

การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี PCR-RFLP



นางสาว ศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN: 974-17-5911-8

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE SPECIES DIFFERENTIATION OF *EIMERIA* IN CHICKEN BY PCR-RFLP



Miss Silamon Choosaksaengthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pathology

Department of Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Acedemic Year 2004

ISBN: 974-17-5911-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี PCR-RFLP  
โดย                              นางสาวศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง  
ภาควิชา                              พยาธิวิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา              อ.สพ.ญ.ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม        รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม        นางสุดจิตต์ จุ่งพิพัฒน์

---

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ น.สพ. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. เล็ก อัสวพลังชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(อาจารย์ สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(นางสุดจิตต์ จุ่งพิพัฒน์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ  
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. มานพ ม่วงใหญ่)

ศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง : การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี PCR-RFLP (THE SPECIES DIFFERENTIATION OF *EIMERIA* IN CHICKEN BY PCR-RFLP) อ. ที่ปรึกษา: อ.สพ.ญ.ดร. นาวิรัตน์ วิเศษกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. สพ.ญ.ดร. สุวรรณิ นิธิอุทัย, นางสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์, 89 หน้า. ISBN : 974-17-5911-8

โรคบิดในไก่ เป็นโรคโปรโตซัวมีสาเหตุมาจากเชื้อบิดในสกุล *Eimeria* โดยทั่วไปพื้นฐานของการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในไก่เป็นการแยกจากลักษณะรูปร่างของเชื้อบิดและบริเวณตำแหน่งในลำไส้ของไก่ที่ติดเชื้อบิด ซึ่งจากหลักการนี้พบว่า การตรวจแยกความแตกต่างชนิดของเชื้อบิดในบางครั้งให้ผลไม่น่าเชื่อถือ จึงได้มีการพัฒนานาวิวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) มาใช้เพื่อแยกชนิดเชื้อบิด โดยเพิ่มปริมาณ DNA ตรงบริเวณ 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA gene) ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกชนิดเชื้อบิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu I*, *Hha I*, *Hpa II* และ *Hae III* โดยความไวของวิธี PCR นั้นอยู่ที่ 0.12 โอไอซิสต์ และความไวของวิธี PCR-RFLP อยู่ที่ 8 โอไอซิสต์ และวิธีนี้ยังมีความจำเพาะต่อเชื้อบิด *Eimeria* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ที่สกัดจากปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ และแพะ ได้แก่ *Raillietina cesticillus*, *R. chinobothrida*, *R. tetragona*, *Ascaridia galli*, *Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae*, *Tetrameres* spp. และ *Trichostrongylus* spp.

จากการศึกษาแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ประกอบด้วยเชื้อบิด 3 ชนิด คือ *E. tenella* มีปริมาณสัมพัทธ์มากที่สุดคือ 64%, *E. necatrix* 32% และ *E. maxima* 4% และเชื้อบิดที่ประกอบอยู่ในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) มีอย่างน้อย 4 ชนิด คือ *E. acervulina* มีปริมาณสัมพัทธ์มากที่สุดคือ 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% และ *E. tenella* 3% โดยการแยกชนิดของเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ที่กระจายอยู่ตามลำไส้ส่วนต่างๆ ได้แก่ ลำไส้ส่วนต้น พบเชื้อบิด 2 ชนิดคือ *E. acervulina* ปริมาณสัมพัทธ์ 84% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 พบเชื้อบิด 4 ชนิด ได้แก่ *E. necatrix* ปริมาณสัมพัทธ์ 26%, *E. acervulina* 21%, *E. tenella* 14% และ *E. maxima* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 พบเชื้อบิด 3 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพัทธ์ 69%, *E. necatrix* 7% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนท้าย พบเชื้อบิดได้ 3 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพัทธ์ 73%, *E. necatrix* 16% และ *E. tenella* 7% และไส้ตันพบเชื้อบิดได้ 3 ชนิด คือ *E. tenella* ปริมาณสัมพัทธ์ 52%, *E. necatrix* 43% และ *E. maxima* 4% ส่วนไก่ที่ติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถแยกชนิดเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นได้ 2 ชนิด คือ *E. acervulina* ปริมาณสัมพัทธ์ 73% และ *E. maxima* 3% ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 พบเชื้อบิด 2 ชนิด คือ *E. maxima* ปริมาณสัมพัทธ์ 90% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 พบเชื้อบิด 2 ชนิด คือ *E. maxima* ปริมาณสัมพัทธ์ 94% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนท้าย พบเชื้อบิด 2 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพัทธ์ 87% และ *E. tenella* 8% และไส้ตัน พบเชื้อบิด 3 ชนิด คือ *E. necatrix* ปริมาณสัมพัทธ์ 45%, *E. tenella* 40% และ *E. maxima* 13%

ดังนั้นวิธี PCR-RFLP สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อบิดในไก่ได้ โดยมีความไวและความจำเพาะที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัยและยังสามารถยืนยันได้ว่าพบเชื้อบิด *E. tenella* หรือ *E. maxima* ได้ทุกบริเวณของลำไส้ไก่อีกด้วย

ภาควิชา พยาธิวิทยา

สาขาวิชา พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อผู้พิมพ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4475571931 : MAJOR Pathobiology

KEYWORDS : *Eimeria* spp./ *E. tenella* CB 38/ Immucox<sup>®</sup> (I) vaccine/ 18S rRNA gene/ PCR-RFLP

SILAMON CHOOSAKSAENGTHONG ; THE SPECIES DIFFERENTIATION OF *EIMERIA* IN CHICKEN BY PCR-RFLP. THESIS ADVISOR : NAREERAT VISESHAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR. SUWANNEE NITHIUTHAI, Ph.D., SUDCHIT CHUNGPIVAT, M.Sc. 89 pp. ISBN: 974-17-5911-8

Avian coccidiosis is a protozoan disease caused by the genus *Eimeria*. Basically, species of *Eimeria* in chicken is distinguished by the distinct morphology and parasitic deposited sites in intestine of the infected animals. The criteria of *Eimeria* species differentiation when the disease occurred is sometime unreliable. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was developed to differentiate species of *Eimeria*. The conserved region of 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA gene) was amplified by PCR to yield the product of 422 bp. The RFLP patterns were analyzed by *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II and *Hae* III. The sensitivity of the PCR technique was to detect at least 0.12 oocysts and PCR-RFLP was able to give the RFLP patterns by using at least 8 oocysts. The specificity of PCR-RFLP was compared to DNA extracted from *Raillietina cesticillus*, *R. Echinobothrida*, *R. Tetragona*, *Ascaridia galli*, *Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae*, *Tetrameres* spp. และ *Trichostrongylus* spp.

By using the technique of PCR-RFLP, *E. tenella* CB38 is a mixture of at least 3 *Eimeria* spp.; *E. tenella* 64%, *E. necatrix* 32% and *E. maxima* 4% while Immucox<sup>®</sup> (I) comprises at least 4 species; *E. acervulina* 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% and *E. tenella* 3%. To identify *Eimeria* spp. of *E. tenella* CB38 isolated from the upper part of the intestine revealed the combination of species *E. acervulina* 84% and *E. tenella* 6%. The proximal part of the intestine was infected with *E. necatrix* 26%, *E. acervulina* 21%, *E. tenella* 14% and *E. maxima* 6%. The distal part of the intestine was infected with *E. maxima* 69%, *E. necatrix* 7% and *E. tenella* 6%. The lower part of the intestine was infected with *E. maxima* 73%, *E. necatrix* 16% and *E. tenella* 7%. Lastly, caecum was infected with *E. tenella* 52%, *E. necatrix* 43% and *E. maxima* 4%. While the identification of *Eimeria* spp. containing in the live-vaccine, Immucox<sup>®</sup> (I), the upper part of the infected intestine revealed the combination of species; *E. acervulina* 73% and *E. maxima* 3%. The proximal part of the intestine was infected with *E. maxima* 90% and *E. tenella* 6%. The distal part of the intestine was infected with *E. maxima* 94% and *E. tenella* 6%. The lower part of the intestine was infected with *E. maxima* 87% and *E. tenella* 8%. Lastly, the caecum, it was infected with *E. necatrix* 45%, *E. tenella* 40% and *E. maxima* 13%.

Therefore the technique of PCR-RFLP on 18S rRNA gene was able to perform a differential diagnosis of avian coccidiosis caused by *Eimeria* spp. Nonetheless, by using this method, *E. tenella* and *E. maxima* could be found in all part of the infected intestine.

Department Pathology

Field of study Veterinary Pathology

Academic year 2004

Student signature.....

Advisor 's signature.....

Co-advisor 's signature.....

Co-advisor 's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.สพ.ญ.ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ได้แก่ รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณิ นิธิอุทัย คุณสุดจิตต์ จุ่งพิพัฒน์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รศ.น.สพ.ดร. มานพ ม่วงใหญ่ ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ที่อนุเคราะห์ให้ทดลอง รศ.ดร. สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา และอ.สพ.ญ. วรพร สุขุมาวาสี ที่ให้คำแนะนำและกำลังใจ รศ.สพ.ญ.ดร. สันนิภา สุรทัตต์ ที่สอนการใช้โปรแกรม scion image และผศ.สพ.ญ.ดร. มีนา สารีกะภูติ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ และการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณจุฑามาศ ดอนทอง และบุคคลากรในหน่วยผลิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ และ นางสาวศิริลักษณ์ เจนช่างกล ที่ช่วยเหลืองานในด้านต่างๆ ตลอดทำการทำวิจัย และนิสิตปริญญาโทภาคพยาบาลวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณบริษัทไปโอจีโนเมด ที่เอื้อเฟื้อชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพเจล และบริษัท Fort Dodge ที่เอื้อเฟื้อวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

ท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา และทุกคน ในครอบครัวที่ให้ความรัก ความห่วงใยและกำลังใจที่มีค่ายิ่งด้วยดีตลอดมา จนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เชื้อบิวด.....	4
2.2 วงชีวิต.....	6
2.3 อาการทางคลินิก.....	7
2.4 พยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยา.....	8
2.5 การตรวจวินิจฉัย.....	9
2.6 ชีววิทยาของ Ribosome.....	11
2.7 การวินิจฉัยด้วย PCR-RFLP ในปัจจุบัน.....	12
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 ไก่ทดลองและการเตรียมไก่ทดลอง.....	13
3.1.1 ไก่ทดลอง.....	13
3.1.2 การเตรียมไก่ทดลอง.....	13
3.1.2.1 การเตรียมห้องเลี้ยงไก่ทดลอง.....	13
3.1.2.2 การทำกล่องเลี้ยงไก่ทดลอง.....	14
3.1.2.3 การเตรียมไก่ทดลอง.....	14
3.2 เชื้อบิวดอ้างอิงและการเตรียมเชื้อบิวด.....	15

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.1 เชื้อบิตอ้างอิง.....	15
3.2.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อ <i>E. tenella</i> CB38 (Propagation of Parasites).....	15
3.2.3 การเตรียมเชื้อบิต.....	15
3.3 การทดลอง.....	16
3.3.1 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตจาก stock ของ <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ก่อนป้อนเชื้อบิตให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	16
3.3.2 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	16
3.3.2.1 การป้อนเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38.....	16
3.3.2.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I).....	17
3.3.2.3 การตรวจหาโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ ด้วยวิธี Floatation Concentration และการนับจำนวนโอโอซิสต์ ด้วยวิธี McMaster Chamber หลังจากได้รับเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน.....	17
3.3.2.4 วิธีการแบ่งลำไส้และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่ แตกต่างกัน.....	17
3.3.2.4.1 การศึกษารอยโรคจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับ เชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อ เป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า.....	18



สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2.4.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผนังลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ ที่แตกต่างกัน สำหรับสกัด DNA.....	19
3.3.2.4.3 การตรวจหาเชื้อบิดจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ ที่แตกต่างกัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....	19
3.4 การสกัด DNA.....	19
3.4.1 การสกัด DNA จาก Stock ของเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) .....	19
3.4.2 การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อผนังลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) .....	20
3.5 การออกแบบไพรเมอร์.....	21
3.6 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR.....	21
3.7 การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ.....	22
3.8 การทดสอบความไวของวิธี PCR-RFLP.....	23
3.9 การทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP.....	23
3.10 ศึกษาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิด.....	24
3.11 การวิเคราะห์และประเมินผล.....	24
4 ผลการทดลอง.....	25

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1 การตรวจหาโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Floatation Concentration และวิธี McMaster chamber.....	25
4.2 การตรวจให้คะแนนรอยโรคที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า.....	26
4.3 การตรวจหาเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....	26
4.4 ความไวของวิธี PCR-RFLP ที่มีกับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38.....	32
4.5 ความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ <i>Eimeria</i> spp. ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	33
4.6 การแยกชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดจาก <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ก่อนป้อนเชื้อบิดให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	37
4.6.1 เชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38.....	37
4.6.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) .....	37
4.7 การแยกชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด <i>E. tenella</i> CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	40
4.7.1 <i>E. tenella</i> CB38.....	40
4.7.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) .....	41
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	49
รายการอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	66
ประวัติผู้เขียนผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	89

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	เปรียบเทียบตำแหน่งรอยโรค ชนิดของเชื้อบิต ขนาดของโอโอซิสต์ พิสัยความยาว และพิสัยความกว้าง ที่พบได้ในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่.....5
3.1	ขนาดของ DNA ของเชื้อบิต <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i> และ <i>E. tenella</i> หลังการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>AluI</i> , <i>Hha I</i> , <i>Hpa II</i> และ <i>Hae III</i> .....23
4.1	ผลการตรวจให้คะแนนรอยโรคในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า.....28
4.2	ผลการตรวจพบรอยโรคในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า..... 29
4.3	ผลการตรวจพบเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง..... 30
4.4	ผลการตรวจพบเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....31

## สารบัญภาพ

### ภาพที่ หน้า

2.1	รูปร่าง sporozoite ของสัตว์เซลล์เดียวใน Phylum Apicomplexa.....	6
2.2	วงชีวิตของ <i>Eimeria tenella</i> .....	7
3.1	ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลางที่1 ลำไส้ส่วนกลางที่2 ลำไส้ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่.....	17
4.1	ค่าเฉลี่ยผลการตรวจนับจำนวนโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังป้อนเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี McMaster Chamber หลังป้อนเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 ด้วยวิธี McMaster Chamber Method.....	27
4.2	ค่าเฉลี่ยผลการตรวจนับจำนวนโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี McMaster Chamber .....	27
4.3	ความไวของเทคนิค PCR ต่อเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 จำนวนเทียบเท่า 0.12 โอโอซิสต์...	32
4.4	ความไวของเทคนิค PCR-RFLP ต่อ DNA ของ เชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38 จำนวนเทียบเท่า 8 โอโอซิสต์.....	33
4.5	ความจำเพาะของวิธี PCR กับ 18S rRNA gene ของ <i>Eimeria</i> spp. ต่อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่.....	35
4.6	ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP กับ 18S rRNA gene ที่แตกต่างกันระหว่าง <i>E. tenella</i> CB38 กับ <i>Trichostrongylus</i> spp. ....	36
4.7	ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP กับ 18S rRNA gene ของ <i>Eimeria</i> spp. ในการแยกชนิดเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB38.....	38
4.8	ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP กับ 18S rRNA gene ของ <i>Eimeria</i> spp. ในการแยกชนิดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) .....	39
4.9	ผลผลิตของ PCR ตั้งแต่วันที่ 0-7 หลังจากได้รับเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB 38.....	43
4.10	ผลในการแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต <i>E. tenella</i> CB 38 ด้วยวิธี PCR-RFLP.....	44
4.11	ผลผลิตของ PCR ตั้งแต่วันที่ 0-7 หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I).....	46
4.12	ผลในการแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox <sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี PCR-RFLP .....	47

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคบิดไก่ (Avian coccidiosis) มีสาเหตุมาจากสัตว์เซลล์เดียวในสกุล *Eimeria* พบได้ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hageni*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox*, *E. necatrix* และ *E. tenella* (Thebo et al., 1998; McDougald and Reid, 1991) โดยเชื้อบิดที่สำคัญและก่อให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจมี 7 ชนิด คือ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. necatrix* และ *E. tenella* (Rose and Long, 1980; Williams, 1998) และชนิดที่มีความสำคัญและก่อโรครุนแรงมากที่สุดมีอยู่ 4 ชนิดคือ *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina* และ *E. maxima* ตามลำดับความรุนแรง (Roberson, 1995)

เชื้อบิดสามารถส่งผลกระทบต่อแตกต่างกันไปในไก่แต่ละประเภท เช่นในไก่กระทง สูญเสียน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average Daily Gain: ADG) ประมาณ 50-100 กรัมต่อตัว และอัตราการเจริญเติบโตลดลง 4-10% ต่อตัว เนื่องจากความสามารถในการดูดซึมอาหารในลำไส้ของไก่ลดลง เป็นผลทำให้สูญเสียอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio: FCR) ส่วนในไก่ไข่และไก่พ่อแม่พันธุ์พบว่าการระบาดของโรคบิดอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เป็ไก่รุ่น ทำให้ระยะเวลาการวางไข่ครั้งแรกล่าช้า (Delayed egg production) และตายมากกว่า 50% เมื่อติดเชื้อบิด รวมทั้งทำให้ไก่สูญเสียลักษณะมาตรฐานตามพันธุ์ เช่น มีขนาดเล็กกว่าปกติ (ถวิล, 2498; ประจักษ์, 2525)

จากปัญหาโรคบิดที่เกิดขึ้นเป็นประจำในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ ทำให้ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาวิธีป้องกันโรคบิดของฟาร์มไก่ส่วนใหญ่ มักกระทำโดยการให้ยากันบิด แต่ในขณะที่เดียวกันก็พบว่าในฟาร์มไก่ที่มีการให้ยากันบิด ยังคงตรวจพบไก่ที่เป็นโรคบิดได้อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการให้ยากันบิดที่ไม่ได้ผล อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อบิดมีการดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการจัดการภายในฟาร์มที่ไม่ดี เช่น วัสดุรองนอนชื้นแฉะทำให้โอโอซิสต์ (oocyst) สามารถพัฒนาไปเป็นระยะติดโรค (sporulated oocyst) ได้ นอกจากนี้การมีโอโอซิสต์ปนเปื้อนในน้ำและอาหาร การระบายอากาศที่ไม่ดี และความหนาแน่นของการเลี้ยงต่อฝูงมากเกินไป ล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคบิดได้ทั้งสิ้น (Ruff, 1993) ทำให้มีการนำวัคซีนมาใช้ในการป้องกันโรคบิดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพบว่าได้ผลดีกว่าการให้ยาต้านบิด นอกจากนี้การให้วัคซีนยังทำให้ไก่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้นานขึ้นหลังจากมีการติดเชื้อบิดติดต่อกัน 2-3 ครั้ง (Joyner and Norton, 1973; Long et al., 1986; Vermeulen et al., 2001) โดยวัคซีนป้องกันโรคบิดมีด้วยกัน 2 ประเภท คือ ประเภท virulent vaccine และ attenuated vaccine ที่ประกอบด้วยโอโอซิสต์ของเชื้อบิดชนิดต่างๆ (oocyst

vaccine หรือ lived vaccine) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง virulent vaccine ผู้ใช้จะต้องมีการควบคุมปริมาณของวัคซีนที่ใช้อย่างระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดโรครุนแรงหลังการให้วัคซีน (Shirley, 1992) เพราะไม่สามารถทราบถึงปริมาณที่แท้จริงของชนิดเชื้อบิตในวัคซีนได้ จึงทำให้ในบางครั้งการเกิดโรคบิตในไก่อาจมีผลมาจากการให้วัคซีนก็เป็นได้ (Shirley et al., 1983)

