การเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่

นางสาววัลภา ลาภภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2549

Preparation of specific egg yolk antibodies against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

Wallapa Lappakdee

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

การเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รศ. ดร. พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
ประธานกรรมการ

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

.....
(รศ. ดร. ทัศนีย์ สุโกศล)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)

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

.....
(อ. ดร. วิทธวัช โมฬี)
กรรมการ

.....
(รศ. ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....
(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

วัลภา ลาภภักดี : การเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ (PREPARATION OF SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. น.สพ. ดร. บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์, 61 หน้า.

การศึกษาการเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแอนติเจน 2 ชนิด ซึ่งนำมาทำเป็นวัคซีน ได้แก่ whole cell และ outer membrane proteins (OMPs) ที่กระตุ้นการตอบสนองของภูมิต้านทานในซีรั่มและไข่แดง ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ไก่ไข่อายุ 34 สัปดาห์ ทำการฉีดวัคซีนในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 เก็บซีรั่มและไข่ทุกสัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 8 แล้วทำการแยกแอนติบอดีในไข่แดงด้วยวิธี water dilution method และวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีในซีรั่มและไข่แดงด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ผลการทดลองพบว่า ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วย whole cell ระดับภูมิต้านทานในซีรั่มเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 จากนั้นลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ส่วนการกระตุ้นด้วย OMPs ระดับภูมิต้านทานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ระดับภูมิต้านทานในไข่แดงค่อย ๆ สูงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและคงอยู่จนสิ้นสุดการทดลองทั้ง 2 แอนติเจน ในการเปรียบเทียบระดับภูมิต้านทานระหว่างซีรั่มและไข่แดง พบว่าระดับภูมิต้านทานในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงทุกสัปดาห์ ($P<0.01$) ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 4 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell แล้วให้ระดับภูมิต้านทานในไข่แดงสูงกว่าในซีรั่ม

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

WALLAPA LAPPAKDEE : PREPARATION OF SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS. : THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. BANCHORN LIKITDECHAROTE, Ph.D , 61 PP.

IMMUNOGLOBULIN Y/EGG YOLK ANTIBODY/*S. ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS/ CHICKEN SALMONELLOSIS

The preparation of specific egg yolk antibodies against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis has been studied. The objective of this study was to determine the immune responses in the serum and egg yolk against two antigens which were used as vaccines, whole cell and outer membrane proteins (OMPs), respectively. In this study, 34 week-old chickens were immunized on 0, 2nd and 4th weeks, then the serum and eggs were collected every week until the 8th week. The antibodies in the egg yolk were separated using water dilution method and the levels of antibodies against *S. enterica* serovar Enteritidis in the serum and egg yolk were analyzed using the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The results showed that the level of antibodies in the serum increased in the 1st and 2nd week, and decreased in the 3rd and 4th week when immunized with whole cell antigen. When immunized with OMPs antigen, the level of antibodies continuously increased throughout the experimental period. The level of antibodies in the egg yolk continuously increased and was maintained at a high level until the end of the experiment when immunized with both antigens. When compared with the levels of antibodies in the serum and egg yolks, it was found that the level of antibodies in the

serum was higher than that in the egg yolks for every week ($P<0.01$), except for the 4^{th} week when immunized with whole cell antigen, with the result that the level of antibodies in the egg yolk was higher than in the serum.

School of Animal Production Technology
Academic Year 2006

Student's Signature…….....
Advisor's Signature…….....
Co-advisor's Signature……..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ. น. สพ. ดร. บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในการให้คำปรึกษา แนวคิด คำแนะนำ ในการดำเนินงานวิจัย ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ แก้ปัญหาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ทั้งทางด้านวิชาการและงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ทัศนีย์ สุโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในการดำเนินงานวิจัย ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รศ. ดร. พงษ์ชาญ ณ ลำปาง อาจารย์ผู้ให้ความรู้และคำปรึกษาวิธีวางแผนการดำเนินงานวิจัย และขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอนถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งให้ทุนสนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัย อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1, 2 และ 3 รวมทั้งบุคคลากรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สัตว์ทดลอง อาหารสัตว์ เครื่องมืออุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่ช่วยสนับสนุนทางการเงินและเป็นเป็นกำลังใจตลอดมา

วัลภา ลาภภักดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญ.....จ

สารบัญภาพ.....ซ

สารบัญตาราง.....ฌ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....2

1.3 สมมติฐานงานวิจัย.....3

1.4 คำสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย.....3

1.5 ขอบเขตการวิจัย.....3

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ลักษณะของเชื้อ *Salmonella*.....4

2.2 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ.....5

2.2.1 ประเภทแอนติเจนของเซลล์แบคทีเรีย.....5

2.3 ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system).....7

2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune system) 8

2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Acquired immune system).....8

2.4 Passive immunity ในสัตว์ปีก.....10

2.5 ลักษณะของ IgY (Characteristics of IgY).....11

2.5.1 โครงสร้าง 11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.2 ความเสถียรของ IgY (Stability).....12
2.5.3 คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกัน.....12
2.6 การแยก IgY จากไข่แดง (Isolation of IgY from yolk).....12
2.7 การผลิต IgY (Production of IgY).....14
2.7.1 การเก็บแอนติบอดีไม่รุกรานสัตว์.....14
2.7.2 ปริมาณการผลิต.....14
2.8 บทบาทของ IgY ต่อการเป็น antimicrobial antibody.....15
2.9 การนำ egg yolk antibody มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค.....19
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....21
3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง.....21
3.2 การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.....21
3.2.1 การเพาะเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis.....21
3.2.2 การเตรียมแอนติเจน whole cell.....22
3.2.3 การเตรียมแอนติเจน outer membrane proteins.....23
3.2.4 การหาปริมาณโปรตีนแอนติเจน.....23
3.2.5 การเตรียมแอนติเจนเพื่อทำวัคซีน.....25
3.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford.....26
3.4 การเตรียมวัคซีนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่.....26
3.5 การเก็บตัวอย่างซีรั่มและไข่.....27
3.5.1 การเก็บซีรั่ม.....27
3.5.2 การเก็บไข่.....27
3.6 การแยก water solution fraction จากไข่แดง.....27
3.7 การวิเคราะห์แอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วยวิธี ELISA.....28
3.7.1 เตรียมแอนติเจน.....28
3.7.2 วิธีการ Indirect ELISA.....30
3.7.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugated antibody.....31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.4 การทดสอบภูมิต้านทานในซีรั่มและใน WSF ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis....32
3.7.4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ในซีรั่ม....32
3.7.4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ใน WSF....33
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล....34
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปราย....35
4.1 ระดับแอนติบอดีในซีรั่ม....35
4.2 ระดับแอนติบอดีใน WSF....37
4.3 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างซีรั่มและ WSF จากไข่แดง....39
5 สรุปและข้อเสนอแนะ....46
6 เอกสารอ้างอิง....48
ภาคผนวก....57
ประวัติผู้เขียน....61

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp. 4
2.2 โครงสร้างของ IgG และ IgY.....11
3.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ใน PBS pH 7.4 ที่ 590 นาโนเมตร
ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica*
serovar Enteritidis โดยวิธีการของ Bradford 24
3.2 กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ใน PBS pH 7.4 ที่ 590 นาโนเมตร
ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน sonicated *S. enterica* serovar Enteritidis
โดยวิธีการของ Bradford.....30
3.3 กราฟการหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control
ในซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี serial dilution.....33
3.4 กราฟการหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control
ใน WSF เพื่อใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี serial dilution 34
4.1 กราฟแสดงระดับแอนติบอดี $\pm$ standard error ในซีรั่มต่อ
whole cell (T1) และ OMPs (T2) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis
เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 37
4.2 กราฟแสดงระดับแอนติบอดี $\pm$ standard error ใน WSF ต่อ
whole cell (T1) และ OMPs (T2) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis
เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4.....39
4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี $\pm$ standard error
ในซีรั่มและWSF ต่อ whole cell ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis
โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 40
4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี $\pm$ standard error
ในซีรั่มและWSF ต่อ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis
โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4.....41

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ความเข้มข้นของ immunoglobulin ในสัตว์ปีก.....11
2.2 ส่วนประกอบของไข่แดง.....13
2.3 การเปรียบเทียบวิธีการแยก IgY ต่อประสิทธิภาพของ IgY
ทางด้านปริมาณและความบริสุทธิ์.....14
2.4 การเปรียบเทียบปริมาณแอนติบอดีของกระต่ายและไก่.....15
2.5 การนำ egg yolk antibody มาใช้ประโยชน์ในคนและสัตว์.....20
3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA)
กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน
whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis 24
3.2 ค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนของ whole cell
และ OMPs ของ *S. enterica* serovar Enteritidis.....25
3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA)
กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ใช้ในศึกษาปริมาณโปรตีนของ
sonicated *S. enterica* serovar Enteritidis เพื่อใช้เป็นแอนติเจน
ในการทดสอบ ELISA.....29
4.1 ค่า optical density (OD) ของซีรั่มไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell
ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนให้วัคซีน.....36
4.2 ค่า optical density (OD) ของซีรั่มไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OMPs
ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนให้วัคซีน.....36
4.3 ค่า optical density (OD) ของ WSF ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell
ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับ WSF ก่อนให้วัคซีน.....38
4.4 ค่า optical density (OD) ของ WSF ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OMPs
ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับ WSF ก่อนให้วัคซีน.....38

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากนโยบายของประเทศที่มุ่งให้ประเทศไทยเป็นครัวโลกนั้น จำเป็นจะต้องผลิตอาหารตั้งแต่ฟาร์มถึงโต๊ะอาหาร (From Farm To Table) ทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีการขยายตัวและทวีความสำคัญขึ้นเป็นระยะ อีกทั้งผู้บริโภคจะคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัยของอาหาร (food safety) เพิ่มมากขึ้น สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ การควบคุมและป้องกันโรคมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร เป็นแหล่งสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในคน โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งฟาร์มส่วนใหญ่มีการควบคุมดูแลในเรื่องของสุขศาสตร์โรงเรือน สภาพแวดล้อม การจัดการและการเฝ้าระวังฝูง รวมทั้งการให้วัคซีน สารเคมีและยาปฏิชีวนะ แต่ในการใช้สารเคมีและยา มักจะเกิดปัญหาในเรื่องการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียและการตกค้างที่อาจส่งผลกระทบเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค จึงมีความพยายามที่จะหาสารทดแทนยาปฏิชีวนะ เช่น prebiotic จำพวก oligosaccharide, probiotic หรือสมุนไพร เช่น กระเทียม ฟ้าทะลายโจร เปลือกทับทิม เป็นต้น

ประเทศไทยมีอุตสาหกรรมการผลิตไก่และแปรรูปไก่เนื้อ เพื่อการบริโภคภายในประเทศรวมทั้งการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศจำนวนมาก ซึ่งผลิตภัณฑ์จากไก่ ได้แก่ เนื้อไก่และไข่ไก่ จัดว่าเป็นแหล่งกักเก็บที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrhea) และภาวะอาหารเป็นพิษ (foodborne) (Bangtrakulnonth et al., 2004) โดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization (WHO)) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Salmonella* ในคนและในแหล่งอื่น ๆ ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993-2002 พบเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis มากที่สุดโดยพบในไก่สูงที่สุดคิดเป็น 19% ในการเก็บข้อมูลจากการแยกเชื้อจากสัตว์ที่เป็นแหล่งเก็บกักโรค (Bangtrakulnonth et al., 2004)

ดังนั้นแนวทางที่น่าสนใจในการป้องกันโรค ซึ่งมีแนวโน้มจะพัฒนาขึ้นทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ คือการใช้ passive immunization จากแอนติบอดีในไข่แดงของไก่ (egg yolk antibody (EYA)) หรือ immunoglobulin Y (IgY) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกับ IgG จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Leslie and Clem, 1969) EYA ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ในการชันสูตรโรคด้วยวิธีการต่าง ๆ (Gross and Speck, 1996) รวมทั้งในด้านการ-

ป้องกันโรคทั้งในคนและสัตว์ (Schade and Hlinak, 1996) โดยจัดเป็นสารชีวภาพที่ไม่มีผลกระทบในด้านการตกค้างหรือเป็นพิษต่อผู้บริโภคหรือสัตว์ที่ได้รับ นอกจากนี้ EYA สามารถผลิตได้ปริมาณมาก ไม่รุกรานสัตว์และไม่ทำให้สัตว์ทรมานจากความเครียด (Tini et al., 2002) วิธีการทำให้บริสุทธิ์ไม่ยุ่งยาก (Akita and Nakai, 1992) และราคาต้นทุนต่ำ ในปัจจุบันมีงานทดลองมากมายที่เกี่ยวข้องกับการนำแอนติบอดีในไข่แดงมาใช้ในการป้องกันโรค ซึ่งมีรายงานการใช้แอนติบอดีในไข่แดงในการป้องกันโรคท้องเสียในลูกสุกรจากเชื้อ *Escherichia coli (E.coli)* และการป้องกันจากโรค Salmonellosis ในคน ลูกโคและในไก่ไข่ (Yokoyama et al., 1992; Yokoyama et al., 1998a,b; Marquardt et al., 1999; Jin et al., 1998; Imberechts et al., 1997; Owusu-Asiedu et al.,2003 a,b; Kassaify and Mine, 2004) และป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหารจากเชื้อแบคทีเรียในคน (Hatta et al.,1997) และมีการประยุกต์ใช้เป็น anti-venum ต่อต้านพิษงู (Maya et al.,2002) แต่ทั้งนี้ในประเทศไทยการทดลองในด้านนี้ยังไม่กว้างขวางทั้งทางด้านงานวิจัยและการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

เชื้อ *Salmonella* มีส่วนประกอบผิวเซลล์ที่หลากหลายซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงในการเกิดโรค การใช้แอนติเจนในการสร้างภูมิคุ้มกันในไก่จะต้องพิจารณาการเป็น immunogen จากส่วนต่าง ๆ ของแบคทีเรียซึ่ง Yokoyama et al. (1998a) ได้รายงานการใช้องค์ประกอบต่าง ๆ ของ *S. enterica* serovar Enteritidis กระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ พบว่าหนูในกลุ่มที่กิน EYA ที่จำเพาะต่อ outer membrane proteins (OMPs) มีอัตราการรอดตายมากที่สุด ดังนั้น OMPs ของเชื้อ *Salmonella* จึงมีศักยภาพในการสร้างภูมิต้านทานในไข่แดงมาก ขณะที่การใช้ whole cell มีวิธีการเตรียมที่ง่ายและเป็นที่นิยมในการใช้เป็นแอนติเจน ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมแอนติบอดีในไข่แดงที่จำเพาะต่อแอนติเจน 2 ชนิดคือ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อระดับภูมิต้านทานในไก่และเปรียบเทียบระดับภูมิต้านทานในซีรั่มและในไข่แดงของไก่ และศึกษาการเตรียมสารภูมิต้านทานเชื้อ *Salmonella* ในไข่ไก่ที่ เหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในซีรั่มจากไก่ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิด ได้แก่ whole cell และ outer membrane proteins (OMPs)
2. เพื่อศึกษาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงจากไก่ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิด

3. เพื่อทราบวิธีการเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ที่เหมาะสม

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในซีรั่มไก่ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิดจะแตกต่างกัน

2. ระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิดจะแตกต่างกัน

3. วิธีการเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่ไก่ที่เหมาะสมเป็นวิธีการที่สะดวกและทำให้เกิดการสร้างภูมิต้านทานที่เพียงพอต่อการป้องกันเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

1.4 คำสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย

immunoglobulin Y, egg yolk antibody, *S. enterica* serovar Enteritidis, chicken salmonellosis

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาผลจากการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในไก่ไข่อายุ 34 สัปดาห์ ด้วย whole cell และ outer membrane proteins (OMPs) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยศึกษาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานในซีรั่มของไก่และในไข่แดงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และศึกษาวิธีการเตรียมสารภูมิต้านทานในไข่แดงที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการลดปริมาณเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในซีรั่มไก่และไข่แดงที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิดได้แก่ whole cell และ outer membrane proteins (OMPs)

2. ทราบชนิดและวิธีการเตรียมแอนติเจนที่เหมาะสม ในการใช้กระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

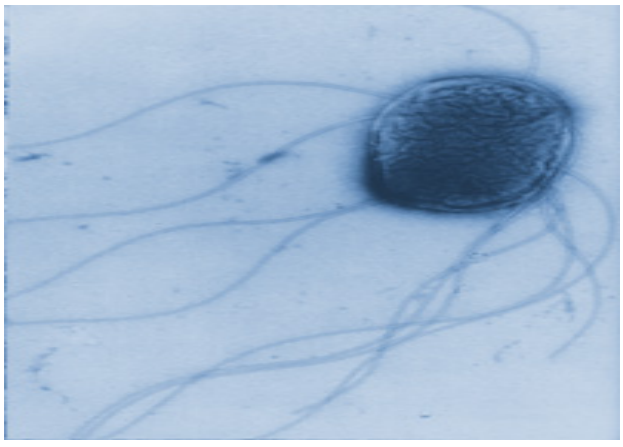
3. สามารถผลิตสารภูมิต้านทานในไข่แดงที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพื่อนำไปใช้ต่อต้านเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Salmonella* spp.

2.1 ลักษณะของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดกว้าง 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) ยกเว้น *S. enterica* serovar Pullorum, *S. enterica* serovar Gallinarum และบางสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ยกเว้น *S. enterica* serovar Paratyphi A, *S. enterica* serovar Choleraesuis) สร้างกรดและก๊าซจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เจริญได้คือ 37-42 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีแม้ในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไว้เท่านั้นและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อไม่ทนความร้อน พบว่าถูกทำลายได้ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที (Bangtrakulnonth et al, 2004)



รูปที่ 2.1 รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp.
(ที่มา: www.heise.de/tp/deutsch/inhalt/co/9698/1.html.)

