาเจียน อึดอัดในท้อง ท้องเสียและมีไข้ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของไก่ในการต่อต้าน LPS เป็นผลมาจากการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ LPS ซึ่งเป็นส่วนหลักที่อยู่บน OMPs ของแบคทีเรียแกรมลบ (Sunwoo et al., 1996 และ Yokoyama et al., 1998a, 1998b) จากการศึกษาของ Sunwoo et al. (1996) พบว่า IgY ที่มีความจำเพาะต่อส่วนของ LPS สามารถใช้เพื่อป้องกันการเกาะยึดของเชื้อ *Salmonella* spp. ทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ นอกจากนี้ก็มีส่วนของ 14 kDa fimbriae (Peralta et al., 1994) และส่วนของ OMPs (Yokoyama et al., 1998a, 1998b) ของ *Salmonella* spp. ก็มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิด Salmonellosis ได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการใช้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อ 14kDa fimbriae ของ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการให้หนูที่มีการติดเชื้อกิน ผลปรากฏว่าสามารถลดความรุนแรงของแบคทีเรียได้ (Peralta et al., 1994) ซึ่งจากการศึกษาของ Yokoyama et al. (1998b) มีการให้ passive immunity โดยการให้กิน IgY ที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อ *S. enterica* serovar Typhimurium และ *S. enterica* serovar Dublin พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรค Salmonellosis ในลูกโคได้เช่นกัน

ในการจัดการอาหารไก่กระทงโดยมีการให้ IgY พบว่ามีความสามารถในการต่อต้าน *S. enterica* serovar Enteritidis phage type 13A พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากกลุ่มควบคุมที่มีการให้อาหารที่เสริมด้วยสารตัวอื่นๆ เช่น multiple probiotics, organic acid และ *Lactobacillus* sp. (Sim et. al., 2000) โดยพบว่า การใช้ anti- *S. enterica* serovar Enteritidis IgY มีประสิทธิภาพสามารถป้องกันการ colonization ของแบคทีเรียภายในลำไส้และสามารถป้องกันการลุกลามไปยังอวัยวะต่างๆ ของไก่กระทงที่มีการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis phage type 13A นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า egg powder ที่มีส่วนของ IgY สามารถที่จะต่อต้าน microbial pathogen ได้ ดังนั้นจึงอาจจะใช้เป็น feed additive ซึ่งมีหน้าที่ช่วยป้องกันโรคได้

2.12.3 Anti-Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) IgY

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียและตายในลูกโคและลูกสุกร (Sim et. al., 2000) การเกิดโรคท้องเสียในลูกโคและสุกรหลังหย่านมได้กลายเป็นปัญหาใหญ่ เนื่องจากมีแนวโน้มที่เกิดขึ้นมาก ซึ่งการให้ภูมิคุ้มกันแบบ passive โดยการให้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* K88, K99 และ 987P fimbraiae ของ ETEC สามารถป้องกันการติดเชื้อในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลืองได้ (Yokoyama et al., 1992) โดย IgY จะเข้าไปจับกับ ETEC ทำให้ ETEC ไม่สามารถเกาะกับ mucosal cell ที่บริเวณผนังลำไส้ได้ และมีการศึกษาเช่นเดียวกันในงานของ Jin et al. (1998) พบว่า IgY ที่มีความจำเพาะต่อ ETEC *E. coli* $K88^+$ MB bacterium (*E.coli* $K88^+$ MB) สามารถป้องกันการเกาะยึดของ *E. coli* $K88^+$ ใน mucus ที่แยกมาจากลำไส้ของสุกรได้ และจากการศึกษาของ Imberechts et al. (1997) ซึ่งเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่า anti-$F18ab^+$ fimbriae IgY สามารถยับยั้งการเกาะของ $F18ab^+$ *E. coli* กับ mucosa ที่บริเวณผนังลำไส้ได้ นอกจากนั้นยังมีผลทำให้การเกิดท้องเสียและอัตราการตายในสุกรที่มีการติดเชื้อ $F18ab^+$ *E. coli* ลดลงด้วย

K99 pili เป็นแอนติเจนตัวหนึ่งที่มีความสำคัญในการเกาะยึดของ ETEC ที่แยกได้จากลูกโค (Sim et. al., 2000) ซึ่งได้มีการศึกษาการใช้ egg yolk powder ที่เตรียมจากแม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นโดย heat-extracted antigen ของ K99 -piliated ETEC strain 431 โดยในการทดลองจะไม่ให้ลูกโคได้รับนมน้ำเหลือง และให้ ETEC เป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิดท้องเสีย พบว่า การใช้ egg yolk powder สามารถป้องกันการเกิดท้องเสียในลูกโคได้ และ O'Farrelly et al. (1992) ได้ศึกษาถึงผลของการใช้ IgY ในการต่อต้านเชื้อ ETEC B16-4 กับ LT (heat-labile toxin) และ CFA (colonization factor antigens)-I ในกระต่าย ต่อการลดการเกิดท้องเสีย โดยมีการให้กิน egg yolk powder ที่มีส่วนประกอบของ IgY เป็นเวลา 4 วันก่อน เพื่อป้องกันกระต่ายจากโรคท้องเสีย หลังจากนั้นจะมีการให้เชื้อพิษ (challenge) ด้วย *E. coli* strain เดียวกัน ผลปรากฏว่ากระต่ายไม่แสดงอาการท้องเสีย

Sunwoo et al. (2002) ศึกษาผลของการใช้ IgY โดยการนำเชื้อ *E. coli* O157:H7 ไป inoculate ร่วมกับ specific และ non-specific IgY จากนั้นนำมาผสมกับ rabbit anti-chicken IgG แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ goat anti-rabbit IgG ที่ผสมร่วมกับ gold ผลปรากฏว่ามี gold อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ของแบคทีเรียที่ทำปฏิกิริยากับ specific IgY แต่ไม่พบในแบคทีเรียที่ทำปฏิกิริยากับ non-specific IgY ซึ่งการที่มีส่วนของ gold เป็นการตรวจสอบว่า specific IgY ทำปฏิกิริยากับ bacteria ในส่วนของ epitope มีผลทำให้เกิด gold particle อยู่รอบๆ บริเวณผิวของแบคทีเรีย ซึ่งนั่นหมายถึงส่วนของ epitope ที่ถูกแยกออกมาจากส่วนผิวของแบคทีเรีย เช่น LPS, OMPs, fimbriae และ flagella มีผลทำให้ morphological ของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลง โดย

ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกออกจากกัน ในขณะที่กลุ่มของแบคทีเรียที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ non-specific IgY ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง morphological ของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee et al. (2002) ที่พบว่า IgY มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และทำลายส่วน cellular processes เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Owusu-Asiedu et al. (2000; 2002; 2003) ได้มีการทดลองเสริม anti-*E. coli* egg yolk antibody ร่วมกับ pea protein isolate (PPI) เปรียบเทียบกับการใช้ spray-dried porcine plasma protein (SDPP) และ animal plasma protein (SDAP) พบว่าในการทดลองที่มีการใช้ SDPP และ SDAP เป็นแหล่งของโปรตีนนั้นสามารถที่จะช่วยในการป้องกันแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ ทั้งนี้เนื่องจาก SDPP และ SDAP สกัดมาจาก plasma ของสัตว์ ซึ่งจะมี immonoglobulins ที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์บางจำพวกได้ แต่เนื่องจาก SDPP และ SDAP มีราคาค่อนข้างแพงและในปัจจุบันทางด้านยุโรปมีการประกาศห้ามใช้โปรตีนดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากอาจจะมีการปนเปื้อนของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy ; BSE) ได้ ดังนั้นจึงมีการหาแหล่งโปรตีนอื่นๆ ที่จะนำมาใช้ทดแทน ซึ่งได้มีการนำ PPI มาทดลองใช้ แต่เนื่องจาก PPI เป็นแหล่งของโปรตีนที่ไม่มี immonoglobulins ที่สามารถป้องกันเชื้อโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody เพื่อช่วยในการป้องกันแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody ร่วมกับ PPI ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ SDPP และ SDAP และจากการศึกษาของ Owusu-Asiedu et al. (2003) ได้มีการศึกษาผลของการใช้ PPI ร่วมกับ anti-*E. coli* egg yolk antibody เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเสริมอื่นๆ คือ zinc oxide, fumaric acid และยาปฏิชีวนะ พบว่า การใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody มีผลทำให้สามารถลดอัตราการตายที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรได้ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ zinc oxide, fumaric acid และยาปฏิชีวนะ

2.12.4 Anti- *Streptococcus mutans* IgY

Streptococcus mutans เป็นแบคทีเรียหลักที่ทำเกิดโรคทางทันตกรรมในมนุษย์ (Sim et. al., 2000) การให้ภูมิคุ้มกันแบบ passive จาก IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. mutans* มีผลทำให้สามารถป้องกันการเกิดคราบหินปูนและฟันผุได้ จากการศึกษาของ Otake et al. (1991) พบว่าการใช้ภูมิคุ้มกันแบบ passive จาก IgY ที่มีความจำเพาะกับ *S. mutans* สามารถลดการเกิดคราบหินปูนและฟันผุได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งได้มีการนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการและมีการนำมาใช้จริง นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่า IgY ที่มีความจำเพาะกับ *S. mutans* มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ใน sucrose ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิด colonization ของ *S.*

mutans ในช่องปากของมนุษย์ได้ (Hatta et al., 1997) จากผลการศึกษาต่างๆ ทำให้ทราบถึงประโยชน์ของการใช้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. mutans* เพื่อการควบคุมการเกิดคราบหินปูนและปัญหาสุขภาพในช่องปากได้

2.12.5 เชื้ออื่นๆ

Bovine coronavirus (BCV) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในการเกิดท้องเสียในลูกโคแรกเกิดและการเกิด acute diarrhea ในโคเล็ก ซึ่งหมายถึง winter dysentery โดย BCV เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียอย่างรุนแรง และทำให้มีอัตราการตายสูงกว่า bovine rotavirus (BRV) ทั้งนี้เนื่องจาก BCV สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในส่วนของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ในขณะที่ BRV เกิดได้เฉพาะในลำไส้เล็ก (Sim et. al., 2000) การให้ภูมิคุ้มกันแบบ passive โดยให้ IgY ที่มีความจำเพาะต่อ BCV สามารถป้องกันการเกิดโรคท้องเสียในลูกโคแรกเกิดที่มีการติดเชื้อ BCV ได้ (Ikemori et al., 1997)

Yoshiko et al. (1996) ได้มีการศึกษาผลของการใช้ IgY ที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย formalin-treated-*Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus* enterotoxin-A และ *S. enterica* serovar Enteritidis ผสมร่วมกัน พบว่า IgY มีประสิทธิภาพสามารถป้องกันเชื้อโรคต่างๆ ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันดังกล่าวได้

การติดเชื้อ *Edwardsiella tarda* ของปลาไหล (eels) เป็นที่รู้กันว่าทำให้เกิดอัตราการตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งจากการศึกษาของ Hatta et al. (1994) ได้มีการให้เชื้อพิษ (challenge) ของ *Edwardsiella tarda* ผสมกับส่วนของไข่แดงผงที่มีส่วนผสมของ IgY 20% และผสมร่วมกับอาหารที่ได้รับการฆ่าเชื้อ (sterile) ทำการสอดท่อปล่อย (cannulation) เข้าไปในท้องของปลาไหล พบว่าสามารถลดอัตราการตาย ทำให้ไม่มีส่วนของเชื้อโรคในลำไส้ ลดการลุกลามของเชื้อที่บริเวณตับและไตได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ IgY antibody สามารถป้องกันการเกิดโรค Edwardsiellosis ในทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำเอา IgY ไปใช้เพื่อป้องกันโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่บริเวณ intestinal mucosa ในทางเดินอาหารของปลาได้ ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงการใช้สารพวกยาปฏิชีวนะ หรือพวก chemotherapeutics ในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาได้

2.13 ข้อจำกัดของการนำไปใช้

ข้อจำกัดของการใช้ IgY ในการป้องกันและรักษาโรค เนื่องจาก IgY มีความไวต่อการถูกย่อยโดย proteolysis จึงมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อการย่อย IgY โดย pepsin พบว่า สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำ (Shimizu et al., 1988 และ Schmidt et al., 1989) IgY มี

half-life ประมาณ 1.85 วัน ซึ่งสั้นกว่า homologous IgG (colostrums antibody) ในสุกรแรกเกิดที่นานประมาณ 12-14 วัน (Curtis and Bourne, 1971, 1973 อ้างโดย Sim et al., 2000) และความสามารถของ IgY ในการที่จะผ่านการย่อยของเอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารไปจนถึงลำไส้เล็ก เพื่อที่จะมีการดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือดจะขึ้นอยู่กับอายุของสุกรด้วย (Yokoyama et al., 1993)

เนื่องจาก IgY ไม่สามารถป้องกันโรคได้ทั้งหมดแต่จะสามารถลดการติดเชื้อได้ (Kuroki et al., 1993) และแม้ว่า IgY จะสามารถยับยั้งการเกาะยึดของ ETEC $K88^+$ MB bacterium (*E. coli* $K88^+$ MB) ใน intestinal mucosa ของสุกรได้ แต่การ inoculate IgY ร่วมกับ *E. coli* ในระยะเวลาที่นานขึ้น ไม่ได้ช่วยในการลดปริมาณของ *E. coli* ในการเกาะกับ intestinal mucosa ได้ โดยแอนติบอดีไม่สามารถเข้าไปแทนที่ *E. coli* $K88^+$ MB ในการจับกับ mucous membrane ในลำไส้เล็กได้ ซึ่งมีการศึกษาพบว่า แอนติบอดีมีแรงในการจับ (affinity) กับ receptor ที่ mucous membrane ต่ำกว่า K88 fimbriae มีผลทำให้ IgY ไม่สามารถทำให้ *E. coli* $K88^+$ MB ที่มีการจับเกาะกับ mucous membrane หลุดออกได้ (Jin et al., 1998)

จากผลการศึกษาของ O'Farrelly et al. (1992) พบว่า IgY และ whole egg yolk สามารถป้องกันโรคได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นในการนำมาใช้จะต้องมีการพิจารณา แม้ว่า IgY ที่ได้จากการสกัดจะมีความบริสุทธิ์และมีความคงตัวมากกว่าในกรณีที่มีการเก็บรักษาในระยะเวลานาน แต่ก็ค่อนข้างที่จะต้องใช้เวลานานในการเตรียมและมีราคาแพง แต่การนำมาใช้ในรูปของ whole egg yolk ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่สะดวกและง่ายในการนำมาใช้ แต่อาจจะเป็นพาหะที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของ *Salmonella* spp. หรือเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่นๆ ได้ จึงต้องมีการพัฒนาต่อไป

2.14 การนำไปใช้ในอนาคต

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่และการผลิต IgY เป็นวิธีที่ง่าย มีการศึกษาการนำเอา IgY มาใช้เสริมในอาหาร เนื่องจาก IgY ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี water dilution ไม่มีการใช้สารเคมีทำให้ได้รับ IgY ที่ปลอดภัย (Kwan et al., 1993) ซึ่ง IgY ได้รับการยอมรับจากกระทรวงเกษตร (United State Department of Agriculture: USDA) และองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration: FDA) ให้อยู่ในบัญชีสารอาหารปลอดภัยที่เรียกว่าบัญชี Generally Recognized as Safe: GRAS (Coleman, 2000)

Akita et al. (1998) พบว่า cocktail IgY สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแอนติเจนได้หลายชนิด และจากการศึกษาของ Schmidt et al. (1989) พบว่า การใช้ไข่ทั้งใบ (whole egg yolk) แม้จะสามารถช่วยป้องกันส่วนของ IgY ให้สามารถทนต่อความร้อนและกรด

ได้มากยิ่งขึ้น แต่ในอีกด้านหนึ่ง พบว่า อาจจะเกิดการแพ้เมื่อมีการใช้ whole egg yolk เนื่องจากความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของ IgY และ IgG ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bernhisel–Broadbent et al., 1991) แต่จากการศึกษาของ Akita et al. (1999) พบว่า ส่วนของ IgY ก่อให้เกิดการแพ้ได้น้อยกว่าส่วนของไข่ขาว (egg white) ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้ในไข่ นอกจากนี้ยังพบว่า มีโอกาสเกิด cross – reactivity ระหว่าง IgY และไข่ขาวน้อยมาก

การเก็บรักษา IgY สามารถเก็บไว้ได้ในรูปของของเหลวที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยมีการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือเก็บไว้ในรูปของการทำแห้ง (Li-Chan, 2000) ซึ่ง IgY สามารถเก็บไว้ได้นาน 5-10 ปี ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (Larsson et al., 1993) การเก็บรักษา IgY ในรูปของการ freeze–drying ที่อุณหภูมิต่ำ มีการศึกษาพบว่า มีโอกาสน้อยมากที่จะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และส่วนของ IgY ยังถูกทำลายน้อยกว่าการเก็บรักษาในรูปของการทำ spray drying (Rousell and McCue, 1991) โดยจากการศึกษาของ Chansarkar (1998) พบว่า IgY หลังจากทำการ freeze-drying ยังคงมีระดับของโปรตีนสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเข้มข้นของเกลือต่ำ คือ 0.14 M NaCl ซึ่งไม่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายได้ของ IgY และประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจน

บทที่ 3
การผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในรูปต่างๆ

3.1 คำนำ

S. enterica serovar Enteritidis เป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease) ซึ่งสถิติการเกิดโรคดังกล่าวมีอัตราเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โดยในปี ค.ศ. 1972-1989 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis 0.70% และต่อมาได้เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จาก 1.33, 2.98, 9.54 และ 16.98% ในปี ค.ศ. 1990, 1991, 1992 และ มกราคม-มิถุนายน ในปี ค.ศ. 1993 ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว พบมีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อไก่มากกว่าผลิตภัณฑ์จากแหล่งอื่นๆ (Bangtrakulnonth et al., 1993) นอกจากนี้ เชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ยังเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากในการส่งออกสินค้าประเภทผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกนั้น สินค้าจะต้องปลอดหรือปนเปื้อนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis น้อยกว่า 10^2 colony forming unit (CFU) ต่อตัวอย่างเนื้อที่ใช้ทดสอบ 25 กรัม (ประกาศสำนักงานกรรมการอาหารและยา, 2546) การติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไก่มีได้หลายทาง เช่น เชื้อสามารถถ่ายทอดจากรังไข่ของแม่ไก่ผ่านไปยังไข่ไก่ได้ และเมื่อไข่ไก่ถูกฟักออกมาเป็นตัวเชื้อนี้จะกลายเป็นพาหะอาศัยอยู่ในไก่ โดยที่ไก่ไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด (จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 2544)

Chicken egg yolk antibodies หรือ Immunoglobulin Y (IgY) คือแอนติบอดีจากไข่แดงของไก่ (Leslie and Clem, 1969) จากการศึกษาพบว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายๆ ด้าน เช่น การนำมาใช้ในการป้องกันโรค ยกตัวอย่างเช่น การใช้ IgY ในการป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกร, ป้องกันโรค Salmonellaosis ในคน ลูกโค และในไก่ไข่ (Yokoyama et al., 1992; 1998a; 1998b; Ronald et al., 1999; Jin et al., 1998; Imberechts et al., 1997; Owusu-Asiedu et al., 2003a; 2003b; Kassaify and Mine, 2004) และป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหารจากเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ในคน (Shin et al., 2002) เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาของ Akita and Nakai (1993) พบว่า วิธีในการแยกและการทำให้ได้

IgY บริสุทธิ์ เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก เนื่องจาก IgY คือ γ-livetin ที่อยู่ในส่วนของ water soluble fraction (WSF) สามารถแยกออกจากส่วนของ water insoluble fraction ได้ด้วยวิธีการ water dilution ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ปริมาณ IgY ได้มากที่สุด และเมื่อต้องการ purified IgY สามารถนำส่วนของ WSF มาทำการตกตะกอนแอนติบอดีได้ ซึ่งมีการศึกษาวิธีการตกตะกอนแอนติบอดีหลายวิธี เช่น sodium sulfate, ammonium sulfate (AMS), polyethylene glycol (PEG) และ dextran sulfate เป็นต้น โดยแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพในการทำให้ได้ IgY บริสุทธิ์แตกต่างกัน (Akita and Nakai, 1993; Deignan et al., 2000; Bizhanov and Vyshniauskis, 2000; Bizanov and Jonauskiene, 2003) นอกจากนี้รูปของการนำ IgY มาใช้ประโยชน์มีในหลายลักษณะ เช่น การนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค จะมีการนำมาใช้ในลักษณะของ purified IgY เนื่องจากมีความบริสุทธิ์ของ IgY มากกว่า (Cook et al., 2001) และทางด้านการนำไปใช้ในการป้องกันโรค มีการนำ IgY ไปใช้ในรูปของการทำให้แห้ง ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้ทั้งในส่วนของ water soluble fraction (WSF) และ whole egg ทั้งนี้นอกจากจะสามารถป้องกันโรคได้ สัตว์ยังสามารถได้รับสารอาหารอื่นที่มีอยู่ในไข่อีกด้วย (O'Farrelly et al., 1992)