การควบคุมโรคบิต ประกอบไปด้วย การป้องกัน การรักษา รวมทั้งการจัดการฟาร์ม ให้ได้อย่างเหมาะสม ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยส่วนใหญ่ของการตรวจวินิจฉัย เพื่อแยกชนิดของเชื้อบิต ทำได้โดยตรวจสอบระยะเวลาก่อนปรากฏโรค (Prepatent period) หรือแยกขนาดโอไอเอสต์ของเชื้อบิต และศึกษาจากตำแหน่งและรอยโรคของเชื้อบิตแต่ละชนิด รวมทั้งการชูดเนื้อเยื่อบริเวณ mucosal จากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน และการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของผนังลำไส้ (Mattiello et al., 2000) แต่เนื่องจากการแยกชนิดของเชื้อบิตด้วยวิธีการต่างๆ เหล่านี้ ยังคงให้ผลการตรวจที่คลาดเคลื่อน เช่น ขนาดของโอไอเอสต์ที่มีความใกล้เคียงกันในแต่ละชนิดของเชื้อบิต โดยเฉพาะขนาดของโอไอเอสต์ระหว่างเชื้อบิต *E. tenella* และ *E. necatrix* ที่มีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก นอกจากนี้ตำแหน่งรอยโรคที่เกิดขึ้นบริเวณลำไส้ของเชื้อ *E. acervulina* และ *E. praecox* อาจเกิดขึ้นในตำแหน่งเดียวกันคือ ลำไส้ส่วนต้น จึงทำให้การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อบิตอาจคลาดเคลื่อนได้ (Barta et al., 1997) ซึ่งวิธีการแยกชนิดเชื้อบิตที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จำเป็นต้องอาศัยความสามารถของผู้ตรวจที่มีความชำนาญสูง ในการแยกชนิดของเชื้อบิตเหล่านี้ออกจากกันได้ (Long and Joyner, 1984)

ปัจจุบันได้มีการนำวิธีทางด้าน อณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics) มาใช้ในการแยกชนิดเชื้อบิตไก่ (Ellis and Bumstead, 1990; McPherson and Gajadhar, Proconier et al., 1993; Shirley, 1994b; Shirley, 1996; Tsuji et al., 1997; Woods et al., 2000; Gasser et al., 2001) เพราะความรู้ทางด้านนี้ช่วยพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยให้มีความไวและความจำเพาะสามารถตรวจหาและแยกความแตกต่างของเชื้อบิตแต่ละชนิดได้ ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อบิตที่ยังมีชีวิตในปริมาณมากหรืออาจใช้เชื้อบิตที่ตายแล้วแต่ยังมี DNA อยู่ (Weiss, 1995) และเป็นวิธีการตรวจที่ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการตรวจหาปรสิตโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

ดังนั้นความรู้ทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของเชื้อบิต สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแยกชนิดเชื้อบิตได้ โดยอาศัยความรู้พื้นฐานของสารพันธุกรรม (DNA) ไม่ว่าจะเป็น วิธี PCR (Polymerase chain reaction) (Stucki et al., 1993) และวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) หรือวิธี RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Costa et al., 2001) และสำหรับประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการประยุกต์ใช้วิธีเหล่านี้ในการศึกษาการจำแนกชนิดเชื้อบิตไก่ หรือจำแนกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ที่ติดเชื้อบิตแต่อย่างใด

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของเชื้อบิดจากเชื้อบิด *E. tenella* strain CB38 (Laboratory isolation) และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) (virulent vaccine) เป็นแหล่งของเชื้อบิด ซึ่งประกอบด้วยเชื้อบิด 4 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* และศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene เพื่อศึกษาความหลากหลาย (polymorphisms) ของเชื้อบิดไก่ชนิดต่างๆ รวมทั้งศึกษาความไวและความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR-RFLP

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจแยกชนิดเชื้อบิด *Eimeria* spp. ที่บริเวณ 18S rRNA gene ด้วยวิธี PCR-RFLP
2. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ (relative quantitative) ของเชื้อบิด จากเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) เป็นแหล่งของเชื้อ และตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีน Immucox<sup>®</sup> (I) ในปริมาณแตกต่างกัน

## 1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

1. วิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดไก่ได้จริงหรือไม่
2. วิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดที่บริเวณ 18S rRNA gene ในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในปริมาณแตกต่างกันได้หรือไม่

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เพื่อใช้ 18S rRNA gene เป็น genetic marker ที่มีความไวและความจำเพาะในการจำแนกชนิดของเชื้อบิดในไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP ได้ในขั้นมาตรฐาน
2. ทำให้ทราบชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของเชื้อบิดที่อยู่ใน *E. tenella* CB38 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)
3. เพื่อนำวิธี PCR-RFLP มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาโรคบิดในฟาร์มไก่ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาและวัคซีนในการป้องกันโรคบิด ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เชื้อบิด

เชื้อบิดไส้สกุล *Eimeria* เป็นสัตว์เซลล์เดียวที่จัดทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้คือ:

Phylum: Apicomplexa

Class: Sporozoasida

Subclass: Coccidiasina

Order: Eucoccidiorida

Suborder: Eimeriorina

Family: Eimeriidae

Genus: *Eimeria*

เชื้อบิดสกุล *Eimeria* มีระยะของเชื้อที่สามารถฝังตัวและทำลายเซลล์ลำไส้ได้หลายระยะ ได้แก่ ระยะ sporozoites (ดังรูปที่ 2.1) ระยะ merozoites และระยะอื่นๆ โดยจะใช้ส่วนของ apical poles นำเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์ (Shirley, 1992) ซึ่ง apical poles ประกอบด้วย polar ring microneme rhoptries conoid และ subpellicular microtubule (Shotysec, 1973) โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจะมีทั้งระยะที่เกิดภายในเซลล์ของโฮสต์ (endogenous phase) คือ schizogony และ gametogony และระยะที่เกิดภายนอกเซลล์ของโฮสต์ (exogenous phase) คือ sporogony ซึ่งเมื่อโอโอซิสต์เจริญพัฒนาเป็น sporulated oocyst ที่ประกอบไปด้วย 4 sporocyst แต่ละ sporocyst ภายในมี 2 sporozoites จึงกลายเป็นระยะการติดต่อสู่โฮสต์

เชื้อบิดในสัตว์ปีกมีด้วยกัน 9 ชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีรูปร่าง ขนาดของโอโอซิสต์และคุณลักษณะอื่นๆ ที่แตกต่างกันไป คือ กลม เกือบกลม รูปไข่ หรือรูปรี โดยผนังของโอโอซิสต์มี 2 ชั้น มองเห็นได้ชัดเจนและใสไม่มีสี แต่ผนังของโอโอซิสต์บางชนิดก็อาจมีสีเหลือง หรือสีเขียวได้ และตำแหน่งรอยโรคที่เกิดจากเชื้อบิดแต่ละชนิดก็แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1

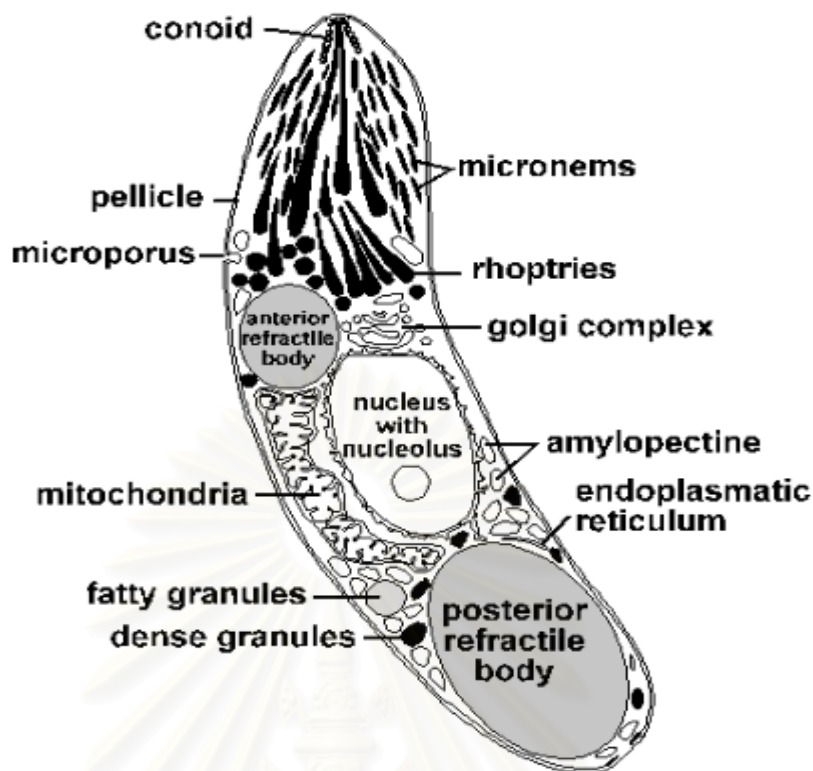


ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบตำแหน่งรอยโรค ชนิดของเชื้อบิด ขนาดของโอโอซิสต์ พิสัยความยาว และพิสัยความกว้าง ที่พบได้ในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่

ตำแหน่งรอยโรค	ชนิดของเชื้อบิด	ขนาดโอโอซิสต์	พิสัยความยาว×พิสัยความกว้าง (ไมโครเมตร)
ลำไส้ส่วนต้น	<i>E. acervulina</i>	เล็ก	(17.7-20.2 × 13.7-16.3)
	<i>E. hageni</i>	เล็ก	(15.8-20.9 × 14.3-19.5)
	<i>E. praecox</i>	ใหญ่	(19.8-24.7 × 15.7-19.8)
ลำไส้ส่วนต้นและส่วนกลาง	<i>E. mivati</i>	เล็กมาก	(11.1-19.9 × 10.5-16.2)
ลำไส้ส่วนกลาง	<i>E. necatrix</i>	กลาง	(13.2-22.7 × 11.3-18.3)
	<i>E. maxima</i>	ใหญ่	(21.5-42.5 × 16.5-29.8)
ลำไส้ส่วนกลางและส่วนล่าง	<i>E. mitis</i>	เล็กมาก	(11.7-18.7 × 11.0-18.0)
ลำไส้ส่วนท้าย	<i>E. brunetti</i>	ใหญ่	(20.7-30.3 × 18.1-24.2)
ไส้ตัน	<i>E. tenella</i>	กลาง	(19.5-26.0 × 16.5-22.8)

ที่มา: McDougald and Reid, 1991

เชื้อบิดเป็นปรสิตที่ตรวจพบได้ในสัตว์เกือบทุกชนิดและการค้นพบเชื้อปรสิตในสัตว์เกิดขึ้นมาเป็นเวลานานกว่า 300 ปีแล้ว และเชื้อบิดเป็นโปรโตซัวชนิดแรกที่ยังมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในปี ค.ศ. 1674 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Leewenhock ได้ตรวจพบโอโอซิสต์ของเชื้อบิดในอุจจาระของกระต่าย ต่อมาในปี ค.ศ. 1865 Stieda ได้บรรยายถึงลักษณะของแต่ละ sporocyst ของ *E. stiedai* ซึ่งเป็นระยะพัฒนาการเจริญเติบโตในช่วงแรกของโอโอซิสต์ในปี ค.ศ. 1870 Eimer พบว่าโอโอซิสต์ของเชื้อบิด *Gregorina falciiformis* ในหนูมีด้วยกัน 2 ลักษณะที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อและแพร่กระจายในหนูได้ ต่อมาได้มีการศึกษาวงจรชีวิต ของเชื้อบิด *E. schubergi* ในตะขาบ โดย Schaudinn ในปี ค.ศ. 1900 หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1926 Wenyon และในปี ค.ศ. 1973 Levine ได้ตรวจพบ unsporulated oocyst และได้ตีพิมพ์เอกสารของโรคบิดในไก่ที่เกิดจากเชื้อบิด *E. avium* เป็นครั้งแรก และในปี ค.ศ. 1929 พบว่าเชื้อบิด *E. avium* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากในการเลี้ยงไก่ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อบิดชนิดนี้ได้ในไก่ป่า พันธุ์ต่างๆ นกกระจอกเทศ และไก่วง โดยสามารถตรวจพบเชื้อบิดที่เกิดขึ้นในไก่ได้มากกว่า 1 ชนิด (Joyner, 1985) จนกระทั่งปัจจุบันนี้ พบว่าเชื้อบิดในไก่มีด้วยกัน 9 ชนิด ดังได้กล่าวข้างต้น และยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคบิดที่กลายเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ทั่วโลก (Molloy et al., 1998; Schnitzler et al., 1999 และ Woods et al., 2000)

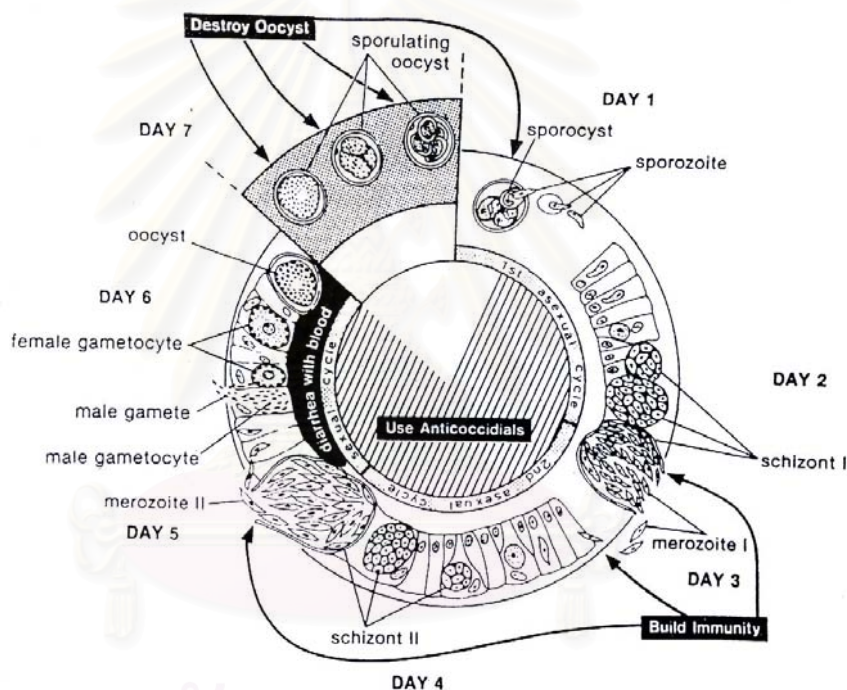


รูปที่ 2.1 รูปร่าง sporozoite ของสัตว์เซลล์เดียวใน Phylum Apicomplexa

## 2.2 วงชีวิต

วงชีวิตของเชื้อบิดแต่ละชนิดจะไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเริ่มต้นจากการที่ไกกิน sporulated oocyst (โอโอซิสต์ระยะติดต่อก) ที่ปนอยู่ในอุจจาระ วัสดุรองพื้น น้ำ และอาหารเข้าไป (Bains, 1979) ต่อมาจะถูกกระเพาะบด (gizzard) และน้ำย่อยบดผนังของโอโอซิสต์ให้แตกออก และปล่อย sporocyst ออกมา เมื่อ sporocyst เดินทางไปถึงลำไส้เล็ก จะถูกน้ำย่อยเช่น chymotrypsin หรือ น้ำดี (bile) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) กระตุ้นให้ sporocyst แตกออกแล้วปล่อย sporozoite ออกมา sporozoite จะเข้าไปฝังตัวอยู่ในเยื่อผนังลำไส้หรือใต้ต้นตามแต่ชนิดของเชื้อบิด (Allen and Fetterer, 2002) หลังจากที่ sporozoite ฝังตัวเข้าไปในเซลล์ของชั้นเยื่อบุผิว (epithelial cell) แล้ว จะเปลี่ยนเป็นระยะ trophozoite ซึ่งมีขนาดเล็กและค่อนข้างกลม และจะถูกล้อมรอบด้วย parasitophorous vacuole ซึ่งเป็นช่องว่างที่เกิดขึ้นระหว่าง trophozoite และ cytoplasm ของเซลล์โฮสต์ จากนั้น trophozoite จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแบบ schizogony หรือ merogony ซึ่งเป็นการแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ โดยที่นิวเคลียสของ trophozoite จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้ปริมาตรมีขนาดใหญ่ขึ้น ต่อมาจะกลายเป็นระยะที่เรียกว่า schizont หรือ meront โดยในระยะแรกยังเจริญไม่เต็มที่เรียกว่า immature schizont หรือ immature meront และปริมาตรจะเปลี่ยนรูปร่างให้ยาวขึ้น (spindle shape) เรียกว่า merozoite ซึ่งเป็นระยะที่ schizont เจริญเต็มหรือเรียกว่า mature schizont และในที่สุด merozoites เหล่านี้จะ

ต้นโฮสต์เซลล์ให้แตกออก ความแตกต่างของจำนวนรอบของการเจริญแบบไม่มีเพศนี้อาจจะมีตั้งแต่ 2-4 รอบตามชนิดของเชื้อบิด โดยการเจริญระยะไม่มีเพศครั้งที่ 2 (second generation schizogony) ของเชื้อบิดชนิด *E. tenella* และ *E. necatrix* จะเป็นระยะที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ไก่แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงและอาจถึงตายได้ จากนั้นก็จะเริ่มเข้าสู่ระยะมีเพศ เรียกว่า gametogony หรือ gamogony โดย microgametes จะแตกออกมาจาก microgametocyte แล้วเคลื่อนที่เข้าไปผสมกับ macrogamete ได้ zygote ซึ่งเมื่อเจริญเต็มที่จะกลายเป็น unsporulated oocyst และถูกขับปนออกมาในอุจจาระ จากนั้นจะพัฒนาเป็นระยะ sporulated oocyst นอกตัวไก่หรือตามวัสดุรองนอน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน โดยอาศัยปัจจัย 3 ประการ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสม ปริมาณออกซิเจน และความชื้น ดังรูปที่ 2.2 (McDougald and Reid, 1991)



รูปที่ 2.2 วงชีวิตของ *Eimeria tenella* (McDougald and Reid, 1991)

### 2.3 อาการทางคลินิก

ไก่ที่ติดเชื้อบิดแต่ละชนิดจะแสดงอาการแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อบิด จำนวนโอโอซิสต์ที่ได้รับ อาหาร สภาพของไก่ การจัดการภายในฟาร์ม โปรแกรมวัคซีนและการสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกายได้อย่างเหมาะสม อายุของไก่ พันธุกรรมของไก่และการติดเชื้อหลายชนิดพร้อมกัน (Vermeulen et al., 2001) ปัจจัยเหล่านี้เป็นผลทำให้โรคบิดมีทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ แต่อาการที่พบได้ส่วนใหญ่ในไก่ที่ติดเชื้อบิด คือ อาจมีอุจจาระร่วงมีเลือดปน อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการไข่ลดลง หรือพบว่าไก่กินอาหารลดลงเนื่องจาก

กระบวนการย่อยหรือดูดซึมอาหารลดลง ซึ่งเป็นผลจากผนังลำไส้ถูกทำลายจากเชื้อบิด รวมทั้งเกิดการสูญเสียน้ำ(dehydration) สูญเสียเลือด และไก่จะมีความไวต่อโรคอื่นๆ มากขึ้น เช่น การติดเชื้อ *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิด necrotic enteritis ได้ หรือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่อาจเกิดร่วมกับโรคบิดได้ (Van der Stroom and van der Sluis, 1999)

จากการทดลองของ McDougald และ Reid (1991) ได้ทำการป้อนโอโอซิสต์ของ *E. tenella* จำนวน 100,000 โอโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว พบว่าไก่อมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงขึ้น และมีน้ำหนักลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ได้รับโอโอซิสต์จำนวน 1-3,000 โอโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ซึ่งไม่พบอัตราการตายของไก่ แต่พบว่ามีอัตราการป่วยและอัตราการเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้จำนวนของเชื้อบิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อไก่ได้แล้วนั้น ยังพบว่าชนิดของเชื้อบิดก็สามารถส่งผลกระทบต่อไก่ที่ได้รับเชื้อได้ด้วยเช่นกัน และจากการศึกษาของ Williams (1998) ได้ทำการทดลองป้อนโอโอซิสต์ของ *E. acervulina*, *E. mitis* และ *E. praecox* ชนิดละ 500,000 โอโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อบิด *E. acervulina* มีน้ำหนักลดลง 40% ต่อไก่ 20 ตัว ในขณะที่ *E. mitis* และ *E. praecox* มีน้ำหนักลดลง 21% และ 25% ต่อไก่ 20 ตัว ตามลำดับ ในช่วง 7 วันหลังได้รับเชื้อบิด