2.2 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ

การจำแนกเชื้อ *Salmonella* เป็นซีโรไทป์ต่าง ๆ นั้นอาศัยคุณสมบัติของแอนติเจนทั้ง O และ H แอนติเจน ซึ่งแอนติเจน O จะคล้ายกับลักษณะของสมาชิกอื่นในตระกูล Entero-bacteriaceae แต่แอนติเจน H จะแตกต่างออกไป เพราะมี 2 phase คือ phase 1 และ phase 2

- แอนติเจน O เป็นสาร lipopolysaccharides (LPS) อยู่ที่ผิวแบคทีเรีย ประกอบด้วยส่วนที่ แตกต่างกัน 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นหน่วยซ้ำ ๆ กันของ oligosaccharide ทำหน้าที่เป็นแอนติเจน O ส่วนนี้จะไปจับกับส่วนที่ 2 ที่ประกอบไปด้วยแกนพอลิแซคคาไรด์ (core polysaccharide) แล้วจึงไปจับกับส่วนที่ 3 คือ lipid A ซึ่งเป็นส่วนที่แสดงความเป็นพิษ (toxicity) สาร lipopolysaccharides ทำหน้าที่เป็น endotoxin O antigen สามารถทนความร้อนได้

- แอนติเจน H เป็นแอนติเจนของแฟลกเจลลาโปรตีน ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ไม่ทนความร้อน มี 2 phase คือ phase 1 แอนติเจนเป็น specific phase เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ ส่วน phase 2 แอนติเจนเป็น non-specific phase จากการอาศัยคุณสมบัติของแอนติเจน H ทำให้สามารถแบ่ง *Salmonella* ออกเป็นซีโรไทป์ต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังมีแอนติเจน Vi ซึ่งแสดงความรุนแรง (virulence) ของเชื้อ แอนติเจน Vi เป็นส่วนของแคปซูล ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน พบใน *S. enterica* serovar Typhimurium และซีโรไทป์อื่น ๆ เล็กน้อย (C.Wray and A.Wray, 2000)

2.2.1 ประเภทของแอนติเจนของเซลล์แบคทีเรีย

Outer membrane proteins

Outer membrane proteins (OMPs) เป็น lipid bilayer ซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ของ peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนของ inner layer มีลักษณะเหมือนกับ cytoplasmic membrane ขณะที่ outer layer มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (Hancock, 1994) ความแตกต่างหลักคือ องค์ประกอบโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์โดย outer membrane จะประกอบด้วยโปรตีนหลักจำนวนหนึ่ง (3-8 high copy number) และมี minor protein จำนวนมาก ความแตกต่างของโปรตีนนี้ทำให้ OMPs มีหน้าที่ต่าง ๆ กัน โดยโปรตีนส่วนที่ติดกับ outer membrane ภายใน peptidoglycan คือ lipoprotein และ OmpA จะจับกันด้วยพันธะ covalent และส่วนอื่น ๆ ที่เป็น porin ซึ่งเป็นตัวคัดเลือกยอมให้สารละลายผ่านเข้าออกเซลล์ ได้แก่ OmpF, OmpC, LamB, PhoE และอื่น ๆ ซึ่ง outer membrane กลุ่มนี้ คือ lipoprotein และ porin มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน แต่ยากต่อการจับกับแอนติบอดี และไม่เหนี่ยวนำการป้องกันโรคของแอนติบอดี มีการนำ LamB มาศึกษาทดแทน epitope ของ viral protein ซึ่งแอนติเจนนี้อาจใช้

เป็น epitope carrier และโปรตีนผสม (hybrid) สามารถใช้เป็นวัคซีนที่ไม่เป็นพิษและไม่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของพิษ (Moat et al., 2002)

Lipopolysaccharide (LPS)

LPS เป็นองค์ประกอบของ outer surface ของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งติดกับ outer membrane เป็นสายยาวอยู่ในรูป S (Smooth) strain และส่วนที่ไม่แสดงออกในรูป R (Rough) strain LPS ยังถูกเรียกว่า somatic หรือ O antigen หรือ endotoxin เพราะมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อโฮสต์ เมื่อแบคทีเรียแพร่เข้าไปในโฮสต์อาจทำให้ตายได้ ลักษณะทางเคมีและการทำงานของ LPS เกิดจากองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ lipid A ประกอบด้วย glucosamines เชื่อมต่อกับ fatty acid แทรกอยู่ภายใน outer membrane ซึ่ง lipid A เป็นส่วนที่ทำให้ LPS มีคุณสมบัติเป็นพิษ (endotoxic shock) ส่วนที่ 2 คือโมเลกุลน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์แสดงความเป็นแอนติเจนและสร้างพันธะ covalent กับ rough core ประกอบด้วย pentose, hexose และ heptose มีจำนวนที่แปรปรวนต่าง ๆ กัน พบใน S (smooth) และ Ra (rough a) strain แต่ถูกตัดใน R mutant ส่วนที่ 3 จะแสดงใน S strain เท่านั้นซึ่งสร้างจาก tri- และ pentasaccharide lateral chain สร้างพันธะ covalent กับส่วนแกน (core)

LPS มีบทบาทในการยับยั้งการ phagocytosis ในบางกรณี LPS ทำงานร่วมกับ capsule component เหมือนใน *Actinobacillus pleuropneumoniae* และการทำงานอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น endotoxin shock การสร้าง LPS หรือองค์ประกอบหนึ่งจะอนุรักษ์ส่วนที่มีบทบาทในการก่อโรคไว้จำนวนมาก ทั้งในส่วนของ rough core (R antigen) และ O antigen ของ LPS เป็น T-cell independent เป็นแอนติเจนที่มีความสามารถมากและเป็น immunogen ที่มีบทบาทต่อการทำงานของ B lymphocyte โดยเฉพาะในการผลิต IgM นอกจากนี้ O antigen เป็นส่วนหลักในเกิดความผันแปรมากที่สุดทั้งความผันแปรของ phenotype และ genotype ในส่วนของ oligosaccharide (ในธรรมชาติส่วนใหญ่ปลายสายเป็นคาร์โบไฮเดรต) ซึ่งการรวมกันของน้ำตาลที่หลากหลายเป็นพื้นฐานของ serogroups ในการใช้จำแนกกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica, Pasteurella multocida*, *P. haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* และอื่น ๆ) ความผันแปรของแอนติเจนยังเกิดจากความแปรปรวนของ การสับเปลี่ยนที่ในส่วน rough core และมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียหนึ่งตัวผลิต LPS ได้มากกว่า 1 โมเลกุล (Moat et al., 2002)

Flagella

Flagella สังเคราะห์จากส่วนของแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ซึ่งเป็น H antigen โพลิเมอร์ของโปรตีนที่จำเพาะนี้เรียกว่า flagellin ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีความเป็น immunogen สูง แต่การ

เหนี่ยวนำแอนติบอดีไม่สามารถป้องกันหรือต่อต้านโรคได้ และแอนติเจน H มีระดับความแปรปรวนสูง

Pili หรือ fimbriae โดย fimbriae จำนวนมากเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของพิษของแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจง ซึ่ง fimbriae โดยทั่วไปเป็นแอนติเจนที่มีความเป็น immunogen ที่แข็งแรงและสามารถเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรค (protective immunity) ได้ นอกจากนี้ pili บางชนิดเป็นอวัยวะที่ใช้เคลื่อนที่อีกด้วย (Moat et al., 2002)

2.3 ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system)

ระบบภูมิคุ้มกัน (immunity) ในสัตว์ปีกเกิดจากเซลล์น้ำเหลือง (lymphocytes) โดยการสร้างเซลล์น้ำเหลืองในสัตว์ปีกนั้น แบ่งออกเป็นสองระบบคือ

1. ระบบต่อมน้ำเหลืองปฐมภูมิ (primary lymphoid system) ประกอบด้วยต่อมเบอร์ซา (bursa of fabricious) เป็นอวัยวะที่มีตำแหน่งเกาะติดบนผนังด้านนอกของทวารรวม และต่อมไธมัส (thymus glands) มีหลายต่อมเรียงรายอยู่บริเวณใต้ผิวหนังบริเวณคอ

2. ระบบต่อมน้ำเหลืองทุติยภูมิ (secoundary lymphoid system) ประกอบด้วย ตับ ม้าม ต่อมฮาร์เดอเรียน (Harderian's glands) ที่บริเวณตาของสัตว์ปีก ต่อมทอลซิลบริเวณไส้ตัน (cecal tonsils) และต่อมน้ำเหลือง (Peyer's patches) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในผนังลำไส้ (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2536)

สัตว์ทุกประเภทมีระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อช่วยในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมประเภทต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยทั่วไประบบภูมิคุ้มกันสัตว์ปีกจะไม่แตกต่างจากระบบภูมิคุ้มกันที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ 1) innate immune system หรือ non-specific immune system เป็นด่านแรกที่จะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ตัวอย่างระบบนี้จะรวมทั้ง genetic resistance, body temperature, body's physical barrier (ป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค เช่น ผิวหนัง mucous membrane ซึ่งอยู่ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และ respiratory cilia) complement system (โปรตีนหรือเอนไซม์ที่ไหลเวียนอยู่ในเลือด เพื่อกำจัดเชื้อโรค) นอกจากนี้ยังรวมถึงเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการเก็บกินเซลล์แปลกปลอม เช่น virus, fungi และเซลล์ที่ตายแล้วที่เรียกว่า macrophage การรักษาสภาวะสมดุลระหว่างแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจัดเป็น innate immune system เช่นเดียวกัน และ 2) acquired immune system หรือ specific immune system จะมีการตอบสนองที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบ acquired immune system (Butcher and Miles, 2003)

2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune system)

ผิวหนังและเยื่อเมือก (mucus membrane) จะทำหน้าที่ในการป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ต่าง ๆ (microorganism) นอกจากนี้ยังมี cilia, mucus และการตอบสนองโดยการไอเพื่อเป็นการขับไล่สิ่งแปลกปลอมออกจากระบบหายใจ ในส่วนระบบทางเดินอาหารมี pH ที่ต่ำในกระเพาะอาหารและมีแบคทีเรียที่เป็น normal flora ในลำไส้ ซึ่งมีความสำคัญมาก โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะทำหน้าที่ในการผลิตสารอาหารบางประเภทที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย และช่วยยับยั้งการบุกรุกของแบคทีเรียพวกที่เป็นพาหะก่อโรค (pathogenic microorganisms)

ในไก่มีส่วนประกอบที่สำคัญของ innate immune system คือระบบ monocytes-macrophages โดยจะจัดการทันทีกับจุลินทรีย์ที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นจึงสามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพวก pathogen (Qureshi et al., 2000) โดย macrophage ทำหน้าที่เป็น microbicidal, phagocytic และ tumoricidal และยังมีบทบาทในการควบคุมเซลล์ cytokines และ metabolites อื่น ๆ โดย monocyte เป็น phagocytic cell หลักในเซลล์เม็ดเลือดขาวของไก่ ในขณะที่ tissue macrophage จะพบได้เกือบทุกอวัยวะของร่างกาย การทำงานของ phagocytic macrophage จะเกิดครั้งแรกภายใน 2 สัปดาห์ของการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอของไก่ (Jeurissen and Janse, 1989 อ้างโดย Carlender, 2002) กลไกของภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะจะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายแต่ไม่สามารถตอบสนองได้เพิ่มมากขึ้นในการตอบสนองซ้ำต่อสิ่งแปลกปลอมตัวเดิมที่เข้ามา

2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Acquired immune system)

Acquired immune system ขึ้นอยู่กับการจดจำสารแปลกปลอมได้ โดยจะตอบสนองและจดจำข้อมูลของสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น เพื่อที่จะตอบสนองซ้ำต่อสิ่งแปลกปลอมตัวเดิมที่เข้าสู่ร่างกายอีก ระบบการทำงานของ acquired immune system จะทำงานร่วมกันระหว่าง 2 กลไก คือ humoral immune system และ cellular immune system

ภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (Humoral immunity)

การตอบสนองของระบบนี้เกิดขึ้นได้โดยการที่แอนติเจนจะไปกระตุ้น B-lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น ๆ ทำให้ B-lymphocyte เพิ่มมากขึ้นและเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell ที่สร้างแอนติบอดีออกมา B-lymphocyte จะมีลักษณะเฉพาะที่ปรากฏอยู่บนผิวของ immunoglobulin ซึ่งจะมีความจำเพาะกับ epitope บนแอนติเจนและ T-lymphocyte ซึ่งสามารถจดจำแอนติเจนเดิมที่เข้ามาได้ (Butcher and Miles, 2003)

ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (Cellular immunity)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์นั้น เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่าง T-cell receptor และแอนติเจน โดยจะมีการปล่อย lymphokine ซึ่งจะกระตุ้นให้ macrophage มายังบริเวณนั้นโดยมีคุณสมบัติในการจับกินเซลล์ที่แปลกปลอมหรือแอนติเจน โดย MHC class I cell จะนำไปสู่การย่อยสลายเซลล์ที่แปลกปลอม

Humoral Immunity ต่อ *Salmonella* ในซีรั่ม

สัตว์เมื่อติดเชื้อ *Salmonella* จะมีการตอบสนองของ humoral immunity อย่างรวดเร็ว ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่ ปริมาณของเชื้อ วิธีทางที่ได้รับเชื้อและอายุของสัตว์มีการรายงานว่าสัตว์ที่อายุน้อยจะมีการตอบสนองเมื่อติดเชื้อน้อยกว่าสัตว์อายุมาก

ในสัตว์ปีกมีการตอบสนองหลังติดเชื้อ 1 สัปดาห์ สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรั่มและคงสร้างภูมิคุ้มกันนานถึง 10 สัปดาห์ หรือมากกว่านั้น โดยปรากฏ immunoglobulin M (IgM) ต่อต้าน *Salmonella* เป็นอันดับแรก ตามด้วย IgG และ IgA จากนั้น IgM และ IgA ค่อย ๆ ลดลง ขณะที่ IgG ยังคงระดับภูมิต้านทานอยู่ช่วงระยะหนึ่ง ผลของการกระตุ้นซ้ำจะมีการตอบสนองของแอนติบอดีเพิ่มขึ้นและ immunoglobulin ในซีรั่มสามารถผ่านไปยังไข่แดงได้โดยตรงซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคในไข่ได้และป้องกันการติดเชื้อในลูกไก่ที่เพิ่งฟัก

การแพร่เชื้อของ *Salmonella* ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความสามารถในการจำได้ของโฮสต์ต่อสิ่งแปลกปลอมจากการติดเชื้อหรือได้รับโดยการให้วัคซีน ความเข้มข้นของการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก (immuno-dominant) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อความล่าช้าในการตอบสนองภูมิคุ้มกันครั้งแรก เช่น ในซีรั่มของไก่ที่ได้รับเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis มีไตเตอร์ของ anti-flagella สูงมากที่สุดในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ ขณะที่ไตเตอร์ต่อ lipopolysaccharide (LPS) และ flagella เกิดขึ้นน้อยในลูกไก่แต่มีมากในแม่ไก่ แต่ในการตอบสนองต่อ fimbrial แอนติเจน SEF 14 ในลูกไก่มีความรุนแรงแต่ไม่รุนแรงในไก่ที่โตเต็มที่ และมีการค้นพบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีต่อต้าน outer membrane proteins (OMPs) และองค์ประกอบของผนังเซลล์มีความรุนแรง (Hassan et al., 1991 อ้างโดย C. Way and A. Way, 2002)

การตอบสนองของภูมิต้านทานต่อ OMPs หลังจากการให้วัคซีนมีผลต่อการป้องกันการแพร่เชื้อ *Salmonella* (Cherles et al., 1994) และภูมิต้านทานต่อ whole cell ของแบคทีเรียมีผลต่อการยับยั้งการ shedding ของเชื้อในลำไส้เล็ก (Barbour et al., 1993; Gast et al., 1993 อ้างโดย C. Way and A. Way, 2002)

2.4 Passive immunity ในสัตว์ปีก

สัตว์ปีก เช่น ไก่ ไก่งวง และเป็ดสร้างแอนติบอดีในเลือดและในไข่เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรคต่างๆ immunoglobulin (Ig) ในเลือดของสัตว์จะถูกถ่ายทอดไปยังไข่แดง ซึ่งเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ลูกสัตว์ปีกที่ยังไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้เมื่อแรกเกิด ในไข่ขาวมี IgA และ IgM ที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.7 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่ในไข่แดงมี IgY ที่ความเข้มข้นสูงกว่า คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Rose et al., 1974 อ้างโดย Sim, 2000) สอดคล้องกับการรายงานของ Schade et al. (2001) ดังตารางที่ 2.1 แอนติบอดีในไข่แดงถูกเรียกว่า IgY (Leslie and Clem, 1969) เนื่องจากมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันแตกต่างจาก IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ IgY มีขนาดใหญ่กว่า มีความเป็นกรดเล็กน้อย มวลโมเลกุลมีความยืดหยุ่นต่ำกว่า IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ IgY ไม่เกาะติดกับ complement ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไม่จับกับโปรตีน A, G และ F_c receptor ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกด้วย (Larsson et al., 1993; Tini et al., 2002)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแอนติบอดีจากแม่จะเคลื่อนย้ายไปยังลูกโดยผ่านทางรก และทางการหลั่งน้ำนม ขณะที่ในสัตว์ปีกจะปรากฏในไข่เพื่อปกป้องลูกไก่ที่เพิ่งฟัก แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงโดยเฉพาะ IgG จะถ่ายทอดจากซีรั่มไปยังไข่แดงและเข้าสู่การไหลเวียนเลือดของลูกไก่ผ่าน endoderm ของ yolk sac แอนติบอดีจะสะสมอยู่ใน egg follicle ที่เจริญเต็มที่ (Patterson et al., 1962 อ้างโดย Sim et al., 2000) และถูกรวมกับไข่ขาวในขณะที่มีการหลั่งของ albumin ใน oviduct เมื่อเปรียบเทียบกับ plasma protein อื่น ๆ IgG ถูกเลือกให้หลั่งใน egg follicle และการหลั่งของ IgG จากระบบไหลเวียนเลือดของแม่ไก่ไปยัง ovarian follicle เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นกลไกที่เฉพาะเจาะจงในการพัฒนาการเคลื่อนย้ายแอนติบอดีไปที่ ovarian follicle นี้ คือ receptor dependent และ ovarian IgG ทั้งหมดที่อยู่ในเลือดของแม่ไก่ (Locken and Roth, 1983 อ้างโดย Sim et al., 2000) ส่วน IgM และ IgA ปรากฏในช่วงการหลั่งของ 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 ซึ่งก็คือกลไกในการปกป้องลูกที่เพิ่งฟักจากแม่ไก่ที่สร้างขึ้นเพื่อป้องกันลูกไก่จากโรคต่าง ๆ