3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลองเป็นไก่ไข่ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุ 53 สัปดาห์ จำนวน 40 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว (ไก่ 2 ตัวต่อซ้ำ) ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด 70 วัน

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (treatment) ดังนี้

กลุ่มที่ 1	ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วยวิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular)
กลุ่มที่ 2	ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis

เลี้ยงไก่ไข่ที่ใช้ทดลองบนกรงตับขังแยกกรงละ 2 ตัว ในโรงเรือนระบบปิด ให้กินน้ำและอาหารสำเร็จรูป และทำวัคซีนตามมาตรฐานไก่ไข่ปกติ (ภาคผนวก ข)

3.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis ตามวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002)

1. เชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis Serotype D (SO325/04) ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข โดยทำการ streak เชื้อลงบน tryptic soy agar (TSA) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เก็บเชื้อด้วย skim milk แบ่งเชื้อที่ได้ใส่ลงใน vial เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะมีการนำมาใช้ต่อไป

2. นำเชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis ที่เก็บเป็น stock ใน skim milk มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant Green Agar (BGA) นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

3. เลือกลักษณะของโคโลนีที่มีสีแดงและตรงกลางมีจุดสีดำ 1 โคโลนี โดยใช้ลูปเขี่ยลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

4. ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากข้อ 3 ใส่ลงใน flask ที่มี TSB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปใส่ลงใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า นาน 18 ชั่วโมง

5. ทำการ inactivated เชื้อ โดยการเติม 40% formalin ปริมาตร 0.5% ของปริมาตร TSB ลงใน flask ข้อที่ 4 จากนั้นนำ flask ใส่ลงใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า นาน18 ชั่วโมง

6. เก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้จากข้อ 5 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแบ่งตัวอย่างเชื้อเพื่อนำมาทำการทดสอบการตายของเชื้อ sterility test และ purity test ดังนี้

6.1 ทดสอบการตายของเชื้อ โดยการ spread plate บน TSA นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

6.2 ทดสอบ sterility test โดยใช้ thioglycolate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมตัวอย่างเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 22 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีและความขุ่นเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

6.3 ทดสอบ purity test โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)

7. นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบแล้ว มาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแยกของเหลว อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอนเป็น pellet

8. นำ pellet ที่ได้มาทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วย sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0

9. นำ pellet ที่ได้ละลายใน PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปเตรียมเป็น whole cell antigen สำหรับใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และส่วนที่สองนำไปเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ ELISA

3.3.3 การเตรียม inactivated whole cell antigen สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีน

จากการศึกษาของ Chang et al. (1999) มีการเตรียม whole cell antigen สำหรับใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเท่ากับ $1x10^9$ CFUต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของวัลภา ลาภภักดี (2549) ที่มีการนำเซลล์แบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วย PBS ให้เท่ากับ MacFarland turbidity standards เบอร์ 4 โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 nm ซึ่งมีเชื้อประมาณ $1.2x10^9$ CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน พบว่าที่ปริมาณเชื้อดังกล่าวมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 39.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการเตรียม whole cell antigen ในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้ปริมาณโปรตีนเป็นมาตรฐานในการเตรียมแอนติเจนที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีวิธีการเตรียมคือ นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ดังจะกล่าวต่อไปในข้อที่ 3.3.5

3.3.4 การเตรียม whole cell antigen สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ ELISA

1. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2 ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic sonicator ที่แอมพิจูด 60% ช่วงละ 30 วินาที 10 ครั้ง โดยทำในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง

2. นำมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

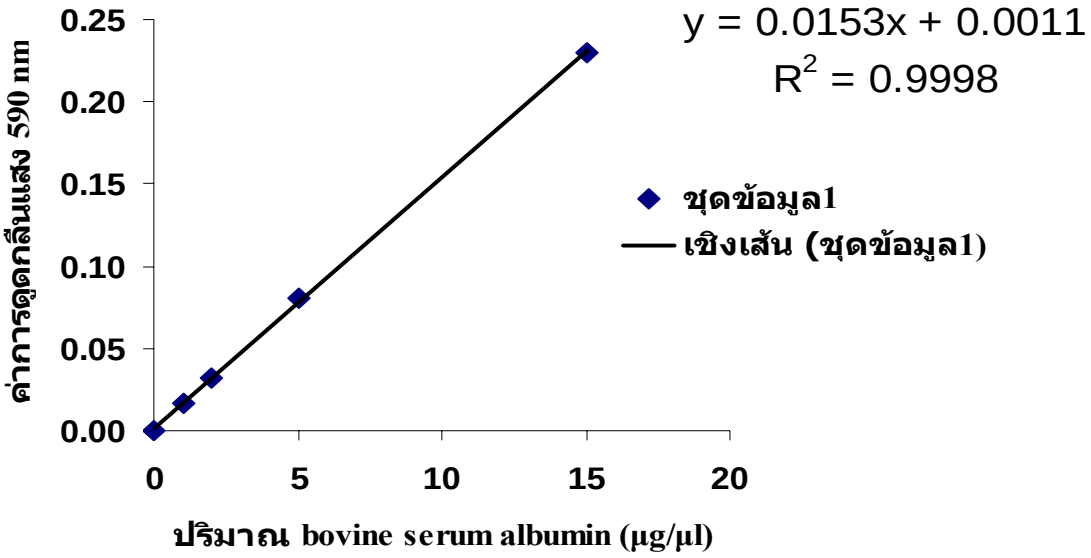
3. เก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) แบ่งตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำไปใช้ต่อไป

3.3.5 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (Kruger, 2002)

Bradford assay ใช้หลักการจับกันของสีย้อม (Dye Commassic Blue G250) กับโปรตีน จากการศึกษาพบว่า dye อิสระสามารถคงอยู่ได้ในรูปของไอออนที่แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า pK_a คือ 1.15, 1.82 และ 12.4 โดยพบว่า dye จะมีผลต่อการวิเคราะห์สารละลายที่มีความเป็นกรด ถ้าสารละลายมีประจุบวกมาก dye จะมีสีแดงและสีเขียว ที่ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 470 และ 650 nm ตามลำดับ และในกรณีที่สารละลายมีประจุลบจำนวนมาก dye จะมีสีน้ำเงิน เนื่องจากมีการจับกันระหว่าง dye กับโปรตีน ที่ค่าดูดกลืนแสงมากสุดที่ 590 nm ดังนั้นการหาปริมาณโปรตีนโดยทั่วไปจะวัดโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 590 nm ตามวิธีการดังนี้

1. เตรียมสารละลายที่ทราบปริมาณโปรตีน ในที่นี้ใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge
2. ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างละ 5 และ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1 และ 2 ตัวอย่างละ 400 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge เติม dye หลอดละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
4. ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 3 ใส่ใน microtitre plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 590 nm
5. สร้างกราฟเส้นโค้งมาตรฐาน ระหว่างค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ทราบค่าแล้ว ซึ่งค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการเส้นตรง (linear regression) นำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างทดลอง

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐานคือ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm (ภาคผนวก ก) ได้ผลดังแผนภาพที่ 3.1 จากภาพดังกล่าว ทำให้ทราบสมการ $y = 0.0153x + 0.0011$ และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ คือ 0.9998



แผนภาพที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin

จากการเตรียม whole cell antigen สำหรับใช้ผสมวัคซีนและสำหรับใช้เคลือบ plate ในการทำ ELISA ตามวิธีการข้อที่ 3.3.3 และ 3.3.4 ข้างต้น จากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนจาก BSA ตามวิธีการของ Bradford แสดงผลดังตารางที่ 3.1

ตาราง 3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง whole cell antigen สำหรับเตรียมวัคซีนและสำหรับทำ ELISA

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 590 nm[a]	ปริมาณโปรตีน[a] (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
whole cell antigen สำหรับเตรียมวัคซีน	0.0450	574
whole cell antigen สำหรับทำ ELISA	0.0365	463

[a] ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จากตารางที่ 3.1 พบว่ามีปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง whole cell antigen สำหรับเตรียมวัคซีนเท่ากับ 574 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ต้องการนำไปใช้สำหรับ

ผสมวัคซีนนั้นเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการนำไปใช้จึงต้องทำการเจือจางตัวอย่างสัดส่วน 1:14 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนตัวอย่างเท่ากับ 40.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับตัวอย่าง whole cell antigen สำหรับทำ ELISA พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 463 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ต้องการนำไปใช้สำหรับเป็นแอนติเจนในการเคลือบ plate สำหรับทำ ELISA นั้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการนำไปใช้จึงต้องทำการเจือจางตัวอย่างสัดส่วน 1:44 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนตัวอย่างเท่ากับ 10.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.6 การเตรียมวัคซีนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่เพื่อให้สร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ประยุกต์ใช้วิธีของ Sunwoo et al. (1996, 2002) และ Lee et al. (2002)

1. เตรียมวัคซีนโดยผสมสารละลาย whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ Freund's complete adjuvant ในปริมาตรเท่ากัน โดยใช้เข็มหัวล็อค 2 หัว (2-way luer lock needle) ค่อยๆ ผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน โดยครั้งแรกให้ดันสารละลายในส่วนของแอนติเจนเข้าไปในส่วนของ adjuvant ก่อน จากนั้นผสมจนกระทั่งวัคซีนเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งวัคซีนที่ได้จะมีลักษณะเป็นครีมขาวข้น ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ทดสอบวัคซีนที่ได้โดยหยดในน้ำเย็น (ถ้าวัคซีนหยดเป็นเม็ดกลมไม่กระจายตัวแสดงว่าผสมเข้ากันดีแล้ว) วัคซีนที่ผสมแล้วจะต้องนำไปใช้ทันที

2. ทำการฉีดวัคซีนด้วยวิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) 4 ตำแหน่ง (0.25 มิลลิลิตรต่อตำแหน่ง) ที่กล้ามเนื้อหน้าอกทางด้านซ้ายและขวาข้างละ 2 ตำแหน่ง

3. ทำการฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำ (booster shots) ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 หลังจากการกระตุ้นในครั้งแรก โดยทำการ emulsified ด้วย Freund's incomplete adjuvant ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 1

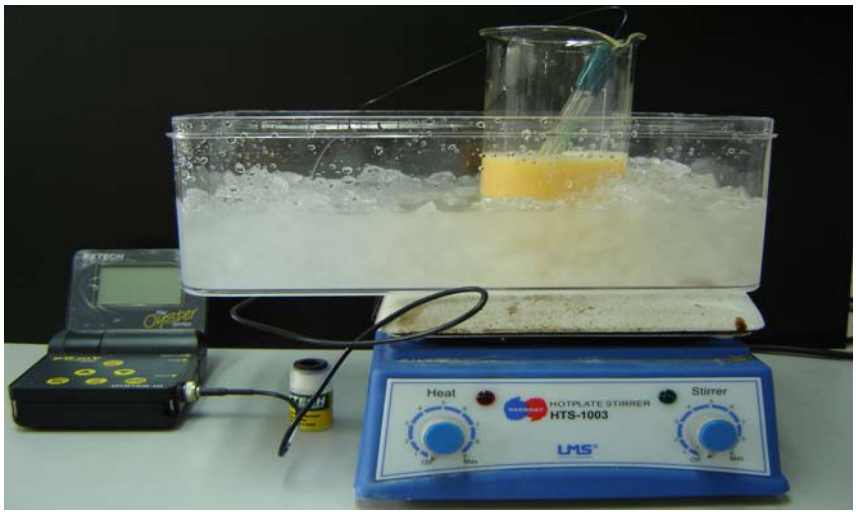
3.3.7 การเก็บตัวอย่างไข่

ก่อนทำการทดลอง 1 สัปดาห์ จะทำการเก็บไข่ทุกวัน เพื่อเก็บไว้เป็นกลุ่มควบคุมก่อนการให้วัคซีน (negative control) และหลังจากที่มีการให้วัคซีนจะทำการเก็บไข่ทุกวัน ซึ่งระยะเวลาที่ทำการเก็บไข่คือ 11 สัปดาห์ โดยนำไข่ที่เก็บได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีการนำออกมาวิเคราะห์ต่อไป

3.3.8 การแยกส่วน water soluble fraction (WSF) ออกจากไข่แดง ดัดแปลงจากวิธีการของ Akita and Nakai (1992)

WSF คือส่วนของ supernatant ที่ได้จากการปั่นตกตะกอนไข่แดง เพื่อแยกเอาส่วนของ water insoluble fraction ที่ประกอบด้วย α- และ β- lipovitellins, phosvitin และ low-density lipoprotein (LDL) ออกไป ทำให้ได้ส่วนของ WSF ที่ประกอบด้วย α-,β- และ γ-livetin ซึ่ง IgY คือ γ- livetin (Sim et al., 2000) โดยมีขั้นตอนในการแยกส่วนของ WSF ดังนี้

1. แยกส่วนของไข่แดงออกจากไข่ขาว จากนั้นนำไข่แดงที่ได้กลิ้งบนกระดาษชำระ เพื่อกำจัดส่วนของไข่ขาวออกให้ได้มากที่สุด
2. เทไข่แดงลงใน graduated cylinder เพื่อวัดปริมาตรไข่แดง
3. เทไข่แดงลงในบีกเกอร์ ดึงเยื่อหุ้มไข่แดงออก
4. วางบีกเกอร์ในน้ำแข็ง ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.2 ทำการเจือจางไข่แดงในสัดส่วน 1:8 ด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นที่มี pH 4.0 โดยในขณะที่เทน้ำกลั่นลงไปนั้นให้เทลงไปอย่างเบาๆ และเทลงไปครั้งละน้อยๆ เพื่อป้องกันการทำลายส่วนของแกรนูลไข่แดงจากกรดที่มีความเข้มข้นสูง ขณะ เดียวกันใช้ magnetic bar ปั่นเบาๆ เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
5. ทำการเจือจางไข่แดงในสัดส่วน 1:2 ด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นที่มี pH 2.0 โดยใช้วิธีเดียวกันตามข้อ 3
6. หลังจากสารละลายผสมเข้ากันแล้ว ปรับ pH ให้ได้ 5.0-5.2
7. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
8. นำส่วนที่ได้จากข้อ 6 มาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
9. เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการตกตะกอนมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
10. ส่วนใสที่ผ่านการกรอง คือส่วนของ WSF ที่มี IgY ประกอบอยู่ แบ่งตัวอย่างใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาระดับของ IgY antibody titer ในไข่ไก่ในแต่ละสัปดาห์ว่าสัปดาห์ใดที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis สูงสุด ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีการนำมาวิเคราะห์ต่อไป



แผนภาพที่ 3.2 วิธีการแยกส่วนของ water soluble fraction

3.3.9 การทดสอบหาความเข้มข้นของ negative control และ positive control ที่เหมาะสมสำหรับการเริ่มทำ serial dilution โดยใช้วิธี Indirect ELISA

วิธี indirect ELISA อ้างอิงเทคนิคของ Sunwoo et al. (1996; 2002); Lee et al. (2002) และ นภาธร บานชื่น (2534) โดยเริ่มจากการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ positive control และ negative control ในการเริ่มทำ serial dilution โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนตามแหล่งอ้างอิง Sunwoo et al. (1996, 2002); Lee et al. (2002) คือ 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และใช้ความเข้มข้นของ conjugated antibody ที่ 1:1,000 โดยอ้างอิงจาก Sunwoo et al. (1996; 2002); Lee et al. (2002) และ วัลภา ลาภภักดี (2549)

การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ negative control และ positive control ทำได้โดยวิธีการดังนี้ คือ

1. ทำการเคลือบ microtitre plate ด้วยสารละลายแอนติเจน 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรของ 0.05 M carbonate coating buffer pH 9.6 ใส่ใน microtitre plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ microtitre plate ใส่ในกล่องพลาสติกชื้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน

2. เทสารละลายแอนติเจนทิ้ง ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วเคาะกับผ้าขนหนูให้แห้ง

3. เติม blocking solution (1% skim milk) ใน carbonate coating buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน false positive บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

5. เติมตัวอย่าง negative control และ positive control ที่เจือจางด้วย PBS-T ในอัตราส่วน 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1,600, 1/3,200, 1/6,400, 1/12,800 และ 1/25,600 หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำ two fold serial dilutions เติม blank (PBS-T) ในแถวที่ 11-12 นำไปบ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

7. เติม rabbit anti-chicken IgG horseradish peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

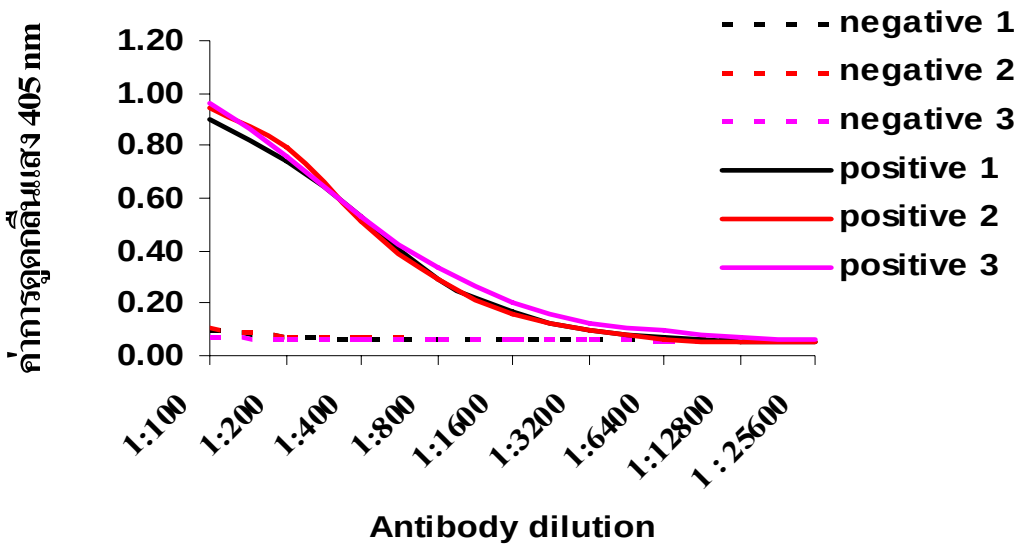
8. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

9. เติม substrate solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

10. เติม stop solution หลุมละ 25 ไมโครลิตร

11. อ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

โดยในการทดสอบจะใช้ตัวอย่าง negative control และ positive control อย่างละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาสร้างกราฟ (ภาคผนวก ก) เพื่อทำการศึกษาอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการทำ serial dilution ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.3



แผนภาพที่ 3.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ negative control และ positive control ในการเริ่มทำ serial dilution

จากการทดสอบค่า optical density (OD) ของ negative control พบว่า ค่าที่ได้มีค่าต่ำมากตั้งแต่ค่าการเจือจางที่ 1/100 ทำให้ค่า OD ของ negative control และ positive control มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นค่าการเจือจางที่ 1/100 จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการเริ่มทำ serial dilution แต่เนื่องจากในการปฏิบัติงานจริง ระดับของ antibody titer ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไปมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงเลือกใช้ค่าการเจือจางที่ 1/500 ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าที่ค่าการเจือจาง 1/500 ยังคงมีความแตกต่างกันระหว่างค่า OD ของ negative control และ positive control อย่างชัดเจน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นของ WSF ที่ค่าเจือจาง 1/500 ในการเริ่มต้นทำ serial dilution ตลอดการทดลอง

3.3.10 การทดสอบหาระดับ antibody titer ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วยวิธี Indirect ELISA อ้างอิงเทคนิคของ Sunwoo et al. (1996; 2002); Lee et al. (2002) และ นภาธร บานชื่น (2534)

เมื่อได้อัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการเริ่มทำ serial dilution คือ 1/500 จากนั้นนำส่วนของ WSF ที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อที่ 3.3.8 มาทำการศึกษาหาระดับ antibody titer ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนตามแหล่งอ้างอิง Sunwoo et al., (1996, 2002) และ Lee et al.,2002 คือ 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และใช้ความเข้มข้นของ conjugated antibody ที่ 1:1,000 โดยอ้างอิงจาก Sunwoo et al. (1996; 2002); Lee et al. (2002) และ วัลภา ลาภภักดี (2549) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการเคลือบ microtitre plate ด้วยสารละลายแอนติเจน 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรของ 0.05 M carbonate coating buffer pH 9.6 ใส่ใน microtitre plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ microtitre plate ใส่ในกล่องพลาสติกชื้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างไว้ 1 คืน
2. เทสารละลายแอนติเจนทิ้ง ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วเคาะกับผ้าขนหนูให้แห้ง
3. เติม blocking solution (1% skim milk) ใน carbonate coating buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน false positive บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
4. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