## 2.4 พยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยา

เชื้อบิดแต่ละชนิดในไก่อทำให้เกิดพยาธิสภาพแตกต่างกันออกไป เช่น ตำแหน่งรอยโรคที่พบและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพในแต่ละระยะของการติดเชื้อ ซึ่งจะพบได้บ่อยในชนิดของเชื้อบิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นส่วนใหญ่ โดยมีลักษณะพยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยา ดังนี้คือ

*E. tenella* : ในวันแรกหลังการได้รับเชื้อบิด และผลจากการผ่าซาก สามารถตรวจพบ sporozoite อยู่ใน intraepithelial lymphocyte ภายในไส้ตัน ต่อมาในวันที่ 2 ของการติดเชื้อ พบหย่อมเนื้อตายเล็กๆ ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และในวันที่ 3 จะเริ่มมองเห็นจุดเลือดออกและไส้ตันขยายใหญ่ด้วยตาเปล่า และบริเวณเยื่อบุผิวจะมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมากจึงอาจพบหย่อมเนื้อตายบริเวณเส้นเลือดฝอยที่มาเลี้ยงชั้นกล้ามเนื้อ วันที่ 4 พบว่ามีอาการอักเสบของไส้ตันและพบจุดเลือดออกกระจัดกระจาย เนื้อเยื่อถูกทำลาย มี eosinophil, lymphocyte, monocyte และ plasma cell เพิ่มขึ้นจากกระบวนการเกิด second-generation ของ schizont ในการเจริญแบบไม่มีเพศ ในวันที่ 5 พบการบวมน้ำในชั้นใต้เยื่อของลำไส้ และเห็นจุดเลือดออกชัดเจนมาก และในวันที่ 6 พบ caecal core จะมีสีเทาซึ่งเป็นก้อนเลือดที่แข็งตัว โดยเนื้อเยื่อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงถ้าไม่เสียหายมากจะกลับคืนสภาพปกติภายใน 10-12 วัน (McDougald and Reid, 1991)

*E. necatrix* : ตรวจพบตำแหน่งรอยโรคได้ที่บริเวณลำไส้ส่วนกลาง หลังจากได้รับเชื้อ 2-3 วัน จะเห็นรอยโรคครั้งแรกในระยะ first generation schizogony ต่อมาในวันที่ 3 และ 4 เริ่มมีจุดเลือดออกที่เยื่อผนังลำไส้ โดยมีเม็ดเลือดขาวแทรกตามเนื้อเยื่อลำไส้ ทำให้ผนังลำไส้หนาขึ้น และมีจุดขาวของ schizont ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อชนิดนี้และมีของเหลวเลือด และเศษชิ้นเนื้ออยู่ภายในลำไส้ ในวันที่ 5-6 พบเนื้อตายและการอักเสบที่บริเวณลึกลงไปถึงชั้น lamina propria ของลำไส้และอาจลึกถึงชั้น muscularis mucosae และในวันที่ 6 จะเห็นรอยโรคในระยะ second generation schizogony ที่มีการลอกหลุดของเนื้อเยื่อ และจะกลับสู่สภาพปกติ ถ้าการหายไม่สมบูรณ์ก็จะเกิดแผลเป็นขึ้นในลำไส้ นอกจากนี้รอยโรคที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากระยะ third generation schizogony ที่มี 6-16 merozoites จึงทำให้เกิดพยาธิสภาพเพียงเล็กน้อย ซึ่งรอยโรคที่เกิดขึ้นสามารถตรวจพบได้ที่ลำไส้ส่วนกลางและไส้ตัน (McDougald and Reid, 1991)

*E. acervulina* : จากการผ่าซาก สามารถตรวจพบรอยโรคได้บ่อยที่บริเวณผิวของลำไส้ส่วนต้น โดยครั้งแรกที่เยื่อผิว จะมีจุดขาวๆ อยู่เป็นแนวยาวตามขวางเหมือนชั้นบันได และลำไส้ อาจจะมีสีขาวยืดและภายในจะมีของเหลวที่เป็นน้ำ โดยรอยโรคจะประกอบไปด้วย schizonts, gametocytes และโอโอซิสต์ที่กำลังเจริญเติบโต (McDougald and Reid, 1991)

*E. maxima* : ในช่วงวันที่ 1-4 หลังจากได้รับเชื้อบิด สามารถตรวจพบเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนกลางที่ถูกทำลายได้ ในการเจริญของเชื้อบิดระยะ first generation schizonts ต่อมาหลังจากได้รับเชื้อบิดมาเป็นเวลานาน 5 ถึง 8 วัน จะเกิดการเจริญของเชื้อบิดระยะมีเพศที่บริเวณลึกลงไปของเนื้อเยื่อลำไส้ (McDougald and Reid, 1991) ทำให้บริเวณลำไส้เกิดการหนาตัวขึ้น โดยภายในลำไส้มีของเหลวใสไม่มีสีที่อาจเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีชมพูได้ และพบว่ามี eosinophil ร่วมกับ mononuclear cell ในตำแหน่งปลายยอดของ villi (ผ่องพรรณและคณะ, 2537)

## 2.5 การตรวจวินิจฉัย

การตรวจแยกชนิดของเชื้อบิดส่วนใหญ่ทำได้โดย ศึกษาระยะเวลาก่อนปรากฏโรค การวัดขนาดของโอโอซิสต์ และตำแหน่งของการเกิดรอยโรคในลำไส้ โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ แสงสว่าง และการศึกษาจุลพยาธิวิทยา (Mattiello et al., 2000) เชื้อบิดบางชนิดมีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกัน เช่น *E. brunetti*, *E. maxima* และ *E. praecox* มีโอโอซิสต์ขนาดใหญ่และกลม ส่วน *E. mitis* และ *E. mivati* มีโอโอซิสต์ขนาดเล็กมากและเกือบกลม นอกจากนี้ยังพบว่า *E. tenella* และ *E. necatrix* ซึ่งเป็นเชื้อบิดชนิดที่ทำให้เกิดโรคได้มากที่สุดโอโอซิสต์จะมีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก (ตารางที่ 2.1) และยังพบว่าในระยะ second generation schizont ของ *E. tenella* ที่พบได้ภายในชั้น lamina propria ของไส้ตันนั้น ในบางครั้งพบว่ามีเชื้อบิดชนิด

*E. necatrix* ในระยะ third generation schizont สามารถเกิดรอยโรค ณ. ตำแหน่งเดียวกันได้กับ เชื้อปรสิตชนิด *E. tenella* หรืออาจพบรอยโรคผิดไปจากตำแหน่งที่คาดว่าจะพบตามตารางที่ 2.1 (McDougald and Reid, 1991) ดังนั้นการตรวจเพื่อแยกชนิดของเชื้อปรสิตด้วยวิธีดังกล่าวอาจเกิดความผิดพลาดและสับสนได้

ในปี ค.ศ. 1975 Shirley ได้ศึกษาการแยกชนิดของเชื้อปรสิตจากเอนไซม์ LDH (Lactate dehydrogenase), GPI (Glucose phosphate isomerase), 6PGD (6-Phosphogluconate dehydrogenase) และ G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) โดยศึกษาด้วยวิธี enzyme electrophoresis สามารถแยกเชื้อปรสิตได้ 6 ชนิด กับ 11 สายพันธุ์ (strain) ในปี ค.ศ. 1982 Chapman ได้ศึกษาเอนไซม์ GPI เพื่อแยกชนิด *E. acervulina*, *E. praecox* และ *E. mivati* ต่อมา ในปีค.ศ. 1991 Kucera ได้ใช้เอนไซม์ LDH และ GPI แยกชนิดเชื้อปรสิตของประเทศ เซคโกสโลวาเกียได้ และในปี ค.ศ.1997 Johnston และ Fernando ได้ศึกษาเอนไซม์ 10 ชนิด ได้แก่ AO (aldehyde oxidase), ALP (alkaline phosphatase), AMY (amylase), FUM (fumarate hydratase), GOT (glutamate-oxaloacetate transferase), IDH (isocitrate dehydrogenase), MDH (malate dehydrogenase), PGM (Phosphoglucomutase), G6PDH และ GPI พบว่า G6PDH, GPI, IDH, MDH และ PGM สามารถตรวจพบได้ในเชื้อปรสิตทุกชนิด ส่วน G6PDH สามารถตรวจแยกได้ถึงในระดับสายพันธุ์ ซึ่งวิธีการตรวจด้วย enzyme electrophoresis เป็นวิธีที่ให้ผลน่าเชื่อถือแต่ไม่สะดวกในการเตรียมและต้องใช้ไอโซซิสต์จำนวนมากเพื่อมาวิเคราะห์ผล

จากการศึกษาแยกชนิดเชื้อปรสิตจากจำนวนและขนาดของโครโมโซม ของ Shirley และคณะ (1990), Fernando และ Pasternak (1991) และ Shirley (1994b) ด้วยวิธี PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) พบว่าความหลากหลายของขนาดและความยาวของ genome ทั้งหมดโดยเฉลี่ยประมาณ 7 Mbp โดยพบว่าเชื้อปรสิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนและขนาดโครโมโซมแตกต่างกันไปคือ *E. acervulina* มี 8 โครโมโซม *E. brunetti* มี 5 โครโมโซม *E. maxima* มี 10 โครโมโซม *E. necatrix* มี 6 โครโมโซม และ *E. tenella* มี 9 โครโมโซม (Fernando and Pasternak, 1991)

ในปีค.ศ. 1997 Tsuji และคณะ ได้ใช้วิธี PCR ในการแยกชนิดเชื้อปรสิต ด้วยวิธี two-step PCR เพื่อใช้เป็นวิธีในการตรวจวินิจฉัยและศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคปรสิตในไก่ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella* และ *E. hagani* ต่อมาก็ได้มีการใช้วิธี PCR ในการตรวจหา *E. acervulina* เพื่อเป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์แยกชนิดและตรวจหาเชื้อปรสิตในไก่ (Molloy et al., 1998) ส่วน Schnitzler และคณะ (1999) ได้ใช้วิธี PCR เพิ่มสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS1 (Internal Transcribed Spacer Region 1) ของ ribosomal DNA เพื่อใช้ในการตรวจหาและแยกความแตกต่างของเชื้อปรสิต 7 ชนิด ในประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. necatrix*,

*E. praecox* และ *E. tenella* ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีที่สะดวกและง่าย เพราะสามารถนำไปใช้ร่วมกับเครื่อง PCR ที่มีความแม่นยำในการทำงานได้เป็นอย่างดี (Yao-Chi et al., 2003) รวมทั้งสามารถทำงานได้แม้จะมีจำนวนโอโอซิสต์น้อยก็ตาม และเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าวิธี enzyme electrophoresis ทำให้ปัจจุบันวิธี PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านวิทยาการระบาดของปรสิตในสัตว์อย่างแพร่หลาย โดยพบว่าวิธีนี้จะสามารถจำแนกชนิดและสายพันธุ์ได้ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำผลที่ได้ไปใช้ในการวางแผนการเลี้ยงและวัคซีนต่อไปในอนาคต (Shirley, 1997) นอกจากนี้ได้มีการนำวิธี RAPD-PCR มาใช้เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อบิดแต่ละชนิดและระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อบิดชนิดเดียวกัน (McPherson and Gajadhar, 1993; Proconier et al., 1993; Shirley and Bumstead, 1994; Cere et al., 1995; Guo and Johnson, 1995; Johnston and Fernando, 1995; Costa et al., 2001) และได้มีการใช้วิธี Recombinant DNA probe ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *E. tenella* (Shirley, 1994a) และได้พัฒนาเพื่อเป็น markers สำหรับ precocious เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ดื้อยา (Shirley, 1996)

## 2.6 ชีววิทยาของ Ribosome

Ribosome เป็นออร์แกเนลล์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่ในการแปลรหัสพันธุกรรมจาก mRNA ของเซลล์ให้เป็นลำดับโปรตีน โดยขนาดของ Ribosome สามารถวัดจากอัตราการเคลื่อนที่ภายใต้แรงเหวี่ยงและมีหน่วยเป็น Svedberg หรือ S ( $1S=10^{-13}$  วินาที) ซึ่ง Ribosome ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือเซลล์ยูคาริโอต (Eukaryotic cell) มีขนาด 80S ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ได้แก่ 40S ที่มีน้ำหนักโมเลกุล  $1.4 \times 10^6$  มี subunit ประกอบด้วย 18S rRNA และโปรตีน 33 ชนิด และขนาด 60S ที่มีน้ำหนักโมเลกุล  $2.8 \times 10^6$  มี subunit เป็นส่วนประกอบของ rRNA 3 ชนิด ได้แก่ 28S, 5.8S, 5S และมีโปรตีน 49 ชนิด โดยแต่ละ subunit จะทำหน้าที่จำเพาะในการแปลรหัสจาก mRNA ให้เป็นโปรตีน โดยอาศัย rRNA สำหรับการทำงาน (Campbell et al., 1999) ซึ่งประโยชน์จากการใช้ยีน SSUrRNA (Small Subunit Ribosomal RNA) มีหลายประการคือ ใช้การศึกษาในระดับชีวโมเลกุลของ Ribosome การหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต และการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัย เนื่องจากลำดับเบสของ 18 SSUrRNA ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีความเหมือนกันและแตกต่าง จากลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงนิยมใช้ลำดับเบสของ SSUrRNA ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาเปรียบเทียบกับเพื่อใช้ในการจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Water et al., 1991; Ananias and Francisco, 1994)

## 2.7 การวินิจฉัยด้วย PCR-RFLP ในปัจจุบัน

ปัจจุบันได้มีการนำวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism (PCR-RFLP) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ โดยอาศัยพื้นฐานของสารพันธุกรรม (DNA) ที่สกัดได้จากเชื้อบิดระยะต่างๆ เช่น merozoite, schizont, gametocyte, zygote หรือโอโอซิสต์ มาใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) ในปฏิกิริยา PCR โดยมี primers คู่ที่ได้รับการออกแบบให้เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวน DNA ในตำแหน่งที่ต้องการศึกษา ซึ่งจากการศึกษาของ Yao-Chi และคณะ (2003) พบว่าจากการใช้วิธี PCR ที่บริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) สามารถแยกชนิดเชื้อบิดได้ 5 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* รวมทั้งการนำวิธี PCR มาใช้ในการแยกแต่ละสายพันธุ์ของ *E. maxima* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่พบได้ทางตอนเหนือของอเมริกาได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย (Barta et al., 1998) และเนื่องจากเชื้อบิดในไก่มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ดังนั้นจึงมีการศึกษาทางด้าน phylogenetic ของเชื้อบิดที่บริเวณ 18S ribosomal sequence โดยอาศัยวิธี PCR เช่นกัน (Barta et al., 1997) และจากการศึกษาของ Jinnemen และคณะ (1996) ได้ศึกษาความแตกต่างระหว่าง *Cyclospora* spp. และ *Eimeria* spp. ที่บริเวณ 18S Ribosomal RNA gene ด้วยวิธี PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ *Mnl* I นอกจากนี้ยังมีการใช้ PCR-RFLP ในการแยกเชื้อบิดในไก่ 6 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox* และ *E. tenella* ที่บริเวณ ITS 2 ด้วยเอนไซม์ *Cfo* I, *Sau3* AI และ *Taq* I (Woods et al., 2000)

ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นพบว่าการใช้วิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่บ่งบอกความหลากหลายทางชีวภาพที่สามารถจำแนกชนิดได้ โดยการตัด DNA จากผลิตภัณฑ์ของ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยแบบแผนของชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (Brown, 1999) และพบว่าวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Sangster et al., 2002) ซึ่งจากผลิตภัณฑ์ของ PCR-RFLP ที่ได้ จัดได้ว่าเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยในเชิงคุณภาพ (Qualitative technique) แล้วนั้นยังสามารถตรวจวินิจฉัยโรคบิดในเชิงปริมาณ (Quantitative technique) ได้อีกด้วย โดยวิธีการตรวจวินิจฉัยเชิงปริมาณที่นิยมใช้กัน คือ การนับจำนวนโอโอซิสต์ด้วยวิธี McMaster chamber ซึ่งผลที่ได้มีความผันแปรมาก และไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อบิดได้ ยกเว้นโอโอซิสต์ของ *E. maxima* ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และจากการที่ไม่สามารถแยกชนิดเชื้อบิดได้อย่างแน่ชัด ทำให้การประเมินสถานะภาพการเกิดโรคบิดของเชื้อบิดแต่ละชนิดจึงทำได้ยาก ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อบิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดแต่ละชนิด จึงช่วยทำให้สามารถประเมินสถานะภาพการเกิดโรคบิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

แผนการทดลองครั้งนี้แบ่งออก 11 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 ไม้ทดลองและการเตรียมไม้ทดลอง

3.2 เชื้อบิตอ้างอิงและการเตรียมเชื้อบิต

3.3 การทดลอง

แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน

3.3.1 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตจาก stock *E. tenella* CB38 และจาก stock วัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ก่อนป้อนเชื้อบิตให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP

3.3.2 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับ *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี PCR-RFLP

3.4 การสกัด DNA

3.5 การออกแบบ Primer

3.6 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR

3.7 การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.8 การทดสอบความไวของ PCR-RFLP

3.9 การทดสอบความจำเพาะของ PCR-RFLP

3.10 ศึกษาปริมาณสัมพัทธ์ของเชื้อบิต

3.11 การวิเคราะห์และประเมินผล

3.1 ไม้ทดลองและการเตรียมไม้ทดลอง

3.1.1 ไม้ทดลอง

ไก่ไข่เพศผู้ พันธุ์ Babcock B 380 จำนวน 200 ตัว

3.1.2 การเตรียมไม้ทดลอง

3.1.2.1 การเตรียมห้องเลี้ยงไม้ทดลอง

ไม้ทดลองทั้งหมดทำการเลี้ยง ณ อาคารสัตว์ทดลองชั้น 8 ตึก 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ผ่านกระบวนการทำความสะอาดห้องเลี้ยงไม้และบริเวณใกล้เคียงดังนี้คือ ชัดล้างด้วยน้ำยาล้างห้องน้ำ ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยโซดา

ไฟที่ผสมกับน้ำ เพื่อขจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ตามซอกพื้น และถูพื้นด้วยน้ำที่ผสม chlorox หลังจากนั้นวาดพื้นและบริเวณโดยรอบด้วยน้ำร้อนอีกครั้ง โดย 5 วัน ก่อนนำไก่เข้าเลี้ยงในห้อง ทำการฆ่าเชื้อด้วย formaldehyde ในอัตราส่วนต่างทับทิม 1 ส่วน : ฟอรัมาลีน 2 ส่วน

### 3.1.2.2 การทำกล่องเลี้ยงไก่ทดลอง

ไก่ทุกตัวที่ทำการทดลองในครั้งนี้ นำมาเลี้ยงในกล่องกระดาษลูกฟูกที่ผ่านการประดิษฐ์ขึ้น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากสิ่งแวดล้อม (ภาคผนวกรูปภาพที่ 1 และ 2) โดยมีวิธีทำกล่องดังนี้คือ นำกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 13x17x15 นิ้ว จำนวน 20 กล่อง และขนาด 18x24x17 นิ้ว จำนวน 4 กล่อง ทำการตัดฝากล่องทั้ง 4 ด้านออก และตัดบริเวณขอบด้านล่างของกล่องตามแนวยาวทางด้านหน้ากล่อง ให้มีความกว้าง 1.5 นิ้ว เพื่อสอดวาง future board ที่คลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ สำหรับเก็บอุจจาระไก่ และจากส่วนด้านล่างกล่องที่ถูกตัดทำการวัดขึ้นมา 5 นิ้ว จากพื้นกล่อง ตัดกล่องตามแนวยาวอีกครั้ง ให้มีความกว้าง 0.5 นิ้ว สำหรับสอดลวดที่ยื่นออกมาออกกล่อง โดยในส่วนของภายในกล่องกระดาษให้นำลวดตาข่ายที่มีขนาดของรูตาข่ายขนาดเล็กมาทำเป็นที่สำหรับให้ไก่ยืน โดยวางลวดตาข่ายให้สูงจากพื้นกล่อง 5 นิ้ว และด้านบนของกล่องให้คลุมด้วยผ้าขาวบางตาถี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