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ immunoglobulin ในสัตว์ปีก (Schade et al., 2001)

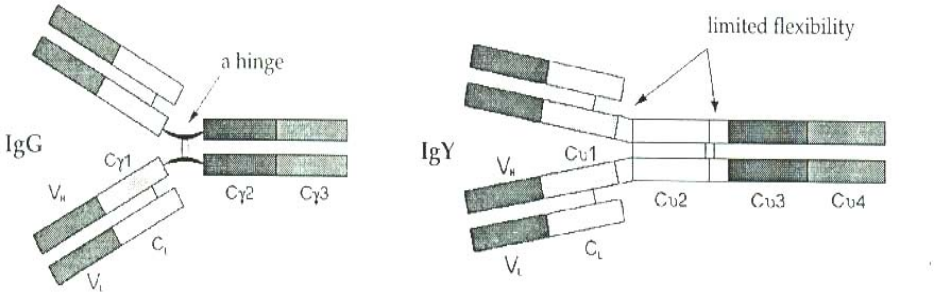
	IgY (IgG) mg/ml	IgM mg/ml	IgA mg/ml
Serum	~ 6	~ 1.3	~ 0.6
Yolk	~ 25	~ 0.02	~ 0.03
Clear part of egg	~ 0.03	~ 0.15	~ 0.15

2.5 ลักษณะของ IgY (Characteristics of IgY)

2.5.1 โครงสร้าง

ในปี ค.ศ. 1969 Lislie and Clem ได้แสดงข้อมูลความแตกต่างของโครงสร้างของ immunoglobulin G (IgG) ระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก และเรียก IgG ในซีรั่มของสัตว์ปีกซึ่งมีการสะสมใน egg yolk ว่า immunoglobulin Y (IgY) ในกลุ่มของสัตว์ปีก ไก่ได้รับความสนใจและศึกษาในการใช้เป็นแหล่งแอนติบอดีอย่างมาก

โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของ IgY เหมือนกับ IgG คือมี 2 heavy (Hν) chain และในแต่ละ chain มีมวลโมเลกุล 67-70 kDa และมี 2 light (L) chain ซึ่งในแต่ละ chain มีมวลโมเลกุล 25 kDa (รูปที่ 2.2) ความแตกต่างของโครงสร้างหลัก ๆ คือ จำนวนของ constant region (C) ใน H chain:IgG มี C จำนวน 3 region ($C_\gamma1$-$C_\gamma3$) ขณะที่ IgY มี C จำนวน 4 region ($C_\upsilon1$-$C_\upsilon4$) ในการรวมกันของ 1 C region กับ 2 สายของคาร์โบไฮเดรทซึ่งมีผลต่อมวลโมเลกุลของ IgY มากกว่า IgG คือ 180 และ 150 kDa ตามลำดับ IgY มีความยืดหยุ่นน้อยกว่า IgG เพราะไม่มีส่วนของ hinge ระหว่าง $C_\gamma1$ และ $C_\gamma2$ ซึ่งไม่เหมือนกับรูปร่างของ IgG ใน IgY มี region เล็กน้อย (ใกล้ ๆ กับบริเวณของ $C_\upsilon1$- $C_\upsilon2$ และ $C_\upsilon2$- $C_\upsilon3$) ซึ่งมี proline และ glycine เป็นส่วนที่จำกัดความยืดหยุ่น (Narat, 2003)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ IgG และ IgY (Schade et al., 2001)

2.5.2 ความเสถียรของ IgY (Stability)

ความทนทานต่อ enzyme, pH และอุณหภูมิ

IgY จะยังคงเสถียรที่ pH 4-9 และอุณหภูมิที่มากกว่า 65°C ในสภาวะที่เป็นของเหลว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ IgG จะมีความเสถียรที่ pH 3-10 และที่อุณหภูมิสูงกว่า 70°C อย่างไรก็ตาม ความทนทานของ IgY ต่อช่วง pH ที่ต่ำจะเพิ่มขึ้นถ้าอยู่ในสภาวะเป็นเกลือสูง หรือ stability reagent เช่น sorbitol (Shin et al., 2002) และ Zhang et al.(2003) ได้รายงานการทำงานของ IgY ที่ specific ต่อ *E.coli* จะเสถียรเมื่อ incubate ด้วย trypsin หรือ chymotrypsin แต่ไวต่อเอ็นไซม์ pepsin ซึ่งมีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ dose ด้วย แต่ผลของ specific IgY ในการควบคุมโรคท้องเสียในลูกวัวแรกเกิดได้พิสูจน์ว่าสามารถป้องกันโรคได้ (Yokoyama et al., 1998b)

2.5.3 คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกัน

IgY ไม่จับกับโปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเนื่องจาก IgY มีความแตกต่างจาก IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทางด้านโครงสร้างและคุณสมบัติทางด้าน immunology คือ IgY มีขนาดใหญ่ ทนต่อความเป็นกรดได้น้อยและมีน้ำหนักมวลโมเลกุลมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่ IgY ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ mammalian complement รวมทั้งไม่จับกับ protein A, G และ Fc receptor ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Larsson et al., 1993; Tini et al., 2002.,Carlender et al., 2002) จึงทำให้การชันสูตรโรคมีความแม่นยำมากขึ้น

2.6 การแยก IgY จากไข่แดง (Isolation of IgY from yolk)

Immunoglobulin Y ในไข่แดงเป็นองค์ประกอบหลักของ γ-livetin มีมวลโมเลกุลใหญ่กว่า α,β-livitin ในไข่แดง ดังนั้นการแยก IgY จึงเกี่ยวกับการแยกโปรตีนต่าง ๆ ออกจากส่วน water soluble fraction (WSF) ของไข่แดง

ไข่แดงมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.2 สามารถแยกได้โดยการปั่นเหวี่ยงแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ‘granules’ และส่วนน้ำใส ‘plasma’ ซึ่งส่วนของ granules ประกอบด้วย α-lipovitellin และ β- lipovitellin อยู่ 70% , phosvitin 16% และ low-density lipoprotein (LDL) 12% และส่วนของ plasma มีประมาณ 78% ของไข่แดงทั้งหมดประกอบด้วย lipid-free globulin protein, livetin (α-,β- และ γ-) ซึ่งมีประมาณ 10.6% ของ yolk solid และ LDL ทั้งหมด (MaCully et al., 1962 อ้างโดย Sim et al., 2000) IgY ก็คือ γ-livetin ซึ่งอยู่ใน egg yolk ร่วมกับ water-soluble protein 2 ส่วนคือ α- , β- livetin และ lipoprotein ดังนั้นการแยก

IgY หรือ γ-livetin ต้องการส่วนสกัดของ water-soluble fraction (WSF) จาก yolk lipoprotein ตามด้วย การสกัดให้บริสุทธิ์ (Ploson et al., 1980 อ้างโดย Sim et al., 2000)

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของไข่แดง (Schade et al. 2001)

Protein	16.6%
Fats and lipids	32.6%
Carbohydrates	1.0%
Inorganic matter	1.1%

ความเข้มข้นของแอนติบอดี IgY ในไข่แดงมีกระบวนการการแยกแอนติบอดีประกอบด้วย การแยกไข่แดงจากไข่ขาวตามด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ของแอนติบอดีในไข่แดง จาก lipid และองค์ประกอบอื่น ๆ ซึ่งวิธีการแยกมีหลากหลายและมีการพัฒนาอย่างมาก ได้แก่ polyethylene glycol (PEG) precipitation, DEAE fractionation, chloroform extraction, water dilution, precipitation ด้วย dextran sulphate หรือ dextran blue หรือ xanthan gums , การแยกใน two-phase system (phosphase และ Tritone x-100) freeze-thaw cycle ควบคู่กับ gel filtration บน Biogel P150, และอื่น ๆ อีกมากมาย (Zhang, 2003) ซึ่งกระบวนการแยกแอนติบอดีโดยทั่ว ๆ ไปมีประสิทธิภาพและเหมาะสมในแง่ทางเศรษฐกิจด้วย แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการในการผลิต IgY antibody แต่ละวิธีนั้น มีความแตกต่างทางด้านปริมาณ, purification, stability และ activity ของแอนติบอดีดังตารางที่ 2.3

วิธีการแยกและทำ IgY จากไข่แดงให้บริสุทธิ์ในปริมาณมากมีหลากหลาย โดยพื้นฐาน lipoprotein รวมตัวกันได้ด้วย ionic แรงต่ำ ๆ นักวิจัยมากมายใช้วิธีการเจือจางไข่แดงด้วยน้ำ ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงหรือกรองแยกส่วนของ WSF ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญ 2 ปัจจัยคือ ค่า pH และระดับของการเจือจางไข่แดง(Akita and Nakai, 1992) ค่า pH มีความสำคัญมากต่อการให้ได้มาของ IgY ได้มากที่สุด หลังจากแยก WSF จากแกรนูลไข่แดงซึ่งมีส่วน livetin อยู่ ขั้นต่อไปคือการแยก IgY จาก water-soluble protein อื่น ๆ คือ α,β-livetin และ low density lipoprotein (LDL) ซึ่งมีวิธีการหลากหลายในการทำ IgY ให้บริสุทธิ์ รวมถึง ultracentifugation,organic solvents, การตกตะกอนโปรตีนโดย polyethyleneglycol, การตกตะกอนโดยใช้ sodium dextran sulphate หรือ natural gum และ ion exchang chromatography (Schade et al., 2001)

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบวิธีการแยก IgY ต่อประสิทธิภาพ IgY ทั้งทางด้านปริมาณและความบริสุทธิ์ (Schade et al. 2001)

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

Protein determination by the Biuret method; quantification of IgY by RID (radial immune diffusion, Mancini-technique); check of purity with SDS-PAGE

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

2.7 การผลิต IgY จากไข่แดง (Production of IgY)

IgY มีการทำงานเหมือนกับ IgG ประโยชน์จากการใช้ไก่เป็นโฮสต์ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นที่น่าสนใจมากซึ่งไข่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของแอนติบอดีดังนี้

2.7.1 การเก็บรวบรวมแอนติบอดีไม่รุกรานสัตว์ทดลอง

การผลิต antiserum จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในแต่ละครั้งจะต้องเก็บเลือดจากสัตว์ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการเก็บไข่จากแม่ไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อนำมาผลิตแอนติบอดีจากไข่แดง IgY จึงไม่เป็นการรุกรานหรือทำให้สัตว์เกิดความเครียดจากการจัดการของคน นอกจากนี้การเก็บไข่เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถผลิตได้มาก และเป็นวิธีการผลิตทางชีวภาพที่สอดคล้องต่อการลดการทรมานสัตว์ในหลักการของสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare)

2.7.2 ปริมาณการผลิต

โดยทั่วไปไก่จะวางไข่ประมาณ 280 ฟองในหนึ่งปีและในไข่แดงมี IgY แอนติบอดี 100-400 มิลลิกรัมต่อไข่ไก่ 1 ใบ มีผลทำให้ได้ IgY 28-42 กรัมต่อปีจากไก่แต่ละตัว (Carlender, 2002) และมี antigen-specific IgY antibody อยู่ในระหว่าง 2% และ 10% ของการผลิต IgY ทั้งหมด (Schade et al., 2001) ซึ่งเป็นการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแอนติบอดีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น กระต่าย หนูและแพะ Narat (2003) ได้รายงานการเปรียบเทียบความสามารถใน

การผลิตแอนติบอดีระหว่างกระต่ายและแม่ไก่ แสดงให้เห็นว่าในแม่ไก่สามารถผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่มากกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งวิธีแยกแอนติบอดีนั้นง่าย สะดวกและไม่เป็นการรุกรานสัตว์ทดลองดังตารางที่ 2.4

นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับประสิทธิการผลิต IgY ซึ่งพบว่าในไก่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงคือ single comb white leghorn (SCWL) และพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ Rhode Island Red (RIR) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในส่วนของโปรตีนและผลรวมปริมาณ IgY เมื่อเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนต่อน้ำหนักไข่ แต่ทั้งนี้น้ำหนัก egg yolk และเปอร์เซ็นต์ hen-day production ของ SCWL มากกว่า RIR จึงเป็นส่วนสำคัญในการพิจารณาประสิทธิภาพการผลิต IgY ดังนั้น ไก่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง (SCWL) จึงมีประสิทธิภาพให้ IgY ได้มากกว่า (Li et al., 1998)

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบปริมาณแอนติบอดีของกระต่ายและไก่ (Narat, 2003)

	กระต่าย	**ไก่**
จำนวนสัตว์	1	1
วิธีการเก็บตัวอย่าง	เก็บตัวอย่างเลือด (20 ml/wk)	เก็บไข่ทุก ๆ วัน
ปริมาณตัวอย่างใน 2 สัปดาห์	เลือด 40 ml	ไข่ 14 ฟอง = 210 ml ของ egg yolk*
จำนวนแอนติบอดีทั้งหมด	200 mg	1120 mg**
จำนวน specific antibody	5% (10 mg)	2-10% (22.4-112 mg)
ผลรวมทั้งหมด-กระต่าย/ไก่***	5-6	1
Specific-กระต่าย/ไก่****	2-11	1
เปอร์เซ็นต์ของ Ig อื่น ๆ	IgM, IgA, IgE	None

* ค่าเฉลี่ยของปริมาณ egg yolk เท่ากับ 15 ml; ** ค่าเฉลี่ยของจำนวน IgY เท่ากับ 80 mg ต่อไข่ 1 ฟอง; *** จำนวนกระต่ายที่ผลิตแอนติบอดีทั้งหมดได้เท่ากับไก่ 1 ตัวในช่วง 2 สัปดาห์;**** จำนวนกระต่ายที่ผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงได้เท่ากับไก่ 1 ตัวในช่วง 2 สัปดาห์

2.8 บทบาทของ IgY ต่อการเป็น antimicrobial antibody

การพิจารณาความรุนแรงของแบคทีเรียหรือความสามารถในการแพร่เชื้อและก่อโรค มีปัจจัยที่หลากหลาย ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคอาจมีหนึ่งลักษณะหรือหลายลักษณะที่เป็นปัจจัยสาเหตุของโรค

แบคทีเรียจำนวนมากมีแคปซูลซึ่งใช้เกาะยึดกับเซลล์ mucosa เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการก่อโรคตามด้วยการพัฒนาของ microcolonies แล้วทำให้เกิดโรค ปฏิกิริยาระหว่างแบคทีเรียกับผิวของเซลล์โฮสต์เป็นขั้นตอนการเกาะยึด แบคทีเรียมีโมเลกุลผิวเซลล์ที่จำเพาะและทำ

ปฏิกิริยากับผิวเซลล์โฮสต์โดยตรง ซึ่งปัจจัยในการเกาะยึดคือ โครงสร้างของผิวเซลล์รวมถึง pili, lipopolysaccharide (LPS), side chain (O antigen) และ M protein

องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ในการเกาะยึดเซลล์โฮสต์ คือ pili (หรือส่วนที่เป็น fimbriae) โดยเฉพาะการสร้างโคโลนีของแอนติเจน ปัจจัยที่สำคัญ คือ colonization factor antigen (CFA) คือส่วนของขนที่ยื่นออกมานอกผิวเซลล์แบคทีเรียหรือส่วนที่เป็นสื่อในการเกาะยึดของแบคทีเรียต่อผิวเซลล์โฮสต์ (Bene and Schmid, 1997) ยกตัวอย่าง *E.coli* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วง มี pili type I ซึ่งเกาะกับ receptor ของ epithelial cell ซึ่งตัว pili และโมเลกุลจำเพาะมีกลไกในการเกาะยึดที่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบของแอนติเจนของ *E.coli* ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคท้องร่วง

LPS เกี่ยวข้องกับการมีบทบาทในการเกาะยึด ปัจจัยในการเกาะยึดทำปฏิกิริยากับเซลล์และเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับความจำเพาะของ receptor ซึ่งแบคทีเรียที่เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดไปสู่เนื้อเยื่อและบริเวณของอวัยวะที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้เกิด affinities ของปัจจัยในการเกาะยึดของแบคทีเรียแตกต่างกัน (Bene and Schmid, 1997)

พาหะนำโรคส่วนมากเข้าบุกรุก epithelial ของโฮสต์เป็นกระบวนการทำให้ติดเชื้ออย่างรุนแรง การรุกรานของแบคทีเรียมีกระบวนการซับซ้อน แบคทีเรียบางส่วน (เช่น *Salmonella* species) บุกรุกเนื้อเยื่อผ่านทาง junction ระหว่าง epithelial cell เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ภายในเซลล์ของโฮสต์ แบคทีเรียจะเข้าล้อมรอบถุงเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สลาย จากนั้นแบคทีเรียจึงสามารถกระจายเข้าสู่ภายใน cytoplasm ได้ (Brook et al., 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียจะผลิตและหลั่งเอนไซม์จำนวนมากซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรค กลไกต่าง ๆ นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและขอบเขตการแพร่ของเอนไซม์ซึ่งจะทำให้ collagen, fibrin และ cellular material ของโฮสต์เสื่อมลง แต่จะลดความรุนแรงและไม่เกิดปฏิกิริยาเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะ

สารพิษของแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ exotoxin เป็นโปรตีนที่ผลิตและหลั่งมาจากเซลล์เป็นตัวทำให้เกิดพิษและ endotoxin เป็นส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่ง endotoxin คือ lipopolysaccharide (LPS) ได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่ว ๆ ไปจะใช้ exotoxin ในการจัด genus หรือแยก strain ที่เป็นตัวก่อโรคซึ่งสารพิษเหล่านี้ถูกแยกเป็น enterotoxin, neurotoxin และ cytotoxin รวมทั้ง heat-labile toxin (LT-I,LT-II), heat-stable toxin (ST) และ cholera toxin มีผลกระทบต่อทางเดินอาหาร

แบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดมี endotoxin อยู่ในส่วนของ outer membrane ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ส่งผลให้ศักยภาพและความสามารถในการก่อให้เกิดลักษณะอาการของโรคแตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงทั่วโลก ซึ่งถูกแยกประเภท

โดยลักษณะของคุณสมบัติความรุนแรงในการก่อโรคและแต่ละกลุ่มมีกลไกการทำงานแตกต่างกัน แบ่งได้ 5 กลุ่ม enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroagressive *E. coli* (EAEC) และ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ซึ่งพบมากในการเป็นสาเหตุของ traveler's diarrhea ในประเทศที่พัฒนาแล้ว ETEC เป็นสาเหตุที่สำคัญมากในการเกิดโรคท้องร่วง strain ETEC มี 2 ขั้นตอนหลัก ๆ ในการก่อโรค คือ การสร้างโคโลนีในลำไส้หรือสื่อในการเกาะยึด CFA และเกิด hypersecretion ของน้ำและอิเล็กโตรไลท์ในร่างกาย ทำให้เกิด ST หรือ LT enterotoxin หรือทั้งสองอย่าง โดย ETEC จะจับกับผนังเซลล์โดยมี fimbriae เป็นสื่อพาหะก่อโรค

ส่วนที่ก่อโรคของเชื้อ *Salmonella* คือส่วน endotoxin ซึ่งเป็น envelope ที่บรรจุด้วย LPS กับ antigen polysaccharide (O antigen) และ outer membrane proteins (OMPs) ซึ่งเป็นสื่อในการเกาะยึดและแพร่กระจายไปยัง intestinal epithelium ในลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียอยู่ได้ทุกสปีชีส์ ความรุนแรงแต่ละสปีชีส์ขึ้นกับความสามารถในการมีชีวิตอยู่ได้ในภาวะกรดในกระเพาะอาหารและซึมแทรก intestinal epithelium และ subepithelium (Virella and Schmidt, 1997) ในส่วนปลายของลำไส้เล็ก (ileum) เชื้อ *Salmonella* ที่สามารถเกาะยึดและผ่านมาถึง epithelial cell ในลำไส้ M cell เป็นส่วนแรกของ follicle ที่เกี่ยวข้องกับ epithelium (Clark et al., 1994) เชื้อ *Salmonella* มีองค์ประกอบของผิวเซลล์ที่หลากหลายซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงในการเกิดโรค ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS), flagella และ outer membrane proteins (OMPs) มีบทบาทต่อการเป็นพาหะก่อโรคที่สำคัญ

กลไกการทำงาน

แอนติบอดีในไข่แดงต่อต้าน *E. coli* F18ab fimbriae จะขัดขวางแบคทีเรียไม่ให้สามารถเกาะยึดผนังลำไส้ ทำให้ยับยั้งการสร้างโคโลนี ลดอาการของโรคหรือป้องกันโรคได้ (Imberechts et al., 1997) และแอนติบอดีต่อต้าน fimbriae ของ *E. coli* K88+ สามารถป้องกันการจับกับ receptor ของ mucosa (Jin et al., 1998) ซึ่งการทดสอบการเกาะยึด (in vitro) พบว่าเมื่อใช้สารละลายที่มี homologus anti-fimbriae antibodies สามารถยับยั้งการจับของเซลล์แบคทีเรียได้เป็นอย่างดี (Yokoyama et al., 1992) เช่นเดียวกับการทดลอง in vivo การป้องกันโรคของ IgY ต่อการเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกร สามารถยับยั้งการเกาะยึดของ *E. coli* ต่อ mucus ในลำไส้ได้ และการศึกษา in vitro พบว่า IgY ขัดขวางการจับของ ETEC ต่อ mucin ในลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการสร้างโคโลนีของแบคทีเรียในลำไส้เล็ก

การ passive transfer ของ anti-OMPs antibody จะมีอิทธิพลต่อการขัดขวาง การสร้างโคโลนีของแบคทีเรีย โดยแอนติบอดีจำเพาะจะจับกับเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ *S. enterica* serovar Typhimurium ซึ่งกลไกของ anti-OMPs antibodies ในการป้องกันต่อต้านการรุกรานของ *Salmonella* ต่อโฮสต์ยังไม่ชัดเจน โดย Yokoyama et al. (1998a) สันนิษฐานว่า OMPs เป็นส่วนของผิวแบคทีเรียซึ่งง่ายต่อการจดจำของแอนติบอดีหลังจากการจับกันของแอนติบอดีกับ OMPs ทำให้การทำงานทางชีววิทยาของ OMPs ลดลงผลสุดท้ายจึงสามารถลดการรุกรานของเชื้อ *Salmonella* ได้เพราะการสูญเสียความสามารถในการสร้างโคโลนีในทางเดินอาหาร

Streptococcus mutants สังเคราะห์ polysaccharides ได้จำนวนมาก เช่น dextrans หรือ levans จากซูโครสมีความสำคัญในการก่อโรคฟันผุ IgY ที่มีความจำเพาะต่อ glucan ที่ไม่ละลายซึ่งอยู่รอบ ๆ ผิวเซลล์ของ *S. mutans* และยับยั้งคุณสมบัติในการเกาะยึดของเซลล์แบคทีเรีย ถึงแม้กลไกของภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในการป้องกันโรคต่อต้านการสร้างโคโลนีของ *S.mutans* ในคนยังไม่ชัดเจน Hatta et al. (1997) เสนอว่า IgY ยับยั้งการเกาะยึดและการสร้างโคโลนีของ *S. mutans* โดยแอนติบอดีจะจับกับ pili ของแบคทีเรียและยับยั้งการสร้างโคโลนีของแบคทีเรียในลำไส้เล็ก ซึ่ง IgY ถูกพบในลำไส้เล็กของลูกสุกรแรกเกิดและมีน้อยลงในลูกสุกรหย่านม เนื่องจาก IgY สามารถถูกทำลายโดย pepsin ในกระเพาะอาหาร (pH 2-3) ในลูกสุกรโตเต็มที่จะมีแอนติบอดีเพียงเล็กน้อยที่สามารถผ่านไปยังลำไส้โดยปราศจากการ hydrolyse หรือไม่มีการสูญเสียโครงสร้างและการทำงานของแอนติบอดี ในลูกสุกรแอนติบอดีสามารถผ่านกระเพาะอาหารโดยปราศจากการทำลาย เพราะระบบการสร้างกรด gastric ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงสามารถดูดซึมแอนติบอดีที่ยังคงโครงสร้างและคุณสมบัติของแอนติบอดีอยู่ในลำไส้เล็กและเคลื่อนย้ายไปในระบบไหลเวียนเลือดได้ (Yokoyama et al., 1993)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการป้องกันโรคของ IgY

ผลของ IgY ในการยับยั้งการเกาะยึดของ ETEC ขึ้นอยู่กับอิทธิพล 2 ปัจจัย คือ ปริมาณ (dose) ของแอนติบอดีและความเข้มข้นของ ETEC การเสริมแอนติบอดีควรเพียงพอเมื่ออยู่ในลำไส้ต่อการป้องกัน *E.coli* จับกับ receptor ของ mucosa Jin et al. (1998) ได้แสดงว่า IgY เมื่อเจือจาง 50 และ 100 เท่า สามารถยับยั้ง *E. coli* K88+ ที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ได้อย่างดี อย่างไรก็ตามการเจือจาง 100 เท่า IgY ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเกาะยึดของ *E. coli* K88+ ที่ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml

2.9 การนำเอา egg yolk antibody มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค

Immunoglobulin Y เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจง เช่น แบคทีเรีย ไวรัส carcinogen และสารพิษ สามารถลบล้างอันตรายที่เกิดจากผลกระทบของแอนติเจนได้ การผลิต IgY จากไข่แดงของแม่ไก่เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพทางด้านเศรษฐกิจในการเพิ่ม polyclonal antibody โดยไม่จำเป็นต้องใช้เลือดจากแม่ไก่และการสกัด IgY ให้บริสุทธ์มีวิธีการที่ไม่ซับซ้อน (Akita and Nakai, 1992) ศักยภาพของการประยุกต์ใช้ IgY จะเพิ่มขึ้นโดยใช้เป็นสารป้องกันโรค เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค และเป็นอาหารเสริม (food supplement) ซึ่งมีการศึกษามากมายในการใช้ไก่เป็นแหล่งของแอนติบอดีโดยไก่ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ รวมถึง bovine serum albumin (BSA) (Li et al, 1998), Lipopolysaccharide (LPS) (Sunwoo et al., 1996), ไวรัส (Carlender, 2002) แบคทีเรีย (Shin et al., 2002) และการประยุกต์ใช้ egg yolk antibody เป็นสารต่อต้านพิษงู (venom) (Maya et al., 2002)

IgY ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างสำหรับในการป้องกันโรค การรักษาโรค การวินิจฉัยโรค มีการนำ purified IgY มาประยุกต์ใช้เป็น passive immunization โดยการกิน ซึ่งมีการรายงานการป้องกันโรคสรุปดังตารางที่ 2.5

ปัจจุบัน IgY ถูกใช้เป็นเครื่องมือทางในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) สำหรับการรักษาโรคมะเร็งและใช้เป็นเครื่องมือทางชีวเคมี (biochemical) แม่ไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของ P110 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหารของคน คือ MGC-803 cell ซึ่ง IgY บริสุทธิ์สามารถจำเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหารได้และแอนติบอดีจับกับเซลล์มะเร็ง และช่วยกระจายรูปปฏิกิริยาของตัวยาซึ่งเป็นส่วนสำคัญสำหรับการรักษาโรคมะเร็ง (Yang et al., 1997) และการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อไวรัสในการรักษาโรคเอดส์ (Coleman, 2000)

ตารางที่ 2.5 การนำ egg yolk antibody มาใช้ประโยชน์ในคนและสัตว์

แหล่งอ้างอิง	การนำ egg yolk antibody (IgY) มาใช้ประโยชน์
<u>ทางด้านการแพทย์</u>	
Maya et al. (2002)	แอนติบอดี IgY ที่จำเพาะต่อพิษงูใช้เป็น anti-venom
Hatta et al. (1997)	ใช้ไข่แดงแอนติบอดีต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ผสมน้ำยาบ้วนปากป้องกันฟันผุ
Yokoyoma et al. (1998a)	ทดลองให้หนูกินไข่แอนติบอดีต่อต้านเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และ *S. enterica* serovar Typhimurium
Shin et al. (2002)	ใช้ไข่แดงแอนติบอดีรักษาโรคเป็นแผลในกระเพาะต่อต้านเชื้อ *Helicobacter pyroli*
<u>ทางด้านสัตว์</u>	
Lee et al. (2000)	ใช้ไข่แอนติบอดีป้องกันโรคในปลา Rainbow trout จากเชื้อ *Yersinia ruckeri*
Yokoyama et al. (1992)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* โดยให้กินในลูกสุกร
Yokoyoma et al. (1998b)	ป้องกันโรคท้องร่วงในลูกโคโดยให้กินไข่แอนติบอดีต่อต้านเชื้อ *Salmonella*
Imberechts et al. (1997)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* F18ในลูกสุกร
Jin et al. (1998)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* K88+ ในลูกสุกร
Marquardt et al. (1999)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* K88+ ในลูกสุกร
Owusu-Asiedu et al. (2003a)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรเปรียบเทียบกับ spray dried plasma porcine
Owusu-Asiedu et al. (2003b)	ป้องกันโรคท้องเสียจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรเปรียบเทียบกับ feed additive ต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะ
Kassaify and Mine (2004)	ป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* ในไก่ไข่

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาทดลองครั้งนี้ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังนี้ การเตรียมสัตว์ทดลอง การเตรียมแอนติเจน การหาปริมาณโปรตีน การเตรียมวัคซีนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ การเก็บตัวอย่างซีรั่มและไข่ การแยก water soluble fraction (WSF) การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดี และการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ที่ใช้ทดลองเป็นไก่ไข่พันธุ์ Bovans goldline ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุ 34 สัปดาห์ จำนวน20 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (ไก่ 1 ตัวต่อซ้ำ) ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด 56 วัน

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (treatment) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ใช้ whole cell ของ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis เป็นแอนติเจนในการเตรียมวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ

กลุ่มที่ 2 ใช้ outer membrane proteins (OMPs) ของ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis เป็นแอนติเจนในการเตรียมวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ

เลี้ยงไก่ไข่ที่ใช้ทดลองบนกรงตับขังแยกกรงละ 1 ตัว ในโรงเรือนระบบปิด ให้กินน้ำและอาหารสำเร็จรูป และทำวัคซีนตามมาตรฐานที่กำหนดไว้

3.2 การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

1. นำเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis serotype D (SO 325/04) ซึ่งได้จาก WHO National Salmonella and Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข เพาะลงบน trypic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บเชื้อด้วย skim milk แบ่งใส่ vial ผนึกฝาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาศึกษา

2. นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาละลายที่อุณหภูมิห้อง ใช้ลูป (loop) แตะเชื้อแล้ว streak ใน TSA ให้กระจายเพื่อเชื้อจะได้ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16

ชั่วโมง จากนั้นเลือก 1 โคโลนีของเชื้อเพาะต่อใน trypic soy broth (TSB) ในหลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3. นำมาเพาะขยายการเจริญของเชื้อใน flask ที่มี TSB 250 มิลลิลิตร โดยใส่เชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตรบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4. แบ่งเชื้อแต่ละ flask มาทำการเจือจาง โดยดูดของเหลวใน TSB มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี TSB 9 มิลลิลิตรเพื่อทำ ten fold dilution โดยทำการเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 10^{-1} – 10^{-9}แล้วทำการ spread plate ใน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

5. จากนั้นทำให้เชื้อตายด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 0.5% ใส่ลงใน broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างแต่ละ flask มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร

6. แบ่งอีกส่วนมาทดสอบ sterility test โดยใช้ thioglycolate ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 22 องศาเซลเซียส สังเกตสีและความขุ่นเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม และทำการย้อมแกรมแบคทีเรียทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ (purity test)

7. หลังจากนั้นทดสอบยืนยันการตายของเชื้อโดย streak เชื้อใน TSA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

8. เก็บเซลล์จาก TSB ทุก flask โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) 7,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

9. ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย sterile phosphate-buffered saline pH 7.0 (PBS) จำนวน 3 ครั้ง ตะกอนเซลล์ส่วนหนึ่งนำไปเตรียมแอนติเจน outer membrane protein (OMPs) อีกส่วนนำไปแขวนลอยใน PBS เพื่อใช้ในการเตรียมแอนติเจน whole cell

3.2.2 การเตรียมแอนติเจน whole cell

นำเซลล์แบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วย PBS ให้เท่ากับ MacFarland turbidity standards เบอร์ 4.0 โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer 625 nm) ทำให้มีเชื้อประมาณ 1.2 $x10^{9}$ cfu (colony-forming unit) ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford ตามวิธีการข้อ 3.3 และใช้เตรียมเป็นแอนติเจน whole cell

3.2.3 การเตรียมแอนติเจน outer membrane proteins

การเตรียม OMPs โดยการดัดแปลงวิธีของ Schanitman (1971) , Yokoyama et al. (1998a) และ Prakash et al. (2005)

1. นำตะกอนแบคทีเรียมาแขวนลอยใน 0.01 M N-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer)

2. ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ที่ amplitude 60% ช่วงละ 30 วินาที 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ ในบิกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง

3. แยกส่วนของเซลล์ที่แตกออกโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. นำส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบน (supernatant) ซึ่งเป็นส่วนที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) มาปั่นเหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. จากนั้นนำตะกอนแบคทีเรียมาแขวนลอยใน 2% triton-x 100 ใน 0.01 M HEPES และบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำมาปั่นเหวี่ยง 30000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. นำตะกอนแบคทีเรียมาแขวนลอยอีกครั้งใน 2% triton-x 100 และ 5 mM EDTA ใน 0.01 M HEPES บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. เก็บส่วนของ OMPs คือส่วนที่ไม่ได้ถูกชะล้าง (detergent) โดยการปั่นเหวี่ยง 30000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. นำตะกอนที่ได้มาแขวนลอยใน PBS ทำการ dialysis กับ PBS buffer ทิ้งไว้ตลอดคืน เก็บสารละลาย OMPs ใส่ในหลอด microtube หลอดละ 1 มิลลิลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford ตามวิธีการข้อ 3.3

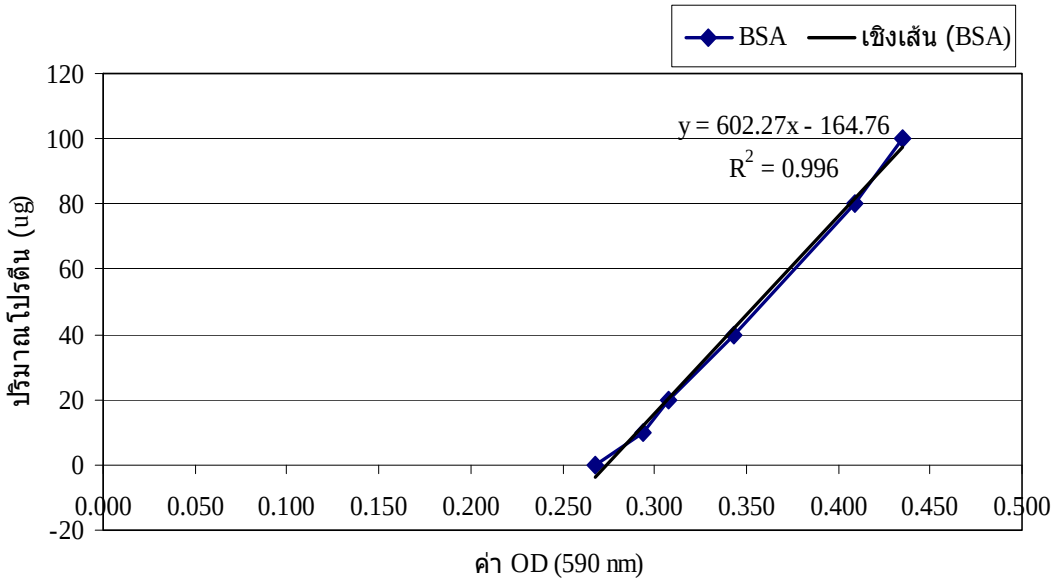
3.2.4 การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจน

ศึกษาปริมาณโปรตีนของ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพื่อทราบปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการเตรียมวัคซีน วิธีการของ Bradford ใช้ในการพิจารณาปริมาณโปรตีน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ใน PBS pH 7.4 กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.1 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.996 และปริมาณโปรตีนของแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

ความเข้มข้นของ BSA (100µg/ml)	OD เฉลี่ย[a]
0	0.268
10	0.294
20	0.308
40	0.344
60	0.362
80	0.409
100	0.435

$y = 6.2027x - 164.76$
$R^2 = 0.996$
a = ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 2 ค่า



รูปที่ 3.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ใน PBS pH 7.4 ที่ 590 นาโนเมตร ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยวิธีการของ Bradford

3.2.5 การเตรียมแอนติเจนเพื่อทำวัคซีน

- การเตรียมวัคซีนจาก whole cell ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณเท่ากับ 10^9 (colony-forming unit) ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นกับ MacFarland turbidity standards เบอร์ 4.0 ใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer 625 nm) โดยทำการเจือจางสารละลาย whole cell ด้วย PBS pH 7.4 ที่ 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 พบว่าในอัตราส่วน 1:8 มีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ MacFarland turbidity standards เบอร์ 4.0 มากที่สุด นำมาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการข้อ 3.3 พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 39.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- การเตรียมวัคซีนจาก OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

จากการสกัดส่วนของ OMPs ตามวิธีการดังกล่าวมาข้างต้นนำมาหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Bradford ในวิธีการข้อ 3.3 หลังจากทำการทดสอบพบว่า มีปริมาณโปรตีน 3,303.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย OMPs ด้วย PBS pH 7.4 ให้ปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับ whole cell อัตราส่วน 1:8 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 39.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้แอนติเจน OMPs ในอัตราส่วน 1:50 จะทำให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 35.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนของ whole cell และ OMPs ของ *S. enterica* serovar Enteritidis

แอนติเจน	ค่าดูดกลืนแสง (625 nm)	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)
MacFarland turbidity standards เบอร์ 4.0 (10^9 cfu/ml)	1.790	-
whole cell 1: 8	1.869	39.605
OMPs 1: 50	-	35.85

3.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (Kruger, 2002)

Bradford assay เป็นกฎของการจับกันของสีย้อม (dye Commassic Blue G250) กับโปรตีน การศึกษาอย่างละเอียดชี้ให้เห็นว่า dye อิสระสามารถคงอยู่ได้ในรูปของ ionic ที่แตกต่างกัน 4 แบบ ซึ่งค่า pk_a เป็น 1.15, 1.82 และ 1.42 ในประจุทั้งสามรูปแบบของ dye มีอิทธิพลมากในการทดสอบสารละลายเคมีที่เป็นกรด ประจุบวกจำนวนมากมีสีแดงและรูปแบบที่เป็นสีเขียวซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 470 นาโนเมตร และ 650 นาโนเมตร ตามลำดับ ในการเปรียบเทียบประจุลบจำนวนมากที่ให้สีฟ้าเมื่อ dye ทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีน มีค่าดูดกลืนแสงมากสุดที่ 590 นาโนเมตร ดังนั้นปริมาณโปรตีนสามารถประเมินค่าโดยการพิจารณาจำนวน dye ในรูป blue ionic การหาค่าโดยทั่วไปจะวัดโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 590 นาโนเมตร

Microassay method

การทดสอบนี้ไวต่อโปรตีนมาก ใช้เมื่อจำนวน unknown protein มีจำนวนจำกัด

1. ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างละ 5 และ 10 ไมโครลิตรใส่ในหลอด (microtube 1.5 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายที่รู้จำนวนโปรตีนแล้ว ในที่นี้ใช้ bovine serum albumin (BSA) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง 6 dilution คือ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตรเป็นตัวอย่างที่ไม่มีโปรตีน (โปรตีน 0 ไมโครกรัม) ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตตัวอย่างละ 400 ไมโครลิตรใส่ใน microtube ทำเช่นเดียวกันในตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน เติม dye หลอดละ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตใส่ใน microtitre plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 590 นาโนเมตร

3. สร้างกราฟของค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ทราบค่าแล้ว ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น พิจารณาโดยสมการเส้นตรง (linear regression) นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนจากตัวอย่างที่ต้องการหาค่าโปรตีน

3.4 การเตรียมวัคซีนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่

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

3.4.1 เตรียมวัคซีนโดยผสมสารละลายแอนติเจน whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยใช้ปริมาณโปรตีนเป็นมาตรฐาน ตัวอย่างละ 40 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีนเท่ากับ whole cell $1.2x10^9$ cfu.) กับ Freund's complete

adjuvant (ส่วนที่เป็นน้ำมัน) ในปริมาตรเท่า ๆ กัน โดยใช้เข็มหัวล็อค 2 หัว (2-way luer lock needle) ทำการดันสารละลายแอนติเจนเข้าไปในส่วนที่เป็นน้ำมันก่อนจากนั้นผลักของเหลวในเข็มทั้งสองฝั่งไปมาจนวัคซีนผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบโดยฉีดวัคซีนลงในน้ำเย็น (ถ้าวัคซีนหยดเป็นเม็ดกลมไม่กระจายตัวแสดงว่าผสมเข้ากันดีแล้ว) แช่วัคซีนในน้ำแข็งระหว่างทางนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่

3.4.2 ฉีดวัคซีนโดยวิธีเข้ากล้ามเนื้อ intramuscular 4 ตำแหน่ง (0.25 มิลลิลิตรต่อตำแหน่ง) ที่กล้ามเนื้อหน้าอกทางด้านซ้ายและขวาข้างละ 2 ตำแหน่ง

3.4.3 ฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำ (booster shots) ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 หลังจากการกระตุ้นในครั้งแรก โดย emulsified ด้วย Freund's incomplete adjuvant ในปริมาตรเท่าเดิม ทำตามขั้นตอนดังกล่าวแล้วข้างต้น

3.5 การเก็บตัวอย่างซีรั่มและไข่

เก็บตัวอย่างซีรั่มจากเส้นเลือดดำที่ปีกในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 และ 56 เก็บไข่ทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างซีรั่มและไข่ก่อนการให้วัคซีน 1 สัปดาห์เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control)

3.5.1 การเก็บซีรั่ม

ใช้เข็มเบอร์ 21 และใช้ไซริงค์ขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปีกใส่หลอด microtube ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดซีรั่มเก็บใส่หลอด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.5.2 การเก็บไข่

เก็บไข่ทุก ๆ วันแยกตามกลุ่มทดลองและตัวไก่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปใช้ในขั้นตอนทดลองต่อไป โดยนำมาวิเคราะห์สัปดาห์ละ 1 ฟองต่อไก่ 1 ตัว (มากกว่าหรือน้อยกว่าอย่างมาก 2 วัน ในกรณีไข่วันที่ทดสอบไก่ไม่ให้ไข่)

3.6 การแยก water soluble fraction (WSF) จากไข่แดง

Water soluble extract fraction (WSF) เป็นส่วนที่มี immunoglobulin Y (IgY) ที่แยกได้จากไข่แดงโดยใช้หลักการการรวมตัวกันของโปรตีนและไลปิด (lipid) ของไข่แดงด้วยค่า pH เป็นกลางและความเข้มข้นอิออน (ion) ต่ำ ดังนั้นการใช้ค่า pH ต่ำ ๆ (pH ที่เหมาะสม 5.0-5.2) สามารถแยกส่วนที่โปรตีน (IgY) (ส่วนที่ละลายน้ำได้) ออกจากส่วนของ lipid และ low-density

lipoprotein (LDL) และขจัดโปรตีนอื่น ๆ ได้จำนวนหนึ่ง ตามวิธีการของ Akita and Nakai (1992) ; Schade et al. (2001) ดังนี้

1. แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวแล้วเทลงในกระบอกตวง วัดปริมาตร นำส่วนของไข่ขาวออกให้หมด (อาจกลิ้งไข่แดงบนกระดาษทิชชู)

2. เทไข่แดงลงในบิกเกอร์แล้วเจาะเยื่อหุ้มไข่แดงออกโดยไม่ให้มีส่วนของเยื่อหุ้มไข่แดงปนอยู่

3. ทำการเจือจางไข่แดง โดยค่อย ๆ ผสมด้วยน้ำกลั่นเย็น (ที่ทำให้มีความเป็นกรดด้วย 0.01 M HCl ให้ได้ pH 4.0) เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายแกรนูลไข่แดง จากความเข้มข้นของกรดสูง โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นเย็นในสัดส่วน 1:8 ของปริมาตรไข่แดง

4. จากนั้นเติมน้ำกลั่นเย็น (pH 2.0) ทำให้ค่าเจือจางสุดท้ายเท่ากับ 1:10 ผสมให้เข้ากันดี แล้วปรับ pH ด้วย 0.01 M HCl ให้ได้ประมาณ 5.0-5.2

5. บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

6. ทำการปั่นเหวี่ยง 3125 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

7. กรองส่วนใสที่ลอยอยู่ส่วนบนของตะกอน (supernatant) ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสคือ WSF ที่มี IgY อยู่ เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ต่อไป

จากการทดลองแยก WSF จากไข่แดงโดยวิธีการเจือจาง (dilution method) ซึ่งในการแยกไข่แดงมีปริมาตรโดยเฉลี่ย 15.6$\pm$1.13 มิลลิลิตร เมื่อแยก WSF ตามวิธีการข้างต้นแล้วมีปริมาตรประมาณ 190-200 มิลลิลิตรต่อไข่ 1 ฟอง

3.7 การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วยวิธี Indirect ELISA

3.7.1 เตรียมแอนติเจน ที่ใช้ในการเคลือบ microplate โดยใช้ whole cell lysate antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อที่ 3.2.1 นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ที่ amplitude 60% ช่วงละ 30 วินาที 10 ครั้ง ในบิกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง เก็บเซลล์ส่วนที่แตกออกโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบน (supernatant)ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้

- การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนในการเคลือบ ELISA plate

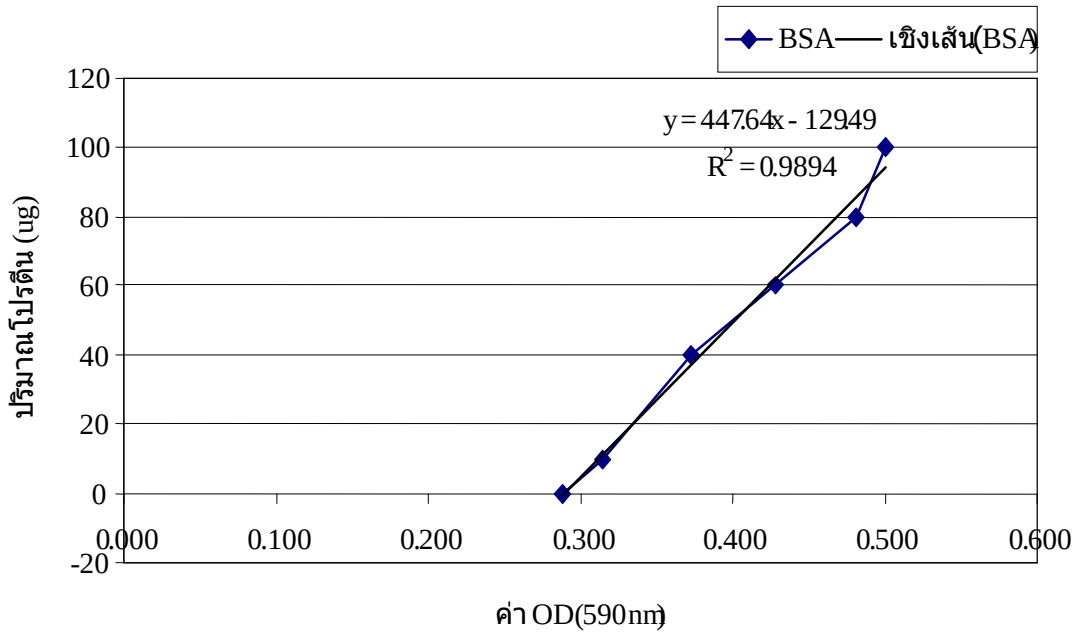
นำแอนติเจนที่เตรียมได้มาหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Bradford ในข้อ 3.3 โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร พิจารณาสมการเส้นตรง แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9894 หลังจากการทดสอบพบว่า มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 330.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.4 ซึ่งในการเคลือบ ELISA plate ในการทดลองนี้ใช้ whole cell lysate antigen ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ที่ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามแหล่งอ้างอิงจาก Sunwoo et al. (1996), (2002)

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ใช้ศึกษาปริมาณโปรตีนใน sonicated *S. enterica* serovar Enteritidis เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA

ความเข้มข้นของ BSA (100µg/ml)	OD เฉลี่ย[a]
0	0.288
10	0.315
20	0.357
40	0.372
60	0.428
80	0.481
100	0.500

$y = 447.64x-129.49$
$R^2 = 0.9894$
a = ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 2 ค่า



รูปที่ 3.2 กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ใน PBS pH 7.4 ที่ 590 นาโนเมตร ใช้ศึกษาโปรตีนใน sonicated *S. enterica* serovar Enteritidis โดยวิธีการของ Bradford

3.7.2 วิธีการ Indirect ELISA ใช้เทคนิคของ Sunwoo et al. (1996,2002); Crowther et al (1995) และนภาธร บานชื่น (2532) โดยเริ่มจากการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugated antibody, positive immune และ negative immune ในซีรั่มและใน WSF ในการเริ่มทำ serial dilution โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนตามแหล่งอ้างอิง sunwoo et al. (1996) คือ 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

- ซีรั่มและ WSF อ้างอิงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ แบ่งเป็น 2 ประเภท

1. Negative control ได้แก่ ซีรั่มและ WSF จากไก่และไข่ก่อนทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

2. Positive control ได้แก่ ซีรั่มและ WSF จากไก่และไข่หลังทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว (สัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง)

วิธีการ Indirect ELISA มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1.ทำการเคลือบ microtritre plate ด้วยสารละลายแอนติเจน 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรใน 0.05 M carbonate coating buffer pH 9.6 ใส่ใน microtitre plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ microtitre plate ใส่ในกล่องพลาสติกชื้น แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น 1 คืน (บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดคืน)

2. เทสารละลายแอนติเจนทิ้งแล้วล้าง 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 150 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน false positive บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้าง microtitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

5. เติมตัวอย่าง serum หรือ WSF ทำ serial dilution ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้าง microptitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

7. เติม Rabbit anti-chicken IgY horseradish peroxidase conjugate 1:1000 (จากการทดสอบในข้อ 3.7.3) ในแต่ละหลุม 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

8. ล้าง microptitre plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง

9. เตรียม substrate solution คือ 2-2,-abino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ทันทีก่อนใช้ ใน 0.05 M citrate buffer ที่มี 30% hydrogen peroxide และเติมในแต่ละหลุม 50 ไมโครลิตร ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 15 นาที

10. อ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

11. พิจารณาระดับแอนติบอดีเป็นค่าไตเตอร์ โดยอ่านค่า end titre ที่ค่า optical density (OD) ของตัวอย่างเท่ากับค่าของ negative control (Kumar et al., 2003)

3.7.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugated antibody

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugated antibody โดยใช้วิธี chessboard titration ดังนี้

1. เคลือบ microplate ด้วยแอนติเจนที่เตรียมดังกล่าวในวิธีการข้อ 3.7.1 ปริมาณ 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ทำ Indirect ELISA ตามวิธีข้อ 3.7.2

2. ทำการบ่มและล้าง plate

3. เติม positive หรือ negative serum และ WSF แล้วทำการเจือจาง two fold serial dilution เริ่มต้นจาก 1/100 ถึง 1/12800 ในคอลัมน์ที่ 1 ถึงคอลัมน์ที่ 11 ส่วนในคอลัมน์ที่ 12 เติม PBS-T

4. ทำการบ่มและล้าง plate

5. เติม conjugated antibody แล้วทำการเจือจาง two fold serial dilution เริ่มจาก 1/1000 ถึง 1/64000 จากแถว A ถึงแถว G ส่วนแถว H เติม PBS-T

6. ทำการบ่มและล้าง plate

7. เติม substrate แล้วอ่านค่า OD

ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ conjugated antibody พบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดสีในค่าเจือจางใด ๆ นอกจากค่าเจือจางเริ่มต้น 1/1000 จึงเลือกใช้ค่าเจือจางนี้ในการทำ Indirect ELISA ตลอดการทดลองครั้งนี้ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการของ Sunwoo et al. (1996)