5. เติมตัวอย่าง WSF ที่ได้รับการเจือจางแล้ว หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำ two fold serial dilutions เติม negative control, positive control และ blank (PBS-T) ในแถวที่ 11-12 นำไปบ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

7. เติม rabbit anti-chicken IgG horseradish peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

8. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

9. เติม substrate solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

10. เติม stop solution หลุมละ 25 ไมโครลิตร

11. อ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

12. พิจารณาระดับแอนติบอดีเป็นค่าไตเตอร์ โดยอ่านค่า end titre ที่ค่า optical density (OD) ของตัวอย่างเท่ากับ 2 เท่าของ negative control (นภาธร บานชื่น, 2530)

3.3.11 การเตรียมไข่แอนติบอดีในรูปต่างๆ

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเตรียมไข่ไก่ให้อยู่ในรูปต่างๆ คือ

กลุ่มที่ 1 การเตรียม whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder

กลุ่มที่ 2 การเตรียม WSF specific IgY powder และ WSF non-specific IgY powder

กลุ่มที่ 3 การเตรียม specific extracted IgY และ non specific extracted IgY

โดยใช้ไข่ไก่กลุ่มที่ 1 (กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis) ในสัปดาห์ที่มีระดับแอนติบอดีสูง (สัปดาห์ที่ 3-7) มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม สำหรับการเตรียม whole egg specific IgY powder, WSF specific IgY powder และ specific extracted IgY และสำหรับการเตรียม whole egg non-specific IgY powder, WSF non-specific IgY powder และ non specific extracted IgY จะใช้ไข่ไก่ในสัปดาห์เดียวกันกับการเตรียมข้างต้น แต่เป็นไข่ไก่ในกลุ่มที่ 2 (กลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis) จากนั้นจึงนำมาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม สำหรับการเตรียมดังกล่าว ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียม ดังนี้

3.3.11.1 เตรียม whole egg specific IgY powder และ whole egg non-specific IgY powder ตามวิธีการศึกษาของ Gurtler et al. (2004) มีขั้นตอน ดังนี้

1. กะเทาะเปลือกไข่ไก่ จากนั้นทำการผสมไข่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน วัดปริมาตร

2. นำไข่ที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปวางบน hot plate เพื่อให้ความร้อนขณะเดียวกันให้กวนตลอดเวลา จนกระทั่งอุณหภูมิถึง 40 องศาเซลเซียส ให้ยกลงจาก hot plate ทันที

3. นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. ไข่ที่ผ่านการกรองแล้ว นำไป spray dried ที่อุณหภูมิ air-inlet 140 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ air-outlet ที่ 72 องศาเซลเซียส

5. แบ่งตัวอย่างไข่ผงที่ได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ไข่ผงที่เหลือเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งมีการนำไปใช้

3.3.11.2 การเตรียม WSF specific IgY powder และ WSF non-specific IgY powder ตามวิธีการศึกษาของ Yokoyama et al. (1992; 1998a; 1998b) มีขั้นตอน ดังนี้

1. นำส่วนของ WSF ที่มีวิธีการเตรียมตามข้อที่ 3.3.8 มาใช้ โดยนำ WSF ที่ได้ไป spray dried ที่อุณหภูมิ air-inlet 140 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ air-outlet ที่ 72 องศาเซลเซียส

2. แบ่งตัวอย่างไข่ผงที่ได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ไข่ผงที่เหลือเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งมีการนำไปใช้

3.3.11.3 การเตรียม specific extracted IgY และ non-specific extracted IgY ตามวิธีการศึกษาของ Akita and Nakai (1993) มีขั้นตอน ดังนี้

หลังจากแยกส่วน water insoluble fraction ที่ประกอบด้วย α- และ β- lipovitellins, phosvitin และ low-density lipoprotein (LDL) ออกไป ทำให้ได้ส่วนของ WSF ที่ประกอบด้วย α-, β- และ γ- livetin จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนแอนติบอดี เพื่อให้ได้เฉพาะส่วนของ γ- livetin ซึ่งเป็นส่วนของแอนติบอดี IgY โดยการเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอน 2 วิธี คือ การตกตะกอนแอนติบอดีด้วยสารละลาย ammonium sulfate (AMS) และ 12% polyethylene glycol (12%PEG) จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนแอนติบอดีทั้ง 2 วิธีมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-

phoresis (SDS-PAGE) หลังจากนั้นเลือกวิธีที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเตรียม specific extracted IgY และ non-specific extracted IgY จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยวิธี Indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.3.11.3.1 การเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนแอนติบอดี

3.3.11.3.1.1 การตกตะกอนแอนติบอดีด้วยสารละลาย Ammonium sulfate (AMS) ดัดแปลงจากวิธีการของ Hansen et al. (1998) มีขั้นตอน ดังนี้

1. ใช้ AMS [$(NH_4)_2SO_4$] 390 กรัมต่อลิตรของ WSF โดยในการเติม AMS ให้ค่อยๆ เติมลงไปครั้งละน้อยๆ รอจนกระทั่งส่วนของ AMS ละลายจนหมด จึงเติมส่วนใหม่ลงไป กวนตลอดเวลา นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนไว้ ละลายตะกอนด้วย PBS ปริมาตรเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น

4. เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำไปใช้ต่อไป โดยแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.3.11.3.1.2 การตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12% polyethylene glycol (12%PEG) ดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Polson and Wechmar (1980) มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ 12%PEG (MW10,000) ในการตกตะกอน โดยคำนวณจากปริมาตรของสารละลาย ขณะเดียวให้กวนตลอดเวลา นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. เก็บส่วนของตะกอนไว้ ล้างส่วนของตะกอน 2 ครั้ง โดยใช้ 12%PEG

4. ละลายตะกอนด้วย PBS ปริมาตรเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการไปใช้ต่อไป โดยแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.3.11.3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดี โดยใช้วิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการดังนี้

นำ specific IgY ที่ได้จากการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 2 วิธี คือ AMS และ 12%PEG มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตกตะกอน เพื่อศึกษาว่าวิธีการใดสามารถตกตะกอนแอนติบอดี IgY ได้บริสุทธิ์ที่สุด ดังวิธีการต่อไปนี้ คือ

1. ทำความสะอาดกระจกด้วยกระดาษเช็ดเลนส์
2. ประกบแผ่นแก้วเข้าด้วยกัน โดยใช้ spacer เป็นตัวกำหนดความหนาของแผ่นเจล
3. เตรียมสารละลายสำหรับ running gel ซึ่งจะใช้ 10% acrylamide gel
4. ใช้ไซริงค์ ดูดสารละลายในข้อ 3 ลงไปในระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ให้มีความสูงห่างจากขอบบนของแผ่นแก้วประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ ไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากชั้นเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอย่างชัดเจน
5. เทส่วนของน้ำกลั่นที่อยู่ด้านบนทิ้ง เช็ดทำความสะอาดช่องระหว่างแผ่นกระจกให้แห้งโดยใช้กระดาษกรองตัดเป็นแผ่นสั้นๆ
6. เตรียมสารละลายสำหรับ stacking gel แล้วเติมสารละลายของ stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบนช่องที่เหลือส่วนบนของแผ่นแก้ว จากนั้นค่อย ๆ สอด comb ลงไปในชั้นของ stacking gel ที่เติมลงไป ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในช่องของ comb ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที
7. ผสมตัวอย่างที่เตรียมไว้กับ loading dye แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง
8. ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟเรซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber ทั้งบนและล่าง จากนั้น ค่อย ๆ ดึง comb ออกจาก stacking gel จะปรากฏช่องสำหรับใส่ตัวอย่างที่ต้องการแยกบนเจล
9. ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 7 ใส่ลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยจะใส่หนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งช่อง
10. ต่อขั้วบวกของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้ากับขั้วบวกของ chamber และต่อขั้วลบเข้ากับขั้วลบของ chamber ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 10 มิลลิแอมแปร์ จากนั้นเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

11. รอจนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ loading dye เคลื่อนที่ผ่าน stacking gel ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 20 มิลลิแอมแปร์

12. รอจนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ loading dye เคลื่อนที่ผ่าน stacking gel ให้จนเกือบถึงปลายล่างของเจล จึงปิดสวิตช์

13. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้วนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมา เจลที่ได้อาจนำไปย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 0.5% นาน 1 ชั่วโมง เทสีออกและเติมสารละลาย Destaining solution เพื่อกำจัดส่วนเกิดของสีออก แช่และล้างเจลเป็นระยะจนแถบโปรตีนปรากฏชัดเจน และเห็นสีพื้นหลังใส

14. บันทึกภาพ เพื่อเปรียบเทียบขนาดและน้ำหนักของแถบโปรตีนของ specific IgY กับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในเจลเดียวกัน

3.3.12 การตรวจสอบปริมาณของ total IgY โดยใช้วิธี Indirect ELISA ตามวิธีการของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. ทำการเคลือบ microtitre plate ด้วยสารละลาย rabbit anti-chicken IgG ที่มีความเข้มข้น 3.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ 0.05 M carbonate coating buffer pH 9.6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ microtitre plate ใส่ในกล่องพลาสติกชื้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน

2. เทสารละลายแอนติเจนทิ้ง ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วเคาะกับผ้าขนหนูให้แห้ง

3. เติม blocking solution (1% skim milk) ใน carbonate coating buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน false positive บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

5. เติมตัวอย่าง WSF ที่ได้รับการเจือจางแล้ว หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำ two fold serial dilutions และใน microtitre plate ที่ใช้หาความเข้มข้นมาตรฐานให้เติมสารละลาย purified chicken IgG (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002 ถึง 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ PBS-T หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำ microtitre plate ไปบ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

7. เติม rabbit anti-chicken IgG horseradish peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

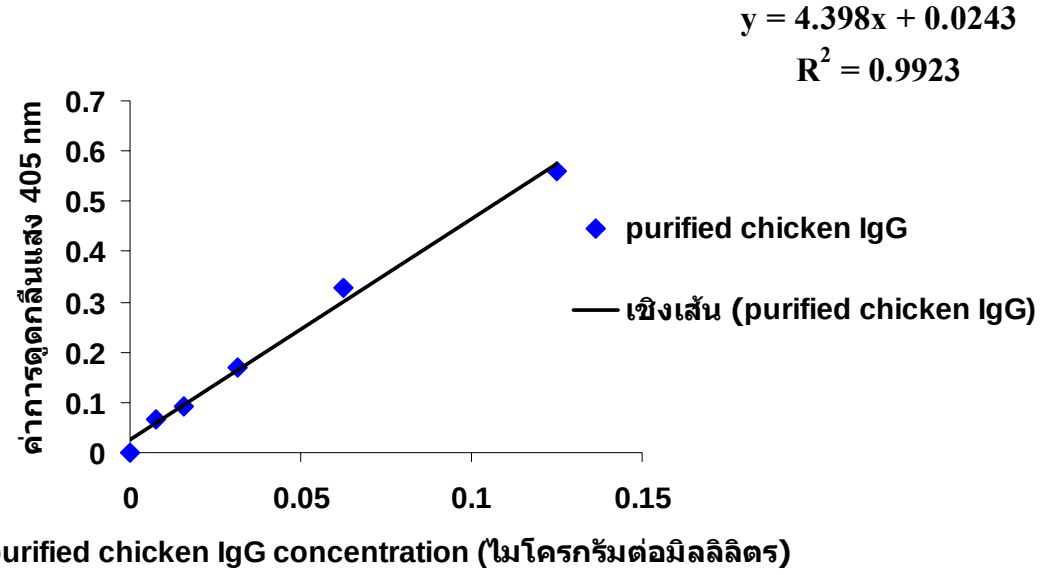
8. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

9. เติม substrate solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

10. เติม stop solution หลุมละ 25 ไมโครลิตร

11. อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

12. สร้างกราฟเส้นโค้งมาตรฐาน ระหว่างค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ purified chicken IgG ที่ทราบค่าแล้ว (ภาคผนวก ก) ซึ่งค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการเส้นตรง (linear regression) ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.4 นำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณ total IgY จากตัวอย่าง



แผนภาพที่ 3.4 กราฟปริมาณความเข้มข้นของ purified chicken IgG สำหรับใช้ในวิเคราะห์หาปริมาณ total IgY

3.3.13 การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific IgY) ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้วิธี Indirect ELISA ตามวิธีการของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. ทำการเคลือบ microtitre plate แรก ด้วยสารละลายแอนติเจนจากเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรใน 0.05 M carbonate coating buffer pH 9.6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และทำการเคลือบ microtitre plate ที่สองด้วยสารละลาย rabbit anti-chicken IgG ที่มีความเข้มข้น 3.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ 0.05 M

carbonate coating buffer pH 9.6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ microtitre plate ใส่ในกล่องพลาสติกชื้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน

2. เทสารละลายแอนติเจนทิ้ง ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วเคาะกับผ้าขนหนูให้แห้ง

3. เติม blocking solution (1% skim milk) ใน carbonate coating buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน false positive บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

5. ใน microtitre plate ที่เคลือบด้วยสารละลายแอนติเจน เติมตัวอย่าง WSF ที่ได้รับการเจือจางแล้ว หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำ two fold serial dilutions และใน microtitre plate ที่เคลือบด้วยสารละลาย rabbit anti-chicken IgG เติมสารละลาย purified chicken IgG (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002 ถึง 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ PBS-T หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำ microtitre plate ไปบ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

7. เติม rabbit anti-chicken IgG horseradish peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

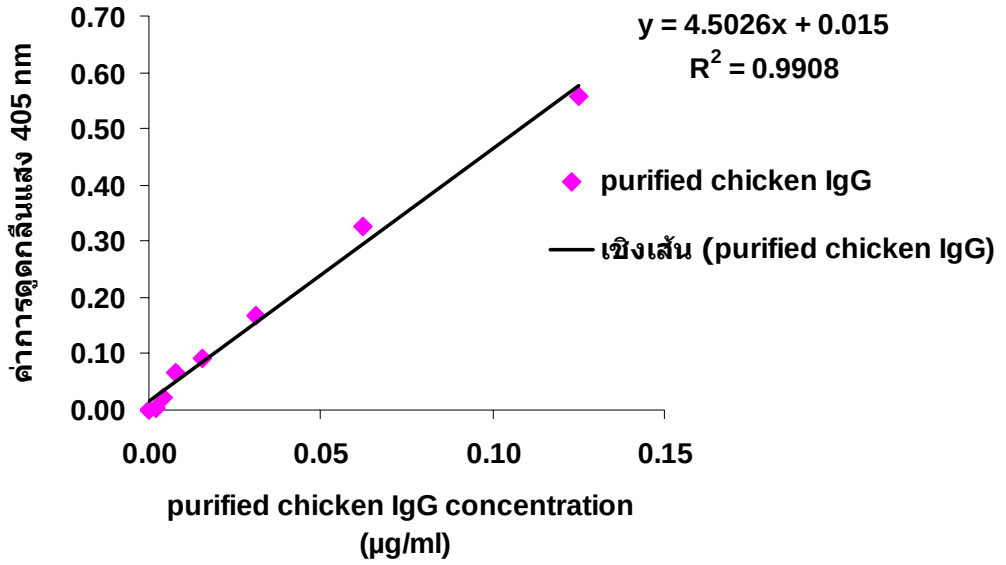
8. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

9. เติม substrate solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

10.เติม stop solution หลุมละ 25 ไมโครลิตร

11.อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

12.สร้างกราฟเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ purified chicken IgG ที่ทราบค่าแล้ว (ภาคผนวก ก) ซึ่งค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการเส้นตรง(linear regression) ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.5 นำสมการที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณ specificIgY จากตัวอย่าง



แผนภาพที่ 3.5 กราฟปริมาณความเข้มข้นของ purified chicken IgG (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับใช้ในวิเคราะห์หาปริมาณ specific IgY

3.3.14 การวิเคราะห์ข้อมูล

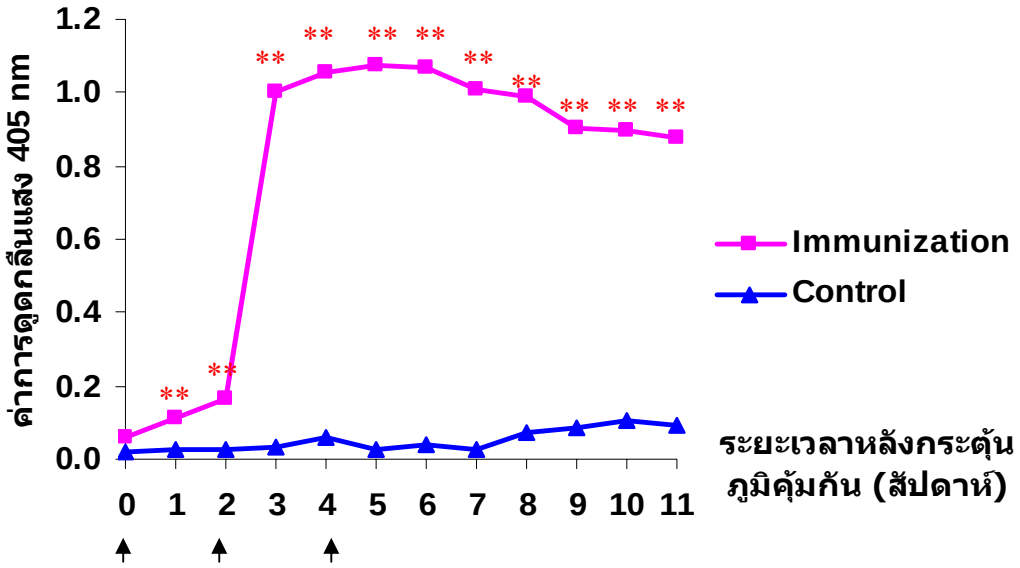
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ t-test แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ±standard error (SE) โดยใช้ group comparison ในการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้จากการแปรรูประหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ whole egg specific IgY powder, WSF specific IgY powder และ specific extracted IgY และกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ whole egg non specific IgY powder, WSF non specific IgY powder และ non specific extracted IgY โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1997)

3.4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

3.4.1 ระดับของ IgY antibody titer ใน WSF

จากการนำเอาไข่ไก่ที่ได้จากกลุ่มการทดลองที่ 1 ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในแต่ละสัปดาห์ (ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึง 11) มาทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Indirect ELISA เพื่อศึกษาถึงระดับการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis หลังจากที่มี

การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ผลที่ได้แสดงในแผนภาพที่ 3.6



** ค่าเฉลี่ยในแต่สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

แผนภาพที่ 3.6 การเปลี่ยนแปลงของระดับ IgY antibody titer หลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในแต่ละสัปดาห์

ซึ่งจากภาพจะเห็นได้ว่า ในสัปดาห์ที่ 0 ก่อนทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ระดับของ IgY antibody titer ที่มีอยู่ใน 2 กลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกผ่านไป 1 สัปดาห์ พบว่า ระดับของแอนติบอดีในไก่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.113$\pm$0.099 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.021$\pm$0.055 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee et al. (2002) ที่พบว่า ระดับของ specific IgY จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างช้า ๆ สามารถอธิบายได้ว่า ในช่วงของสัปดาห์แรก specific IgY มีการผลิตอยู่ในซีรั่มและมีปริมาณน้อยที่มีการส่งผ่านไปยังไข่แดง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Li et al. (1998) พบว่า ระดับของ specific IgY สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่พบได้ในปริมาณที่ไม่มากนัก ต่อมาในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ระดับของแอนติบอดีถึงจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าระดับของ IgY antibody titer ในสัปดาห์ที่ 2 ในไก่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.163±0.142 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย

OD เท่ากับ 0.030±0.029 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และหลังจากได้มีการ booster ครั้งแรกในสัปดาห์ 2 พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างรวดเร็ว โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของ OD เท่ากับ 1.003±0.149 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.032±0.103 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการตอบสนองต่อแอนติเจนครั้งนี้เป็นการตอบสนองครั้งที่ 2 ที่เรียกว่า secondary response ทำให้มีการสร้าง memory B cell เพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากกว่าการสัมผัสกับแอนติเจนครั้งแรก (Kuby, 1997) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 1.053±0.180 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.059±0.120 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และเมื่อมีการ booster ครั้งที่สองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ IgY antibody titer ไม่เด่นชัดเท่ากับการ booster ครั้งแรก โดยจะเห็นได้ว่าในสัปดาห์ที่ 5 กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะมีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 1.077±0.207 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากค่าเฉลี่ย OD ในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.012 และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.023±0.055 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 พบว่ามีระดับของแอนติบอดีสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 1.066±0.233 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.037±0.108 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจากภาพจะเห็นได้ว่าในสัปดาห์ที่ 7 ระดับของแอนติบอดีจะค่อยๆ ลดลง โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 1.006±0.256 ซึ่งลดลงจากสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 0.071 แต่อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ย OD ของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในสัปดาห์ที่ 7 สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.024±0.052 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shin et at. (2002) ซึ่งพบว่า ระดับของ antibody titer ของ IgY จะมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 6-8 และหลังจากสัปดาห์ที่ 7 พบว่าระดับของ antibody titer จะค่อยๆ ลดลง และต่อมาในสัปดาห์ที่ 8-11 พบว่า ระดับของแอนติบอดีจะค่อยๆ ลดลงจากสัปดาห์ที่ 7 โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.990±0.296, 0.905±0.280, 0.894±0.315 และ 0.879±0.332 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ที่มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ 0.073±0.134, 0.085±0.201, 0.109±0.172 และ 0.090±0.167 ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Behn et al. (1996) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีไข่แดงนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็นลักษณะของรูปแบบกราฟได้ 2 ประเภท คือ mammalian-like curve และ salutatory curve ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกราฟในลักษณะ mammalian like curve สามารถอธิบายได้ว่า จะมีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี ในช่วง 10 วัน หลังจากที่มีการ booster ครั้งแรก และจะคงที่อยู่ประมาณ 10 วัน ต่อจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง และต่อมาเป็นการเปลี่ยนแปลงของลักษณะกราฟแบบ salutatory curve สามารถอธิบายได้ว่า หลังจากที่มีการ booster ครั้งแรก

จะมีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี และหลังจากนั้นระดับของแอนติบอดีจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในลักษณะที่ค่อนข้างคงที่ อาจจะสามารถอยู่ได้หลายสัปดาห์หรืออาจจะเป็นเดือน ซึ่งจากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีแบบ mammalian–like curve

3.4.2 ปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder

จากการนำเอาไข่ไก่ในสัปดาห์ที่มีระดับของแอนติบอดีสูงมารวมกัน (โดยเก็บไข่ระหว่างสัปดาห์ที่ 3-7) จากนั้นนำไข่ทั้งใบมาผสมรวมกัน และนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยใช้วิธีการ spray dried ที่อุณหภูมิ air-inlet 140 องศาเซลเซียส และ air-outlet ที่ 72 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ไข่ผง นำไข่ผงที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgY ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ดังแสดงผลในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis (mean±SE) ที่มีอยู่ใน whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder

	ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง)	
	Total IgY	Specific IgY
Whole egg specific IgY powder	267.24±1.07 [a]	12.67±0.167[a]
Whole egg non specific IgY powder	233.83±1.77[b]	0.04±0.09[b]

[ab] ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน whole egg specific IgY powder โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า ความเข้มข้นของ specific IgY ใน whole egg specific IgY powder ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) และพบว่า สัดส่วนของ specific IgY ใน total IgY ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4.74% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yokoyama et al. (1992) ที่พบว่าสัดส่วนของ purified IgY ต่อ total IgY เท่ากับ 5.2% แต่จะ

เห็นได้ว่าปริมาณของ specific IgY ในการทดลองครั้งนี้น้อยกว่าการทดลองของ Yokoyama et al. (1992) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการทดลองของ Yokoyama et al. (1992) ได้มีการใช้แอนติเจนจากส่วนของ fimbriae ของเชื้อ *E. coli* ทำให้ความสามารถในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการผลิตแอนติบอดีแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuby (1997) ที่พบว่าความสามารถในการตอบสนองต่อการผลิตแอนติบอดีของร่างกายจะแตกต่างกัน เนื่องจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของแบคทีเรีย ส่วนของแอนติเจนแบคทีเรียที่ใช้ในการกระตุ้น (LPS, OMPs และ fimbriae) ปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้น ตำแหน่งที่ฉีดวัคซีนและชนิดของ adjuvant ที่ใช้ในการกระตุ้น ซึ่งเหล่านี้มีผลทำให้การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Gurtler et al. (2004) ได้ทำการศึกษาระดับของ antibody titer จากไข่ผงที่ได้จากการนำเอาไข่ทั้งใบไปทำการ spray dried พบว่ามีระดับของ antibody titer เท่ากับ 1:32 ถึง 1:64 ที่ dilution 1:4 ซึ่งค่าของ antibody titer ที่ได้น้อยกว่าผลการทดลองครั้งนี้ ซึ่งมี antibody titer เท่ากับ 1:4,000 ที่ dilution 1:500 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการศึกษาของ Gurtler et al. (2004) ได้ทำการ booster ทั้งหมด 6 ครั้ง ที่วันที่ 28, 56, 176, 197, 218 และ 240 นับจากวันที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก และทำการเก็บไข่หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกไปแล้ว 42 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะห่างในการ booster ในแต่ละครั้งค่อนข้างห่างกัน จึงอาจจะทำให้ระดับของ antibody titer ในบางช่วงอาจจะลดต่ำลงไปแล้ว ทำให้เมื่อมีการนำเอาไข่ที่เก็บได้ทั้งหมดมารวมกัน จึงอาจมีผลทำให้ระดับ antibody titer ในไข่ผงที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Schade et al. (2001) ที่พบว่าปริมาณของ IgY ที่มีในไข่แดงแต่ละวันมีความผันแปรมาก

3.4.3 ปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน WSF specific IgY powder และ WSF non specific IgY powder

จากการนำเอาไข่ไก่ในสัปดาห์ที่มีระดับของแอนติบอดีสูงมารวมกัน (เก็บไข่ระหว่างสัปดาห์ 3-7) และนำไปทำการแยกส่วนของ water insoluble fraction ออกจากส่วนของ WSF นำส่วนของ WSF ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยใช้วิธี spray dried ที่อุณหภูมิ air-inlet 140 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ air-outlet 72 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ออกมาในลักษณะเป็นผง จากนั้นจะนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgY ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ total IgY และ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis (mean±SE) ที่มีอยู่ใน WSF specific IgY powder และ WSF non specific IgY powder

	ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง)	
	Total IgY	Specific IgY
WSF specific IgY powder	138.88±3.08 [a]	27.69±0.71[a]
WSF non-specific IgY powder	100.66±2.97[b]	0.11±0.18[b]

[ab] ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

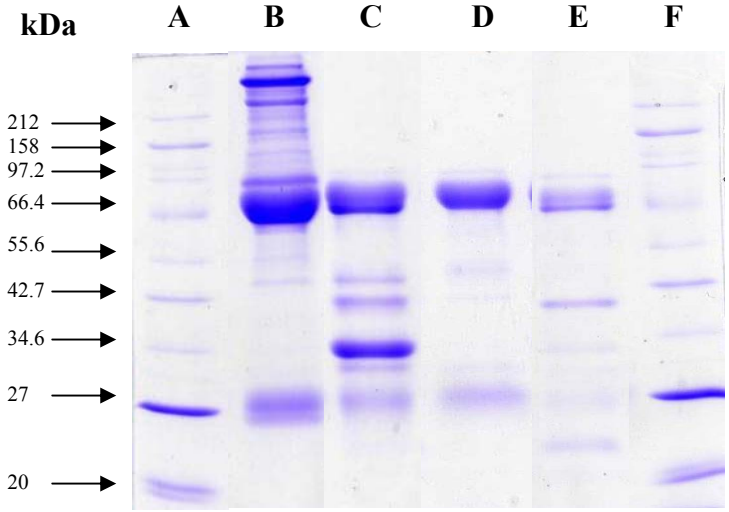
จากผลการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน WSF specific IgY powder โดยนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า ความเข้มข้นของ specific IgY และ total IgY ใน WSF specific IgY powder ของกลุ่มควบคุมมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และพบว่าสัดส่วนของ specific IgY ใน total IgY ของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและกลุ่มควบคุม มีค่าเฉลี่ยประมาณ 20.1% และ 0.11% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee et al. (2002) ที่ได้ทำการศึกษา IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ whole cell เป็นแอนติเจน และมีวิธีการทำแห้งโดยใช้วิธี freeze-drying พบว่ามีความเข้มข้นของ specific IgY ประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง และเมื่อคิดสัดส่วนของ specific IgY ต่อ total IgY พบว่ามีประมาณ 16% ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ specific IgY มีปริมาณน้อยกว่าผลการทดลองครั้งนี้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและระดับของ antibody titer ในไข่ผงที่เตรียมด้วยวิธี freeze-drying ทำให้ไข่ผงที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำกว่าไข่ผงที่ได้จากวิธี spray dried จึงมีผลทำให้ไข่ผงที่ได้จากวิธี freeze-drying สามารถละลายน้ำไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับของ antibody titer ระหว่างวิธีการ freeze-drying และวิธีการ spray dried ที่อุณหภูมิ air-inlet 140 องศาเซลเซียส air-outlet 72 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) (Yokoyama et al, 1992)

3.4.4 ปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน specific extracted IgY และ non specific extracted IgY

3.4.4.1 ผลการศึกษาวิธีการตกตะกอนแอนติบอดี IgY บริสุทธิ์ ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

นำไข่ในสัปดาห์ที่มีระดับแอนติบอดีสูง (สัปดาห์ที่ 3-7) ไปแยกส่วนของ water insoluble fraction ออกจากส่วนของ WSF ด้วยวิธี water dilution หลังจากได้ส่วนของ WSF ออกมา นำไปผ่านกระบวนการตกตะกอนแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย 2 วิธีการ คือ การตกตะกอนด้วย AMS และการตกตะกอนด้วย 12%PEG เพื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์และปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ได้จากวิธีการทั้งสอง

จากผลการทดลอง พบว่า specific IgY ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย AMS และ 12%PEG เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงผลดังแผนภาพที่ 3.7



แผนภาพที่ 3.7 แถบโปรตีนของ specific IgY ทำการแยกโดยวิธี SDS-PAGE; แถบ A และ F คือ protein maker, แถบ B คือ ซี่รั่มไก่, แถบ C คือ WSF, แถบ D คือ specific IgY ที่ตกตะกอนด้วย 12%PEG, แถบ E คือ specific IgY ที่ตกตะกอนด้วย AMS

จากภาพจะเห็นได้ว่า ในส่วนของ WSF ก่อนการตกตะกอนนั้น จะมีแถบโปรตีนทั้งหมด 5 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27, 36, 41, 45 และ 66 kDa ซึ่งที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 และ 66 kDa จากการศึกษาของ Cook et al. (2001); Amaral et al. (2002) และ Bizhanov and Vyshniauskis (2000) พบว่า ที่น้ำหนักโมเลกุลดังกล่าว คือส่วนของ heavy chain และ light chain ของโครงสร้าง IgY ตามลำดับ และในส่วนของน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36, 41 และ

45 คือส่วนของโปรตีนที่มีอยู่ในไข่ที่อยู่ในรูปของ ovalbumin, lipovitellin และ phosvitin ตามลำดับ ซึ่งหลังจากที่มีการนำมาตกตะกอนด้วย 12%PEG ทำให้ได้ specific IgY ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เนื่องจากมีการกำจัดส่วนของโปรตีนส่วนอื่นๆ ออกไป ทำให้ได้เฉพาะแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 kDa และ 27 kDa ซึ่งหมายถึงส่วนของ heavy chain และ light chain ของโครงสร้าง IgY แต่ในขณะเดียวกันการตกตะกอนด้วย AMS นั้น แม้ว่าจะสามารถกำจัดโปรตีนส่วนอื่นๆ ออกไปได้ แต่จากภาพจะเห็นได้ว่ายังคงมีโปรตีนบางส่วนที่มีการปนเปื้อนอยู่ โดยพบว่าจะมีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36 และ 41 kDa ที่มีการปนเปื้อน นอกเหนือจากส่วนของน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 kDa และ 27 kDa ดังนั้นจากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่า การตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12%PEG จะได้ปริมาณของ specific IgY ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS

และเมื่อนำมาศึกษาจากปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ที่ได้จากวิธีการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY เท่ากับ 2.385±0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ซึ่งมีปริมาณแอนติบอดีน้อยกว่าวิธีการตกตะกอนด้วย 12%PEG ที่มีปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY เท่ากับ 2.616±0.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Deignan et al. (2000) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีในการสกัดแอนติบอดีบริสุทธิ์ (IgY) 3 วิธี คือ การตกตะกอนด้วย sodium sulfate, AMS และ 12%PEG พบว่าวิธีการตกตะกอนด้วย 12%PEG เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการตกตะกอนแอนติบอดี โดยพบว่ามี IgY เฉลี่ยเท่ากับ 8.62-8.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณของ IgY เฉลี่ยจากการศึกษาของ Deignan et al. (2000) มีปริมาณมากกว่าการทดลองครั้งนี้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการในการแยกส่วนของ water insoluble fraction ออกจากส่วนของ WSF แตกต่างกัน โดย Deignan et al. 2000 ได้ใช้วิธีการ freeze and thaw ที่ pH 7.0 แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้วิธีการ water dilution ที่ pH 5.0-5.2 และจากการศึกษาของ Akita and Nakai (1993) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีในการตกตะกอน IgY พบว่า การตกตะกอนด้วย 12%PEG มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนดีกว่าการตกตะกอนด้วย sodium sulfate ซึ่งเป็นวิธีการตกตะกอนแอนติบอดีด้วยเกลือเช่นเดียวกับ AMS พบว่ามี %purity IgY สูงกว่า โดยการตกตะกอน IgY ด้วย 12%PEG มี %purity IgY เท่ากับ 96% ในขณะที่การตกตะกอน IgY ด้วย sodium sulfate มี %purity IgY เท่ากับ 83% และพบว่าปริมาณของแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 12%PEG เท่ากับ 4.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hassl and Aspock (1988) ที่รายงานว่ามีปริมาณของ IgY หลังจากที่มีการตกตะกอนด้วย 12%PEG เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ซึ่งทั้งสองการ

ทดลองมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณ IgY ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Bizhanov and Vyshniauskis (2000) ได้ทำการศึกษาการตกตะกอน IgY โดยใช้ PEG พบว่ามีความเข้มข้นของปริมาณ IgY ประมาณ 2-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง

ดังนั้นจากผลการทดลองศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนแอนติบอดี IgY ด้วย AMS และ 12%PEG เพื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์และปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ได้จากวิธีการทั้งสอง สามารถสรุปได้ว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12%PEG จะได้ปริมาณของ specific IgY ที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมากกว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS

3.4.4.2 ปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ใน specific extracted IgY และ non-specific extracted IgY

นำไข่ในสัปดาห์ที่มีระดับแอนติบอดีสูง (สัปดาห์ที่ 3-7) นำไปแยกส่วนของ water insoluble fraction ออกจากส่วนของ WSF จากนั้นนำไปสกัดแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย 12%PEG และนำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ specific IgY ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ดังแสดงผลในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis (mean±SE) ที่มีอยู่ใน specific extracted IgY และ non specific extracted IgY จากการแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย 12%PEG

	ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง)
	Specific IgY
Specific extracted IgY	2.72 ± 0.201^{a}
Non specific extracted IgY	0.74 ± 0.100^{b}

[ab] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยิ่งสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica serovar* Enteritidis ใน specific extracted IgY และ non specific extracted IgY โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า ความเข้มข้นของ specific IgY ใน specific extracted IgY ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เท่ากับ 2.72±0.201 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ

ไข่แดง ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณ specific IgY เท่ากับ 0.74±0.100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ซึ่งปริมาณของ specific IgY ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยจากผลการศึกษา พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ในการทดลองครั้งนี้ใกล้เคียงกับปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY จากการศึกษาของ Akita and Nakai (1993) และ Hassl and Aspock (1998) ที่มีการรายงานว่ามีความเข้มข้นของ specific IgY เท่ากับ 4.9 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ตามลำดับ

3.5 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในรูปของ inactivated whole cell antigen นั้นมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการสร้างแอนติบอดีไข่แดง ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ โดยพบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ระดับของแอนติบอดีค่อยๆ เพิ่มขึ้น และหลังจากมีการ booster ครั้งแรกในสัปดาห์ 2 พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 มีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างรวดเร็ว ในสัปดาห์ที่ 6 มีระดับแอนติบอดีสูงสุด และระดับของแอนติบอดีจะลดต่ำลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ดังนั้นสามารถนำเอาไข่ไก่มาใช้เพื่อผลิตแอนติบอดีได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3-7 และในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีในการตกตะกอนแอนติบอดี พบว่า การตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12%PEG จะได้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่าและมีความบริสุทธิ์กว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS เนื่องจากการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12% PEG ทำให้ได้แถบโปรตีนหลัก 2 แถบ กล่าวคือ ส่วนของ heavy chain และ light chain ของ IgY ในขณะที่การตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS ทำให้ได้แถบของโปรตีนอื่นที่เป็นส่วนประกอบในไข่ปนเปื้อนมาด้วย เมื่อนำมาแปรรูปให้อยู่ในรูปของ specific extracted IgY, WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder พบว่ามีปริมาณ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เฉลี่ยเท่ากับ 2.72±0.201 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง 27.69±0.707 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง และ 12.67±0.166 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม non-specific IgY ที่อยู่ในรูปของ non specific extracted IgY, WSF non specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder มีปริมาณ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เท่ากับ 0.74±0.100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง, 1.10±0.183 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง และ 0.44±0.088 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่ผง

บทที่ 4
การศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ในรูปต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp.

4.1 บทนำ

Chicken egg yolk antibodies คือแอนติบอดีจากไข่แดงของไก่ ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด Immunoglobulin Y (IgY) (Leslie and Clem, 1969) มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยาใกล้เคียงกับ Immunoglobulin G (IgG) จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา มีการนำ IgY มาใช้ในการพิสูจน์โรค (Gross and Speck, 1996) ทั้งนี้เนื่องจาก IgY มีคุณสมบัติที่ไม่จับกับโปรตีน A หรือ G และส่วนของ Fc receptor ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Larsson et al., 1993) รวมทั้งมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการให้สารภูมิต้านทานเพื่อป้องกันการเกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ (Schade et al., 1996) เช่น การใช้ IgY ป้องกันโรคท้องเสียในลูกสุกรจากเชื้อ *E. coli* (Ronald et al., 1999; Jin et al., 1998; Imberechts et al., 1997 and Owusu-Asiedu et al.,2003a) ป้องกันโรค Salmonellaosis ในคน ลูกโคและในไก่ไข่ (Yokoyama et al., 1992; Yokoyama et al., 1998 and Kassaify and Mine, 2004) และป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหารจากเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ในคน (Shin et al., 2002) เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจาก IgY จัดเป็นสารชีวภาพที่ไม่ส่งผลกระทบในส่วนของสารตกค้าง หรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคหรือสัตว์ที่ได้รับ นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Owusu-Asiedu et al. (2003) ซึ่งได้ทำการศึกษาการใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody เปรียบเทียบกับการใช้สารเสริมตัวอื่นๆ คือ zinc oxide, fumaric acid และยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* พบว่าการใช้ anti-*E. coli* egg yolk antibody สามารถลดอัตราการตายที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรได้ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารเสริมตัวอื่นๆ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีความเป็นได้ในการนำ egg yolk antibodies หรือ IgY มาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งสอดคล้องกับสถานการณ์ในปัจจุบันที่ผู้บริโภคได้หันมาให้ความสนใจด้านความปลอดภัยทางอาหารกันมากขึ้น ทำให้มีการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะบางตัวที่เคยอนุญาต ไม่ให้มีการนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์

S. enterica serovar Enteritidis เป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease) ซึ่งพบว่าสถิติของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในประเทศไทยมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 โดยพบว่ามีจำนวนคนไข้เฉลี่ยในปี ค.ศ. 1972-1989 ประมาณ 0.70±0.41% และต่อมาได้เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จาก 1.33, 2.98, 9.54 และ 16.98% ในปี ค.ศ. 1990, 1991, 1992 และ มกราคม-มิถุนายน ในปี ค.ศ. 1993 ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว โดยพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อไก่มากกว่าผลิตภัณฑ์จากแหล่งอื่นๆ (Bangtrakulnonth et al., 1993) นอกจากนี้ เชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ยังเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากในการส่งออกสินค้าประเภทผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกนั้น สินค้าจะต้องปลอดหรือปนเปื้อนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis น้อยกว่า 10^2 colony forming unit (CFU) ต่อตัวอย่างเนื้อที่ใช้ทดสอบ 25 กรัม (ประกาศสำนักงานกรรมการอาหารและยา, 2546) การติดเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไก่นั้นมีได้หลายทาง เช่นเชื้อสามารถถ่ายทอดจากรังไข่ของแม่ไก่ผ่านไปยังไข่ไก่ได้ และเมื่อไข่ไก่ถูกฟักออกมาเป็นตัว เชื้อนี้จะกลายเป็นพาหะอาศัยอยู่ในไก่ได้ โดยที่ไก่ไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด (จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 2544)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของไข่แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในรูปต่างๆ เช่น specific extracted IgY, water soluble fraction (WSF) specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis รวมถึงการศึกษาผลของปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในการทดลองครั้งนี้ใช้ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro* method)