### 3.1.2.3 การเตรียมไก่ทดลอง

นำไก่อายุ 1 วัน จำนวน 400 ตัว จากโรงฟักที่ปลอดเชื้อ โดยทำการแบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 200 ตัว และในแต่ละครั้งของการทดลองให้แบ่งเลี้ยงไก่ในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 13x17x15 นิ้ว จากข้อ 3.1.2.2 กล่องละ 10 ตัว จำนวน 20 กล่อง โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ในช่วง 5 วันแรกเป็นอาหารสูตรมียากันบิด และก่อนป้อนเชื้อบิด 2 วัน เปลี่ยนอาหารเป็นสูตรไม่มียากันบิด และใช้อาหารสูตรไม่มียากันบิดตลอดการทดลอง

ตรวจอุจจาระไก่ทุกกลุ่ม ทุกวัน ตลอดการทดลอง เพื่อตรวจหาไอโอสีสต์ของเชื้อบิด ด้วยวิธี Floatation concentration (วิธีทำให้ไอโอสีสต์ลอยตัว) ซึ่งมีวิธีดังนี้คือ เก็บอุจจาระจากพื้นกล่องที่คลุมรองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยทำการเปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวัน นำอุจจาระที่ได้ทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วตักแบ่งอุจจาระมาประมาณ 5 กรัม ผสมกับน้ำเกลืออิ่มตัว ที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.12 คนให้เข้ากัน แล้วกรองสารละลายผ่านกระชอนที่มีผ้าก๊อชอยู่ด้านบนลงมายังกระบอกพลาสติกใสเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้เทใส่กระบอกพลาสติกใสเบอร์ 4 จนกระทั่งเต็มปริมาตรถึงขอบ นำ cover glass ขนาด 22x22 มิลลิเมตร วางปิดด้านบน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำ cover glass มาวางบนแผ่นกระจกแก้ว ตรวจหาไอโอสีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 10x

และ 40x และในกรณีที่ตรวจพบโอโอซิสต์จากอุจจาระก่อนการป้อนเชื้อในไก่กลุ่มใด จะทำการ คัดทิ้งไก่กลุ่มนั้นทันที

นำไก่อายุ 7 วัน มาใช้ในการทดลอง ข้อ 3.3.2.1 และข้อ 3.3.2.2 โดยก่อนการ ทดลองป้อนเชื้อบิต 1 วัน แบ่งไก่สะอาด 200 ตัว/1 การทดลอง ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 50 ตัว/1 กลุ่ม เลี้ยงในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 18×24×17 นิ้ว

### 3.2 เชื้อบิตอ้างอิงและการเตรียมเชื้อบิต

#### 3.2.1 เชื้อบิตอ้างอิง

3.2.1.1 เชื้อบิต *E. tenella* CB38 เป็นเชื้อบิตที่ได้เพาะเลี้ยงต่อเนื่องไว้ที่หน่วยผลิต วิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี 2538

3.2.1.2 เชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากบริษัท Fort Dodge (USA) ประกอบด้วยโอโอซิสต์ของเชื้อบิต 4 ชนิด คือ *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella*

#### 3.2.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 (Propagation of Parasites)

ใช้ไก่อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว เนื่องจากจะทำให้ได้จำนวนโอโอซิสต์มากกว่าไก่ อายุน้อย โดยนำเชื้อบิตมาป้อนให้ไก่จำนวน 60,000 sporulated oocysts/ไก่ 1 ตัว ด้วยหลอด ฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ต่อกับเข็มเบอร์ 18 ตัดปลาย โดยนับวันป้อนเชื้อบิตเป็นวันที่ 1 และ ทำการเก็บเชื้อบิตระยะโอโอซิสต์ในวันที่ 7 โดยขูดเก็บเชื้อบิตจากบริเวณไส้ตันเท่านั้น แล้วจึง นำสิ่งที่ขูดได้ทั้งหมดมาปั่นด้วยเครื่องปั่น แล้วกรองผ่านกระชอนตาถี่ ใส่ใน sedimentation flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วล้างตะกอนซ้ำ 2-3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น โดย ครั้งสุดท้ายเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ให้เหลือตะกอนประมาณ 30 มิลลิลิตร เทใส่หลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ต่อจากนั้นดูดน้ำออกให้มากที่สุดจนเหลือแต่ ตะกอน ทำการเติม 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  ลงไป เขย่าให้ตะกอนภายในหลอดกระจายตัว แล้วเทใส่ จานแก้วขนาดใหญ่ และทำให้โอโอซิสต์แบ่งตัวพัฒนาเป็น sporulated oocyst ด้วยการให้ ออกซิเจนโดยใช้เครื่องเป่าลม เป่าลมเย็นลงในจานแก้วขนาดใหญ่ วันละ 2-3 ครั้ง เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิดและเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น stock ของ *E. tenella* CB38 ตลอดการทดลอง

#### 3.2.3 การเตรียมเชื้อบิต

ตรวจนับจำนวน sporulated oocysts จาก stock ของเชื้อบิต *E. tenella* CB38 จากข้อ 3.2.2 ที่เก็บไว้ใน 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  และ sporulated oocysts ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในสารละลายสำหรับเก็บรักษา ด้วยวิธี McMaster chamber (Conway and

McKenzie,1991) เพื่อหาจำนวนไอโอสีสต์ในสารละลาย 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  และในสารละลายสำหรับเก็บรักษา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากขวด stock ของเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) โดยดูไอโอสีสต์ตามจำนวนที่ต้องการใช้ ขึ้นมาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อเอาสารละลาย 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  และสารละลายสำหรับเก็บรักษา ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ออก เพื่อนำไปใช้ตามข้อ 3.3.1 และข้อ 3.3.2

### 3.3 การทดลอง

#### 3.3.1 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตจาก stock ของ *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ก่อนป้อนเชื้อบิตให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP

นำเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 3.2.3 มาตัวอย่างละ 10,000 ไอโอสีสต์ ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนของข้อ 3.4.1 (การสกัด DNA ด้วย lysis buffer-CTAB) ถึง 3.7 (การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ)

#### 3.3.2 ศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิตที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี PCR-RFLP

##### 3.3.2.1 การป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38

นำไก่สะอาดจากข้อ 3.1.2.3 (การเตรียมไก่ทดลอง) ที่อายุ 7 วัน จำนวน 200 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว ทำการป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 จากข้อ 3.2.3 ที่ระดับปริมาณต่างกัน ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ปริมาณ  $10^2$  ไอโอสีสต์/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ปริมาณ  $10^3$  ไอโอสีสต์/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 4 ป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ปริมาณ  $10^4$  ไอโอสีสต์/ไก่ 1 ตัว

### 3.3.2.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

นำไก่สะอาดจากข้อ 3.1.2.3 (การเตรียมไก่ทดลอง) ที่อายุ 7 วัน จำนวน 200 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว ทำการป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากข้อ 3.2.3 ที่ระดับปริมาณต่างกัน ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 25 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว หรือ 6,431.25 โอไอซีเอสต์/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 50 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว หรือ 12,862.5 โอไอซีเอสต์/ไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 4 ป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 100 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว หรือ 25,725 โอไอซีเอสต์/ไก่ 1 ตัว

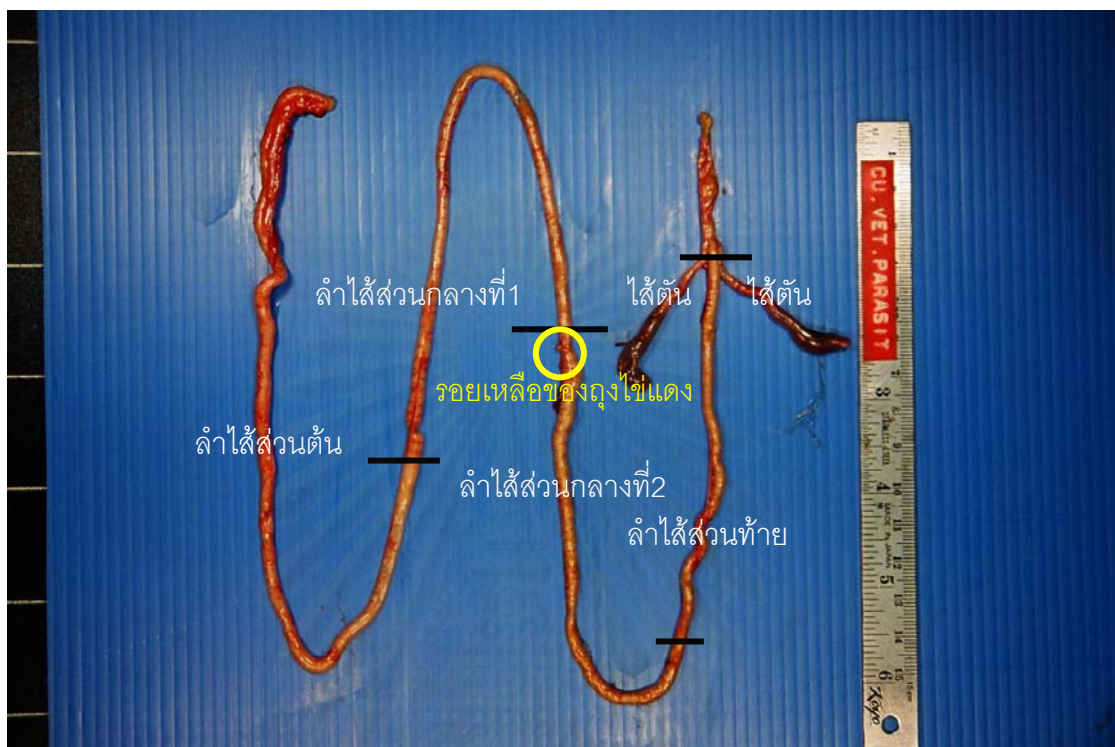
### 3.3.2.3 การตรวจหาโอไอซีเอสต์ในอุจจาระไก่ ด้วยวิธี Floatation concentration และการนับจำนวนโอไอซีเอสต์ด้วยวิธี McMaster chamber หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน

ทำการเก็บอุจจาระไก่จากทุกกลุ่มที่ทำการทดลอง ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิด โดยนับวันที่ทำการป้อนเชื้อเป็นวันที่ 1 นำอุจจาระไก่ทั้งหมดที่เก็บได้ในแต่ละวันของแต่ละกลุ่มผสมให้เข้ากัน และทำการตรวจหาโอไอซีเอสต์ด้วยวิธี Floatation concentration ตามข้อ 3.1.2.3 และในกรณีที่กลุ่มการทดลองกลุ่มใด ตรวจพบโอไอซีเอสต์จากวิธี Floatation concentration ให้นำอุจจาระของกลุ่มการทดลองกลุ่มนั้นมานับจำนวนโอไอซีเอสต์ด้วยวิธี McMaster chamber (Conway and McKenzie, 1991) เพื่อหาจำนวนโอไอซีเอสต์ต่ออุจจาระ 1 กรัม

### 3.3.2.4 วิธีการแบ่งลำไส้และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน

ทำการ Euthanized ไก่ ตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิด กลุ่มละ 3 ตัว/วัน โดย euthanized ด้วยวิธีฉีด แอลกอฮอล์เข้าบริเวณกระดูกข้อต่อคอหรือสมองไก่ ทำความสะอาดตัวไก่ด้วย 70% แอลกอฮอล์ ต่อกจากนั้นผ่าเปิดบริเวณช่องท้อง นำเฉพาะลำไส้และไส้ตันออกมา แล้วจึงทำการแบ่งลำไส้ออกเป็น 2 ส่วน โดยแบ่งครึ่งบริเวณรอยเหลือของถุงไข่แดง แล้วแบ่งครึ่งลำไส้แต่ละส่วนอีกครั้ง ดังนั้นจะได้ลำไส้ทั้งหมด 5 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้น 1

ส่วน ลำไส้ส่วนกลาง 2 ส่วน ลำไส้ส่วนท้าย 1 ส่วน และไส้ตัน 1 ส่วน ดังรูปที่ 3.1 โดยนำแต่ละส่วนที่ได้มาศึกษาดังนี้



รูปที่ 3.1 ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 ลำไส้ส่วนท้าย และไส้ตัน ของไก่

— เส้นแสดงการแบ่งลำไส้แต่ละส่วนและไส้ตันของไก่

○ ตำแหน่งรอยเหลือของถุงไข่แดง

#### 3.3.2.4.1 การศึกษารอยโรคจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด

*E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า

ตรวจให้คะแนนรอยโรค จากบริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ทดลองทุกกลุ่มๆ ละ 3 ตัว ด้วยตาเปล่า ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 หลังได้รับเชื้อบิด ตามวิธี Johnson และ Reid (1970)

### 3.3.2.4.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผนังลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน สำหรับสกัด DNA

ทำการเปิดผ่าลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน ต่อจากนั้นใช้ spatula ขูดเนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้แต่ละส่วน และไส้ตันมาประมาณ 20-50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ภายในหลอดมีสารละลาย lysis buffer 60 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น กรรไกร ปากคีบ และ spatula จะผ่านการล้างฆ่าเชื้อด้วย 70% แอลกอฮอล์ และล้างไฟฆ่าเชื้อทุกครั้ง โดยนำเนื้อเยื่อที่ขูดได้ในแต่ละวันเก็บแช่ที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทำตามขั้นตอนของข้อ

3.4.2 (lysis buffer-CTAB) ถึง 3.7 (การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ)

### 3.3.2.4.3 การตรวจหาเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1

ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

หลังจากตรวจรอยโรคและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตามข้อ 3.3.2.4.1 และ 3.3.2.4.2 เสร็จเรียบร้อยแล้ว ทำการขูดตรวจเนื้อเยื่อจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตัน ด้วย coverglass นำตัวอย่างแต่ละส่วนมาผสมกับ normal saline ที่หยดอยู่บนสไลด์ ผสมให้เข้ากันตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อตรวจหาระยะต่างๆ ของเชื้อบิตในแต่ละวัน เป็นเวลา 8 วัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ

## 3.4 การสกัด DNA

### 3.4.1 การสกัด DNA จาก stock ของเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

สกัด DNA ด้วยวิธี lysis buffer-CTAB (Cetyl - Trimethyl Ammonium Bromide) (Modify Zhao et al., 2001) โดยนำตัวอย่างจากข้อ 3.3.1 มาเติม lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3% *N* - lauroylsarcosine, 2 mg/ml proteinase K, pH 9.5) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ vortex โดยใช้ glass-bead ขนาด 5.5-6.5 มิลลิเมตร จำนวน 1 เม็ด และขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 20 เม็ด เพื่อทำให้ผนังของโอโอซิสต์แตก แล้วแช่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65

องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยทุกๆ ครั้งชั่วโมงทำการ vortex นานครั้งละ 3-4 นาที ต่อจากนั้นทำการเติม 350 ไมโครลิตร CTAB buffer และแช่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง vortex ทุกครั้งชั่วโมง นานครั้งละ 3-4 นาที และดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นสกัด DNA ด้วย phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1) ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูดมา จำนวน 2 ครั้ง และตกตะกอน DNA ด้วย 100% cold ethanol ซึ่งปริมาตรที่ใช้จะเป็น 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดมา และเติม 4 M NaCl โดยมีปริมาตรที่ใช้จะเป็น 0.04 เท่าของสารละลายที่ดูดมา แช่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ภายในมีตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ต่อจากนั้นทำการเก็บตะกอน DNA โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วจึงล้างตะกอน DNA ด้วย 70% cold ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง ปั่นเก็บตะกอนของ DNA และละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA นี้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

#### 3.4.2 การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อผนังลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

สกัด DNA ด้วยวิธี lysis buffer-CTAB (Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide) (Modify Zhao et al., 2001) โดยนำแต่ละตัวอย่างจากเนื้อเยื่อผนังลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันจากข้อ 3.3.2.4.2 มาเติม lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3% *N*-lauroylsarcosine, 2 mg/ml proteinase K, pH 9.5) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ vortex โดยใช้ glass-bead ขนาด 5.5-6.5 มิลลิเมตร จำนวน 1 เม็ด และขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 20 เม็ด เพื่อให้ผนังของโอโอซิสต์แตก แล้วแช่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำแต่ละตัวอย่างมา vortex นาน 4 นาที และทำการแช่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ต่ออีก 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทำการเติม 350 ไมโครลิตร CTAB buffer และแช่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำแต่ละตัวอย่างมา vortex นาน 4 นาที อีกครั้ง และทำการแช่หลอดทดลองที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ต่ออีก 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นสกัด DNA ด้วย phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1) ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูดมา จำนวน 2 ครั้ง และตกตะกอน DNA ด้วย 100% cold ethanol ปริมาตรที่ใช้จะเป็น 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดมา และเติม 4 M NaCl โดยมีปริมาตรที่ใช้จะเป็น 0.04 เท่าของสารละลายที่ดูดมา แช่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ภายในมีตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ต่อจากนั้นทำการเก็บตะกอน DNA โดยการปั่นเหวี่ยงที่



ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วจึงล้างตะกอน DNA ด้วย 70% cold ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง ปั่นเก็บตะกอนของ DNA และละลายตะกอน DNA ด้วย น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA นี้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

### 3.5 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ จาก conserved region ของ 18S rRNA gene โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ 18S rRNA gene ของเชื้อบิด 8 ชนิด คือ *E. acervulina* (accession number U67115), *E. brunetti* (accession number U67116), *E. maxima* (accession number U67117), *E. mitis* (accession number U67118), *E. mivati* (accession number U67148), *E. necatrix* (accession number U67119), *E. praecox* (accession number U67120) และ *E. tenella* (accession number U67121) ที่ได้จาก GenBank ทำให้ได้

Forward Primer 5'-GAGGGAGCCTGAGAAACGGCT-3' และ

Reverse Primer 5'-CCATGCTGCAGTATTCAGGGC-3' PCR Product คาดว่าจะมีขนาด 422 bp

### 3.6 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR

เป็นปฏิกิริยารวมใน 25 ไมโครลิตร โดยใช้ DNA บริสุทธิ์ จากข้อ 3.4.1 (lysis buffer-CTAB) มา 2.5 ไมโครลิตร ส่วน DNA จากข้อ 3.4.2 (lysis buffer-CTAB) เป็นการนำ DNA จากแต่ละตัวอย่างของกลุ่มเดียวกันและวันเดียวกันมาตัวอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:100 คือ DNA 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นนำ DNA ที่เจือจางแล้วมา 2.5 ไมโครลิตร สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA Forward primer 0.2 ไมโครโมล Reverse primer 0.2 ไมโครโมล เอนไซม์ Taq polymerase 0.3 ไมโครลิตร (0.5 unit) และบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 20 มิลลิโมล Tris-HCl (pH 8.2), 1.5 มิลลิโมล MgCl<sub>2</sub>, 100 มิลลิโมล KCl, 60 มิลลิโมล (NH<sub>2</sub>)SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton x-100 และ 0.2 มิลลิโมล dNTPs โดยสารทั้งหมดถูกบรรจุในหลอด PCR แล้วนำเข้าเครื่อง GeneAmp System 2700 และในแต่ละครั้งของการทำ PCR ต้องประกอบไปด้วย DNA ของ *Eimeria* spp. ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp เป็น positive control และ negative control ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทน DNA โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Initial PCR activation step ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นเข้าสู่รอบของการทำ PCR ที่ทำซ้ำ 35 รอบ ดังนี้ Denaturation step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing step 54 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension step 72

องศาเซลเซียส 45 วินาที Final extension step 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วคงอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ PCR ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ โดยวิธี 2% agarose gel electrophoresis และ TAE buffer (Tris-acetic-EDTA buffer) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที โดยย้อม DNA ด้วย ethidium bromide และถ่ายรูป ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