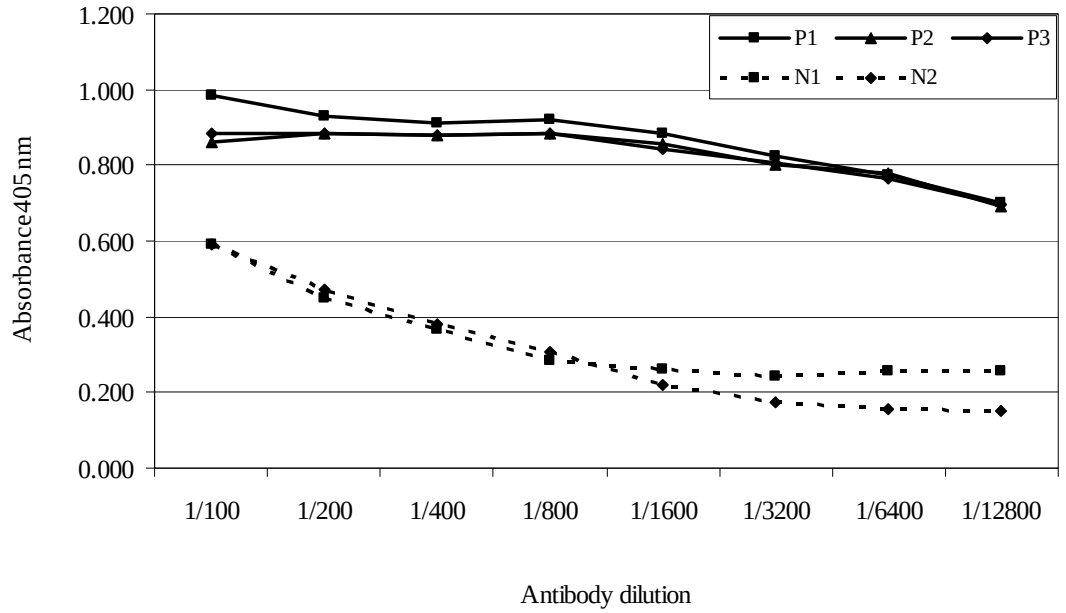
3.7.4 การทดสอบภูมิต้านทานในซีรั่มและใน WSF ต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis

ระดับภูมิต้านทานหรือแอนติบอดีไตเตอร์ทำการวิเคราะห์ โดยวิธี Indirect ELISA ตามวิธีการข้อ 3.7.2 ในซีรั่มและในไข่แดงของแม่ไก่ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน 2 ชนิด คือ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ดังนี้

3.7.4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ในซีรั่ม

ทดสอบหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ในซีรั่มโดยเคลือบ microplate ด้วยแอนติเจน 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มและล้าง plate เหมือนวิธีการ Indirect ELISA ข้อ 3.7.2 แล้วเติม negative หรือ positive ซีรั่ม ทำ two fold serial dilution เริ่มจาก 1/100 ถึง 1/12800 ทำการบ่มและล้าง plate จากนั้นเติม conjugated antibody ที่ความเข้มข้น 1/1000 บ่มและล้าง plate เติม substrate และอ่านค่า OD

จากการทดสอบพบว่า ค่าเจือจางที่ 1/100 และ 1/200 ให้ค่า OD ของ negative ซีรั่มค่อนข้างสูง ทำให้ค่า background สูงและเห็นความแตกต่างระหว่าง negative และ positive ซีรั่มไม่ชัดเจน ซึ่งค่าเจือจางที่ 1/400 ถึง 1/3200 ให้ค่า OD ของความแตกต่างระหว่าง negative และ positive ซีรั่มมากกว่า สามารถพิจารณาได้ว่าความเข้มข้นของ negative และ positive ซีรั่มที่ค่าเจือจางที่ 1/400 ถึง 1/3200 เหมาะสมต่อทดสอบระดับแอนติบอดีในซีรั่ม ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ความเจือจางที่ 1/500 ในการเริ่มทำ serial dilution เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการวัดหาระดับแอนติบอดีและเป็นค่าเจือจางที่สะดวกในการเตรียมและเหมาะสมต่อการปฏิบัติงานแสดงดังรูปที่ 3.3

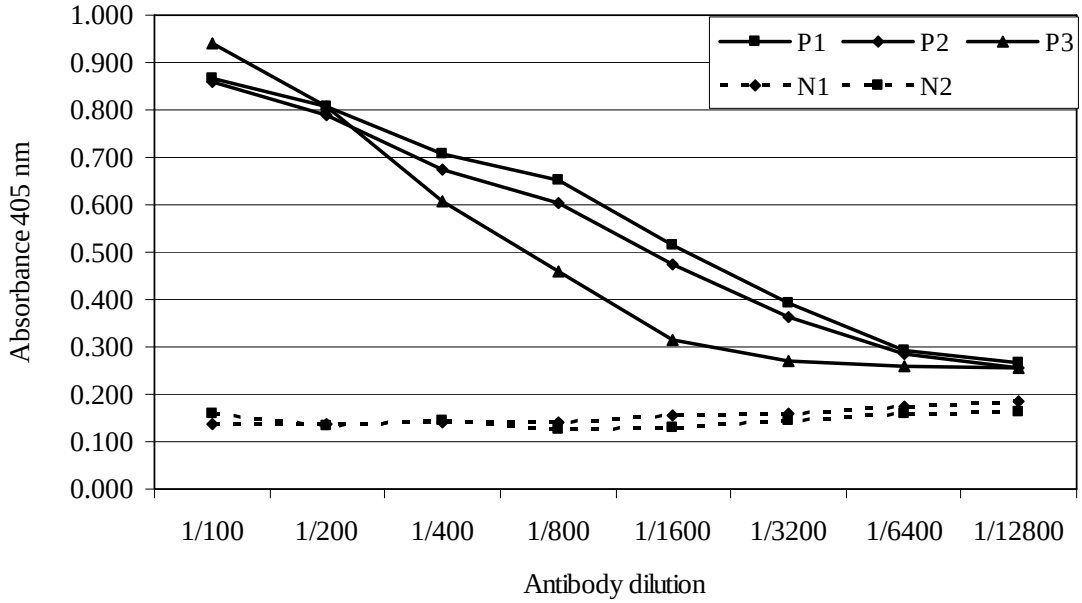


รูปที่ 3.3 กราฟการหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative control (N1, N2) และ positive control (P1, P2, P 3) ในซีรั่มเพื่อใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี serial dilution

3.7.4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ใน WSF

การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative และ positive control ใน WSF จากไข่แดง เหมือนกับวิธีการในข้อ 3.7.4.1 ยกเว้นการเติม negative หรือ positive เปลี่ยนเป็นตัวอย่าง WSF โดยทำการเจือจางแบบ two fold serial dilution เริ่มจาก 1/100 ถึง 1/12800 แล้วทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว

จากทดสอบค่า OD ของ negative WSF มีค่าต่ำมากตั้งแต่ค่าเจือจางเริ่มต้นที่ 1/100 และให้ค่า OD ของ negative และ positive ใน WSF มีความแตกต่างกันมากอย่างชัดเจน ดังนั้นค่าการเจือจางที่ 1/100 จึงมีความเหมาะสมมากที่สุดในทดสอบหาระดับแอนติบอดี ในการทดลองครั้งนี้ จึงใช้ความเข้มข้นของ WSF ที่ค่าเจือจาง 1/100 ในการเริ่มต้นทำ serial dilution ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 กราฟการหาความเข้มข้นเริ่มต้นของ negative control (N1, N2) และ positive control (P1, P2, P 3) ใน WSF เพื่อใช้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี serial dilution

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ t-test โดยใช้ group comparison ในการเปรียบเทียบแอนติเจนทั้งสองชนิดคือ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในซีรั่มและในไข่แดง และใช้ paired comparison ในการเปรียบเทียบระดับภูมิต้านทานในซีรั่มและในไข่แดง พิจารณาความแตกต่างในทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1997)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปราย

ผลจากการศึกษาทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่โดยการฉีดวัคซีน *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไก่ไข่จำนวน 20 ตัวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรกได้รับวัคซีนจากส่วน whole cell ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis และกลุ่มที่ 2 ได้รับวัคซีนจากส่วน outer membrane proteins (OMPs) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis เพื่อศึกษาผลต่อภูมิต้านทานในซีรั่มและในไข่แดงของไก่ และศึกษาการเตรียมสารภูมิต้านทานในไข่ไก่ดังนี้

4.1 ระดับแอนติบอดีในซีรั่ม

ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ไข่ด้วยแอนติเจน 2 ชนิด คือ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกโดยการฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมจากแอนติเจนผสมกับ Freund's complete adjuvant และกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก โดยเตรียมวัคซีนจากแอนติเจนผสมกับ Freund's incomplete adjuvant เก็บซีรั่มก่อนและหลังการให้วัคซีนและเก็บตัวอย่างซีรั่มทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วิเคราะห์หาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยวิธี ELISA

ผลการทดลองพบว่า หลังจากการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีในซีรั่ม สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกเมื่อเปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนทำการให้วัคซีน ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน OMPs ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) ในสัปดาห์แรก ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งแสดงระดับแอนติบอดีเป็นค่า optical density (OD) เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ได้ ในการเจือจางซีรั่มที่ 1:500 ซึ่งใช้เป็นความเจือจางเริ่มต้นในการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีโดยวิธี serial dilution และหลังจากสัปดาห์ที่ 2 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ลดลงเล็กน้อยในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน OMPs แต่ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ค่อนข้างต่ำ หลังจากกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 ระดับภูมิต้านทานสูงขึ้นและมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 5 ซึ่งมีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 4.35 ± 0.11 และ 4.63 ± 0.10 ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs ตามลำดับ ซึ่งระดับภูมิต้านทานยังคงอยู่สูงจนสิ้นสุด

การทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 4.41 $\pm$ 0.13 และ 4.48 $\pm$ 0.11 ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ระดับแอนติบอดีในการกระตุ้นด้วยแอนติเจนทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05) ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 4 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจน OMPs สูงกว่า whole cell อย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ (P<0.01) ดังแสดงในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า optical density (OD 405 nm) ของซีรั่มไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนให้วัคซีน

wk 0	wk 1	wk 2	wk 3	wk 4	wk 5	wk 6	wk 7	wk 8
0.06$\pm$ 0.01	0.09$\pm$ 0.03	0.53$\pm$ 0.07	0.47$\pm$ 0.06	0.58$\pm$ 0.10	0.64$\pm$ 0.14	0.55$\pm$ 0.17	0.64$\pm$ 0.08	0.55$\pm$ 0.09
	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

หมายเหตุ - แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD

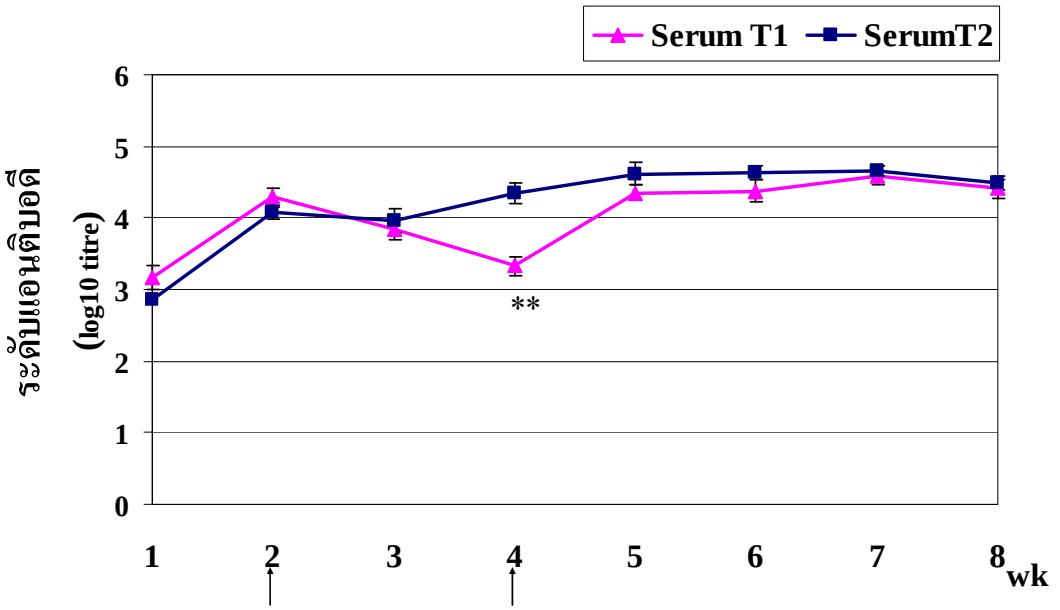
- ตัวอย่างซีรั่มทำการเจือจางที่ 1:500

ตารางที่ 4.2 ค่า optical density (OD 405 nm) ของซีรั่มไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OMPs ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับซีรั่มก่อนให้วัคซีน

wk 0	wk 1	wk 2	wk 3	wk 4	wk 5	wk 6	wk 7	wk 8
0.06$\pm$ 0.01	0.07$\pm$ 0.01	0.44$\pm$ 0.13	0.46$\pm$ 0.18	0.81$\pm$ 0.09	0.75$\pm$ 0.17	0.65$\pm$ 0.11	0.79$\pm$ 0.05	0.62$\pm$ 0.10
	P>0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

หมายเหตุ - แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD

- ตัวอย่างซีรั่มทำการเจือจางที่ 1:500



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงระดับแอนติบอดี ± standard error ในซีรั่มต่อ whole cell (T1) และ OMPs (T2) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลูกศรแสดงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

หมายเหตุ ** = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

4.2 ระดับแอนติบอดีใน (water soluble fraction, WSF)

จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วยแอนติเจน 2 ชนิด คือ whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ทำการเก็บไข่ก่อนและหลังการให้วัคซีนและเก็บทุก ๆ วัน หลังจากให้วัคซีน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการแยกแอนติบอดีหรือ IgY จากไข่แดงด้วยวิธี water dilution method เนื่องจากแอนติบอดีในไข่แดงรวมตัวอยู่กับส่วนของ lipid, lipoprotein และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water soluble fraction, WSF) ได้แก่ α-,β- และ γ- livetins (IgY) ดังนั้นส่วนของ WSF จึงมี IgY รวมอยู่ด้วย การสกัดด้วยน้ำสามารถแยกส่วนของไลปิดและแกรนูลโปรตีนบางส่วนได้ ซึ่งวิธี water dilution method อาศัยหลักความเจือจางและค่า pH เป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อผลของความบริสุทธิ์และปริมาณ IgY (Akita and Nakai, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการแยกส่วนของ WSF จากไข่แดงโดยทำการเจือจางด้วยน้ำปริมาตร 10 เท่า และปรับค่า pH อยู่ในช่วง 5.0-5.2 และวิเคราะห์ระดับภูมิต้านทานที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ด้วยวิธี ELISA

ผลการทดลองพบว่า ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยระดับแอนติบอดี

สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดีใน WSF ก่อนให้วัคซีนอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell และสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน OMPs ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 หลังจากกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell มีไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 3.84 ± 0.11 จากนั้นระดับแอนติบอดีไตเตอร์ลดลงเล็กน้อย ต่อมาภายหลังสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 3.90 ± 0.09 ขณะที่กลุ่มที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน OMPs มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 3.69 ± 0.08 และระดับแอนติบอดียังคงอยู่จนสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ titre เท่ากับ 3.96 ± 0.08 แต่อย่างไรก็ตาม ระดับแอนติบอดีในการกระตุ้นด้วยแอนติเจนทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 5 ระดับแอนติบอดีเมื่อกระตุ้นด้วย OMPs สูงกว่า whole cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ค่า optical density (OD 405 nm) ของ WSF ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับ WSF ก่อนให้วัคซีน

wk 0	wk 1	wk 2	wk 3	wk 4	wk 5	wk 6	wk 7	wk 8
0.06± 0.01	0.09± 0.02	0.46± 0.15	0.56± 0.10	0.80± 0.06	0.79± 0.09	0.64± 0.14	0.67± 0.12	0.73± 0.05
	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

หมายเหตุ - แสดงค่าเฉลี่ย ± SD

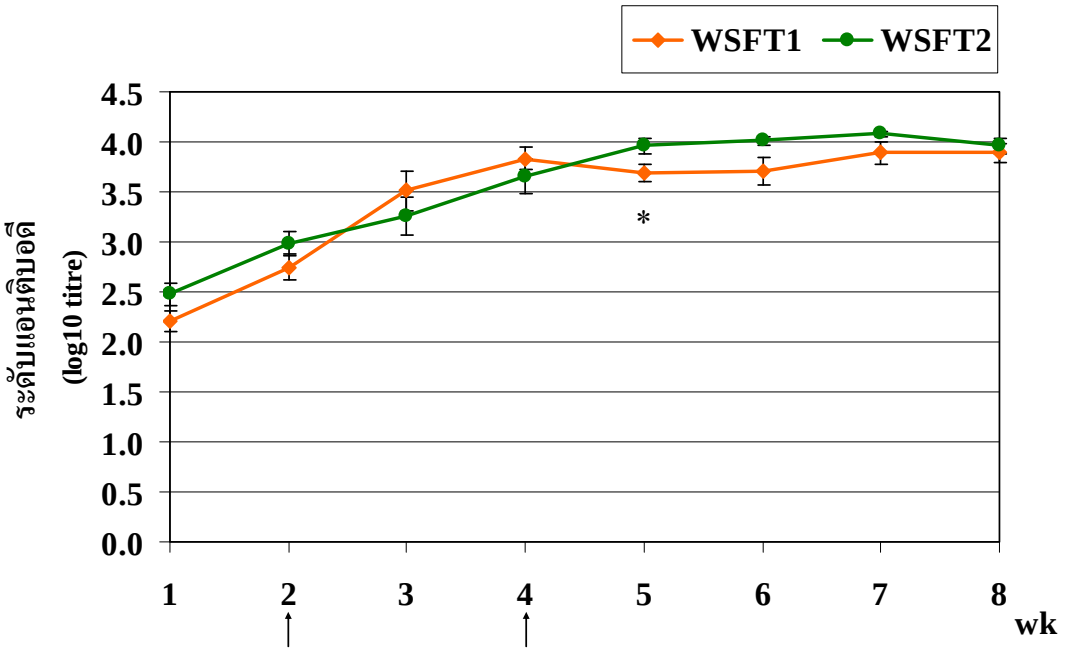
- ตัวอย่าง WSF ทำการเจือจางที่ 1:100

ตารางที่ 4.4 ค่า optical density (OD 405 nm) ของ WSF ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OMPs ของ *S. enterica* serovar Enteritidis เปรียบเทียบกับ WSF ก่อนให้วัคซีน

wk 0	wk 1	wk 2	wk 3	wk 4	wk 5	wk 6	wk 7	wk 8
0.07± 0.01	0.10± 0.03	0.36± 0.17	0.56± 0.11	0.80± 0.17	0.82± 0.12	0.77± 0.13	0.74± 0.11	0.74± 0.06
	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