4.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของไข่แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่อยู่ในรูปต่างๆ เช่น specific extracted IgY, water soluble fraction (WSF) specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis รวมถึงการศึกษาผลของปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในการทดลองครั้งนี้ใช้ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro* method)

4.3 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไข่แอนติบอดีที่อยู่ในรูปต่างๆ คือ specific extracted IgY, water soluble fraction (WSF) specific IgY powder และ whole egg specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ได้จากการเตรียมในบทที่ 3 มาทำการทดลอง เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และศึกษาปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบในเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. โดยสามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

4.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณของ specific extracted IgY ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ตามวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002)

4.3.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. นำเชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis ที่เก็บเป็น stock ใน skim milk มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant Green Agar (BGA) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง
2. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีแดงและตรงกลางมีจุดสีดำ 1 โคโลนี มาทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยใช้ลูปเขี่ยลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง
3. ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี colony counter โดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร

4.3.1.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY

นำ specific extracted IgY ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.11.3 บทที่ 3 มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ TSB โดยเตรียมจากตัวอย่าง specific extracted IgY ปริมาตร 0.184, 0.368, 0.552 และ 0.735 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ TSB ตามลำดับ

4.3.1.3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อทำการผสมร่วมกับ specific extracted IgY

1. เตรียม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย specific extracted IgY ใน TSB ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติมเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่มีปริมาณเชื้อ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน ในหลอดควบคุมจะไม่มีการเติมส่วนของ specific extracted IgY

2. ทำการแบ่งตัวอย่างออกเป็น aliquotsๆ ละ 300 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9 และ 24 นับตั้งแต่มีการบ่มเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ร่วมกับ specific extracted IgY จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าตลอดเวลา

3. เมื่อครบจำนวนชั่วโมง นำส่วนของ aliquots มาทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตที่เวลา 0, 3, 6, 9 และ 24 ชั่วโมง โดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

4. ทำการนับจำนวนเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ CFUต่อมิลลิลิตร

4.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ตามวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002)

จากการศึกษาผลของการใช้ specific extracted IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. enterica* serovar Enteritidis ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ เพื่อเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของ WSF specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ whole egg specific IgY powder จึงจะใช้ความเข้มข้นของ specific extracted IgY ที่ 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 4.3.1.1

4.3.2.2 การเตรียมสารละลาย WSF specific IgY powder, WSF non specific IgY powder, whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder

1. นำไข่แอนติบอดีในรูป WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.11.1 และ 3.3.11.2 ในบทที่ 3 มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ TSB โดยชั่ง WSF specific IgY powder น้ำหนัก 0.036 และ 0.072 กรัมต่อมิลลิลิตรของ TSB ตามลำดับ และชั่ง whole egg specific IgY powder น้ำหนัก 0.079 และ 0.158 กรัมต่อมิลลิลิตรของ TSB ตามลำดับ จากนั้นผสมให้เข้ากัน ในส่วนของกลุ่ม non specific IgY ชั่ง WSF non specific IgY powder น้ำหนัก 0.072 กรัมต่อมิลลิลิตรของ TSB และชั่ง whole egg non specific IgY powder น้ำหนัก 0.158 กรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของกลุ่มควบคุมใส่เฉพาะ TSB

2. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เก็บส่วนของ supernatant ไว้ จากนั้นนำไปทำการกรอง โดยใช้ 0.22 μm -pore-size-membrane filter เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

4.3.2.3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อทำการผสมร่วมกับ WSF specific IgY powder

ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 4.3.1.3

4.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. ตามวิธีการศึกษาของ Lee et al. (2002) และ Sunwoo et al. (2002)

ในการศึกษาครั้งนี้มีการนำเอา specific IgY ที่อยู่ในรูป specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้ในการศึกษาผลของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่น ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองที่ 1 พบว่า specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ดีที่สุด โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

4.3.3.1 ศึกษาผลของการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*

4.3.3.1.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR No. 780 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet Red Bile Glucose agar (VRBG agar) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

2. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีแดง มาทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยใช้ลูปเขี่ยลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

3. ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี colony counter โดยการ spread plate บน Nutrient agar (NA) จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร

4.3.3.1.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY

1. นำไข่แอนติบอดีในรูป specific extracted IgY ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.11.3 บทที่ 3 มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ NB โดยเตรียมจากตัวอย่าง specific extracted IgY ปริมาตร 0.735 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ NB จากนั้นผสมให้เข้ากัน และกลุ่มควบคุมใส่เฉพาะ NB

2. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เก็บส่วนของ supernatant ไว้ จากนั้นนำไปทำการกรองโดยใช้ 0.22 μm -pore-size-membrane filter เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

4.3.3.1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* เมื่อทำการผสมร่วมกับ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

1. เตรียม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ NB จากนั้นเติมเชื้อ *E. coli* ที่มีปริมาณเชื้อ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน ในส่วนของหลอดควบคุมจะไม่มีการเติมส่วนของ specific extracted IgY

2. ทำการแบ่งตัวอย่างออกเป็น aliquotsๆ ละ 300 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9 และ 24 นับตั้งแต่มีการบ่มเชื้อ *E. coli* ร่วมกับ specific extracted IgY จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าตลอดเวลา

3. เมื่อครบจำนวนชั่วโมง นำส่วนของ aliquots มาทำการศึกษาการเจริญเติบโตที่เวลา 0, 3, 6, 9 และ 24 ชั่วโมง โดยการ spread plate บน NA ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

4. ทำการนับจำนวนเชื้อ *E. coli* และนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ CFUต่อมิลลิลิตร

4.3.3.2 ศึกษาผลของการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.

4.3.3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. นำเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. TISTR No. 539 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS agar (MRS agar) นำไปใส่ไว้ใน anaerobic jar และนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2. เลือก 1 โคโลนี ของ *Lactobacillus* sp. มาเพาะเลี้ยงต่อโดยใช้ลูปเขี่ยลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS broth (MRS broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ไว้ใน anaerobic jar เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3. ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยการ spread plate บน MRS agar จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร

4.3.3.2.2 การเตรียมสารละลาย specific extracted IgY

1. นำไข่แอนติบอดีในรูป specific extracted IgY ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.11.3 บทที่ 3 มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ MRS broth โดยเตรียมจากตัวอย่าง specific extracted IgY ปริมาตร 0.735 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ MRS broth จากนั้นผสมให้เข้ากัน และกลุ่มควบคุมใส่เฉพาะ MRS broth

2. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เก็บส่วนของ supernatant ไว้ จากนั้นนำไปทำการกรองโดยใช้ 0.22 μm -pore-size-membrane filter เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

4.3.3.2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. เมื่อทำการผสมร่วมกับ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

1. เตรียม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ MRS broth จากนั้นเติมเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่มีปริมาณเชื้อ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน ในส่วนของหลอดควบคุมจะไม่มีการเติมส่วนของ specific extracted IgY

2. ทำการแบ่งตัวอย่างออกเป็น aliquots ๆ ละ 300 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9 และ 24 นับตั้งแต่มีการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* sp. ร่วมกับ specific extracted IgY นำไปใส่ไว้ใน anaerobic jar เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. เมื่อครบจำนวนชั่วโมง นำส่วนของ aliquots มาทำการศึกษาการเจริญเติบโตที่เวลา 0, 3, 6, 9 และ 24 ชั่วโมง โดยการ spread plate บน MRS agar ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำ plate นำไปใส่ไว้ใน anaerobic jar เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4. ทำการนับจำนวนเชื้อ *Lactobacillus* sp. และนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ CFUต่อมิลลิลิตร

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

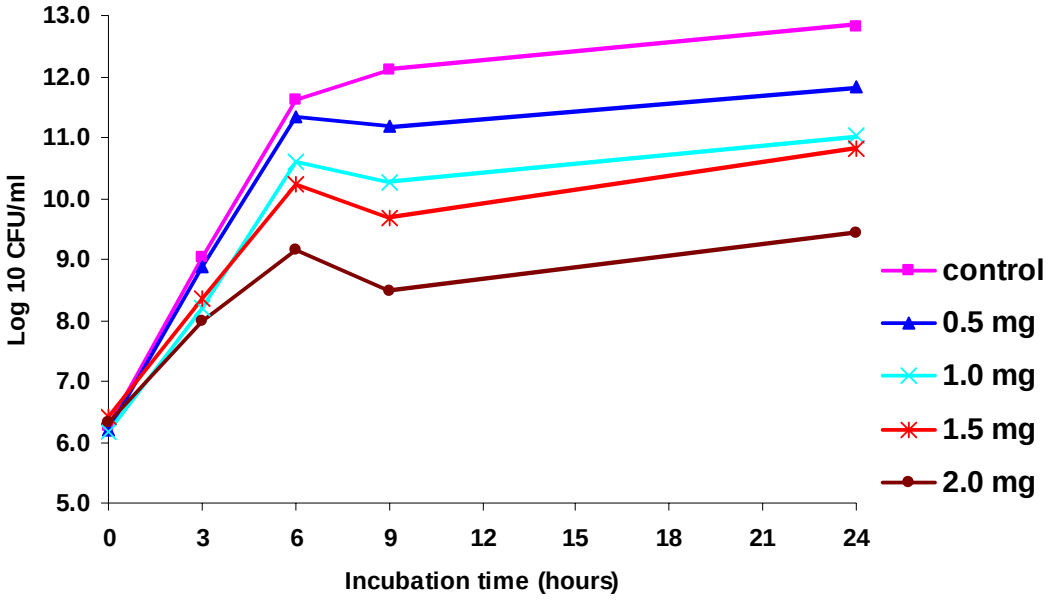
ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยการวัดซ้ำ โดยวิธี repeated measurement in CRD ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1997) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± standard error (SE)

4.5 ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

4.5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณของ specific extracted IgY ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

หลังจากทำการบ่มเพาะ specific extracted IgY ร่วมกับ *S. enterica* serovar Enteritidis นาน 3 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งหมายถึงทุกกลุ่มการทดลองมีการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis แต่

จากกราฟจะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 2.68, 2.031, 1.922 และ 1.633 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.77 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 1.5%, 1.0%, และ 0.5% ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.1



แผนภาพที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

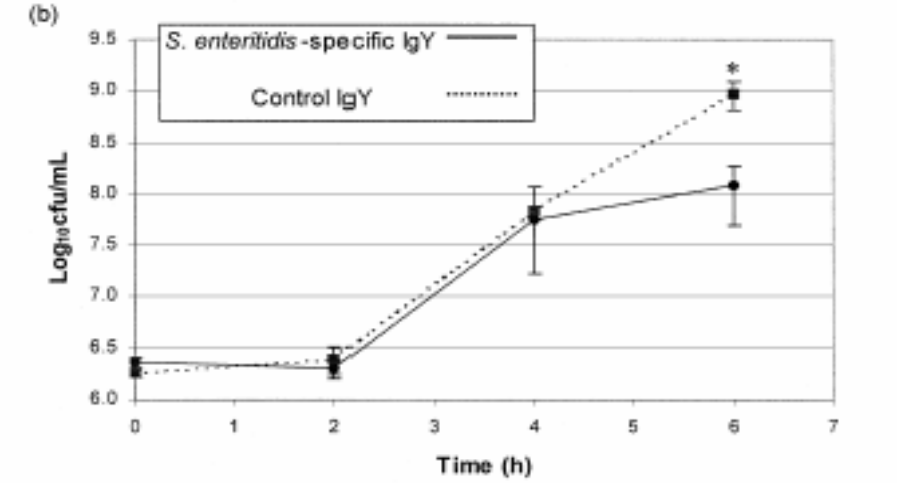
เช่นเดียวกันในชั่วโมงที่ 6 ที่พบว่าปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 3 แต่กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY ทุกกลุ่มการทดลองมีการเจริญเติบโตน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 3 เท่ากับ 2.467, 2.401, 1.893 และ 1.172 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามความเข้มข้นของระดับ IgY ที่ 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.589 log CFUต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 9 หลังจากทำการบ่มเพาะ specific extracted IgY ร่วมกับ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY มีผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อลดลงจากชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.167, 0.318, 0.547 และ 0.665 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของ specific extracted IgY เพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น 0.495 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายถึงชั่วโมงที่ 9 กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในชั่วโมง 24 พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY มีการเจริญเติบโตในอัตราที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่า กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 11.841±0.118, 11.023±0.123, 10.825±0.090 และ 9.421±0.381 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามระดับความเข้มข้นของ specific extracted IgY เท่ากับ 0.5, 1.0 , 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 12.827±0.021 log CFUต่อมิลลิลิตร

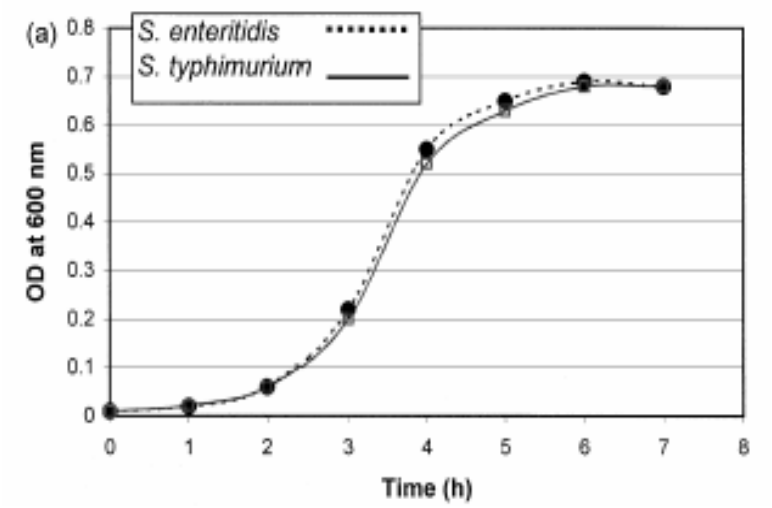
จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เมื่อทำการบ่มเพาะ *S. enterica* serovar Enteritidis ร่วมกับ specific extracted IgY มีผลทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลดลง แม้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis จะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 0-6 แต่จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY จะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และในชั่วโมงที่ 9 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ เนื่องจากมีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลดลงจากชั่วโมงที่ 6 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของระดับ IgY เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Lee et al. (2002) ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.2 ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของการใช้ specific IgY ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ระดับความเข้มข้น 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการใช้ non-specific IgY (control IgY) และกลุ่มควบคุม (การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ตามปกติ ที่ไม่มีการผสมร่วมกับสารใดๆ) โดยเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่ากลุ่มที่มีการใช้ non-specific IgY (control IgY) ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยพบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการใช้ non-specific IgY (control IgY) ยังคงเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับการเจริญเติบโตของเชื้อปกติ คือในชั่วโมงที่ 0-2 และ 2-6

มีการเจริญเติบโตแบบ lag phase และ exponential phase ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.3 แต่ในกลุ่มที่มีการใช้ specific IgY มีผลทำให้ลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลังจากมีการบ่มเพาะร่วมกับเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ผ่านไปแล้ว 4 ชั่วโมง โดยพบว่าปริมาณเชื้อของกลุ่ม specific IgY และกลุ่ม non-specific IgY เพิ่มขึ้น 0.3 และ 1.2 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในระหว่างชั่วโมงที่ 4-6 หลังการบ่มเพาะ พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้ specific IgY มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 4 เท่า



แผนภาพที่ 4.2 ผลการศึกษาการใช้ specific IgY ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ระดับความเข้มข้น 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis (Lee et al., 2002)

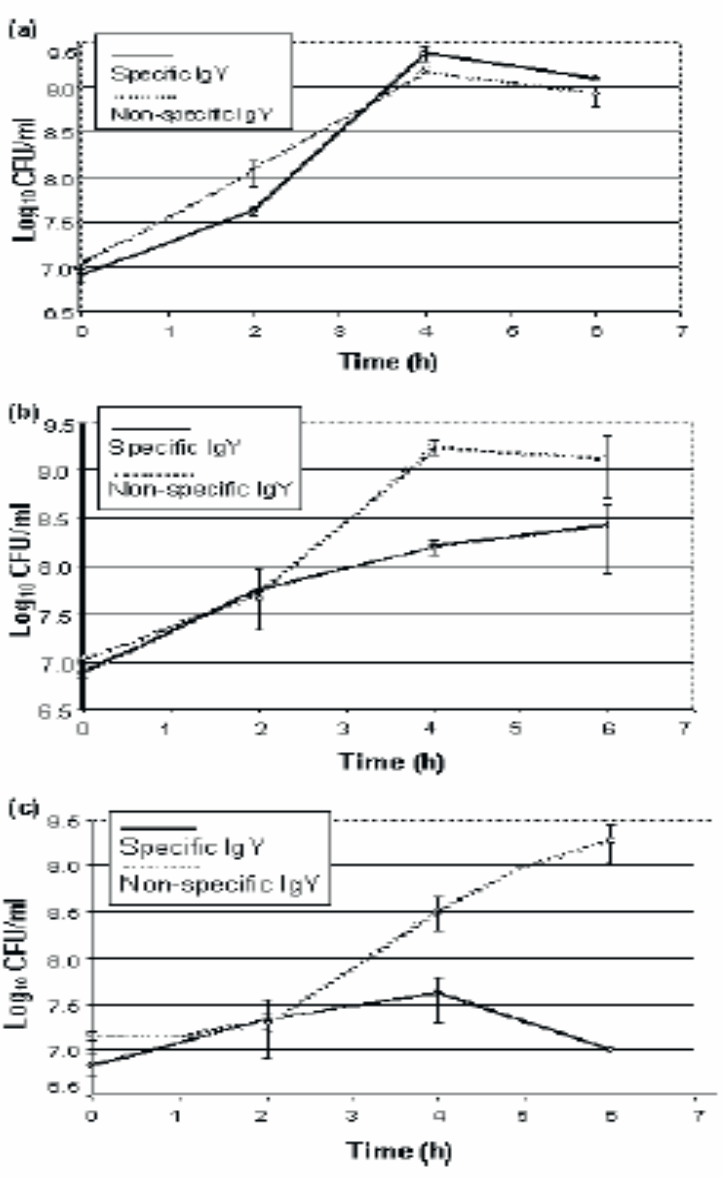


แผนภาพที่ 4.3 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ *S. enterica* serovar Typhimurium (Lee et al., 2002)

นอกจากนี้ Sunwoo et al. (2002) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ระดับความเข้มข้น 0.59, 1.17 และ 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.4 โดยได้มีการทำการทดลองใน *in vitro* พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในกลุ่มที่มีการใช้ specific IgY ความเข้มข้น 0.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่ใช้ non-specific IgY ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ในขณะที่กลุ่มที่มีการใช้ specific IgY ที่ระดับความเข้มข้น 1.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ non-specific IgY พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 2 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.5 และ 1.5 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในระหว่างชั่วโมงที่ 2-4 พบว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific IgY สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่ากลุ่มที่มีการใช้ non-specific IgY ถึง 1.0 log CFUต่อมิลลิลิตร ต่อมาในชั่วโมงที่ 6 พบว่า มีความแตกต่างของปริมาณเชื้อระหว่างกลุ่มที่ใช้ specific IgY และ non-specific IgY เท่ากับ 0.7 log CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ specific IgY ขึ้นเป็น 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้ผลการทดลองเหมือนกับกลุ่มที่ใช้ specific IgY ที่ความเข้มข้น 1.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในชั่วโมงที่ 4 พบว่าในกลุ่มที่มีการใช้ specific IgY มีปริมาณเชื้อลดลง 0.6 log CFUต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่ใช้ non-specific IgY มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.8 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *E. coli* O157:H7 ระหว่างกลุ่มที่ใช้ specific IgY และกลุ่มที่ใช้ non-specific IgY พบว่ามีความแตกต่างกันถึง 2.3 log CFUต่อมิลลิลิตร

Sunwoo et al. (2002) ได้สรุปผลการทดลองว่า ความสามารถของ specific IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณ IgY ที่มีการนำมาใช้ โดยพบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ซึ่งจะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ specific extracted IgY จาก 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มมากขึ้น ในกรณีของชั่วโมงที่ 24 หลังจากที่มีการบ่มเพาะ specific IgY ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียมีผลทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นนั้น อาจจะเกิดจากการที่ปริมาณความเข้มข้นของ specific IgY ไม่เพียงพอต่อการจับกันของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จึงมีผลทำให้แบคทีเรียที่ไม่มีการจับกับ specific IgY สามารถที่จะมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee et al. (2002) ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.2 ที่มีการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว ผลปรากฏว่าใน