### 3.7 การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการตรวจสอบผลิตภัณฑ์มาทำการตกตะกอน DNA และทำให้บริสุทธิ์ ด้วย 4 M NaCl โดยปริมาตรที่ใช้คือ 1 ไมโครลิตร และ 100% cold ethanol 40 ไมโครลิตร ต่อผลิตภัณฑ์ PCR 15 ไมโครลิตร แช่ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง และทำการล้างตะกอน DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย 70% cold ethanol จำนวน 2 ครั้ง ที่มีปริมาตรการใช้เท่ากับ 100% cold ethanol หลังจากนั้นทิ้งตะกอน DNA ให้แห้ง แล้วจึงละลายตะกอน DNA ด้วยการเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่อผลิตภัณฑ์ PCR 15 ไมโครลิตร

ส่วนผสมในการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร 10× บัฟเฟอร์ของแต่ละเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 3.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร (0.25 unit) (Promega) ดังนั้นผลรวมของปฏิกิริยารวมในการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเป็น 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแต่ละตัวอย่างที่ตัดในแต่ละเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ไปวิเคราะห์ด้วย 2.5% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบหาแถบ DNA ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูป gel นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับตารางที่ 3.1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 3.1** ขนาดของ DNA ของเชื้อบิด *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* หลังการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu I*, *Hha I*, *Hpa II* และ *Hae III*

ชนิดของเชื้อบิด	ขนาดของ DNA หลังการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (bp)			
	<i>Alu I</i>	<i>Hha I</i>	<i>Hpa II</i>	<i>Hae III</i>
	AG'CT TC'GA	G'CGC CGC'G	C'CGG GGC'C	GG'CC CC'GG
<i>E. acervulina</i>	38 183 201	19 39 45 93 226	68 (354)	-
<i>E. maxima</i>	(27) 38 (56) (100) 201	19 39 45 93 226	106 (316)	-
<i>E. necatrix</i>	70 (169) 183	45 (58) 93 226	48 (70) 106 (198)	(130 292)
<i>E. tenella</i>	38 70 (131) 183	45 93 (284)	48 106 (268)	-

( ) คือขนาดของ DNA ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด

### 3.8 การทดสอบความไวของวิธี PCR-RFLP

จากข้อ 3.4.1 (lysis buffer-CTAB) นำมาทำ 2-fold dilution จากจำนวนไอโอสีสต์ที่แตกต่างกัน โดย DNA ที่สกัดได้เริ่มต้นมีจำนวน  $10^4$  ไอโอสีสต์/ 200 ไมโครลิตร ดังนั้นเมื่อทำ 2-fold dilution เปรียบเทียบกับจำนวนไอโอสีสต์ที่ได้มีดังนี้คือ 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.0975 และ 0.04875 ไอโอสีสต์/ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้นำมาใช้เป็น DNA ตั้งต้นของปฏิกิริยา PCR และ RFLP

### 3.9 การทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP

ความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. เปรียบเทียบกับปรสิตที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของไก่ ได้แก่ *Ascaridia galli*, *Capillaria* spp., *Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae* (เพศผู้และเพศเมีย), *Raillietina cesticillus*, *R. echinobothrida*, *R. tetragona*, Tapeworm segment, *Tetrameres* spp. และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะ ได้แก่ *Trichostrongylus* spp. มาสกัด DNA ตามข้อ 3.4.2 (lysis buffer-CTAB) ถึง 3.7 (การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ) และนำมาทดสอบด้วย primers ที่จำเพาะต่อ *Eimeria* spp. เพื่อตรวจสอบว่า primers นี้มีความจำเพาะกับ DNA ของเชื้อต่างชนิดและต่างโฮสต์ได้หรือไม่

### 3.10 ศึกษาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิด

เป็นการวัดค่าโดยอ้อมเพื่อศึกษาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดแต่ละชนิด โดยนำความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ DNA ของเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) หลังจากแยกชนิดเชื้อบิดด้วยวิธี PCR-RFLP ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อบิดแต่ละชนิดของ *Eimeria* spp. ดังตารางที่ 3.1 มาวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ DNA และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Scion Image Software (Scion Corporation, USA)

### 3.11 การวิเคราะห์และประเมินผล

ทำการตรวจสอบการปรากฏและไม่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ PCR และ PCR-RFLP จากรูปที่ถ่ายออกมาด้วยกล้องถ่ายภาพ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดความเข้มของ DNA และ Molecular weight (bp) หลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตามตารางที่ 3.1 และหาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิด ตามข้อ 3.10 (ศึกษาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิด)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจหาโอไอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Floatation concentration และวิธี McMaster chamber

พบว่าในกลุ่มควบคุม ตรวจไม่พบโอไอซิสต์ในอุจจาระไก่ ส่วนไก่ 3 กลุ่ม ที่ได้รับการป้องกันเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าในช่วง 4 วันแรกหลังการติดเชื้อบิด ตรวจไม่พบโอไอซิสต์ และสามารถตรวจพบโอไอซิสต์จากอุจจาระไก่ได้ครั้งแรกในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิด จากกลุ่มที่ป้องกันเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอไอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ส่วนกลุ่มที่ป้องกันเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอไอซิสต์/ตัว สามารถตรวจพบโอไอซิสต์ได้เป็นครั้งแรกในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด ด้วยวิธี Floatation concentration และเมื่อตรวจนับจำนวนโอไอซิสต์ต่ออุจจาระ 1 กรัม ในวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิด ด้วยวิธี McMaster chamber พบว่ากลุ่มที่ป้องกันเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอไอซิสต์/ไก่ 1 ตัว มีจำนวนโอไอซิสต์มากกว่ากลุ่มที่ป้องกันเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^2$  โอไอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ดังรูปที่ 4.1 และตารางภาคผนวกที่ 1

จากรูปที่ 4.2 ผลการตรวจอุจจาระไก่หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25, 50 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบโอไอซิสต์ในอุจจาระไก่ได้วันแรก ในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี Floatation concentration ส่วนการตรวจนับจำนวนโอไอซิสต์ ด้วยวิธี McMaster chamber พบว่าในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จำนวนโอไอซิสต์ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว มีจำนวนโอไอซิสต์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 50 และ 25 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว และในวันที่ 6 และ 7 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 50 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว มีจำนวนโอไอซิสต์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ปริมาณ 25 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว (ตารางภาคผนวกที่ 3)

#### 4.2 การตรวจให้คะแนนรอยโรคที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า

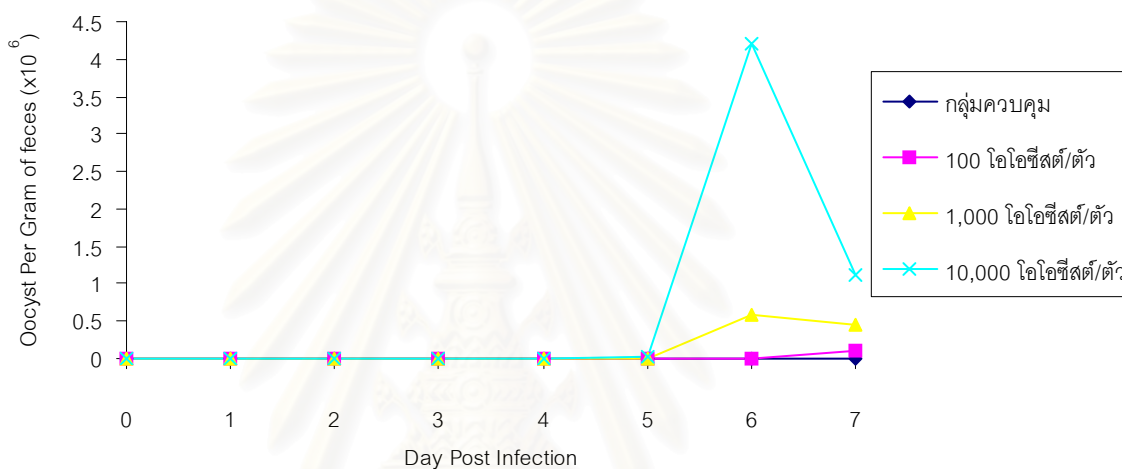
พบว่าในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 เริ่มตรวจพบรอยโรคได้ที่ไส้ตันของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว โดยมีคะแนนรอยโรค +1 และในวันที่ 5 และ 6 หลังการติดเชื้อบิด พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว มีคะแนนรอยโรคเพิ่มขึ้นเป็น +2 และ +3 ตามลำดับ นอกจากนี้ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว เริ่มพบรอยโรคได้ที่ไส้ตันเป็นครั้งแรก และกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว พบรอยโรคที่ลำไส้ส่วนต้น โดยทั้ง 2 ส่วน มีคะแนนรอยโรค +1 ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบรอยโรคที่มีคะแนนรอยโรค +1 ที่ลำไส้ส่วนต้น ได้ในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิด ด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 4.1)

จากตารางที่ 4.2 พบว่าวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถตรวจพบรอยโรคได้จากทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น โดยมีคะแนนรอยโรค +1 ได้เป็นวันแรกหลังได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) และนอกจากนี้ยังพบรอยโรคได้ในไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ที่ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 โดยในส่วนของลำไส้ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตัน ตรวจไม่พบรอยโรคจากทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

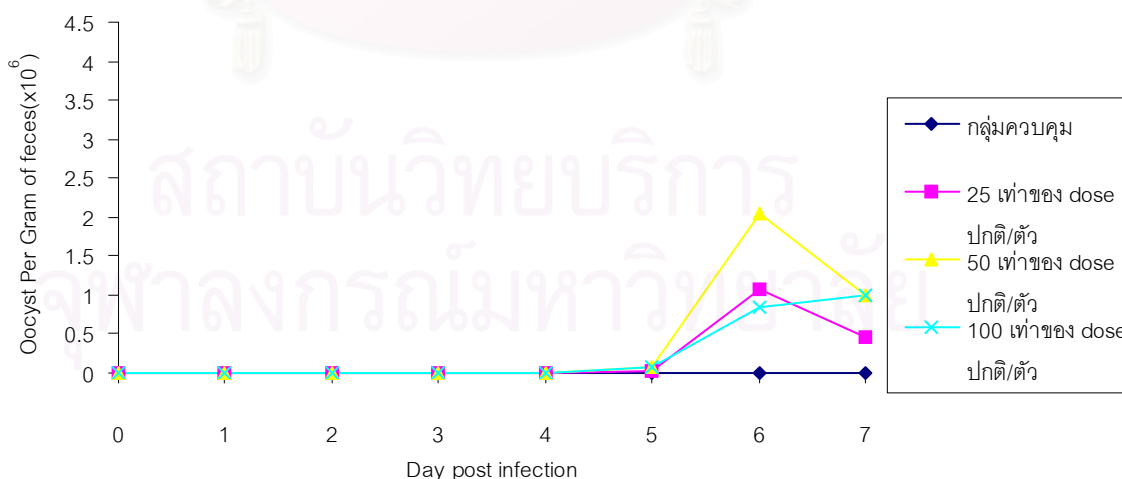
#### 4.3 การตรวจหาเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

จากการป้อนเชื้อบิด *E. tenella* CB38 สามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว ที่บริเวณไส้ตันได้เป็นส่วนแรกจากทั้งหมด 5 ส่วน ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตรวจพบเชื้อบิดได้เฉพาะที่ไส้ตันในวันที่ 6 และวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิด ในขณะที่ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 และส่วนกลางที่ 2 สามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิด และในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด จึงพบเชื้อบิดที่ลำไส้ส่วนท้าย โดยพบเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว ซึ่งกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอคซิซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตรวจพบเชื้อบิดที่ลำไส้ส่วนต้นและส่วนกลางที่ 1 กับส่วนท้าย ได้ในวันที่ 6 และ 7 หลังการติดเชื้อบิด ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 และตารางภาคผนวกที่ 2

จากตารางที่ 4.4 ตรวจพบเชื้อบิดได้วันแรกในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25, 50 และ 100 เท่า ของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ที่ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 และส่วนท้าย ส่วนที่ไส้ตันพบเชื้อบิดวันแรกในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) และสามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ทุกส่วนของลำไส้และไส้ตันได้ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) (ตารางภาคผนวกที่ 4)



รูปที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยผลการตรวจนับจำนวนโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังป้อนเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี McMaster Chamber



รูปที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยผลการตรวจนับจำนวนโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ หลังป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี McMaster Chamber

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจให้คะแนนรอยโรคในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า

ปริมาณเชื้อที่ป้อน (ไอโอสีสต์/ตัว)	DPI	0			1			2			3			4			5			6			7					
		ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
กลุ่มควบคุม	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	+1	+1	+1
1,000	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	0	0	0	+1	+1	+1	+1	+1	+2
10,000	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	+1	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	+2	+2	0	+3	+3	+2	+3	+3	+2

DPI : Day Post Infection ให้คะแนนรอยโรคตามวิธี Johnson และ Reid (1970)



ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจให้คะแนนรอยโรคในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox® (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยตาเปล่า

ปริมาณเชื้อที่ป้อน (dose วัคซีน/ตัว)	DPI ลำไส้ส่วนต่างๆ	0			1			2			3			4			5			6			7					
		ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่			ไกตัวที่								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
กลุ่มควบคุม	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 เท่า	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+2	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 เท่า	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 เท่า	ส่วนต้น	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+2	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	ส่วนกลางที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1
	ส่วนกลางที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ส่วนท้าย	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ไส้ตัน	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

DPI : Day Post Infection ให้คะแนนรอยโรคตามวิธี Johnson และ Reid (1970)

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจพบเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ปริมาณเชื้อที่ป้อน (ไอโอสีสต์/ตัว)	DPI	0			1			2			3			4			5			6			7		
		ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
กลุ่มควบคุม	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
1,000	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	✓	✓	-
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10,000	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	✓	✓	-	-
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	✓	✓
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

DPI : Day Post Infection

✓ : ตรวจพบเชื้อบิต

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจพบเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox® (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีกลังจุลทรรศน์แสงสว่าง

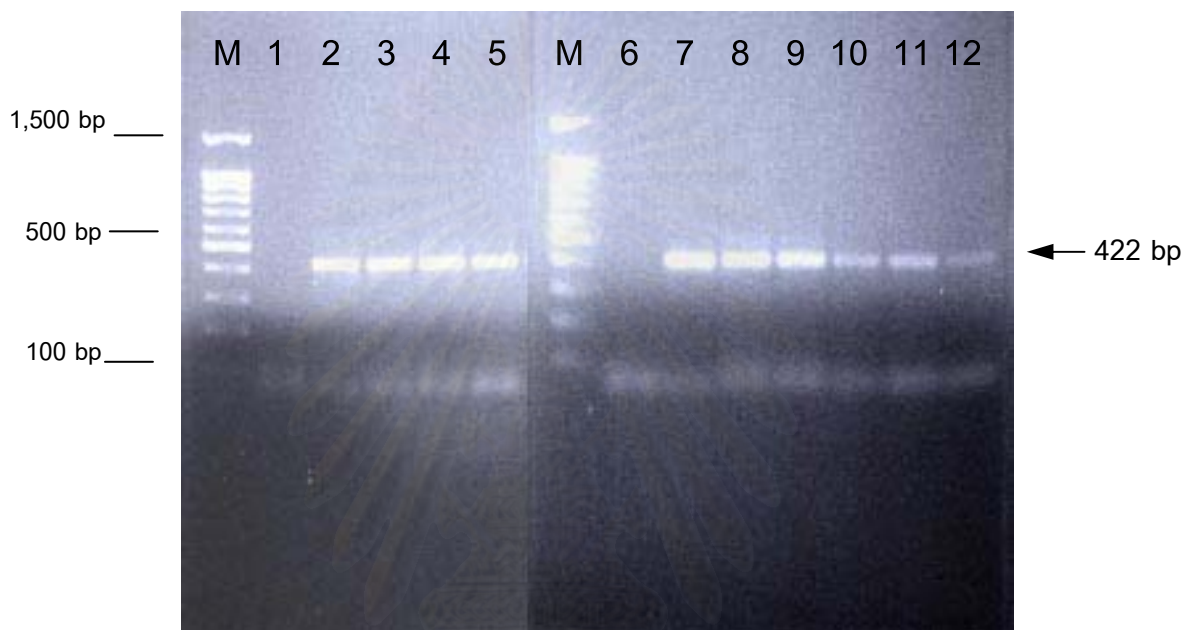
ปริมาณเชื้อที่ป้อน (ไอโซซีสต์/ตัว)	DPI ลำไส้ส่วนต่างๆ	0			1			2			3			4			5			6			7		
		ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่			ไก่ตัวที่					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
กลุ่มควบคุม	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25 เท่า	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
50 เท่า	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
100 เท่า	ส่วนต้น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนกลางที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ส่วนท้าย	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ไส้ตัน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

DPI : Day Post Infection

✓ : ตรวจพบเชื้อบิต

#### 4.4 ความไวของวิธี PCR-RFLP ที่มีกับเชื้อบิด *E. tenella* CB38

จากผลการทดสอบหาความไวของวิธี PCR เมื่อเจือจาง DNA ลง (2-fold dilution) และทดสอบความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. พบว่าความไวของการทดสอบอยู่ที่จำนวนไอโอสีสต์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหาได้ในครั้งนี้ คือ 0.12 ไอโอสีสต์ โดยมีผลิตภัณฑ์ขนาด 422 bp ส่วนความไวของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่าให้ความไวที่ 8 ไอโอสีสต์ ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ความไวของวิธี PCR ต่อเชื้อบิด *E. tenella* CB38 จำนวนเทียบเท่า 0.12 ไอโอสีสต์

Lane M : 1.5 Kbp DNA ladder marker

Lane 1,6: Negative control (H<sub>2</sub>O)

Lane 2 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 62.50 ไอโอสีสต์

Lane 3 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 31.25 ไอโอสีสต์

Lane 4 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 15.63 ไอโอสีสต์

Lane 5 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 7.81 ไอโอสีสต์

Lane 7 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 3.91 ไอโอสีสต์

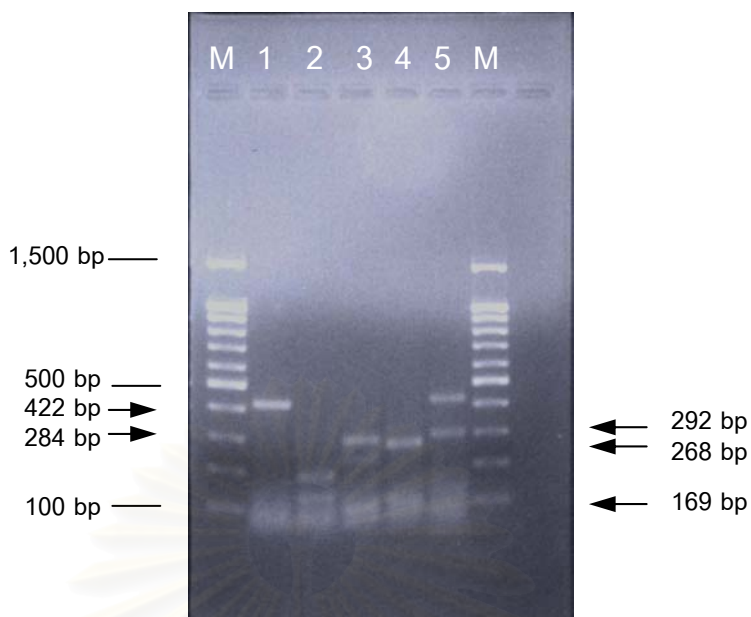
Lane 8 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 1.96 ไอโอสีสต์

Lane 9 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 0.98 ไอโอสีสต์

Lane 10 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 0.49 ไอโอสีสต์

Lane 11 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 0.24 ไอโอสีสต์

Lane 12 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.tenella* CB38 จำนวน 0.12 ไอโอสีสต์