หมายเหตุ - แสดงค่าเฉลี่ย ± SD

- ตัวอย่าง WSF ทำการเจือจางที่ 1:100



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงระดับแอนติบอดี ± standard error ใน WSF ต่อ whole cell (T1) และ OMPs (T2) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลูกศรแสดงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

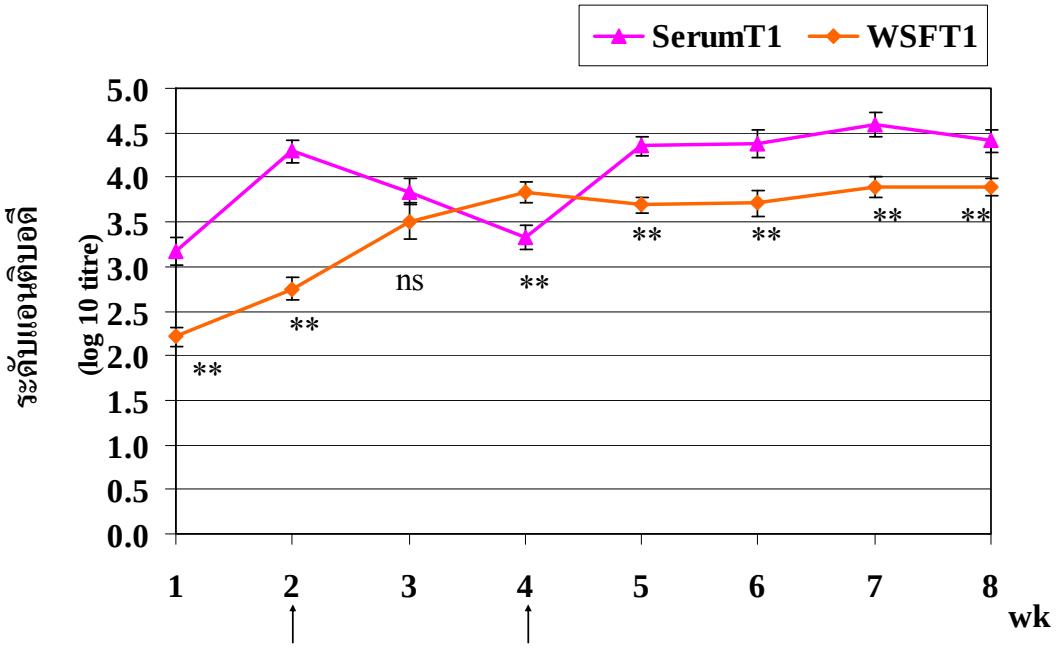
หมายเหตุ * = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

จากการพิจารณาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการกระตุ้นครั้งแรก พบว่าระดับแอนติบอดีในซีรั่มมีความผันแปรมากโดยระดับแอนติบอดีลดลง ซึ่งไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการตอบสนองของระบบ humoral system ของการกระตุ้นซ้ำหรือการได้รับแอนติเจนเดิมอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนของตัวสัตว์หรือเป็นความผิดพลาดในการปฏิบัติงาน ขณะที่การตอบสนองของภูมิต้านทานในไข่แดงเป็นไปตามทฤษฎี โดยระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเป็นลำดับอย่างต่อเนื่องและเพิ่มมากขึ้นหลังจากการกระตุ้นซ้ำ

4.3 เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างซีรั่มและ WSF จากไข่แดง

ในการเปรียบเทียบระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานระหว่างซีรั่มและ WSF จากไข่แดง โดยเปรียบเทียบตัวอย่างซีรั่มและ WSF จากไก่ตัวเดียวกัน เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ไข่ด้วยแอนติเจน whole cell ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis พบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เกือบทุกสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการทดลอง ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 3 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มและไข่แดงไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

(P>0.05) แต่ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในไข่แดงสูงกว่าในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความแตกต่างของระดับแอนติบอดี ± standard error ในซีรั่มและ WSF ต่อ whole cell (T1) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลูกศรแสดงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

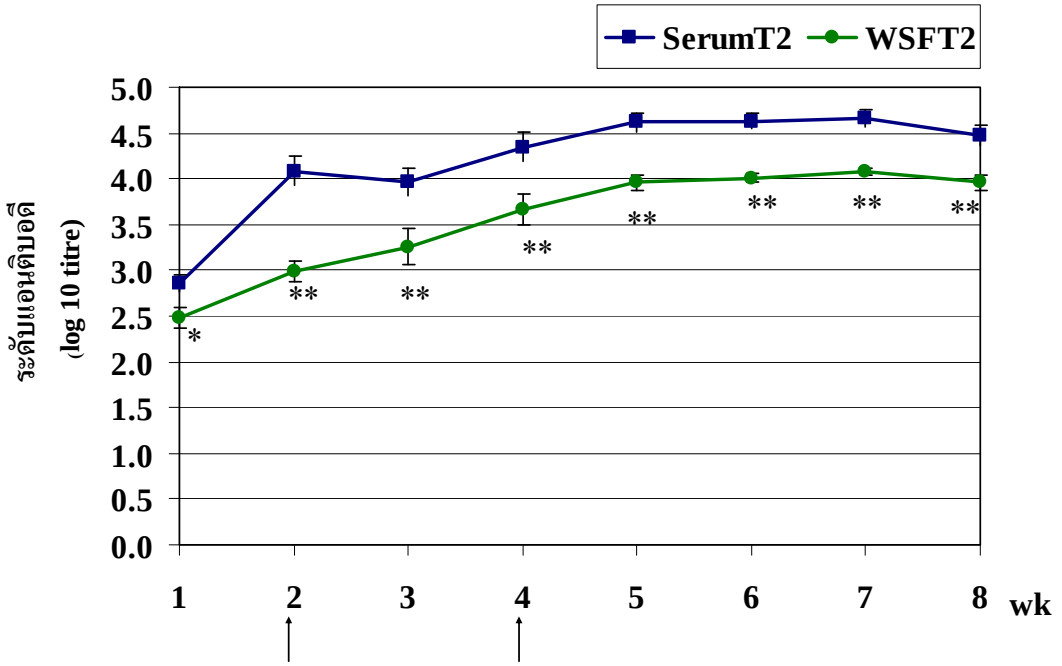
หมายเหตุ ** = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ns = ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05)

เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ไข่ด้วยแอนติเจน OMPs ของเชื้อ S. *enterica* serovar Enteritidis พบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงทุกสัปดาห์ตั้งแต่สัปดาห์แรกอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และในสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 (สิ้นสุดการทดลอง) ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ สรุปได้ว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงทั้งในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs

เมื่อแม่ไก่ได้รับวัคซีนและเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะและนำเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด ซึ่งอาจมีกลไกในการถ่ายทอดภูมิต้านทานบางส่วนไปยังไข่แดง ความเข้มข้นของแอนติบอดีในไข่แดงจึงน้อยกว่าในซีรั่ม หรืออาจมีการถ่ายทอดแอนติบอดีไปยังไข่แดงในความเข้มข้นใกล้เคียงกับในซีรั่ม แต่ในการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีในไข่แดงต้อง

ผ่านกระบวนการในการแยกแอนติบอดีจากไข่ไก่ จึงทำให้ตรวจพบแอนติบอดีในไข่แดงต่ำกว่าในซีรั่มไก่ซึ่งไม่ต้องผ่านขั้นตอนใด ๆ ในการเตรียมเพื่อวิเคราะห์หาระดับแอนติบอดี



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความแตกต่างของระดับแอนติบอดี ± standard error ในซีรั่มและ WSF ต่อ OMPs (T2) ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ลูกศรแสดงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

หมายเหตุ * = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

**** = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.05)**

การตอบสนองภูมิต้านทานของไก่ต่อสิ่งแปลกปลอม (แอนติเจน) ที่เข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะเป็นจากการให้วัคซีนหรือสัตว์ได้รับการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมนั้น สัตว์ปีกจะสร้างภูมิต้านทานทั้งทางด้านเซลล์ (cellular immunity) และทางด้านสารน้ำ (humoral immunity) คือแอนติบอดีหรือ immunoglobulins (Ig) ซึ่ง immunoglobulin Y (IgY) เป็นส่วนที่สามารถถ่ายทอดไปสะสมยังไข่แดง ขณะที่ IgM และ IgA ถ่ายทอดไปยังไข่ขาว เมื่อแอนติบอดีเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด แม่ไก่สามารถถ่ายทอดภูมิคุ้มกันไปยังลูกไก่โดยการขนถ่ายไปยังถุงหุ้มไข่แดง (yolk sac) โดยผ่าน follicular epithelium ในช่วง fluid phase ของ yolk ดังนั้นจึงพบระดับแอนติบอดีเหมือนกับในซีรั่มแม่ไก่ซึ่งค่าเฉลี่ยไตเตอร์ในไข่แดงมีแนวโน้มต่ำกว่าในซีรั่ม (Tizard, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ ที่ผลการทดลองมีค่าเฉลี่ยไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงตลอดระยะเวลาการทดลอง เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Li et al. (1998) ซึ่งทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ด้วย bovine serum albumin (BSA) พบการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมาถึงจุดคงที่ในวันที่ 14 ส่วนแอนติบอดีในไข่แดงพบปริมาณเล็กน้อยในวันที่ 7 และเพิ่มอย่างรวดเร็วในวันที่ 14 และเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ต่อมาภายหลังถึงจุดสูงสุดในวันที่ 56 และคงที่อยู่จนสิ้นสุดการทดลอง แต่ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติของระดับแอนติบอดีในซีรั่มและในไข่แดงตลอดการทดลอง

Prakash et al. (2005) ศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแม่ไก่ด้วย *S. enterica* serovar Gallinarum โดยศึกษาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OMPs โดยวิธี ELISA พบว่าระดับแอนติบอดีในไข่แดงที่ปรากฏ มีแนวโน้มเหมือนกับในซีรั่ม ซึ่งไตเตอร์ในซีรั่มสูงกว่าในไข่แดงอย่างสม่ำเสมอในฝูงที่ให้วัคซีน ขณะที่มีการรายงานความเข้มข้นของ IgY ในไข่แดงสูงกว่าในซีรั่ม แต่ความแตกต่างนี้ อาจจะเกิดเนื่องจากจำนวน IgY ในไข่แดงในแต่ละวันมีความแปรผันมาก (Schade et al., 2001) ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่จำเพาะในไข่แดง มีโครงร่างของแอนติบอดี (antibody-profile) เหมือนกับในซีรั่ม ซึ่งหมายถึงว่า serum-IgG จะเคลื่อนผ่านไปยังไข่แดงในระหว่างการเป็น follicle ที่เจริญเต็มที่ ส่วนเหตุผลของ Erhard et al. (2000) รายงานว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ IgY ในซีรั่มของไก่อายุ 5 เดือนเท่ากับ 9.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและในไข่แดงเท่ากับ 10.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นของแอนติบอดีในไข่แดงสูงกว่าในซีรั่ม ขณะที่ในไก่อายุ 9 เดือน มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ IgY ในซีรั่มเท่ากับ 5.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและในไข่แดงเท่ากับ 5.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นของแอนติบอดีในไข่แดงต่ำกว่าในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างในทางสถิติในการเปลี่ยนแปลงระดับ IgY ในซีรั่มและไข่แดงหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

Fu et al. (2006) รายงานว่า หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีในไข่แดงใน 3 สัปดาห์แรกซึ่งการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อ SARS coronavirus ในไข่แดงเริ่มตรวจพบได้ใน 2 สัปดาห์หลังจากมีการผลิต IgY ในซีรั่ม เหมือนกับการศึกษาของ Sunwoo et al. (1996) พบว่า IgY activity เพิ่มขึ้นในซีรั่มก่อนส่วนในไข่แดงเกิดขึ้นล่าช้าในช่วง 1-3 สัปดาห์ในการกระตุ้นภูมิต้านทานด้วย *S. enterica* serovar Typhimurium และ *Escherichia coli (E. coli)* ซึ่งระยะเวลาในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะในไข่แดงล่าช้ากว่าในซีรั่ม อธิบายได้จากแอนติบอดีในซีรั่มไก่จะเคลื่อนย้ายและสะสมในไข่แดง (Li et al., 1998) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ มีการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะในไข่แดงตั้งแต่สัปดาห์แรก อาจเป็นไปได้ว่าในตัวสัตว์ทดลองอาจมีภูมิต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นตามธรรมชาติอยู่บ้างแล้ว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีการให้วัคซีน ระดับแอนติบอดีหลังให้วัคซีนเกิดขึ้นสูงกว่าก่อนการให้วัคซีนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ ขณะที่มีการรายงานของ Gurtler and Fehlhaber (2004) กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ

S. enterica serovar Enteritidis live vaccine ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในไข่แดงสูงสุดอยู่ในช่วง 1:160-1:1280 และมีความเข้มข้นของ anti-*S. enterica* serovar Enteritidis specific IgY จำนวน 0.2-0.7 มิลลิกรัมต่อกรัมของไข่แดง และแสดงผลของไข่แดงที่ไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันแม่ไก่จะไม่พบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis

การตอบสนองของภูมิต้านทานในไข่แดงในการทดลองนี้ ตรวจพบระดับแอนติบอดีได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในการกระตุ้นด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs ระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเป็นลำดับหลังจากกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ซึ่งในการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Lee et al.(2002) ศึกษา IgY จำเพาะเจาะจงต่อ whole cell ของ *S. enterica* serovar Enteritidis พบ specific IgY activity เพิ่มขึ้นหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 และเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ โดยเริ่มตรวจพบการผลิตแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 1 และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 มีค่า OD เท่ากับ 1.10 เช่นเดียวกับ Sunwoo et al. (2002) ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *E. coli* O157:H7 whole cell พบการตอบสนองครั้งแรกมีลักษณะเป็น lag phase ซึ่งตรวจพบ *E. coli* O157:H7 specific activity ในไข่แดงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกซึ่งการตอบสนองลำดับที่สองจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพิ่มขึ้นแบบ exponential และมาถึงจุดสูงสุดมีค่า OD เท่ากับ 0.949 รูปแบบการทำงานของแอนติบอดีสามารถอธิบายตามหลักการของ memory B cell ซึ่งสร้างขึ้นระหว่างการตอบสนองครั้งแรก การกระตุ้นซ้ำจึงมีการตอบสนองที่ง่ายและมากกว่า B cell ดั้งเดิมที่พบกับแอนติเจนเป็นครั้งแรก (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2537)

Yokoyama et al. (1998a) รายงานการใช้ OMPs, LPS และ flagella ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ พบว่ามีระดับไตเตอร์เท่ากับ 1:256, 1:128 และ 1:1024 ตามลำดับ แต่เมื่อ challenge หนูด้วยเชื้อ *Salmonella* จากนั้นให้กิน egg yolk antibody (EYA) ที่จำเพาะในแต่ละแอนติเจน พบว่ากลุ่มที่ได้รับ OMPs-antibody มีอัตราการรอดตายมากที่สุดถึง 80% ส่วนใน LPS antibody และ flagella antibody มีอัตราการรอดตาย 47% และ 60% ตามลำดับ ถึงแม้ OMPs-antibody มีไตเตอร์น้อยกว่า flagella-antibody แต่เมื่อให้หนูกิน EYA ที่จำเพาะต่อ OMPs พบว่ามีอัตราการรอดตายมากที่สุด อธิบายได้ว่าความสำคัญและบทบาทของแอนติเจน OMPs, LPS และ flagella ต่อความรุนแรงของ *Salmonella* ในหนู โดยเฉพาะ OMPs หรือ porin มีบทบาทเป็น pathogenic determinants ซึ่งเป็นส่วนของผิวแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้น cellular และ humoral system การให้ passive anti-OMPs antibody อาจมีอิทธิพลต่อการสร้างโคโลนีของ *S. enterica* serovar Enteritidis โดยแอนติบอดีจำเพาะจะไปจับกับผิวโปรตีนของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียไปจับกับเซลล์ของโฮสต์ไม่ได้ ดังนั้น

anti-OMPs egg yolk antibody สามารถป้องกันหนูจากโรค Salmonellosis ได้ แต่กลไกในการต่อต้านการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* ของ OMPs antibody ยังไม่ชัดเจน ซึ่งมีข้อสมมติฐานว่า OMPs เป็นส่วนผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นแอนติเจนที่ดี ทำให้เกิดการตอบสนองในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะได้ง่าย แอนติบอดีจำเพาะที่ผลิตขึ้นจะทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อโรค จึงทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* ลดลง โดยแบคทีเรียจะสูญเสียความสามารถในการสร้างโคโลนีในลำไส้จึงป้องกันโรคได้ ในการศึกษาครั้งนี้ระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs เกิดขึ้นสูงทั้งในซีรั่มและในไข่แดง แสดงให้เห็นว่าวิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วยแอนติเจนทั้งสองร่วมกับ Freund's complete adjuvant ในการกระตุ้นภูมิคุ้นกันครั้งแรกและ booster ด้วย Freund's incomplete adjuvant ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ทำการแยก IgY ด้วยวิธี water dilution method เหมาะสมต่อการผลิตภูมิต้านทานต่อต้าน *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดง (Akita and Nakai et al., 1992; Lee et al., 2002; Sunwoo et al,2002; Erhard et al., 2000) ทั้งนี้ระดับหรือปริมาณสารภูมิต้านทานในไข่แดงขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ ตัวสัตว์ ปริมาณแอนติเจน วิธีการให้วัคซีน วิธีการแยก IgY และวิธีการทำให้บริสุทธิ์