ชั่วโมงที่ 6 มีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้จากคุณสมบัติของ IgY ที่ว่า IgY ไม่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ แต่จะมีคุณสมบัติในการช่วยลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเข้าไปทำการ block กับส่วนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าวได้ (Schade el al., 2001)



แผนภาพที่ 4.4 ผลการศึกษาการใช้ specific IgY ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7; (a) คือ specific IgY ที่ระดับความเข้มข้น 0.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b) คือ specific IgY ที่ระดับความเข้มข้น 1.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (c) คือ specific IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sunwoo et al., 2002)

กลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดย specific IgY ยังไม่มีการยืนยันที่ชัดเจนซึ่งในขณะนี้พบว่ามี 2 กลไก กลไกแรกคือ การเกิด agglutination ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างชิ้นส่วนของแอนติเจน (particulate antigen) กับแอนติบอดี ทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มกัน มีผลทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ของแบคทีเรียลดลง โอกาสที่แบคทีเรียจะได้รับสารอาหาร เพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนมีน้อยกว่าแบคทีเรียที่แยกอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว แต่เนื่องจากได้มีการรายงานผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการใช้ specific IgY ในอาหารที่เป็นวุ้นแข็ง ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ ผลปรากฏว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียลงได้ (Sadziene et al., 1992; Feldman et al., 1992) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Kuby et al, 1973 และ Gallagher et al., 1974 อ้างโดย Sunwoo et al., 2002 พบว่าปฏิกิริยา agglutination อาจจะไม่ใช่ปัจจัยหลักในการทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากว่าส่วนของ steric hindrace ของแขน Fab ของโครงสร้าง IgY มีความสามารถในการยืดหยุ่นได้น้อย ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถปรับมุมที่เหมาะสมเพื่อจับกับอิทิโทป (epitope) 2 ตำแหน่งบนแอนติเจนต่างๆ ได้

และอีกกลไกหนึ่งที่อาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ specific IgY มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจาก specific IgY มีความจำเพาะในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งแอนติเจนดังกล่าวอาจจะเป็นส่วนของ outer membrane proteins (OMPs), lipopolysaccharide (LPS), fimbriae (pili) หรือ flagella ที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ specific IgY จับกับแอนติเจนดังกล่าวแล้วเกิดการ block มีผลต่อการทำลายหน้าที่หรือโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Sim et al., 2000)

นอกจากนี้จากรายงานของ Lee et al. (2002) ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงกลไกการจับกันระหว่าง specific IgY กับเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้วิธี immunofluoresence microscopy และ immunoelectron microscopy โดยวิธีการ immunofluoresence microscopy มีการนำเอาเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis มาผสมร่วมกันกับ specific IgY และ non- specific IgY จัดเป็น positive control และ negative control ตามลำดับ จากนั้นจะทำการเติม fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti–chicken IgG ซึ่งเป็น fluorescence dye ผลจากการทดลองพบว่า สามารถเห็นการเรืองแสงของสี fluorescence ในกลุ่มที่มีการบ่มเพาะแบคทีเรียร่วมกันกับ specific IgY ในขณะที่จะไม่มีสีเกิดขึ้นในกลุ่มที่เป็น negative control ซึ่งการปรากฏสี fluorescence สามารถอธิบายได้ว่า specific IgY มีการจับกันกับเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ non-covalent ระหว่าง antigenic–

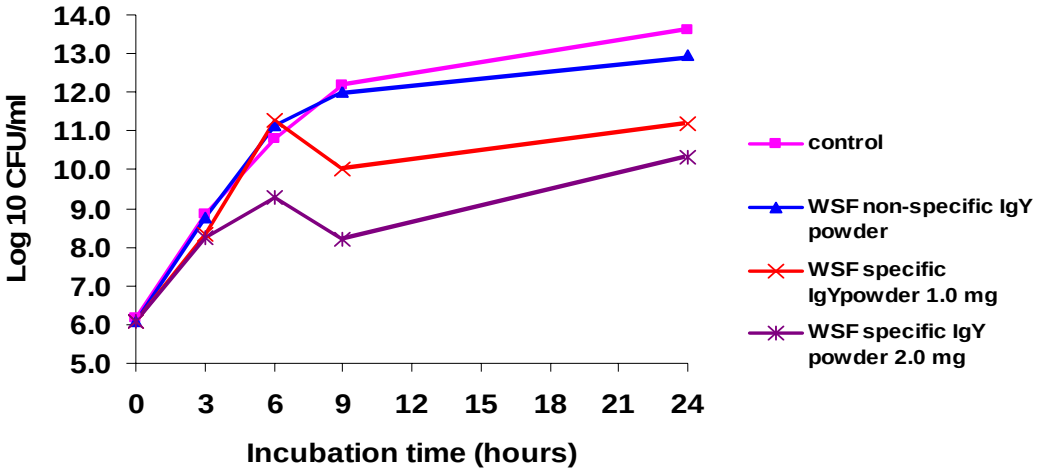
binding site หรือ epitope ของแอนติเจนและ variable–regions หรือ complementarity–determining regions (CDRs) (Kuby , 1997) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการจับกันระหว่าง specific IgY กับแบคทีเรีย เป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CDRs ของ specific IgY และ epitope ของแบคทีเรีย และจากการศึกษาโดยวิธี immunoelectron microscopy ที่มีการบ่มเพาะเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ร่วมกับ rabbit anti–chicken IgG และ goat anti–rabbit IgG conjugated with immunogold โดยแบคทีเรียจะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของ negative stain และ ultrathin section โดย negative stain ได้จากการย้อมด้วย 2% uranyl acetate และในส่วนของ ultrathin section ได้จากการนำตัวอย่างไป fixed ด้วย 25% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide นำไปทำให้แห้งด้วย ethanol จากนั้นทำให้แบคทีเรียติดแน่น (embedded) โดยการใช้ Spurr's medium และนำไปผ่านกระบวนการ polymerization ตัวอย่างที่ได้จะถูกตัดให้บาง และนำไปย้อมด้วย 2% uranyl acetate จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมทั้ง 2 วิธี มาตรวจสอบโดยใช้การส่องผ่านจาก electron microscopy โดยผลการทดลองพบว่า จะมีส่วนของ immunogold อยู่บริเวณรอบ ๆ เซลล์ของแบคทีเรียที่มีการบ่มเพาะร่วมกับ specific IgY แต่ไม่พบในกลุ่มที่บ่มเพาะร่วมกับ non–specific IgY ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า การที่มีส่วนของ immunogold อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ของแบคทีเรีย เป็นการยืนยันว่า specific IgY สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียที่บริเวณ epitope เฉพาะของแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะเป็นส่วนของ OMPs, LPS, fimbriae (pili) หรือ flagella ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย มีผลทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (immobilize) และทำให้เกิดการทำลายขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียเมื่อมีการจับกับ specific IgY ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Sunwoo et al. (2002) ที่ได้มีการศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยวิธี immunofluoresence microscopy และ immunoelecteon microscopy ปรากฏว่าให้ผลการทดลองเหมือนกับการศึกษาของ Lee et al. (2000) คือ เมื่อนำมาทดสอบด้วย immunofluoresence microscopy สามารถเห็นการเรืองแสงของสี fluorescence ในกลุ่มที่มีการผสมเชื้อร่วมกันกับ specific IgY แต่จะไม่มีสีเกิดขึ้นในกลุ่มที่มีการผสมร่วมกับ non-specific IgY และในการศึกษาด้วยวิธี immunoelectron microscopy พบว่ามีส่วนของ immunogold อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ของแบคทีเรียที่มีการผสมเชื้อร่วมกับ specific IgY แต่จะไม่พบในกลุ่มที่ผสมร่วมกับ non-specific IgY ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการที่มีส่วนของ immunogold

อยู่บริเวณรอบๆ เซลล์ของแบคทีเรีย นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบคทีเรีย เมื่อมีการจับกันระหว่าง specific IgY ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากบริเวณผิวของแบคทีเรียอาจจะถูก block โดยการจับกันของ IgY เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างเซลล์ และเป็นผลทำให้เกิดการทำลายขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

4.5.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของไข่แอนติบอดีที่อยู่ในรูปของ WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

4.5.2.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ WSF specific IgY powder และ WSF non specific IgY powder

จากแผนภาพที่ 4.5 เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ WSF non specific IgY powder มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.845±0.033 และ 8.745±0.065 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากปริมาณเชื้อของทั้งสองกลุ่มการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่มีปริมาณเชื้อแตกต่างจากกลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่ากลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.322±0.028 และ 8.230±0.028 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



แผนภาพที่ 4.5 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritdis โดยการใช้ WSF specific IgY powder ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ WSF non specific IgY powder

ในชั่วโมงที่ 6 พบว่ากลุ่มที่มีการใช้ WSF non specific IgY powder และ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ 11.130±0.025 และ 11.255±0.020 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่มีปริมาณเชื้อแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.806±0.033 และ 9.279±0.263 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีการใช้ specific extracted IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่พบว่าในชั่วโมงที่ 6 กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อลงได้ และต่อมาในชั่วโมงที่ 9 พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่า กลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.017±0.026 และ 8.201±0.069 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ เท่ากับ 0.33 และ 1.11 log CFUต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ WSF non specific IgY powder มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 1.37 และ 0.87 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองในชั่วโมงที่ 9 จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ โดยที่ความเข้มข้นของ WSF specific IgY powder ที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ดีที่สุด ต่อมาในชั่วโมงที่ 24 พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยกลุ่มที่มีการใช้ WSF specific IgY powder ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 11.170±0.034 และ 10.322±0.116 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ WSF non specific IgY powder ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 13.592± 0.084 และ 12.975±0.519 log CFUต่อมิลลิลิตร

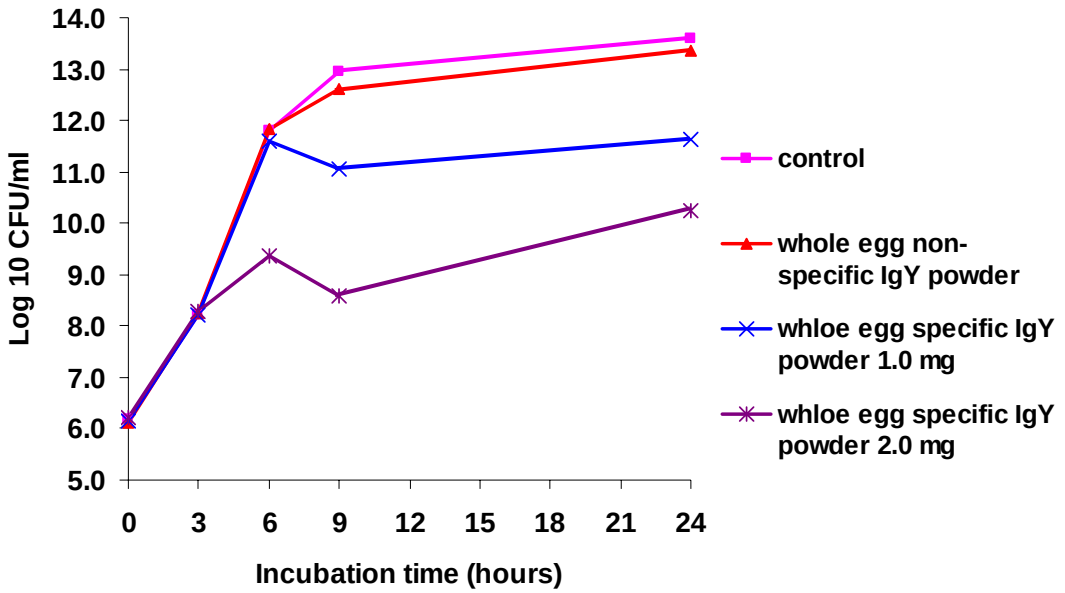
จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การใช้ WSF specific IgY powder สามารถลดอัตราเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ในชั่วโมงที่ 6 และในชั่วโมงที่ 9 พบว่า WSF specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมีผลทำให้ปริมาณเชื้อลดลงจากชั่วโมงที่ 6 และจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ WSF specific

IgY powder จาก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้ WSF specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้เช่นเดียวกับการใช้ specific extracted IgY ในส่วนของกลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อของการใช้ specific extracted IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

4.5.2.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ whole egg specific IgY powder และ whole egg non specific IgY powder

เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลองเพิ่มมากขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 โดยปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.6



แผนภาพที่ 4.6 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยการใช้ whole egg specific IgY powder ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ whole egg non specific IgY powder

ในชั่วโมงที่ 6 พบว่าปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 3 โดยพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ whole egg non specific IgY powder มีปริมาณเชื้อ *S.*

enterica serovar Enteritidis เท่ากับ 11.806 ± 0.038 และ 11.820 ± 0.027 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่พบว่าทั้งสองกลุ่มการทดลองดังกล่าวมีปริมาณเชื้อแตกต่างจากกลุ่มที่มีการใช้ whole egg specific IgY powder ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เท่ากับ 11.614±0.081 และ 9.352±0.080 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองในชั่วโมงที่ 6 จะเห็นได้ว่าการใช้ whole egg specific IgY powder สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ โดยที่ความเข้มข้นของ WSF specific IgY powder ที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีการใช้ specific extracted IgY และ WSF specific IgY powder ที่ระดับเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่าสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อลงได้ ต่อมาในชั่วโมงที่ 9 พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบว่ากลุ่มที่มีการใช้ whole egg specific IgY powder ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 11.041±0.092 และ 8.593±0.176 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.57 และ 0.76 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า การใช้ whole egg specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ whole egg specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีขึ้น ในขณะที่กลุ่มที่มีการใช้ whole egg non specific IgY powder และกลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 12.949±0.160 และ 12.616±0.065 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.796 และ 1.143 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อในชั่วโมงที่ 24 พบว่าในทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้นจากชั่วโมงที่ 9 โดยกลุ่มที่มีการใช้ whole egg non specific IgY powder และกลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ13.362±0.437 และ 13.592 ± 0.044 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่มีการใช้ whole egg specific IgY powder ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 11.633±0.186 และ 10.260±0.138 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ specific extracted IgY และ WSF specific IgY powder ที่

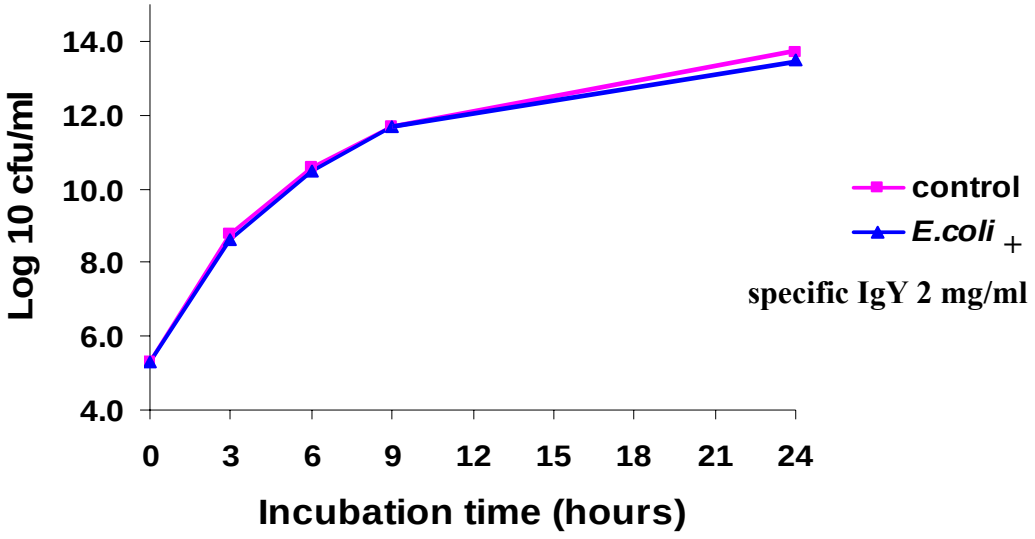
พบว่าจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 24 แต่พบว่ามีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการใช้ non specific IgY powder

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการใช้ whole egg specific IgY powder สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้เช่นเดียวกับการใช้ specific extracted IgY และ WSF specific IgY powder ในส่วนของกลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อของการใช้ specific extracted IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

4.5.3 ผลการศึกษาการใช้ไข่แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *Lactobacillus* sp.

4.5.3.1 ผลของการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*

จากแผนภาพที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จาก specific extracted IgY ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



แผนภาพที่ 4.7 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*

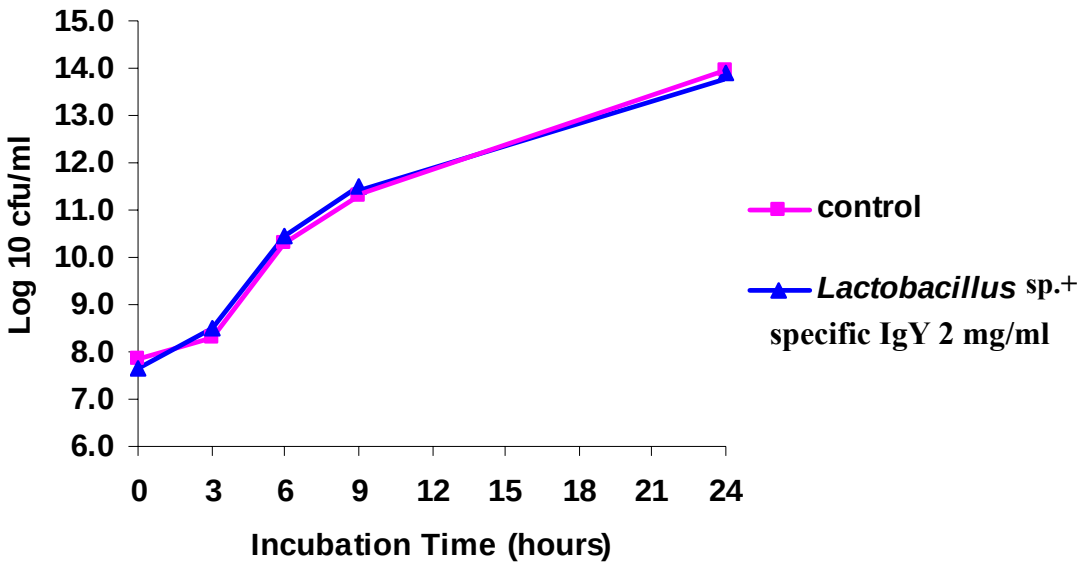
ทั้งนี้เนื่องจาก ไม่ว่าจะมีการสุ่มตรวจที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9 หรือ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่าง โดยในกลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9 หรือ 24 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.301±0.326, 8.602±0.210, 10.462±0.350, 11.672±0.283 และ 13.505±0.138 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.301±0.326, 8.778±0.138, 10.556±0.311, 11.699±0.221 และ 13.681±0.137 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการ ศึกษาของ Lee et al. (2002) ที่มีการศึกษา cross reactivity ระหว่าง specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ทดสอบร่วมกับเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธี ELISA ผลปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยา cross reactivity ต่อกันน้อยมาก ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis มี identical epitope จำนวนน้อยที่เหมือนกันกับลักษณะของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า specific IgY มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยา cross reactivity ของ IgY เช่น จากการศึกษาของ Lee et al. (2002) พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยา cross reactivity ระหว่าง specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis กับ *S. enterica* serovar Typhimurium เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นจึงอาจเกิดการ share antigen (O:1 และ O:12) และ common epitope และ flagellin กันได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sunwoo et al. (2002) ที่พบว่า การใช้แอนติเจนที่ผลิตจาก whole cells ของแบคทีเรีย อาจเกิดปฏิกิริยา cross reactivity ได้ เนื่องจาก whole cells มี epitope ขนาดใหญ่ อาจเกิดการ share กันได้ระหว่างแบคทีเรียตัวอื่นที่อยู่ใน family เดียวกัน

4.5.3.2 ผลของการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.

จากแผนภาพที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จาก specific extracted IgY ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องจาก ไม่ว่าจะมีการสุ่มตรวจที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9 หรือ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่าง โดยในกลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9 หรือ 24 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ

7.672±0.153, 8.519±0.497, 10.462±0.314, 11.477±0.141 และ 13.903±0.075 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.839±0.082, 8.322±0.273, 10.310±0.266, 11.301±0.351 และ 13.944±0.116 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีความต่างกันมากระหว่าง 2 สายพันธุ์ เพราะว่า *S. enterica* serovar Enteritidis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่ *Lactobacillus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นจึงมีความแตกต่างกันในส่วนโครงสร้าง ทำให้โอกาสที่จะมีการ share ส่วนของ antigenic binding site และ epitope เป็นไปได้น้อย แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Shin et al., 2003 ที่ได้มีการนำเอา IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *H. pylori* มาทำการศึกษาปฏิกิริยา cross reactivity กับเชื้อ *L. salivarius* โดยวิธี Western blot พบว่า เกิดปฏิกิริยา cross reactivity ขึ้นระหว่าง IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *H. pylori* กับเชื้อ *L. salivarius*



แผนภาพที่ 4.8 ผลของ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.