**รูปที่ 4.4** ความไวของวิธี PCR-RFLP ต่อเชื้อบิด *E. tenella* CB38 จำนวนเทียบเท่า 8 โอไอซีเอสต์

Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker

Lane 1: ผลิตรหัส PCR ของ *E. tenella* CB 38 ขนาด 422 bp

Lane 2: ผลิตรหัส PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I ขนาด 183 bp, 169 bp

Lane 3: ผลิตรหัส PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hha* I ขนาด 284 bp, 226 bp

Lane 4: ผลิตรหัส PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* I ขนาด 268 bp

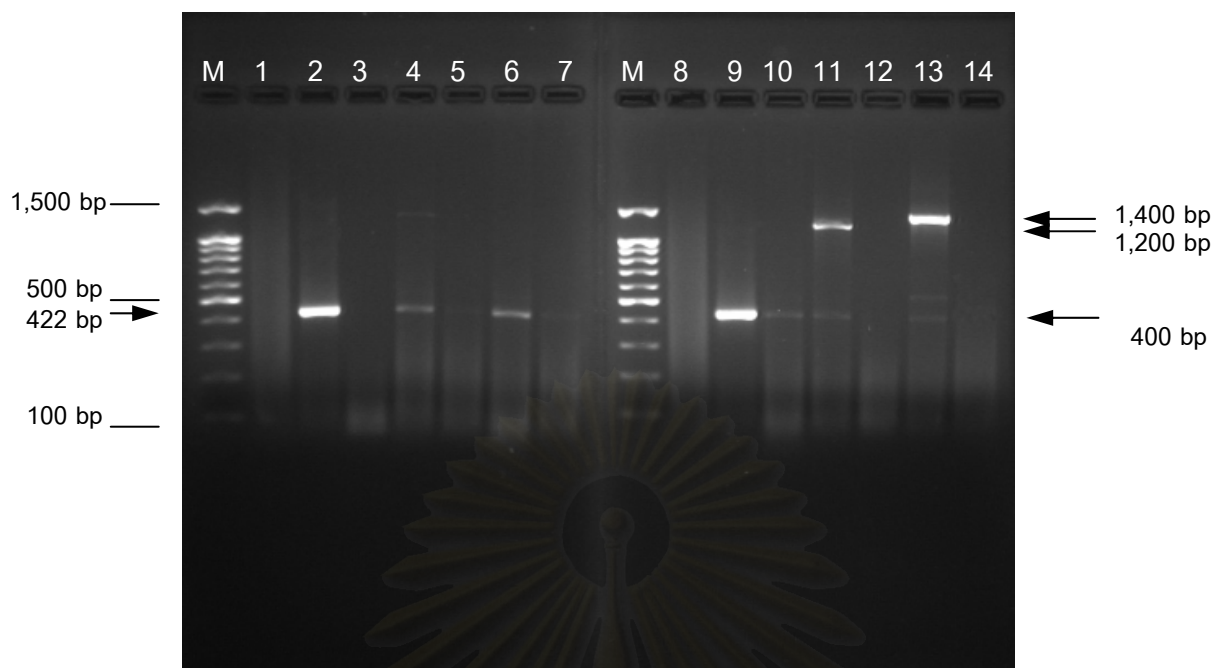
Lane 5: ผลิตรหัส PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III ขนาด 422 bp, 292 bp, 130 bp

#### 4.5 ความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ด้วยวิธี PCR-RFLP

ผลการเพิ่มจำนวน DNA ตรงบริเวณ 18S rRNA gene ของเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ ได้แก่ หนอนพยาธิตัวกลม *Ascaridia galli*, *Capillaria* spp., *Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae* (เพศผู้และเพศเมีย) และ *Tetrameres* spp. พยาธิตืด *Raillietina cestocillus*, *R. echinobothrida*, *R. tetragona*, Tapeworm segment และหนอนพยาธิตัวกลม ในลำไส้เล็กของแพะ ได้แก่ *Trichostrongylus* spp. พบว่าไม่มีผลิตรหัส PCR กับ DNA ของ *Heterakis gallinae* (เพศผู้) *R. tetragona*, *R. cestocillus*, *Ascaridia galli* และ *Capillaria* spp. (รูปที่ 4.5; Lane 3, 5, 7, 12 และ 14 ตามลำดับ) และพบผลิตรหัส PCR ง่าย ๆ มีขนาด 400 bp จากตัวอย่าง DNA ที่ได้จาก *R. echinobothrida* และ Tapeworm segment (รูปที่

4.5; Lane 6 และ 10 ตามลำดับ) สำหรับ *Gongylonema* spp. พบผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 400 bp และ 1,200 bp (รูปที่ 4.5; Lane 11) ในขณะที่ *Heterakis gallinae* (เพศเมีย) และ *Tetrameres* spp. มีขนาดประมาณ 400 bp และ 1,400 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.5; Lane 4, 13 ตามลำดับ) และสุดท้าย *Trichostrongylus* spp. มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ประมาณ 1,200 bp (รูปที่ 4.6; Lane 4) ซึ่งพยาธิชนิดนี้เป็นหนอนพยาธิในลำไส้เล็กของแพะ

ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ที่บริเวณ 18S rRNA gene มีสูงเมื่อเทียบกับ *Trichostrongylus* spp. (รูปที่ 4.6) ผลความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP ระหว่างการทดสอบเชื้อบิต *E. tenella* CB 38 กับ *Trichostrongylus* spp. ที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hpa* II และ *Hae* III พบว่าสามารถแยกชนิดเชื้อบิตได้ 2 ชนิด คือ *E. tenella* มีขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ 106 bp และ 268 bp ส่วน *E. necatrix* จะมีขนาดของชิ้นส่วน DNA 106 bp ส่วน *Trichostrongylus* spp. ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II และเมื่อย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III พบว่า ชิ้นส่วน DNA ของ *E. tenella* มีขนาด 422 bp และ ชิ้นส่วน DNA ของ *E. necatrix* มี 2 ขนาด คือ 130 bp และ 292 bp ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ ของ *Trichostrongylus* spp. มีขนาดของชิ้นส่วน DNA 1,100 bp ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบ RFLP ระหว่าง *E. tenella*. CB38 และ *Trichostrongylus* spp. ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP สามารถใช้ในการแยกชนิดเชื้อบิตได้ โดยการวิเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ



รูปที่ 4.5 ความจำเพาะของวิธี PCR ที่บริเวณ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ต่อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่

Lane M : 1.5 Kbp DNA ladder marker

Lane 1,8 : Negative control ( $H_2O$ )

Lane 2,9 : Positive control (ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. tenella* CB38)

Lane 3 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Heterakis gallinae* (เพศผู้)

Lane 4 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Heterakis gallinae* (เพศเมีย)

Lane 5 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina tetragona*

Lane 6 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina echinobothrida*

Lane 7 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina cesticillus*

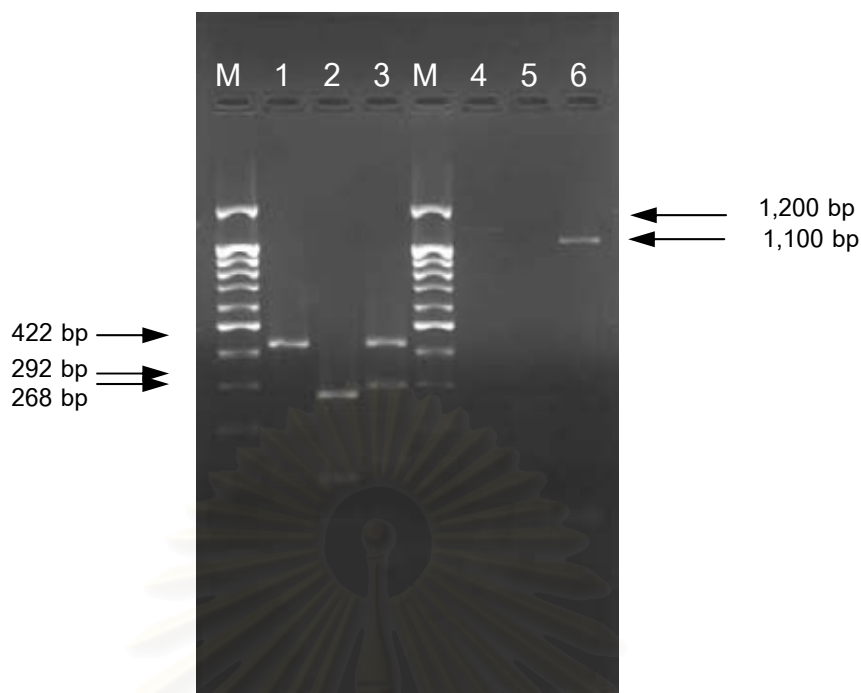
Lane 10 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ Tapeworm segment

Lane 11 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Gongylonema* spp.

Lane 12 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Ascaridia galli*

Lane 13 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Tetrameres* spp.

Lane 14 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Capillaria* spp



รูปที่ 4.6 ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene ที่แตกต่างกันระหว่าง *E. tenella* CB38 กับ *Trichostrongylus* spp.

Lane M : 1.5 Kbp DNA ladder marker

Lane 1 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. tenella* CB38 ขนาด 422 bp

Lane 2 : ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa* II ขนาด 268 bp

Lane 3 : ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ขนาด 130 bp, 292 bp, 422 bp

Lane 4 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Trichostrongylus* spp. ขนาด 1,200 bp

Lane 5 : ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Trichostrongylus* spp. ตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

Lane 6 : ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Trichostrongylus* spp. ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ขนาด 1,100 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#### 4.6 การแยกชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดจาก *E. tenella* CB38 และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ก่อนป้อนเชื้อบิดให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP

##### 4.6.1 เชื้อบิด *E. tenella* CB38

จากรูปที่ 4.7 แสดงความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ในการแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ในไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III พบว่าสามารถแยกเชื้อบิดได้ 3 ชนิด คือ *E. maxima* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ส่วน *E. necatrix* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 292 bp และ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III และ *E. tenella* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ โดยเทียบขนาดของผลผลิต PCR-RFLP ที่ได้ตามตารางที่ 3.1

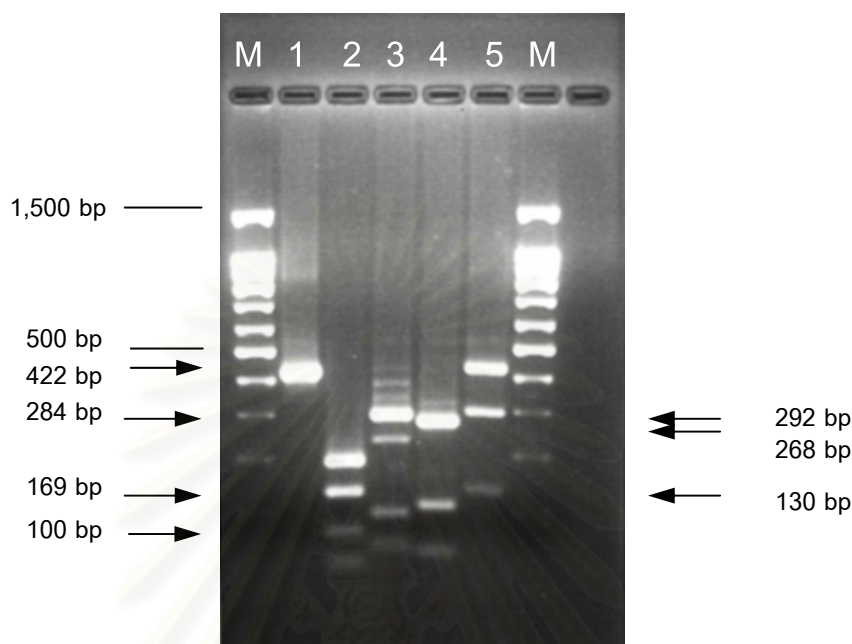
ในการศึกษาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดแต่ละชนิด ที่พบรวมอยู่ในเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ครั้งนี้ พบว่าอัตราส่วนของเชื้อบิดทั้ง 3 ชนิด คิดเป็นร้อยละได้ดังนี้คือ *E. tenella* 64% *E. necatrix* 32% และ *E. maxima* 4% ตามลำดับ ด้วยโปรแกรม Scion Image Software

##### 4.6.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

จากรูปที่ 4.8 แสดงความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ในการแยกชนิดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III พบว่าสามารถแยกเชื้อบิดได้ 4 ชนิด คือ *E. acervulina* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 354 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II *E. maxima* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp และ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hpa* II ตามลำดับ ส่วน *E. necatrix* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 169 bp และ 292 bp ร่วมกับ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hae* III ตามลำดับ และ *E. tenella* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ และผลจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hpa* II พบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 422 bp ซึ่งเป็นชิ้นส่วน DNA ที่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อบิดชนิด *E. parecox* จึงคาดว่าในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) อาจจะมีเชื้อบิดชนิด *E. parecox* หรือเชื้อบิดชนิดอื่นเป็นส่วนประกอบอยู่ภายในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) โดยเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ที่ได้ตามตารางที่ 3.1

จากการหาปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม Scion Image Software ที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่ามีเชื้อบิด *E. acervulina* 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% และ *E. tenella* 3% ตามลำดับ ในขณะที่อาจจะมีปริมาณ

สัมพันธภาพของ *E. praecox* หรือเชื้อบิดชนิดอื่นอยู่ 48% ที่คาดว่าน่าจะผสมอยู่ภายในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)



รูปที่ 4.7 ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ในการแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38

Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker

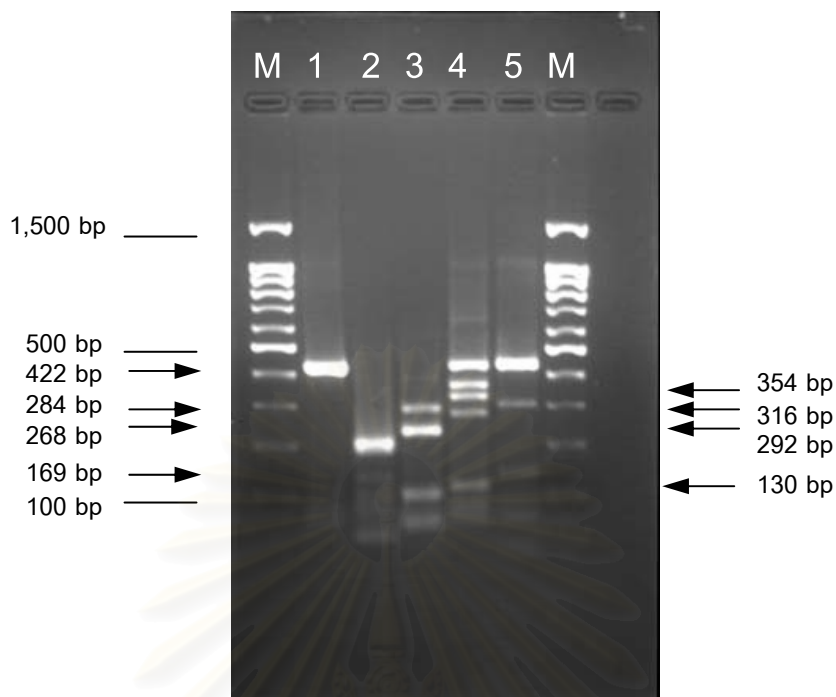
Lane 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. tenella* CB38 ขนาด 422 bp

Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP product ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ขนาด 183 bp, 169 bp, 100 bp

Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha* I ขนาด 284 bp, 226bp

Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa* II ขนาด 268 bp, 106 bp

Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *E. tenella* CB38 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ขนาด 422 bp, 292 bp, 130 bp



รูปที่ 4.8 ความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ในการแยกชนิดเชื้อปรสิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker

Lane 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ขนาด 422 bp

Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I ขนาด 201 bp, 169 bp

Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hha* I ขนาด 284 bp, 226 bp

Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II ขนาด 422 bp, 354 bp, 316 bp, 268 bp, 106bp

Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III 422 bp, 292 bp, 130 bp

#### 4.8 การแยกชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่1 ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และ จากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี PCR-RFLP

##### 4.7.1 *E. tenella* CB38

จากรูปที่ 4.9 แสดงผลการตรวจหาเชื้อบิด หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 422 bp พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถเริ่มตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ไส้ตัน ได้วันแรกในวันที่ 2 หลังการติดเชื้อบิด ต่อจากนั้นพบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไส้ตัน ในวันที่ 4 และวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิด ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^2$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตามลำดับ ได้เป็นวันแรก ส่วนที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่2 และส่วนท้าย สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้วันแรกในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด จากกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ได้ที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น และส่วนท้าย ได้ในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด เช่นกัน และในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้วันแรกที่บริเวณลำไส้ส่วนกลางที่1 และส่วนกลางที่2 จากกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  และ  $10^3$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตามลำดับ และจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ได้ในทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตัน ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว ที่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้เฉพาะลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่2 ส่วนท้าย และไส้ตัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้เฉพาะบริเวณไส้ตันเท่านั้น จากผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ได้จากแต่ละกลุ่ม และในแต่ละวันหลังการติดเชื้อบิด ได้ทำการเลือกผลิตภัณฑ์ PCR จากวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกชนิดเชื้อบิดจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน เนื่องจากพบผลิตภัณฑ์ PCR จากทุกส่วนของลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน ของวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซิสต์/ไก่ 1 ตัว และมีปริมาณ DNA เพียงพอในการนำมาศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิดแต่ละชนิด ด้วยวิธี PCR-RFLP

ดังนั้นในการศึกษาชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิดพบว่าในลำไส้ส่วนต้น ประกอบไปด้วยเชื้อบิด *E. acervulina* 84% และ *E. tenella* 6% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 354 bp และ 284 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II และ *Hha* I ตามลำดับ (รูปที่ 4.10 A) ลำไส้ส่วนกลางที่1 ประกอบไปด้วยเชื้อบิด *E. necatrix* 26% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 292 bp และ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III *E. acervulina* 21% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 354 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II *E. tenella* 14% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่

จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hae* III ตามลำดับ และ *E. maxima* 6% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II (รูปที่ 4.10 B) ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. maxima* 69% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II *E. necatrix* 7% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 292 bp และ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III และ *E. tenella* 6% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ (รูปที่ 4.10 C) ส่วนท้าย ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. maxima* 73% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II *E. tenella* 16% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ และ *E. necatrix* 7% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 169 bp และ 292 bp ร่วมกับ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hae* III (รูปที่ 4.10 D) และไส้ตันประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. tenella* 52% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ *E. necatrix* 43% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 169 bp และ 292 bp ร่วมกับ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hae* III และ *E. maxima* 4% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I (รูปที่ 4.10 E)