วิธีการเตรียมนี้นอกจากให้ระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานมากแล้ว การแยก IgY จากไข่แดงด้วยวิธี water dilution method ใช้สารเคมีน้อยจึงเหมาะต่อการนำไปใช้ในการป้องกันโรคด้วยการกินโดยไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ซึ่งการศึกษาครั้งนี้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย whole cell และ OMPs ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ดังนั้น whole cell จึงมีศักยภาพต่อการเป็น immunogen ในการเตรียมสารภูมิต้านทานในไข่แดงที่ดีกว่า เนื่องจากมีวิธีการเตรียมที่สะดวก ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ในการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าควรเก็บไข่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เพราะมีระดับภูมิต้านทานสูงจนถึงมากกว่าสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งระดับภูมิต้านทานยังคงอยู่สูงแต่อย่างก็ตามต้องมีการศึกษาต่อไปว่าสามารถเก็บไข่ได้นานเท่าไร นอกจากนี้อาจมีการแปรรูปโดยการ spray dried (Owusu-Asiedu et al.,2003 a,b ; Yokoyama et al., 1992; 1998b) หรือ freeze dried (Lee et al., 2002; Sunwoo et al., 2002) เพื่อความสะดวกต่อการนำไปใช้และยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการเคลือบ IgY ที่แยกได้เพื่อป้องกันการย่อยสลายเนื่องจากกรดในกระเพาะอาหาร (Lee et al., 2000; Kovacs-Nolan and Mine, 2005)

การนำ IgY มาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบทาง serology ไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการในการสกัด IgY หรือทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่ยุ่งยากเพราะสามารถตรวจสอบได้โดยตรง (Gast et al., 1997) นอกจากนี้การผลิต specific egg yolk antibody เพื่อการรักษาโรคไม่จำเป็นต้องสกัด IgY การใช้ประโยชน์จากไข่ทั้งใบจะคุ้มค่ากว่า เพราะได้รับทั้งโปรตีนและสารอาหาร IgM และ

IgA ในไข่ขาวด้วย อย่างไรก็ตาม การนำมาใช้สำหรับการวิจัยและชันสูตรเชื้อโรคจำเป็นต้องมีการทำให้ IgY บริสุทธิ์เนื่องจากเป็นการทดสอบที่ต้องการความแม่นยำในการตรวจ

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิธีการเตรียมสารภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงของไก่และตรวจหาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานต่อเชื้อ *Salmonella* ในซีรั่มและไข่แดง เพื่อให้ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงโดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วยแอนติเจน whole cell และ outer membrane proteins (OMPs) ของ *S. enterica* serovar Enteritidis ซึ่ง emulsified ด้วย Freund's complete adjuvant ในการกระตุ้นครั้งแรกและ Freund's incomplete adjuvant ในการกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เก็บซีรั่มและเก็บไข่มาแยก IgY ด้วยวิธี water dilution method ตรวจสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. ปริมาณแอนติบอดีจำเพาะ (specific antibodies) ในซีรั่มและไข่แดงเกิดขึ้นสูงตลอดระยะเวลาการทดลอง (8 สัปดาห์)

2. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน whole cell และ OMPs ของเชื้อ *S. enterica* serovar Enteritidis สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีทั้งในซีรั่มและไข่แดงในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการทดลอง

3. วิธีการเตรียมแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้น แอนติเจน whole cell จะเตรียมได้สะดวกและรวดเร็วกว่าการเตรียมแอนติเจน OMPs

4. เพื่อให้เกิดปริมาณแอนติบอดีที่มากและนาน สามารถใช้แอนติเจน whole cell กระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยทำการกระตุ้น 3 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 ตามวิธีการทดลอง

การใช้ whole cell เตรียมสารภูมิต้านทานในไข่แดงของไก่เหมาะสมต่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถผลิตสารภูมิต้านทานป้องกันโรคต่าง ๆ ด้วยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วยแอนติเจนของโรคนั้น ๆ ประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภาพรักษาโรค เป็นอาหารเสริมช่วยเพิ่มภูมิต้านทานให้แก่ร่างกายหรือเป็น anti-venom ต่อต้านพิษงูและอื่น ๆ โดยเฉพาะนำมาใช้ในปศุสัตว์ทางสัตว์ปีกในการป้องกันโรค Salmonellosis ซึ่งปัจจุบันมีปัญหาเรื่องการดื้อยาปฏิชีวนะค่อนข้างมาก และใช้เป็นสารชีวภาพที่ไม่มีผลตกค้างเป็นการส่งเสริมทางด้านเศรษฐกิจ

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองครั้งนี้ สามารถเตรียมสารภูมิต้านทานต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงของไก่ที่เหมาะสมได้ โดยสามารถตรวจหาระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานในไข่แดงได้มากตลอดระยะเวลาการทดลองนาน 8 สัปดาห์ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการนำสารภูมิต้านทานต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงนี้มาพัฒนาผลิตในเชิงใช้ประโยชน์จริงต่อไปจึงมีข้อเสนอแนะดังนี้

1.ควรมีการทดลองเพิ่มเติมในการจัดโปรแกรมการให้วัคซีนว่าควรทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 หรือ 3 ครั้งเพื่อลดขั้นตอนความยุ่งยากและลดค่าใช้จ่ายในการผลิตสารภูมิต้านทานจากไข่แดง

2. ควรทำการทดลองต่อจากระยะเวลา 8 สัปดาห์จนแม่ไก่หยุดให้ไข่ เพื่อหาระยะเวลาว่าระดับแอนติบอดีหรือ IgY มีอยู่นานเท่าใดและเพื่อหาช่วงเวลาในการผลิต IgY ที่คุ้มค่าทางการค้าและทางด้านเศรษฐกิจ

3. ควรมีการศึกษาถึงผลของสารภูมิต้านทานต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงต่อการลดปริมาณเชื้อโรคหรือการป้องกันโรคต่อไป เพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาอุตสาห-กรรมการเลี้ยงสัตว์หรือนำมาใช้ประโยชน์ต่อการป้องกันโรคติดเชื้อในคน โดยสามารถนำสารภูมิต้านทานต่อ *S. enterica* serovar Enteritidis ในไข่แดงมาใช้ป้องกันโรค โดยเฉพาะในกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง เช่น เด็ก ผู้สูงอายุและผู้ป่วยด้วยโรคที่ทำให้มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

4. ควรพัฒนาการนำมาใช้เป็นทางเลือกเพื่อป้องกันการติดเชื้อในคน โดยการทำเป็นผงและการนำมาเคลือบด้วย capsule ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เพื่อให้ส่วนของ capsule ไปทำปฏิกิริยากับกรดในกระเพาะอาหารป้องกันไม่ให้เกิดการย่อย IgY ก่อนจับกับเชื้อโรคและเข้าสู่กระแสเลือดได้

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. โรคติดเชื้อในไก่. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

นภาธร บานชื่น. 2532. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศุภวานิช, กรุงเทพมหานคร.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล..2537. อิมมูโนวิทยา.โรงพิมพ์บริษัท เค.พี. พริ้นติ้ง จำกัด กรุงเทพมหานคร.

Akita, E. M., and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J. Food Sci. 57: 629-634.

Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong, C. Pulsrikarn, P.Sawanpanyalert, S. Rene Hendriksen, M. A. Danilo Lo Fo Wong and M. Frank Aarestrup. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. Emerging Infectious Diseases Vol. 10 No. 1: 131-136.

Barbour, E.K., W.M. Frerichs, N.H. Nabbut, P.E. Poss, and M.K. Brinton. 1993. Evualuation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella enteritidis* for prevention of infection in egg-laying chicken. Am. J. Vet. Res. 54:1306-1309.

Bene, V.D., and M.G. Schmidt. 1997. Bacterial virulence factors. In Microbiology and Infectious Diseases. ed. Birell, G., pp66-70 Williams & Wikins.

Brooks, G.F., J.S. Butel, and S.A. Morse. 1998. Medical Microbiology. Appleton& Lange.

Butcher, G. D., and R. D. Miles. 2003. The avian immune system. University of Florida. IFAS EXTENSION.[online] available: http://edis.ifas.ufl.edu.

Carlender, D. 2002. Avian IgY antibody in vitro and in vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine.

Charles, S.K., I. Hussain, C.U.Choi, K.V. Nagaraja, and V. Sivanandan.1994. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmmonella enteritidis* in fection in turkeys. Am. J. Vet. Res. 55: 636-642.

Clark, M.A., M.A. Jepson, N.L., Simmons, and B.H. Hirst. 1994. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's M cells. Res. Microbiol. 145:543-522.

Coleman, M. 2000. Using egg antibodies to treat diseases. pp. 351-370.in Egg Nutrition and Biotechnology. J. S. Sim, S. Nakai., and W. Guenter, ed. CAB International, New York.

Crowther, J.R.1995. ELISA theory and practice. Methods in Molecular Biology Vol.42. Humana Press Totowa, New Jersey.

Erhard M.H., P. Schmidt, P. Zinsmeister, A. Hofmann, U. Munster, B. Kaspers, K.H. Wiesmuller, E.G.Bessler, and M. Stangassinger. 2000. Adjuvant effects of various lipopeptide and interferon-γ on the humoral immune response of chickens. Poult. Sci. 79: 1264-1270.

Fu, C.-Y., H. Huang, X.-M. Wang, Y.-G. Liu, Z.-G. Wang, S.-J. Cui, H.-L. Gao, Z. Li, J.-P. Li, X.-G. Kong. 2006. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. J. Virol. Met. 133:112-115.

Gast, R.K., H.D. Stone, and P.S. Holt. 1993. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterins for reducing faecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. Avian Diseases 37:1085-1091.

Gast, R.K., R. E. Porter, and P.S.Holt. 1997. Assessing the sensitivity of egg yolk antibody testing for detection *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. Poult. Sci. 76:798-801.

Gurtler, M., and K. Fehlhaber. 2004. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk from eggs laid by immunized hens. Inter. J. Food. Microbiol. 90:107-113.

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

Hancock, R. E. W., D.N. Karunaratne, and C. Bernegger-egli. 1994. Moleccular organization and structure role of outer membrane macromolecular. In J.-M. Ghuysen and R. Hackenbck (eds.), Bacterial Cell Wall. Elsevier, Amsterdam, The Natherlands, pp. 263-79.

Hassan, J.O., A.P.A. Mockett, D. Catty, P.A.,and Barrow. 1991. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune response. Avian Diseases. 35:809-819.

Hatta, H., K. Tsuda, M. Ozeki, T. Yamamoto, S. Otake , M. Hirasawa, J. Katz, N. K. Childens, and S. M. Michale. 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 (4): 268-74.

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

Jeurissen S.H., and E. M. Janse. 1989. Distribution and function of non-lymphoid cells in liver and spleen of embryonic and adult chickens. Prog Clin Biol Res. 307:149-157.

Jin, L. Z., K. Baidoo, R. R. Marquardt, and A. A. Frohlich. 1998. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. FEMS Immunol. Med. Microbiol21:313-321.

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.

Kovacs-Nolan, and Y. Mine. 2005. Microencaplulation for the gastric passage and controlled intertinal release release of immunoglobulin Y. J. Immunol. Methods. 296:199-209.

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.

Kumar, S. Y. Kumar, D.V. Malhotra, S. Dhar, and A. K. Nichani. 2003. Standardisation and comparison of serial dilution and single dilution enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using different antigenic preparations of the *Babesia (Theileria)* equi parasite.Vet. Res. 34:71-83.

Larsson, A. Ros-mari Balow, T. L. Lindahl., and Per-olof Forsberg. 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution- A review. Poult. Sci. 72:1807-1812.

Lee, S. B., Y. Mine, and R. M. W. Stevenson. 2000. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. J. Agric. Food. 48:110-115.

Lee, E. N., H. H. Sunwoo. K. Menninen, and J. S. Sim. 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 L.W. Clem. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function:III. Immunoglobulins of the chicken. J. Exper. Med. 130:1337-1352.

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

Locken, M.R., and R.E. Roth.1983. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. Immunol. 49:21-28.

Marquardt R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich, and S. K. Baidoo. 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.

Maya, D. C., M. Vasantha Bai, and L.K. Krishnan. 2002. Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. Toxicon 40: 857-861.

McCally, K. A., C. C. Mok, and R. H. Common. 1692. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. Can. J. Biochem. Physiol. 40: 937-952.

Moat, A.G., J. W. Foster, and M. P. Spector. 2002. Microbila Physiology. Printed in the United States of America.

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

Owusu-Asiedu, A., C.M. Nyachoti, S.K. Baidoo, R.R. Marquardt, and X. Yang. 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 egg yolk antibody. J. Anim. Sci. 81:1781-1789.

Owusu-Asiedu, A., C.M. Nyachoti, and R.R. Marquardt. 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 egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. J. Anim. Sci. 81:1790-1798.

Patterson, R., J.S.Younger, W.O. Weigle, and F.J. Dixon. 1962. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretions of serum proteins by the ovary of the hen. J. Physiol. 45:501-513.

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

Prakash B., T. Suryanarayana, L. Muniyappa and G. Krishnappa. 2005. Evaluation of *Salmonella* Gallinarum outer membrane protein based enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies in vaccineted and infected chicken. Inter. J. Poult Sci. 4 (4): 222-227.

Qureshi M.A., C.L., Heggen, and I. Hussain.2000. Avian macrophage: effector functions in health and disease. Dev. Comp. Immunol 24(2-3):103-119.

Rose, M.E., E. Orlans, and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 4:521-523.

Salmonella spp. [online]: available: **www.heise.de/tp/deutsch/inhalt/co/9698/1.html.**

Schade, R., and A. Hlinak.1996. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. Altex. 13(5) : 5-9.1798.

Schade, R., I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak, and C. Staak. 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Germany.

Schanitman, C.A. 1971. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, triton x-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J. Bacteriology. Vol 108:553-563.

Shin Ji-Hyun, M. Yand, S. W. Nam, J. T. Kim, N. H. Myung, Won-Gi Bang, and I. H. Roe. 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. Clin.Diadn. Lab. Immunol. Vol 9 No. 5: 1061-1066.

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

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

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

Sunwoo, H.H., E.N. Lee, K. Menninen, M.R. Suresh, and J.S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Sci. 67:1486-1495.

Tini M., U.R. Jewell, G. Camenisch, D. Chilov, and M. Gassman. 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp. Biochem. Physiol. Part A 131:569-574.

Tizard, I. 2002. The Avain antibody response. Seminar in Avain and Exotic Pet Medicine, 11: 2-14.

Virella, G., and M.G. Schmidt. 1997. Gram-negative rods II: Enterobacteriaceae and other enteropathogenic Gram-negative rods. In Microbiology and Infectious Diseases, ed. Virella, G., pp. 141-157. Williams & Wklkins.

Yang, H., Z. Jin, Q.Yu, T.Yang, H.Wang, and L. Liu. 1997. The selective recognition of IgY for digestive system cancers. Chin. J. Biotechnol.13:85-90.

Yokoyama, H., R. C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo, Y. Ikemori, and Y. Kodama. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect. Imm. Vol. 60 No. 3: 998-1007.

Yokoyama, H., R. C. Peralta, S. Sendo, Y. Ikemori, and Y. Kodama. 1993. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulin 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., K. Umeda, R. C. Peralta. T. Hashi. F. C. Icatlo, M. Kuroki, Y. Ikemori and Y. Kodama. 1998a. Oral passive immunization against experimental Salmonellaosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. Vaccine, Vol. 16 No. 4: 388-393.

Yokoyama, H., R. C. Peralta, K. Umeda, T. Hashi, F. C. Icatlo, M. Kuroki, Y. Ikemori, and Y. Kodama. 1998b. Prevention of fatal Salmonellaosis in neonatal calves. Using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. AJVR, Vol 59, No.4:416-420.

Wray C. and A. Wray. 2000. *Salmonella* in Domestic Animals. Department of Oral Biology, College of Dentistry, University of Florida, Gainesvill, Florida, USA.427p.

Zhang, W. 2003. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery [on line]. DDT Vol. 8: 364-371. Available:http:www.drugdiscoverytoday.com

ภาคผนวก

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 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ Autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer: Coating buffer

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
NaN_3	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 PBS, pH 7.4 : Blocking solution

skim milk	1	กรัม
PBS, pH 7.4	100	มิลลิลิตร

Citrate buffer

Citric acid	1.05	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ABTS solution

ABTS	15	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ABTS solution buffer

Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
ABTS solution	200	ไมโครลิตร
30% H_2O_2	10	ไมโครลิตร

ตารางการเปรียบเทียบระดับหรือปริมาณภูมิต้านทานในซีรั่มและไข่แดงที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันไก่ด้วย whole cell และ OMPs ของ *S. enterica* serovar Enteritidis

Antibody titre (log_{10} titre)						
สัปดาห์	whole cell			OMPs		
	serum	WSF	p-value	serum	WSF	p-value
0	<2.7	<2.0		<2.7	<2.0	
1	3.17 ± 0.16	2.21 ± 0.10	p<0.01	2.87 ± 0.10	2.48 ± 0.11	p<0.05
2	4.29 ± 0.13	2.75 ± 0.13	p<0.01	4.08 ± 0.16	2.99 ± 0.12	p<0.01
3	3.84 ± 0.15	3.51 ± 0.20	p>0.05	3.96 ± 0.15	3.26 ± 0.19	p<0.01
4	3.33 ± 0.13	3.84 ± 0.11	p<0.01	4.35 ± 0.16	3.66 ± 0.17	p<0.01
5	4.35 ± 0.11	3.69 ± 0.09	p<0.01	4.63 ± 0.10	3.69 ± 0.08	p<0.01
6	4.38 ± 0.16	3.69 ± 0.14	p<0.01	4.63 ± 0.08	4.02 ± 0.05	p<0.01
7	4.60 ± 0.13	3.90 ± 0.11	p<0.01	4.66 ± 0.10	4.08 ± 0.03	p<0.01
8	4.41 ± 0.13	3.90 ± 0.09	p<0.01	4.48 ± 0.11	3.96 ± 0.08	p<0.01

หมายเหตุ แสดงค่าเฉลี่ย ± standard error

ประวัติผู้เขียน

นางสาววัลภา ลาภภักดี เกิดเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2523 ภูมิลำเนา จังหวัดสมุทรสาคร ศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนรัตนโกสินทร์สมโภชบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพมหานคร และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2539 ศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2545 และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2546 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2549