4.6 สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการบ่มเพาะ *S. enterica* serovar Enteritidis ร่วมกับ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis มีผลทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลดลง แม้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis จะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 0-6 แต่จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY จะมีปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และในชั่วโมงที่ 9 พบว่า กลุ่มที่มีการใช้ specific

extracted IgY สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ เนื่องจากมีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลดลงจากชั่วโมงที่ 6 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น และจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของปริมาณ specific IgY เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ต่อมาในชั่วโมงที่ 24 พบว่า ในทุกกลุ่มการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อ แต่กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY มีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อมีการนำเอา WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder มาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่า ให้ผลการทดลองเป็นไปในรูปแบบเดียวกับการใช้ specific extracted IgY

และสำหรับผลการศึกษา specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าว

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการผลิตแอนติบอดีไข่แดงที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ เพื่อนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว รวมถึงนำมาศึกษาปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ เช่น *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. พบว่าในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแม่ไก่ด้วย inactivated whole cells antigen จากเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแม่ไก่ เพื่อสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ได้ โดยพบว่าระดับ antibody titer จะเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเมื่อมีการ booster ครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 2 พบว่ามีผลทำให้ระดับ antibody titer ในสัปดาห์ที่ 3 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อทำการ booster ครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ antibody titer ที่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 5 มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งระดับ antibody titer จะสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 และจะเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 7

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนแอนติบอดี IgY บริสุทธิ์ ด้วย 2 วิธี คือ AMS และ 12%PEG พบว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12%PEG จะทำให้ได้ปริมาณ specific IgY ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 12%PEG เมื่อนำไปศึกษาด้วยวิธีการ SDS-PAGE พบว่าทำให้ได้แถบของโปรตีนหลัก 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 และ 27 kDa ซึ่งมีรายงานว่าคือเป็นส่วนของ Heavy chains และ Light chains ในโครงสร้างของ IgY ในขณะที่การตกตะกอนแอนติบอดีด้วย AMS จะมีแถบของโปรตีนอื่นๆ ที่เป็นส่วนประกอบของไข่ปนเปื้อนมาด้วย

เมื่อมีการนำเอาไข่แอนติบอดีที่ได้มาแปรรูปให้อยู่ในรูปของ whole egg specific IgY powder, WSF specific IgY powder และ specific extracted IgY พบว่ามีปริมาณของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เท่ากับ 12.67±0.17, 27.69±0.71 มิลลิกรัมต่อกรัมของไข่ผง และ 2.74±0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม whole egg non specific IgY powder, WSF non specific IgY powder และ non-specific extracted IgY มีปริมาณของ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. eterica* serovar Enteritidis เท่ากับ 0.04±0.09, 0.11±0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของไข่ผง และ 0.74±0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไข่แดง ตามลำดับ

และจากการนำไข่แอนติบอดีที่อยู่ในรูปต่างๆ มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่า เมื่อมีการใช้ specific extracted IgY ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าชั่วโมงที่ 1-6 หลังจากที่มีการบ่มเพาะจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อในทุกกลุ่มการทดลอง แต่กลุ่มที่มีการใช้ specific extracted IgY มีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และในชั่วโมงที่ 9 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ เนื่องจากมีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลดลงจากชั่วโมงที่ 6 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น และจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของระดับ IgY เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งกลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดย specific IgY ยังไม่มีการยืนยันที่ชัดเจนซึ่งในขณะนี้พบว่ามี 2 กลไก กลไกแรกคือ การเกิด agglutination ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างชิ้นส่วนของแอนติเจน (particulate antigen) กับแอนติบอดี ทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มกัน มีผลทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ของแบคทีเรียลดลง โอกาสที่แบคทีเรียจะได้รับสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนมีน้อยกว่าแบคทีเรียที่แยกอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และอีกกลไกหนึ่งที่อาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ specific IgY มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจาก specific IgY มีความจำเพาะในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งแอนติเจนดังกล่าวอาจจะเป็นส่วนของ outer membrane proteins (OMPs), lipopolysaccharide (LPS), fimbriae (pili) หรือ flagella ที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ specific IgY จับกับแอนติเจนดังกล่าวแล้วเกิดการ block มีผลต่อการทำลายหน้าที่หรือโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่จากงานวิจัยหลายงาน พบว่ากลไกที่สองมีความเป็นไปได้มากกว่าทั้งนี้เนื่องจากในกลไกแรกนั้นมีข้อจำกัดที่ว่าส่วนของ steric hindrace ของแขน Fab ของโครงสร้าง IgY มีความสามารถในการยืดหยุ่นได้น้อย ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถปรับมุมที่เหมาะสมเพื่อจับกับอิทิโทป (epitope) 2 ตำแหน่งบนแอนติเจนต่างๆ ได้ และจากการนำเอา WSF specific IgY powder และ whole egg specific IgY powder มาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่า ให้ผลการทดลองเป็นไปในรูปแบบเดียวกับการใช้ specific extracted IgY และจากผลการศึกษาการใช้ specific extracted IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อปฏิกิริยาข้ามที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าว

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า specific IgY มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้ และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำ specific IgY มาใช้เพื่อป้องกันโรคทั้งในคนและสัตว์ได้ซึ่งการนำไปใช้นั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงในชั่วโมงที่ 9 และในชั่วโมงที่ 24 พบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ specific IgY มีไม่เพียงพอในการที่จะเข้าไปจับกับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ทั้งหมด จึงมีผลทำให้เชื้อที่เหลือมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งในการนำไปใช้อาจจะมีการให้ specific IgY ถี่ขึ้น เพราะจากผลการทดลองพบว่าในชั่วโมงที่ 9 การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลง

รูปแบบของการนำไข่แอนติบอดีไปใช้นั้น สามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 3 รูปแบบ คือ whole egg specific IgY powder, WSF specific IgY powder และ specific extracted IgY ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้ เช่น การนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคนั้น ควรจะมีการนำไปใช้ในรูปของ specific extracted IgY ทั้งนี้เนื่องจาก specific extracted IgY ได้จากการนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์ (purification) มากกว่าไข่แอนติบอดีในรูปของ whole egg specific IgY powder และ WSF specific IgY powder ซึ่งการที่มีส่วนของโปรตีนอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องอาจจะทำให้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ในด้านของการนำไปใช้ในการป้องกันโรค การนำไปใช้ในรูปของ specific extracted IgY และ WSF specific IgY powder อาจจะมีข้อจำกัดเนื่องจากว่า specific extracted IgY และ WSF specific IgY powder คือ specific IgY ที่ได้จากการแยกเอาส่วนของโปรตีนและไขมันอื่นๆ ออกไปแล้ว ดังนั้นเมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านกระบวนการย่อยจากเอนไซม์ และ pH ต่างๆ ภายในร่างกาย ทำให้โครงสร้างของ IgY อาจจะมีโอกาสที่จะถูกทำลายได้ง่าย เนื่องจากไม่มีส่วนของโปรตีนหรือไขมันมาช่วยในการป้องกันการถูกย่อย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำเอาสารสังเคราะห์ เช่น gelatin มาเคลือบเพื่อป้องกันการถูกทำลาย แต่การนำไข่แอนติบอดีมาใช้ในรูปของ whole egg specific IgY powder พบว่า สามารถช่วยลดโอกาสที่โครงสร้างของ IgY จะถูกทำลายได้ เนื่องจาก whole egg specific IgY powder จะมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีนหรือไขมันมาช่วยป้องกันการย่อยจากเอนไซม์ต่างๆ ในทางเดินอาหาร ทำให้ IgY สามารถผ่านไปยังลำไส้เล็กได้ และมีประสิทธิภาพที่จะช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคที่มีการ colonization ภายในลำไส้เล็กได้ แต่อย่างไรก็ตามการนำมาใช้ในรูปของ whole egg specific IgY powder ก็มีข้อจำกัดคือ แม้จะสามารถช่วยป้องกันส่วนของ IgY ให้สามารถทนต่อการย่อยจากเอนไซม์และกรดได้มากยิ่งขึ้น แต่ในอีกด้านหนึ่ง พบว่า บางคนอาจจะเกิดการแพ้ส่วนของไข่ขาวได้

จากการศึกษาครั้งนี้มีการศึกษาผลของการใช้ specific IgY ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่น คือ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. ด้วยวิธี colony counter ซึ่งเป็นการนำเอาแบคทีเรียทั้งเซลล์มาผสมร่วมกับ specific IgY โดย IgY จะจับกับแอนติเจนได้เฉพาะบริเวณผิวภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย คือ ส่วนของ outer membrane proteins (OMPs), flagella และ pili เท่านั้น และเนื่องจากแบคทีเรียทั้ง *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. เป็นแบคทีเรียคนละสายพันธุ์ โดยเฉพาะ *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแตกต่างจาก *S. enterica* serovar Enteritidis ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้มีโครงสร้างบริเวณผิวภายนอกเซลล์แตกต่างกัน โอกาสที่จะพบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) จึงมีได้น้อย ดังนั้นควรที่จะมีการศึกษาต่อไปด้วยวิธีอื่น เช่น ELISA หรือ immunoblotting เพื่อตรวจสอบผลของ IgY ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากวิธี ELISA หรือ immunoblotting จะมีการนำเอาเซลล์ของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบมาทำให้เซลล์แตก (sonicate) ทำให้ได้ epitope ย่อยๆ ที่อยู่ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้ IgY มีโอกาสจับกับ epitope ต่างๆ ได้มากขึ้น และอาจจะมีโอกาสพบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ได้

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2544. **การสร้างภูมิคุ้มกันในไก่: โรคติดเชื้อในไก่**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 240.

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

นภาธร บานชื่น. 2530. **ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ศุภวานิช, กรุงเทพมหานคร.

ประกาศสำนักงานอาหารและยา. 2546. **โครงการเนื้อสัตว์ปลอดภัย** [ออนไลน์]. Available: http: //natres.psu.ac.th/Department/AnimalScience/515-408/word.files/meat%20and %20meal.htm.

วัลภา ลาภภักดี. 2549. **การเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อซัลโมเนลลา เอ็นเตอริก้า ซีโรวาร์ เอ็นเตอริทิดิส ในไข่ไก่**. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สันนิภา สุรทัตต์. 2545. **Veterinary Immunology an update**. กรุงเทพมหานคร: บริษัท โนวาร์ตีส (ประเทศไทย) จำกัด. 78 หน้า.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และเกรียงศักดิ์ สายธนู. 2539. เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ. ใน **สถิติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2536-2538**. การประชุมสัมมนาวิชาการ โรคติดเชื้อจากอาหารและการจัดระบบเฝ้าระวังการดื้อยาของจุลชีพ. 11-13 ธันวาคม, เพชรบุรี.

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

Akita, E.M. and Nakai, S. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. **J. Food. Sci**. 57: 626-634.

Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **J. Immunol. Methods**. 16: 207-214.

Akita, E.M. Li-Chan, E.C.Y. and Nakai, S. 1998. Neutraization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. **Food Agri. Immunol**. 10: 161-172.

Alexkruse, S., Tollefson, L. and Bogel, K. 1993. **Control strategies for *Salmonella Enteritidis* in five countries USFDA/WHO in press**.

Amral, J.A., De Franco, M.T., Carneiro-Sampaio, M.M.S., and Carbonare, S.B. 2002. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized Leghorn chickens. **Res. Vet. Sci**. 2002. 72: 229-234.

Bangtrakunonth, A., Pornrunangworg, S., Chalermchaikit, T. and Saitanu, K. 1993. ***Salmonella enteritidis* infection in Thailand: A public health problem?** Proc 11th International Symposium WAVFH. The world association of veterinary food hygienists. 24-29 October, Bangkok p. 175-180.

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

Behn, I,. Hommel, U., Oertel, M. And Hauschildt, U. 1996. Kinetics of IgY formation after immunization of hens with different protein antigens. **ALTEX**. 13: 18-21.

Bene, V.D. and Schmidt, M.G. 1997. **Bacterial virulence factors: Microbiology and infection diseases**. ed. Virella, G., pp 66-70. Williams and Wilkins.

Bernhisel-Broadbent, J., Yolken, R.H., and Sampson, H.A. 1991. Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food-allergic children. **Pediatrics**. 87: 208-214.

Bizanov, G., and Vyshniauskis, G. 2000. A comparison of three methods for extracting IgY fromm the egg yolk of hens immunized with Sendai Virus. **Vet. Res. Comm**. 24: 103-113.

Bizanov, G., and Jonauskiene, I. 2003. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. 47: 403-410.

Bollen, L.S., Crowley, A., Stodulski, G. and Hau, J. 1996. Antibody production in avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **J. Immunol. Methods**. 191: 113-120.

Bollen, L.S. and Hau, J. 1999. Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunized chickens. **In vitro**. 13: 107-108.

Brooks, G,F., Butel, J.S., and Morse, S.A. 1998. **Medical microbiology**. Appleton and Lange.

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

Chang, H.M., Ou-Yang, R.F., Chen, Y.T. and Chen, C.C. 1999. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype C in chicken egg yolk (IgY). **J. Agric. Food. Chem**. 47: 61-66.

Chansarkar, N.L.1998. Studies on structural stability of hen's egg yolk immunoglobulin (IgY). MSc thesis, The University of British Columbia, Vancouver. British Columbia, Canada.

Coleman, M. 2000. **Using egg antibodies to treat diseases: Egg nutrition and biotechnology**. Eds. Sim., Nakai, S., and Guenter, W. pp. 351-337. CAB International.

Cook, C.L., Winnie, P., Joseph, R.F., Byron, E.A. and Jonathan, P.F. 2001. Simple purification methods for an α-galactose-specific antibody from chicken egg. 2001. **J. Biosci. Bioengin**. 91(3): 305-310.

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

Deignan, J., Jacinta, K., Adel, A. and O'Farrelly, C. 2000. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. **Foood and Agric Immunol**. 12: 77-85.

Ebina, T., 1996. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. **Arch.Virol**. 12: 217-223.

Elfaki, M.G., Kleven, S.H., Jin, L.H. and Ragland, W.L. 1992. Sequential intracoelomic and intrabursal immunization of chicken with inactivated *Mycoplasma gallisepticum* bacterin and iota carrageenan adjuvant. **Vaccine**. 10: 655-662.

Erhard, M.H., Schmidt, P., Hofmann, A., Bergmann, J., Mittermeier, P., Kaufmann, P., Wiesmuller, K.H., Bessler, W.G. and Losch, U. 1997. The lipopeptide, Pam3Cys- Ser-(Lys)4: An alternative adjuvant to Freund's adjuvant for the immunization of chicken to produce egg yolk antibodies. **ATLA**. 25: 173-181.

Feldmann, R.C., Henrich, B., Kolb-Bachofen, V., and Hadding, U. 1992. Decreased metabolism and viability of Mycoplasma induced by monoclonal antibody-mediated agglutination. **Infect. Immun**. 60: 166-174.

Fichtali, J., Charter, E.A., Lo, K.V. and Nakai, S. 1993. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. **J. Food.Sci**. 58: 1282-1290.

Filler, s.J., Gregory, R.L., Michalck, S.M., Katz, J. and McGhee, J.R. 1991. Effect of immune bovine milk on *Streptococcus mutans* in human dental plaque. **Arch. Oral. Biol**. 36: 41-47.

Gross M., and Speck, J. 1996. Avian yolk antibodies in diagnosis and reseach. **Tierarztl Wochenschr**. 103(10): 417-22.

Gurtler M., Methner, U., Kobilke, H. and Fehlhaber, K. 2004. Effect of orally administered egg yolk antibodies on *Salmonella enteritidis* contamination of hen's eggs. **J. Vet. MedB**. 51: 129-134.

Hansen, P., Judith, A.S., Brendon, H. and Nicholas, J.H. 1998. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **J. Immunol. Methods**. 215: 1-7.

Hassl, A., and Aspock, H., 1998. Purification of egg yolk immunoglobulins : a two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. **J. Immunol. Methods**. 110: 225-228.

Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, Sl, Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. 1993. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. **Biosci. Biotech. Biochem**. 57: 1077 - 1081.

Hatta, H., Mabe, K., Kim, M., Yamamoto, T., Guterrez, M.A. and Miyazaki, T. 1994. **Prevention of fish disease using egg yolk antibody: Egg uses and**

processing technologies-new developments. eds. Sim., J.S. and Nakai, S., pp. CAB International.

Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz., J., Katz, J., Childers, N.K. and Michalek, S.M. 1997. Passive immunization against dental plaque formation in humans: Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Res**. 31: 268-274.

Helm, B.A., Ling, Y., Teale, C., Padlan, E.A. and Bruggemann, M. 1991. The nature and importance of the inter-epsilon chain disulfide bonds in human IgE. **Eur. J. Immunol**. 21: 1543-1548.

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

Ikemori, Y., Peralta, R.C, Kuroki, M., Yokoyama, H. and Kodama, Y. 1993. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. **Poult. Sci**. 72: 2361-2365.

Ikemori, Y., Ohta, M., Umeda, K., Icatlo, F.C., Kuroki, M., Yokoyama, H. and Kodama, Y. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrums antibody powder. **Vet. Microbiol**. 58: 105-111.

Imberechts, H., Eprez, P., Van Driessche, E. and Pohl, P. 1997. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 postitive *E.coli* by experimentally infected pigs. **Vet. Microbiol**. 54: 329 - 341.

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

Jin, L.Z., Baidoo, S.K. Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A, 1998. *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**. 21: 313-321.

Jungling, A., Wiedemann, V., Kuhlmann, R., Erhard, M., Schmidt, P. and Losch, U. 1991. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases IV. *In vitro* studies on protective effects against adhesion of enterotoxigenic *E.coli* to isolated enterocytes. **J. Vet. Med**. B38: 373-381.

Kassaify Z. G. and Y. Mine. 2004. Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens. **Poult. Sci**. 83: 753-760.

Kokko, H. and Karenlampi, S.O. 1992. Antibody from hen's egg against a conserved sequence of the gametophytic self-incompatibility proteins of plants. **Anal. Biochem**. 201: 311-318.

Kruger, N.J. 2002. The Bradford Method for Protein Quantitation. Page 15-21.in The **Protein Protocol Handbook**. Humana Press Inc. Printed in the United States of American.

Kuby, J. 1997. Antigens. **In Immunology**. 3rd eds. p. 87-106. W.H. Freeman and Company. New York.

Kuroki, M., Ikemori, Y., Yokoyama, H., Peralta, R.C., Icatlo, F.C., and Kodama., Y., 1993. Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in

murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Vet. Microbiol**. 37: 135-146.

Kuroki, M., Ohta, M., Ikemori, Y., Reralta, R.C., Yokoyama and Kodama, Y. 1994. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Arch. Virol**. 138: 143-148.

Kwan, L., Li-Chan, E., Helbig, N. and Nakai, S. 1991. Fractionation of water-soluble and water – insoluble components from egg yolk with minimum use of organic solvents. **J. Food. Sci**. 56: 1537-1541.

Larsson, A., Balow, R., Lindahl, T.L. and Forsberg, P. 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution –A review. **Poult. Sci**. 72: 1807-1812.

Lax, A.J., Barrow, P.A., Jones, P.W. and Wallis, T.S. 1995. Current perspectives in Salmonellosis. **Bri. Vet. J.** 151: 351-377.

Lee, E. N., Sunwoo, H. H., Menninen, K. and Sim, J. S. 2002. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poult. Sci**. 81: 632-641.

Leslie, G.A. and Clem, L.W. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function III. Immunoglobulins of the chicken. **J. Exp. Med**. 130: 1337-1352.

Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H.H., Paek, B.H., Chae, H. S. and Sim, J.S. 1998. Effects of egg yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poult. Sci**. 77: 266-270.

Li-Chan, E.C.Y., Ler, S.S., Kummer, A. and Akita, E.M. 1998. Isolation of lactoferrin by immunoaffinity chromatography using yolk antibodies. **J. Food Biochem**. 22:179-195.

Li-Chan, E.C.Y. 2000. **Application of egg immunoglobulins in immunoafinity chromatography**. In: Egg nutrition and biotechnology. Eds.

Mason, J. and Ebel E. 1992. **Adhis *Salmonella Enteritidis* control program**. Proceeding san Dieogo Symposium on the diagnosis and control of *Salmonella*, Carter Printing Company, Richmond, USA.

Mine, Y., and Kovacs, J. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: review. **J. Med. Food.** 5: 159-169.

Misher, B., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Cameron, D.N., Hutcheson, R.M. and Schaffarer, W. 1991. *Salmonella Enteritidis* gastroenteritidis transmitted by intact chicken eggs. **Annals. Inter. Med.** 115: 190-194.