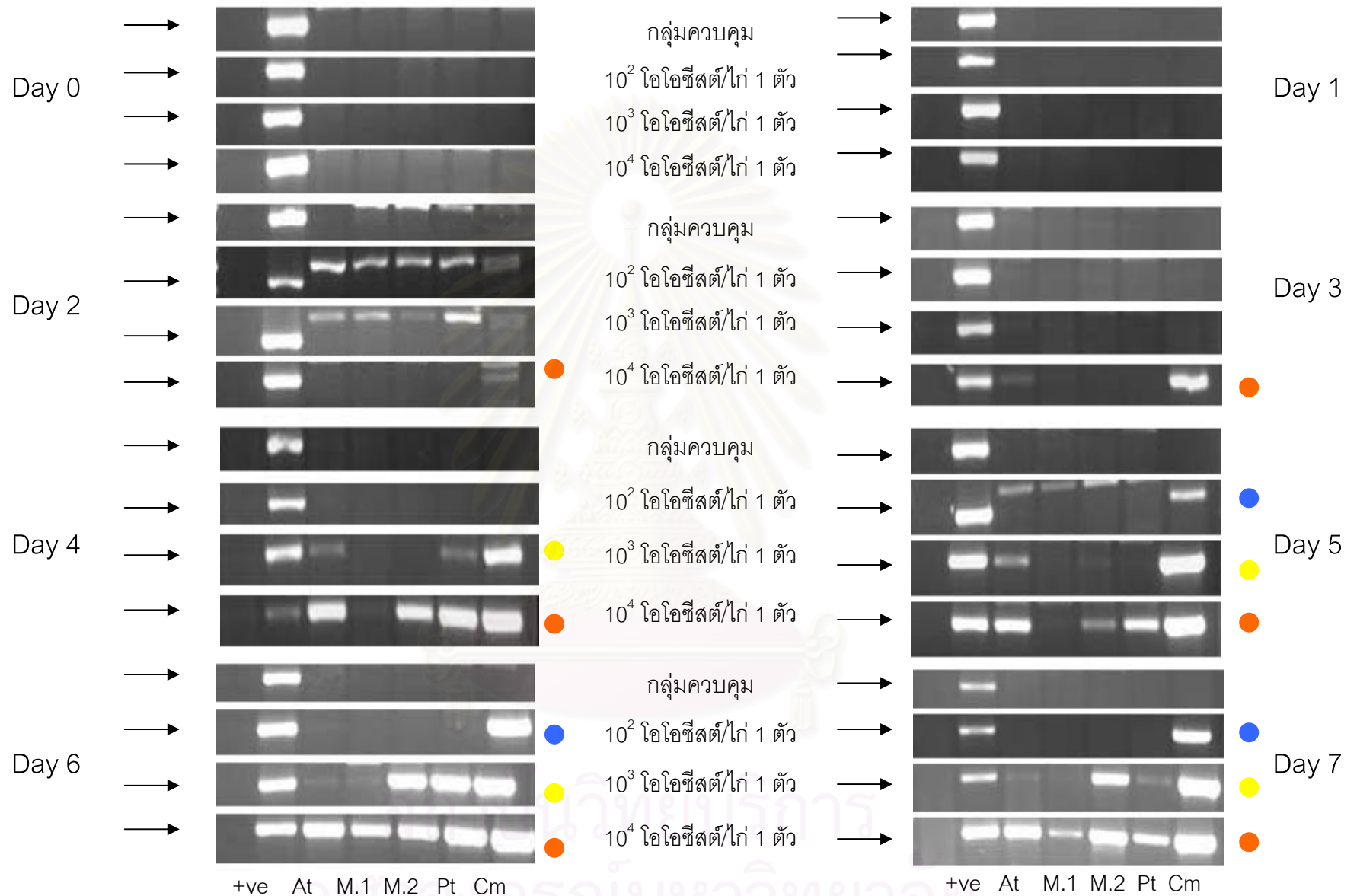
#### 4.7.2 วัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

ในส่วนของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) เริ่มตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่มีขนาด 422 bp ของเชื้อบิต ได้วันแรกในวันที่ 1 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่บริเวณไส้ตัน เฉพาะกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ซึ่งต่อมาพบว่าไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ได้ในช่วงวันที่ 2-4 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) และสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ไส้ตัน อีกครั้งในวันที่ 5-7 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25, 50 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ในขณะที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น และส่วนกลางที่ 1 ตรวจพบได้วันแรกในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) จากทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับการได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) แต่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 ด้วย ต่อมาในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ลำไส้ส่วนท้ายเป็นวันแรก จากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25 และ 50 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว และใน

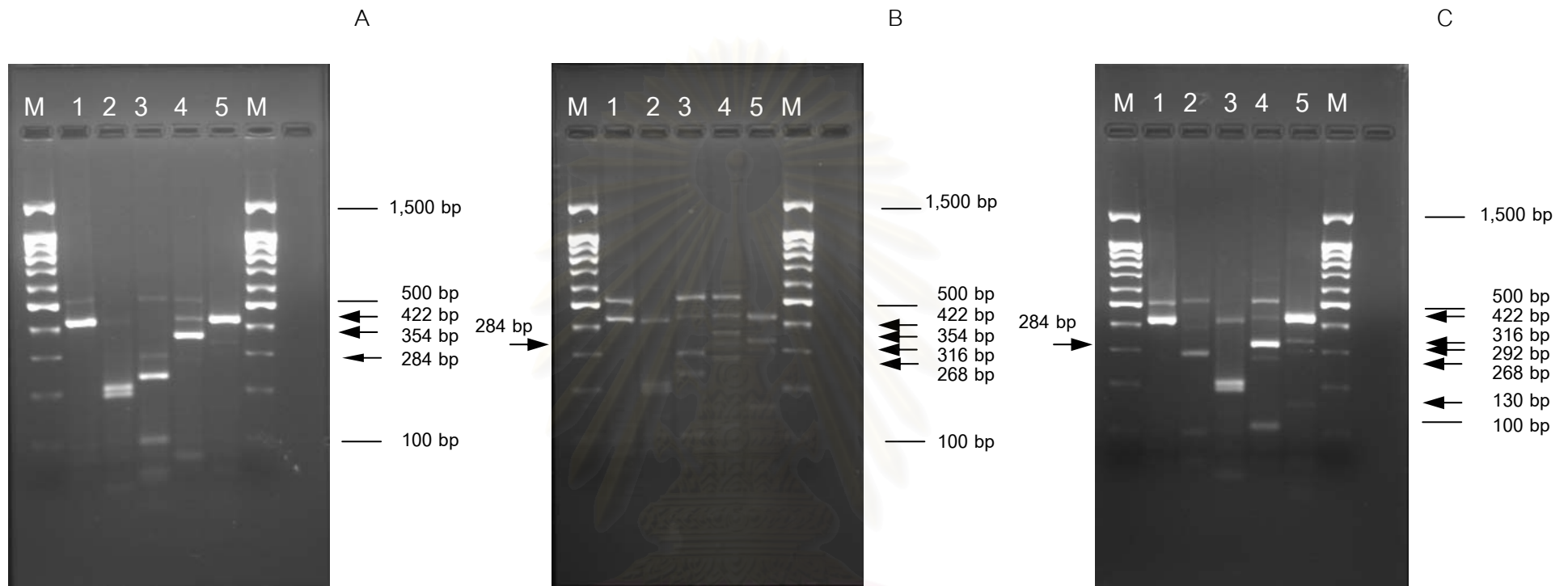
วันที่ 5 หลังติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ของ PCR ได้ใน  
ทุกส่วนของลำไส้และไส้ตัน จากทุกกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ดังรูปที่ 4.11

และในการตรวจแยกชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของเชื้อบิตในแต่ละส่วนของลำไส้  
และไส้ตัน หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ในครั้งนี้ ได้เลือกผลิตภัณฑ์ PCR ของวันที่ 6  
หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1  
ตัว มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน พบว่าในลำไส้  
ส่วนต้น มีเชื้อบิต *E. acervulina* 73% และ *E. maxima* 3% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 354  
bp และ 316 bp ตามลำดับ เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II (รูปที่ 4.12 A) ลำไส้ส่วนกลางที่  
1 ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. maxima* 90% และ *E. tenella* 6% มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่  
316 bp และ 284 bp ตามลำดับ เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II และ *Hha* I ตามลำดับ (รูป  
ที่ 4.12 B) ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. maxima* 94% และ *E. tenella* 6% มี  
ขนาดผลิตภัณฑ์ ที่จำเพาะอยู่ที่ 316 bp และ 284 bp ตามลำดับ เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ  
*Hpa* II และ *Hha* I ตามลำดับ (รูปที่ 4.12 C) ลำไส้ส่วนท้าย ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. maxima*  
87% มีขนาดผลิตภัณฑ์ ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp และ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I  
และ *Hpa* II ตามลำดับ และ *E. tenella* 8% มีขนาดผลิตภัณฑ์ ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp เมื่อตัดด้วย  
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I (รูปที่ 4.12 D) และไส้ตัน ประกอบไปด้วยเชื้อบิต *E. necatrix* 45% มี  
ขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 169 bp และ 292 bp ร่วมกับ 130 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัด  
จำเพาะ *Alu* I และ *Hae* III *E. tenella* 40% มีขนาดผลิตภัณฑ์ ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268  
bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ และ *E. maxima* 13% มีขนาด  
ผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp และ 316 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hpa* II  
ตามลำดับ (รูปที่ 4.12 E)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

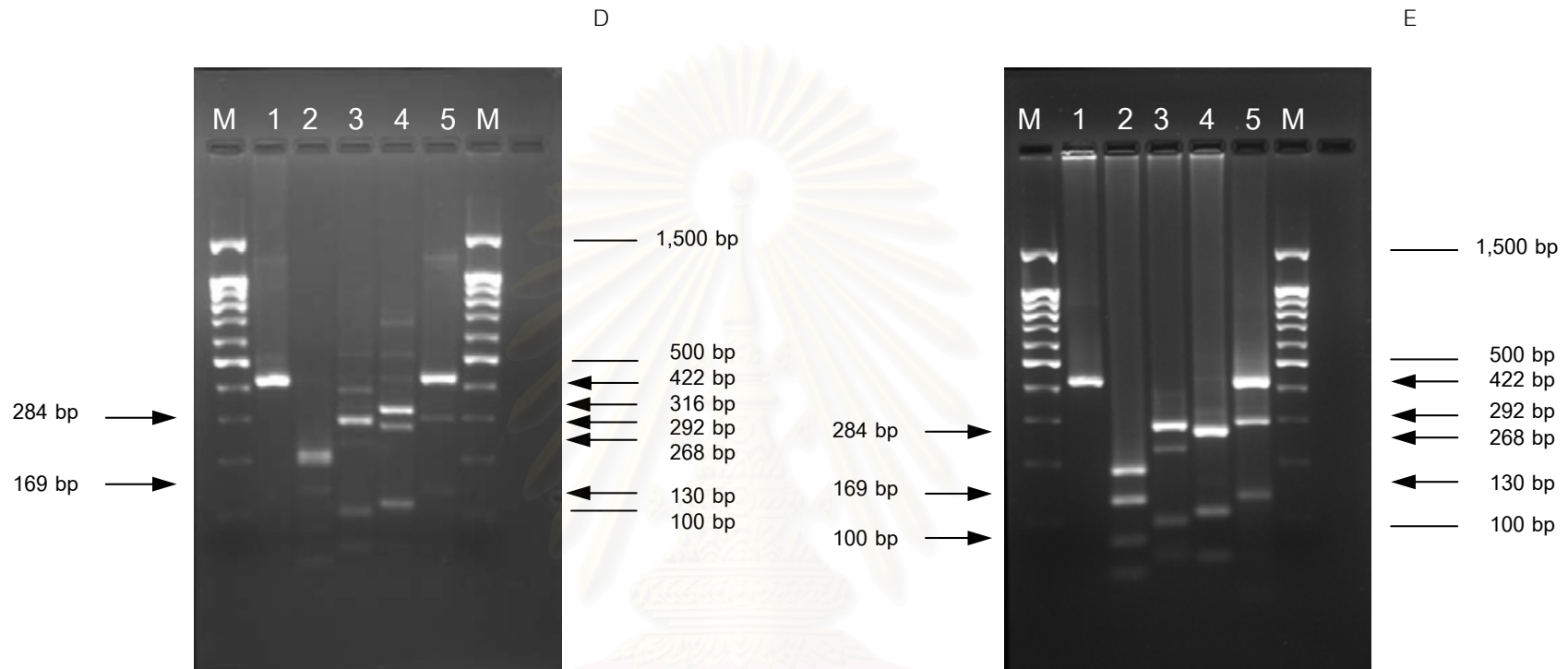


รูปที่ 4.9 ผลิตรหัส PCR ตั้งแต่วันที่ 0-7 หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38; + ve : Positive Control (422 bp), At : ลำไส้ส่วนต้น, M.1 : ลำไส้ส่วนกลางที่1, M.2 : ลำไส้ส่วนกลางที่2, Pt : ลำไส้ส่วนท้าย, Cm : ไล่ต้น, ● 10<sup>2</sup> โอลิโอซีสตร์/ไก่ 1 ตัว, ● 10<sup>3</sup> โอลิโอซีสตร์/ไก่ 1 ตัว, ● 10<sup>4</sup> โอลิโอซีสตร์/ไก่ 1 ตัว

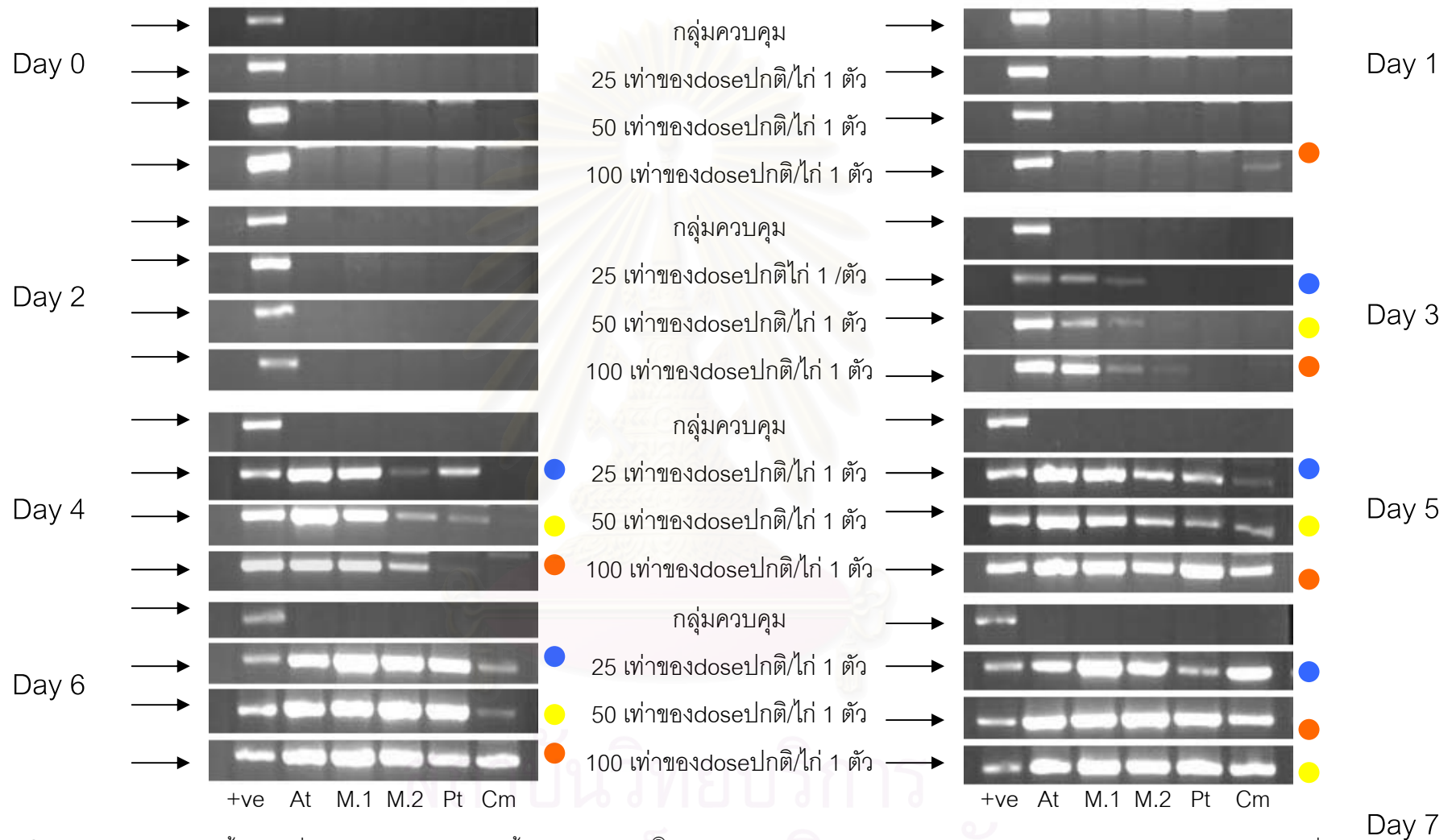


รูปที่ 4.10 ผลการแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ด้วยวิธี PCR-RFLP A) ลำไส้ส่วนต้น, B) ลำไส้ส่วนกลางที่ 1: Lane M; 1.5 Kbp DNA ladder marker, Lane 1; ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. tenella* CB38 ขนาด 422 bp, Lane 2; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, Lane 3; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, Lane 4; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, Lane 5; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III , C) ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 : Lane M; 1.5 Kbp DNA ladder marker, Lane 1; ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. tenella* CB38 ขนาด 422 bp, Lane 2; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, Lane 3; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I , Lane 4; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, Lane 5; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III

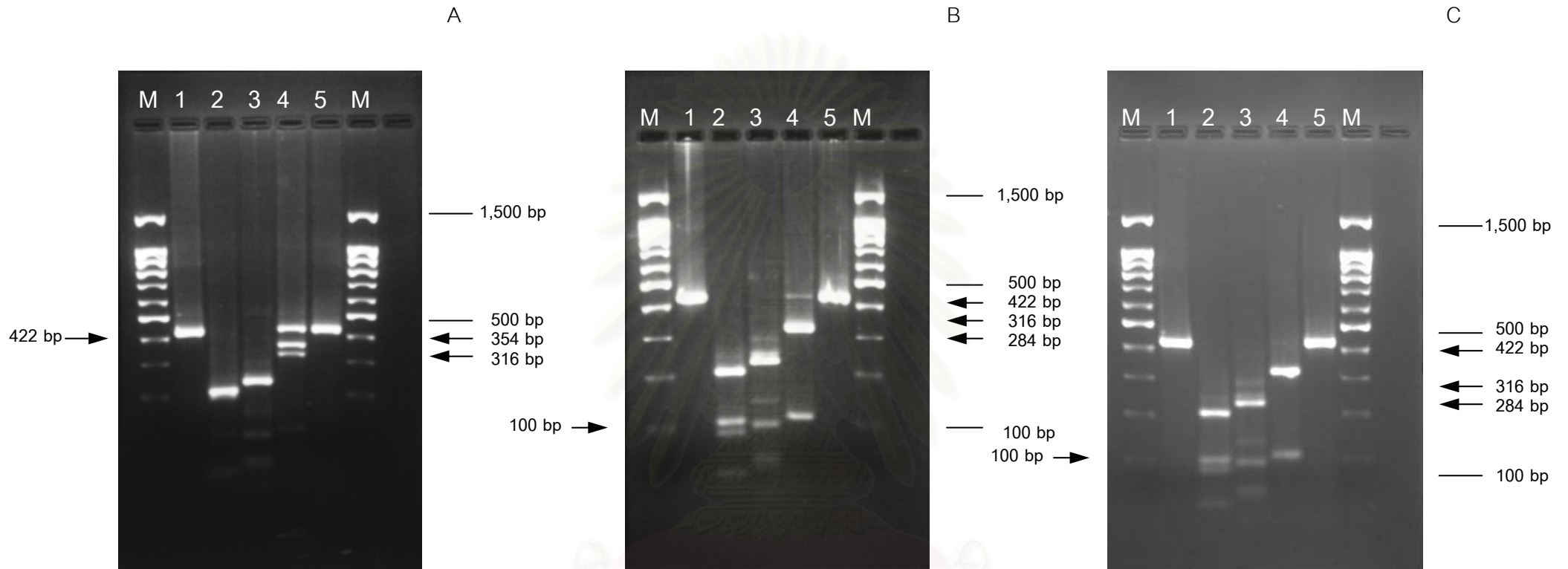




รูปที่ 4.10 (ต่อ) ผลการแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่หลังจากได้รับเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ด้วยวิธี PCR-RFLP D) ลำไส้ส่วนท้าย , E) ไส้ตัน : Lane M; 1.5 Kbp DNA ladder marker, Lane 1; PCR product ของ *E. tenella* CB38 ขนาด 422 bp, Lane 2; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, Lane 3; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, Lane 4; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, Lane 5; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III