Narat, M. 2003. Production of antibodies in chickens. **Food. Technol. Biotechnol.** 41 (3): 259-267.

O'Farrelly, C., Branton, D. and Wanke, C.A. 1992. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. **Infect. Immun**. 60: 2593-2597.

Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. and Hirasawa, M. 1991. Protection of rats against caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). **J. Dent. Res**. 70: 162-166.

Otani, H., Matsumoto, K., Saeki, A. and Hosono, A. 1991. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. **Lebensm Wiss. U. Techonol**. 24: 152-158.

Owusu-Asiedu, A., Baidoo, S.K., Nyachoti, C.M. and Marquardt, R.R. 2002. Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-based

diets supplemented with specific egg yolk antibody against enterotoxigenic *Escherichia Coli*. **J. Anim. Sci**. 80: 2895-2903.

Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C.M., Baidoo, S.K., Marquardt, R.R. and Yang, X. 2003a. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus chicken egg yolk antibody. **J. Anim. Sci**. 81: 1781-1789.

Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C.M. and Marquardt, R.R. 2003b. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus specific egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid or antibiotic. **J. Anim. Sci**. 81: 1790-1798.

Peralta, R.C., Yokoyama, H., Ikemori, Y., Kuroki, M., and Kodama, Y. 1994. Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg yolk antibodies specific for 14kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. **J. Med. Microbiol**. 41 : 29.35.

Polson,A., and Von Wechmar, M.B. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolk of immunized hens. **Immunol.Comm**. 9: 476-493.

Ronald, R. M., Jin, L.Z., Kim, J. W., Fang, L., Frohich, A. A. and Baidoo, S. K. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**. 23: 283-288.

Rousell, R.H. and McCue, J.P. 1991. **Antibody purification of from plasma**. In Blood separation and plasman fractionation. Eds. Harris, J.R. pp. 307-340. Wiley-Liss, New York.

Sadziene, A., Thomopson, P.A., and Barbour, A.G. 1993. *In vitro* inhibition of Borrelia burgdorferi growth by antibodies. **J. Infect**. 167:n165-172.

Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, H., Kock. G., Larsson, A., Pollmann, W., Regenmortel, M. Rike, E., Spielmann, H., Steinbusch, H. and Straughan, D. 1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **ALTA**. 24: 925-934.

Schade, R., Behn, I., Erhard, M., Hlinak, A. and Staak, C. 2001. **Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology**. Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York. Germany.

Schmidt, P., Wanke, R., Linch, E., Wiedemann, V., Kuhlmann, R. and Losch, U. 1989. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. II. *In vitro* studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Vet. Med**. B36: 619-629.

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

Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C. and Nakai, S. 1988. Anti-*E.coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **J. Food. Sci**. 53: 1360-1366.

Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K. and Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci. Biotech. Biochem**. 56: 270-274.

Shimizu , M., Nagashima, H., Hashimot, K., and Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. **J. Food. Sci**. 59: 763-765-772.

Shin Ji-Hyun, Yand, M., Nam, S. W., Kim, J. T., Myung, N. H., Bang, Won-Gi and Roe, I. H. 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* Infection. **Clin. Diadn. Lab. Immunol** 9(5): 1061-1066.

Sim, J. S., Sunwoo, H. H. and Lee, E. N. 2000. **Ovoglobulin IgY: Natural Food Antimicrobial Systems**. pp 227-252. A. S. Naidu, eds. CRC Press, Boca Raton, Fl

Skrabanja, A. T.P. De Meere, A.L.J., De Ruiter, R.A. and Van Den Oetelaar, P.J.M. 1994. Lyophilization of biotechnology products. PDA. **J. Pharmaceutical. Sci. Technol**. 48: 311-317.

Stadelman, W.J., and Owen, J.C. 1986. **Egg science and technology: The nutritive valve of eggs: composition of eggs**. 3th pp 144. The avi publishing company, inc. Columbia.

Statistical Analysis System.1997. **SAS User's Guide: Statistics**. NC: SAS Institute.

Sunwoo, H.H., Nakano, T., Dixon, W.T., and Sim, J.S. 1996. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Poult. Sci**. 75:342-345.

Sunwoo, H.H., Li, X., Lee, E.N., Kim, Y.K., and Sim, J.S. 2000. **Preparation of antigen specific IgY for food application**. In Egg nutrition and biotechnology. Eds. Sim, J.S., Nakai, S., and Guenter, W. pp. 311-322. CAB International.

Sunwoo, H. H., Lee, E. N., Menninen, K., Suresh, M. R. and Sim, J. S. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia* coli O157:H7. **J. Food. Sci**. 67(4): 1486-1494.

Svendsen, L., Crowley, A., Stodulski, G. and Hau, J. 1995. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Lab. Anm. Sci**. 45: 89-93.

Tsunemitsu, H., Shimizu, M., Hirai, T., Yonemichi, H., Kudo, T., Mori, K. and Onoe, S. 1989. Protection against bovine rotaviruses in newborn calves by continuous feeding of immune colostrums. **Jap. J. Vet. Sci**. 51: 300-308.

Varavithya, W., Vathanophas, K., Bondhedatta, L., Punyaratabandhu, P., Sangchai, P., Athipanyakom, S., Wasi, C., and Echeverria, P., 1990. Importance of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. **J. Clin. Microbiol**. 28: 2507-2510.

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

WHO National Salmonella And Shigella Center, Department of Medical Sciences, 1998. **Annual Reports of Salmonellae in Thailand 1992-1997**. การจัดสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย. 15-16 มกราคม กรุงเทพฯ.

Wolley, J.A. and Landon, J. 1995. Comparison of antibody production to human interleukin-6(LL-6) by sheep and chickens. **J. Immunol. Methods**. 178: 253-265.

Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun**. 60: 998-1007.

Yokoyama, H., Peralta., R.C., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. 1993. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. **Am. J. Vet. Res**. 54: 867-872.

Yokoyama, H., Umeda, K., Peralta, R.C., Hashi, T., Icatlo, F.C., Kuroki, M., Ikemori, Y. and Kodama, Y, 1998a. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Vaccine**. 16: 388-393.

Yokoyama, H., Peralta R.C., Umeda, K., Hashi, T., Icatlo, F.C., Kuroki, M., Kkemori, Y. and Kodama, Y. 1998b. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. **Am. J. Vet. Res**. 59: 4,416-420.

Yoshiko, S.K., Shibata, K., Yun., S.S., Yukiko, H.K., Yamaguchi, K. and Kumagai, S. 1996. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Biosci. Biotech. Biochem**. 60: 886-888.

ภาคผนวก ก

(แสดงข้อมูลจากการทดลอง)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 nm

ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 590 nm
0	0.000
1	0.016
2	0.032
5	0.080
15	0.230

การหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมในการเริ่มทำ serial dilution ของ water soluble fraction (WSF) จากไข่แดง โดยวิธี Indirect ELISA แสดงผลการทดลองเป็นค่า OD

dilution	NI 1	NI 2	NI 3	PI 1	PI 2	PI 3	ค่าเฉลี่ย NI	ค่าเฉลี่ย PI
1:100	0.101	0.105	0.072	0.903	0.945	0.961	0.093	0.936
1:200	0.072	0.072	0.063	0.737	0.797	0.760	0.069	0.765
1:400	0.065	0.067	0.060	0.526	0.510	0.533	0.064	0.523
1:800	0.061	0.063	0.059	0.293	0.288	0.334	0.061	0.305
1:1600	0.061	0.061	0.058	0.164	0.158	0.201	0.060	0.174
1:3200	0.060	0.059	0.058	0.098	0.095	0.120	0.059	0.104
1:6400	0.060	0.058	0.057	0.071	0.063	0.096	0.058	0.077
1:12800	0.058	0.056	0.056	0.057	0.049	0.068	0.057	0.058
1:25600	0.056	0.056	0.055	0.056	0.050	0.065	0.056	0.057

ในการทดสอบ negative control (NI) และ positive control (PI) จะใช้ตัวอย่างทดสอบอย่างละ 3 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาระดับ antibody titer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enteica* serovar Enteritidis จาก WSF ของไข่แดงจากไก่ในแต่ละสัปดาห์

Treatment 1 (ไข่จากแม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis)

สัปดาห์ที่	ระดับ antibody titer ในไข่แอนติบอดีที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Optical density;OD)										เฉลี่ย	SE
	T1R1	T1R2	T1R3	T1R4	T1R5	T1R6	T1R7	T1R8	T1R9	T1R10		
0	0.067	0.062	0.063	0.059	0.067	0.061	0.065	0.059	0.058	0.061	0.062	0.026
1	0.115	0.131	0.072	0.122	0.096	0.122	0.108	0.150	0.114	0.101	0.113	0.099
2	0.245	0.140	0.171	0.220	0.136	0.139	0.146	0.148	0.146	0.138	0.163	0.142
3	1.075	1.030	0.977	0.834	0.974	1.089	0.999	1.053	0.919	1.080	1.003	0.149
4	1.062	1.078	1.072	1.046	1.101	1.038	1.088	1.011	0.974	1.065	1.053	0.180
5	1.029	1.073	1.059	0.993	1.063	1.155	1.108	1.149	1.093	1.049	1.077	0.207
6	0.869	1.043	1.053	1.069	1.082	1.089	1.114	1.138	1.105	1.098	1.066	0.233
7	1.027	1.008	1.016	0.984	1.036	1.019	1.013	0.997	1.012	0.949	1.006	0.256
8	1.120	1.104	1.011	0.896	0.960	0.975	0.973	0.939	0.987	0.937	0.990	0.296
9	1.009	1.032	1.062	0.958	1.005	1.044	0.136	1.006	1.019	0.785	0.905	0.280
10	1.101	0.980	0.962	0.806	0.873	0.917	0.678	0.916	0.858	0.850	0.894	0.3154
11	0.818	0.998	0.970	0.801	0.899	0.923	0.888	0.823	0.855	0.818	0.879	0.3324

ผลการศึกษาระดับ antibody titer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis จาก WSF ของไข่แดงในแต่ละสัปดาห์

Treatment 2 (ไข่จากแม่ไก่ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย inactivated whole cell antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis)

สัปดาห์ที่	ระดับ antibody titer ในไข่แอนติบอดีที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Optical density;OD)										ค่าเฉลี่ย	SE
	T2R1	T2R2	T2R3	T2R4	T2R5	T2R6	T2R7	T2R8	T2R9	T2R10		
0	0.024	0.023	0.020	0.025	0.024	0.020	0.022	0.016	0.019	0.018	0.021	0.055
1	0.038	0.035	0.034	0.034	0.033	0.025	0.021	0.025	0.022	0.023	0.029	0.080
2	0.033	0.036	0.030	0.033	0.032	0.024	0.023	0.024	0.024	0.030	0.029	0.069
3	0.050	0.040	0.035	0.036	0.036	0.021	0.022	0.039	0.020	0.019	0.032	0.103
4	0.039	0.038	0.083	0.067	0.070	0.069	0.058	0.062	0.048	0.052	0.059	0.120
5	0.030	0.024	0.023	0.024	0.021	0.022	0.025	0.019	0.021	0.024	0.023	0.055
6	0.057	0.040	0.042	0.051	0.043	0.033	0.024	0.023	0.028	0.026	0.037	0.108
7	0.027	0.021	0.025	0.028	0.027	0.025	0.023	0.020	0.022	0.025	0.024	0.052
8	0.119	0.078	0.070	0.080	0.056	0.068	0.072	0.066	0.054	0.068	0.073	0.134
9	0.064	0.037	0.038	0.063	0.055	0.132	0.106	0.159	0.101	0.095	0.085	0.201
10	0.112	0.062	0.071	0.103	0.088	0.145	0.114	0.155	0.111	0.126	0.109	0.172
11	0.060	0.073	0.058	0.071	0.063	0.131	0.106	0.124	0.102	0.112	0.090	0.167

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปริมาณ purified chicken IgG กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ total IgY

ความเข้มข้นของ purified chicken IgG (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง 405 nm
0.1250	0.5585
0.0625	0.3265
0.0313	0.1679
0.0156	0.0929
0.0078	0.0653

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของของปริมาณ purified chicken IgG กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ specific IgY

ความเข้มข้นของ purified chicken IgG (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง 405 nm
0.2500	0.0000
0.1250	0.5585
0.0625	0.3265
0.0313	0.1679
0.1560	0.0929
0.0078	0.0653
0.0039	0.0236
0.0020	0.0024

ผลการศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ specific extracted IgY ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enteica* serovar Enteritidis

specific IgY / hour	ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis				
	Control	Specific IgY 0.5 mg	Specific IgY 1.0 mg	Specific IgY 1.5 mg	Specific IgY 2.0 mg
0	6.267±0.091	6.190±0.100	6.159±0.179	6.420±0.263	6.310±0.273
3	9.033±0.131[a]	8.872±0.102[b]	8.190±0.100[c]	8.342±0.118[d]	7.972±0.221[e]
6	11.622±0.108[a]	11.339±0.159[b]	10.591±0.265[c]	10.235±0.103[d]	9.144±0.120[e]
9	12.117±0.065[a]	11.172±0.203[b]	10.273±0.364[c]	9.688±0.064[d]	8.479±0.060[e]
24	12.827±0.214[a]	11.841±0.118[b]	11.023±0.123[c]	10.825±0.090[b]	9.421±0.381[d]

[abcde] ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ WSF specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enteica* serovar Enteritidis

specific IgY / hour	ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis			
	Control	WSF non specific IgY powder	WSF specific IgY 1.0 mg	WSF specific IgY 2.0 mg
0	6.176±0.091	6.085±0.130	6.079±0.142	6.079±0.138
3	8.845±0.033[a]	8.748±0.065[a]	8.322±0.0279[b]	8.230±0.028[b]
6	10.806±0.033[b]	11.130±0.025[a]	11.255±0.020[a]	9.279±0.263[c]
9	12.176±0.081[a]	12.000±0.150[b]	10.017±0.026[c]	8.201±0.069[d]
24	13.592±0.084[a]	12.975±0.519[a]	11.170±0.034[b]	10.322±0.116[c]

[abcd] ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ Whole egg specific IgY powder ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. enteica* serovar Enteritidis

specific IgY / hour	ปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis			
	Control	WSF non specific IgY powder	Whole egg specific IgY 1.0 mg	Whole egg specific IgY 2.0 mg
0	6.176±0.027	6.114±0.114	6.146±0.185	6.204±0.139
3	8.230±0.234 [a]	8.245±0.039 [a]	8.203±0.250 [a]	8.279±0.127 [a]
6	11.806±0.038 [a]	11.820±0.027 [a]	11.614±0.081 [b]	9.352±0.080 [c]
9	12.949±0.160 [a]	12.616±0.065 [b]	11.041±0.092 [c]	8.593±0.176 [d]
24	13.592±0.044 [a]	13.362±0.437 [a]	11.633±0.186 [b]	10.260±0.138 [c]

[abcd] ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาปฏิกิริยาข้ามของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ specific extracted IgY ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E .coli*

specific IgY / hour	ปริมาณเชื้อ ***E coli***	
	Control	Specific extracted IgY+ *E. coli*
0	5.301±0.326	5.301±0.326
3	8.778±0.138	8.602±0.210
6	10.556±0.311	10.462±0.350
9	11.699±0.221	11.672±0.283
24	13.681±0.137	13.505±0.138

การศึกษาปฏิกิริยาข้ามของ specific IgY ที่อยู่ในรูปของ specific extracted IgY ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.

specific IgY / hour	ปริมาณเชื้อ ***Lactobacillus* sp.**	
	Control	Specific extracted IgY+ *Lactobacillus* sp.
0	7.839±0.082	7.672±0.153
3	8.322±0.273	8.519±0.497
6	10.301±0.336	10.462±0.314
9	11.301±0.351	11.477±0.141
24	13.944±0.116	13.903±0.075

ภาคผนวก ข

(แสดงวิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Brilliant Green Bile agar (BGA)

Brilliant Green Bile agar	20.7	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Fluid Thioglycollate Medium

Fluid Thioglycollate Medium	29.75	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Lactobacillus MRS agar (MRS agar)

Lactobacillus MRS broth	67.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Lactobacillus MRS broth (MRS broth)

Lactobacillus MRS broth	35.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Nutrient agar (NA)

Nutrient agar	28.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Nutrient broth (NB)

Nutrient broth	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Soyabean Casein Digest Medium (tryptone Soya agar)

Soyabean Casein Digest Medium	30.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Soyabean Casein Digest Medium (tryptone Soya Broth)

Soyabean Casein Digest Medium	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Violet Red Blie Glucose agar (VRBG agar)

Violet Red Blie Glucose agar	39.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน นำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สารละลายที่ใช้ในการแยก WSF ออกจากส่วนของไข่แดง

น้ำกลั่น pH 2

นำน้ำกลั่นปรับ pH ให้ได้ 2.0 ด้วย 1 M HCl จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไป Autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

น้ำกลั่น pH 4

นำน้ำกลั่นปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย 1 M HCl จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไป Autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารเคมีสำหรับ ELISA

Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

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

มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 0.1 M HCl ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไป Autoclave จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer: Coating buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
NaN_3	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย 1 N NaOH เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

PBS, pH 7.4	1,000

มิลลิลิตร

Tween 20	0.5

มิลลิลิตร

1% skim milk in coating buffer : Blocking solution

skim milk 1 กรัม
Coating buffer, pH 9.6 100
มิลลิลิตร

Citrate buffer

Citric acid 1.05 กรัม
น้ำกลั่น 100
มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ABTS solution

ABTS 15
มิลลิกรัม
Citrate buffer 10
มิลลิลิตร
6% H_2O_2 167
ไมโครลิตร เตรียมแล้วต้องใช้ทันที

Stop solution

SDS 1 กรัม
น้ำกลั่น 100
มิลลิลิตร

นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส จนกว่า SDS จะละลายจนหมด วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายที่ใช้ในการแยกชนิดของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

15% running gel

น้ำกลั่น 1.65
มิลลิลิตร
1.5 M Tris, pH 8.8 2.5
มิลลิลิตร
10% SDS 100
มิลลิลิตร
40% acrylamide 5
มิลลิลิตร

2% N'N – methylene-bis-acrylamide 2
มิลลิลิตร
10% ammomium persulfate 33
ไมโครลิตร
TEMED 5
ไมโครลิตร

4.8% stocking gel

น้ำกลั่น 3.72
มิลลิลิตร
2 M Tris, pH 6.8 312
ไมโครลิตร
10% SDS 50
ไมโครลิตร
40% acrylamide 600
ไมโครลิตร
2% N'N – methylene-bis-acrylamide 300
ไมโครลิตร
10% ammomium persulfate 16.5
ไมโครลิตร
TEMED 5
ไมโครลิตร

10% SDS

SDS 10 กรัม
น้ำกลั่น 100
มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8

Tris 18.15 กรัม
น้ำกลั่น 50
มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 M HCl เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2 M Tris-HCl buffer, pH 6.8

Tris	12.11	กรัม
น้ำกลั่น	20	

มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 M HCl เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

TEMED

ซื้อจากบริษัท Bio-Rad เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5X running buffer

Trizma base	15.15	กรัม
Glycine	72.05	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	

มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10% ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	

มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Sample buffer

2 M Tris-HCl buffer, pH 6.8	25

ไมโครลิตร

Glycerol	100

ไมโครลิตร

น้ำกลั่น	625

ไมโครลิตร

2X loading buffer

Sample buffer	375

ไมโครลิตร

10%SDS	300

ไมโครลิตร

β-mercaptoethanol 75

ไมโครลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Stocking 0.5% Coomassie brilliant blue R-250

Coomassie blue 0.5 กรัม

Absolute methanol 100

มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

Staining solution

Stocking 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 22.5

มิลลิลิตร

Absolute methanol 22.5

มิลลิลิตร

Glacial acetic acid 10

มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 45

มิลลิลิตร

Destaining solution

Absolute methanol 90

มิลลิลิตร

Glacial acetic acid 20

มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 90

มิลลิลิตร

โปรแกรมการฉีดวัคซีนไก่ไข่

อายุไก่	**วัคซีนที่ฉีด**
1 วัน	มาเร็กซ์
	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ
14 – 16 วัน	ไมโครพาสมา
17 – 18 วัน	กัมโบโร
3 สัปดาห์	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ
	ฝีดาษ
8 สัปดาห์	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ
10 สัปดาห์	กล่องเสียงอักเสบ
	หวัดหน้าบวม
15 สัปดาห์	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ
	ฝีดาษ
	หวัดหน้าบวม
18- 20 สัปดาห์	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ
ทุกๆ 6 – 8 สัปดาห์	นิวคาสเซิล + หลอดลมอักเสบ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจีราพร บัวชู เกิดเมื่อวันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี เริ่มการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนวัดชยาราม อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2546 จากนั้นศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2546 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2549