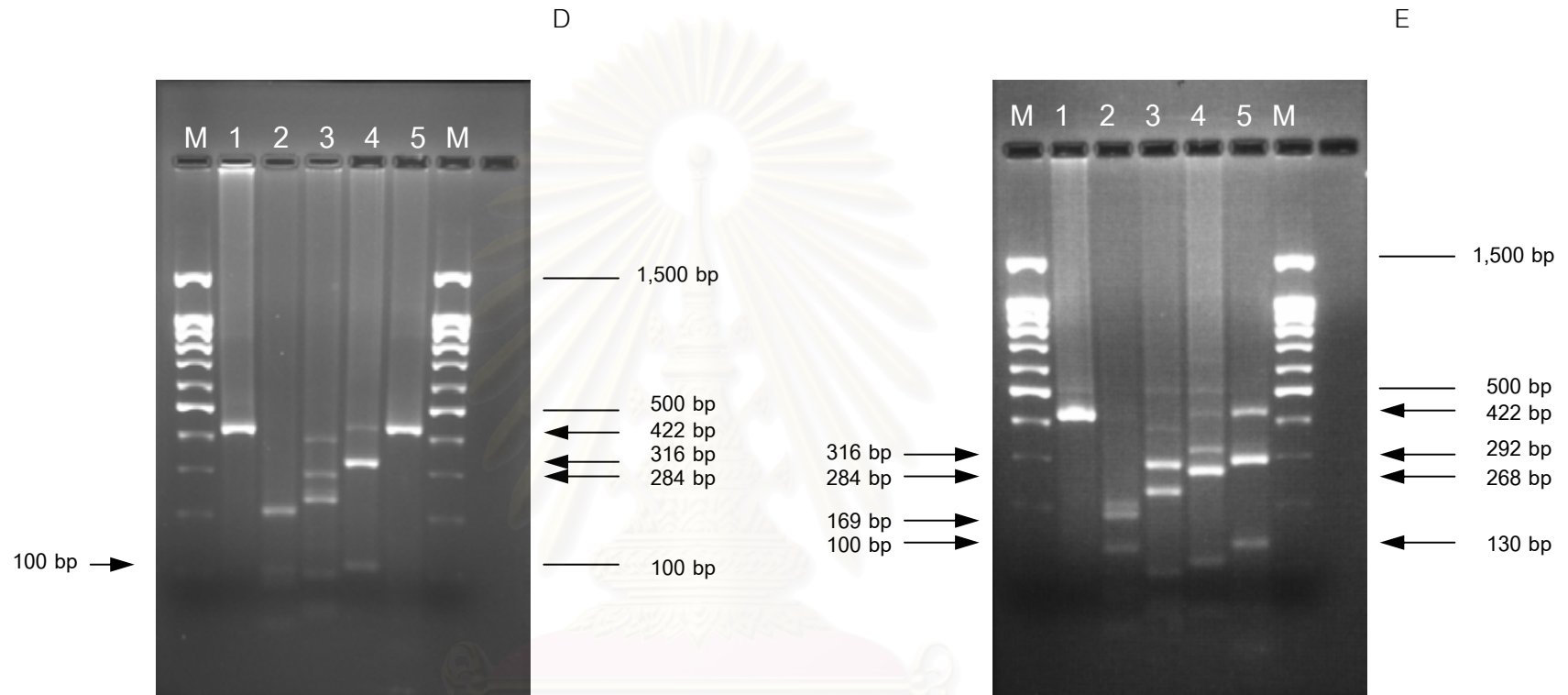


รูปที่ 4.11 ผลิตรกษณ์ PCR ตั้งแต่วันที่ 0-7 หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I); + ve : Positive Control (422 bp), At : ลำไส้ส่วนต้น, M.1 : ลำไส้ส่วนกลางที่ 1, M.2 : ลำไส้ส่วนกลางที่ 2, Pt: ลำไส้ส่วนท้าย, Cm : ไล่ต้น, ● 25 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว, ● 50 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว, ● 100 เท่าของdoseปกติ/ไก่ 1 ตัว



**รูปที่ 4.12** ผลการแยกชนิดเชื้อบิดจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี PCR-RFLP A) ลำไส้ส่วนต้น, B) ลำไส้ส่วนกลางที่ 1, C) ลำไส้ส่วนกลางที่ 2: Lane M; 1.5 Kbp DNA ladder marker, Lane 1; ผลิตภัณฑ์ PCR ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ขนาด 422 bp, Lane 2; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, Lane 3; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, Lane 4; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, Lane 5; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 (ต่อ) ผลการแยกชนิดเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วยวิธี PCR-RFLP

D) ลำไส้ส่วนท้าย, E) ไส้ตัน : Lane M; 1.5 Kbp DNA ladder marker, Lane 1; ผลิตภัณฑ์ PCR ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ขนาด 422 bp, Lane 2; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, Lane 3; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, Lane 4; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, Lane 5; เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย (polymorphisms) เพื่อแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene โดยได้รับการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการออกแบบ Primer จำนวน 1 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณที่เรียกว่า conserved region ของ *Eimeria* spp. ในไก่ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 422 bp และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกชนิดเชื้อบิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีด้วยกัน 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III โดยวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค (Sangster et al., 2002) และได้มีผู้ทำการศึกษากการแยกชนิด *Cyclospora* spp. กับ *Eimeria* spp. ในไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene ซึ่งเชื้อบิดในไก่นำมาศึกษามีด้วยกัน 2 ชนิด คือ *E. tenella* 3 สายพันธุ์ และ *E. mitis* 1 สายพันธุ์ พบว่าวิธีนี้สามารถแยกระหว่าง *Cyclospora* spp. กับ *Eimeria* spp. ได้ แต่ไม่สามารถแยกระหว่าง *E. tenella* 3 สายพันธุ์ กับ *E. mitis* 1 สายพันธุ์ ได้ (Jinemen et al., 1996) ในปัจจุบันพบว่านอกจากการนำวิธี PCR-RFLP มาใช้กับงานด้านการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ได้แล้วนั้น ยังพบว่าสามารถนำมาใช้กับปรสิตชนิดอื่นๆ เช่น *Cryptosporidium* spp. (Patel et al., 2000) และมีการนำวิธี PCR-RFLP มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านต่างๆ เช่น Taxonomy และ Phylogeny ของเชื้อบิดในสัตว์ฟันแทะ (Hnida and Duszynnski, 1999) ศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (Duraisingh et al., 1998) และศึกษาการระบาดสำหรับตรวจสอบหาความจำเพาะของ DNA จากโอโอซิสต์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอุจจาระหรือสิ่งแวดล้อมได้ (Woods et al., 2000)

จากการศึกษาการตรวจหาโอโอซิสต์จากอุจจาระไก่ พบว่าสามารถตรวจพบโอโอซิสต์ได้ในช่วงระหว่างวันที่ 5-6 หลังการติดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ McDonald และ Shirley (1987) ที่สามารถตรวจพบโอโอซิสต์จากอุจจาระไก่ หลังป้อนเชื้อบิด *E. tenella* สายพันธุ์ Houghton ในช่วงเวลา 132 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อบิด โดยปัจจัยการตรวจพบเชื้อบิดขึ้นอยู่กับอายุไก่ พันธุ์ไก่ ชนิดของเชื้อบิดและปริมาณเชื้อบิดที่ไก่ได้รับ (Vermeulen, 2001) โดยสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิด ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว อยู่ 1 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดใน

ระดับปริมาณ  $10^4$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว มีจำนวนโอลิโอซิสต์ที่นับได้จากอุจจาระหนัก 1 กรัม มากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว และ  $10^2$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว แต่ในการตรวจหาโอลิโอซิสต์จากอุจจาระไก่ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่าไก่ทั้ง 3 กลุ่ม ที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถเริ่มตรวจพบโอลิโอซิสต์ได้ในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดเหมือนกันทุกกลุ่ม แต่ผลการตรวจนับจำนวนโอลิโอซิสต์จากอุจจาระไก่หนัก 1 กรัม ผลที่ได้ไม่ได้สอดคล้องกับจำนวนโอลิโอซิสต์ที่ไก่แต่ละกลุ่มได้รับ โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 50 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว มีจำนวนโอลิโอซิสต์ที่นับได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ในช่วงวันที่ 6-7 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) แสดงว่าอาจเกิด crowding effect คือ การที่ไก่ได้รับปริมาณโอลิโอซิสต์มากจนถึงระดับหนึ่งและมีผลทำให้การเจริญของเชื้อหยุดลง ทำให้โอลิโอซิสต์ที่ปล่อยออกมามีจำนวนลดลง (Williams, 2001)

ในการศึกษาการตรวจให้คะแนนรอยโรค จากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่าขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของเชื้อบิดที่ไก่แต่ละตัวได้รับ โดยไก่ตัวที่ได้รับปริมาณเชื้อบิดมากสามารถตรวจพบรอยโรคและมีคะแนนรอยโรคมากกว่าไก่ตัวที่ได้รับปริมาณเชื้อบิดปริมาณน้อย (Idris et al., 1997; Schito and Barta, 1997) ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB 38 ในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตรวจพบรอยโรคได้เร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว โดยกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^4$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว มีคะแนนรอยโรคมากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว เมื่อทำการตรวจให้คะแนนรอยโรคในวันเดียวกันและจากส่วนไส้ตันเหมือนกัน และในส่วนของให้คะแนนรอยโรคหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่าไก่ทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน สามารถตรวจพบรอยโรคได้วันแรกในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) เหมือนกัน และคะแนนรอยโรคจาก 3 กลุ่มการทดลอง ให้ผลใกล้เคียงกันเมื่อทำการตรวจที่วันเดียวกันและจากบริเวณลำไส้ตำแหน่งเดียวกัน และจากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าไก่ที่ได้รับปริมาณเชื้อบิด *E. tenella* CB 38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่เท่ากันแต่สามารถตรวจให้คะแนนรอยโรคต่างกัน ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 เพราะวิธีนี้เป็นการตรวจด้วยตาเปล่าจึงก่อให้เกิดความหลากหลายในการตรวจได้ (Kogut and Powell, 1993) นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยโรคบิด ด้วยวิธีการให้คะแนนรอยโรค สามารถให้ผลการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือได้มาก ในไก่ที่ติดเชื้อบิด *E. acervulina* เพราะสามารถเห็นรอยโรคได้ง่ายและชัดเจน (Idris et al.,

1997) แต่ในกรณีที่ไม่ได้ติดเชื้อ *E. maxima* การตรวจหาโรคเป็นสิ่งที่ยาก เพราะระดับการก่อโรคไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของรอยโรคที่สามารถมองเห็นได้ (Conway et al., 1990) และในบางครั้งรอยโรคที่ปรากฏบริเวณลำไส้อาจเกิดจากโรคอื่นได้ เช่น ulcerative enteritis, necrotic enteritis และ botulism (Kohler, 2000) ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยโรคบิดด้วยการให้คะแนนรอยโรคจำเป็นต้องอาศัยผู้มีความชำนาญสูง เพื่อแยกชนิดเชื้อบิดเหล่านี้ให้ออกจากกันได้ (Long and Joyner, 1984)

ส่วนผลที่ได้จากการตรวจหาเชื้อบิดจากลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 ส่วนท้าย และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่าการตรวจพบเชื้อบิดขึ้นอยู่กับปริมาณการได้รับเชื้อของไก่ กล่าวคือ ไก่ที่ได้รับเชื้อบิดจำนวนมากสามารถตรวจพบเชื้อบิดได้เร็วกว่าไก่ที่รับเชื้อบิดจำนวนน้อย (Idris et al., 1997; Schito and Barta, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มที่ป้อนเชื้อบิดในระดับปริมาณ  $10^2$  โอลิโอซิสต์/ไก่ 1 ตัว ที่สามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ในขณะที่ผลการป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกันของไก่ทั้ง 3 กลุ่ม สามารถตรวจพบเชื้อบิดได้ในวันเดียวกัน คือวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) แสดงว่าปริมาณวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่เพิ่มมากขึ้นที่ละ 2 เท่าของ dose ปกติ โดยเริ่มต้นที่ระดับปริมาณ 25 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว จนถึงระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ให้ผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลของการป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในครั้งนี้พบว่ามีความสอดคล้องกับผลการตรวจนับจำนวนโอลิโอซิสต์จากอุจจาระไก่ที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นผลในการทดลองส่วนนี้จึงน่าจะมีผลมาจากเชื้อบิดเกิด crowding effect (Williams, 2001)

การศึกษาความไวของวิธี PCR ในครั้งนี้พบว่าใช้จำนวนโอลิโอซิสต์น้อยที่สุดอยู่ที่ 0.12 โอลิโอซิสต์ ที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp ซึ่งต่างกับการศึกษาของ Yao-Chi และคณะ (2003) ที่พบว่าความไวของวิธี PCR สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 463 bp ของ *E. tenella* ที่บริเวณ ITS-1 ได้เมื่อใช้จำนวนโอลิโอซิสต์ 50 โอลิโอซิสต์ จากประเทศไต้หวัน และความไวของวิธี PCR-RFLP ที่สามารถตรวจแยกชนิดเชื้อบิดได้ ในครั้งนี้อยู่ที่ 8 โอลิโอซิสต์ ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกบริเวณ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. เนื่องจากในสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีความเหมือนกันและแตกต่างกันจากลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงนิยมนำมาเปรียบเทียบกัน (Water et al., 1991; Ananias and Francisco, 1994) และบริเวณ 18S rRNA gene เป็นบริเวณที่มีระดับ conservation สูง (Medlin et al., 1988; Sogin, 1989) จึงเป็นบริเวณที่นิยมเลือกมาใช้ใน

การศึกษาทางด้าน phylogenetic ของปรสิตประเภท apicomplexa (Barta et al., 1991; Water et al., 1991;)

จากผลการทดลองหาความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ที่มีกับปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะในครั้งนี้พบว่า Primer ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่ง 18S rRNA gene ของเชื้อบิด *Eimeria* spp. แต่ไม่มีความจำเพาะต่อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะ ทั้งนี้เนื่องจากพยาธิในระบบทางเดินอาหารของไก่ ไม่ว่าจะเป็น *Gongylonema* spp. และ *Tetrameres* spp. ทั้ง 2 ชนิดอาศัยอยู่ที่กระเพาะอาหาร และ proventriculus ตามลำดับ ส่วน Tapeworm segment เป็นพยาธิที่อาศัยในลำไส้เล็กของไก่ และพยาธิ *Heterakis* spp. (เพศเมีย) อาศัยอยู่ที่ไส้ตันเช่นเดียวกับเชื้อบิด แต่ผลิตภัณฑ์ PCR บางๆ ของพยาธิทั้ง 2 ชนิด ที่พบมีขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งต่างกับ *Eimeria* spp. ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp และจากการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของ *Heterakis* spp. ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene (accession number คือ AF 083003) พบว่า Primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับ *Eimeria* spp. ไม่สามารถเกาะกับ DNA ของพยาธิ *Heterakis* spp. ได้

ผลการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดที่เป็นส่วนประกอบอยู่ใน *E. tenella* CB38 ด้วยวิธี PCR-RFLP ก่อนป้อนเชื้อบิดให้ไก่ในครั้งนี้พบว่า สามารถตรวจแยกชนิดเชื้อบิดได้ 3 ชนิด คือ *E. tenella*, *E. necatrix* และ *E. maxima* ดังรูปที่ 4.7 โดยเชื้อบิดแต่ละชนิดมีปริมาณสัมพันธ์คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละแตกต่างกันดังนี้ คือ 64%, 29% และ 4% ตามลำดับ ซึ่งจากแหล่งของเชื้อบิด *E. tenella* CB 38 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้อย่างต่อเนื่องที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี 2538 โดยเป็นการเก็บตัวอย่างเชื้อบิดเฉพาะบริเวณไส้ตันเท่านั้น ซึ่งตามคำกล่าวของ McDougald and Reid (1991) ที่ได้กล่าวว่าการตรวจเชื้อบิดบริเวณไส้ตันสามารถตรวจพบเชื้อบิดชนิด *E. tenella* และ *E. necatrix* ในระยะที่ 3 ของ schizogony ส่วน *E. maxima* สามารถตรวจพบได้ที่บริเวณลำไส้ส่วนกลางตั้งแต่บริเวณด้านล่างของ duodenum loop ถึงบริเวณรอยเหลือของถุงไข่แดง จากคำกล่าวที่ว่านี้แสดงให้เห็นว่า *E. maxima* ไม่สามารถตรวจพบได้ที่ไส้ตัน แต่ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *E. maxima* สามารถตรวจพบได้ที่ไส้ตัน โดยดูจากผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu* I พบว่ามีขนาดผลิตภัณฑ์ที่ 100 bp ซึ่งเป็นขนาดที่แสดงความจำเพาะของเชื้อบิด *E. maxima* ในขณะที่ *E. tenella* มีขนาดผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ 284 bp และ 268 bp โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ และ *E. necatrix* มีขนาดผลิตภัณฑ์จำเพาะที่ 130 bp และ 292 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hae* III



ส่วนการตรวจหาเชื้อบิต *E. tenella* CB38 จากเนื้อเยื่อของผนังลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน หลังป้อนเชื้อบิตให้ไก่อายุ 7 วัน พบว่าวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไวกว่าการตรวจด้วยตาเปล่าและการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเป็นอย่างมาก โดยพบว่าผลการตรวจรอยโรคของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว และกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^2$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว จะตรวจพบรอยโรคที่ไส้ตันได้ในวันที่ 4 และวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิตได้เป็นวันแรก ตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างสามารถตรวจพบเชื้อบิตที่บริเวณไส้ตันได้เป็นวันแรกในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^4$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^2$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว จะตรวจพบเชื้อบิตที่ไส้ตันได้ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อบิตได้เป็นวันแรก และเมื่อนำผลการตรวจรอยโรคและผลตรวจพบเชื้อบิตจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ มาเปรียบ เทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อบิตที่มีขนาด 422 bp สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริเวณไส้ตันได้วันแรกในวันที่ 2 หลังการติดเชื้อบิต จากกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว ส่วนกลุ่มที่ป้อนเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^3$  และ  $10^2$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว ตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อบิตที่ไส้ตัน ได้วันแรกในวันที่ 4 และวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิต ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อบิตด้วยวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อบิตจากบริเวณลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน ได้ไวกว่าการตรวจหารอยโรค ด้วยตาเปล่า และไวกว่าการตรวจหาเชื้อบิตด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เพราะพบว่าบริเวณที่ตรวจไม่พบรอยโรคและเชื้อบิต สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อบิตได้ด้วยวิธี PCR

และจากการศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิต *E. tenella* CB38 หลังได้รับเชื้อบิตในระดับปริมาณ  $10^4$  โอคือซีสต์/ไก่ 1 ตัว พบว่าวิธี PCR-RFLP สามารถแยกชนิดเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ได้ โดยพบว่าเชื้อบิตแต่ละชนิดที่แยกได้ในแต่ละส่วนของลำไส้และไส้ตันไม่สอดคล้องกับ McDougald and Reid (1991) ที่กล่าวว่าเชื้อบิตชนิด *E. acervulina* สามารถตรวจพบได้ที่ลำไส้ส่วนต้น เชื้อบิตชนิด *E. maxima* และ *E. necatrix* จะพบที่ลำไส้ส่วนกลาง และเชื้อบิตชนิด *E. necatrix* และ *E. tenella* จะพบได้ที่ไส้ตัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อบิต *E. acervulina* สามารถตรวจพบได้ที่ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนกลางที่ 1 เชื้อบิตชนิด *E. maxima* และ *E. necatrix* สามารถตรวจพบได้ที่ตั้งแต่ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 ลำไส้ส่วนกลางที่ 2 เรื่อยไปจนถึงลำไส้ส่วนท้าย และไส้ตัน ส่วนเชื้อบิตชนิด *E. tenella* สามารถตรวจพบได้ทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตัน ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการแยกชนิดเชื้อบิตจากขนาดรูปร่างโอคือซีสต์และตำแหน่งรอยโรค ให้ผลที่คลาดเคลื่อนได้มากกว่าการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP ที่มีความจำเพาะสูง (Barta et al, 1997; Sangster et al., 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากการศึกษาเชื้อบิดจาก *E. tenella* CB38 ยังได้ทำการศึกษาชนิดของเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อบิดที่ทราบชนิดเชื้อบิดที่เป็นองค์ประกอบภายในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) พบว่าผลการแยกชนิดเชื้อบิดที่ผสมอยู่ในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถแยกเชื้อบิดได้ทั้งหมด 4 ชนิด ดังนี้คือ *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* โดยมีปริมาณสัมพัทธ์คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละดังนี้คือ 23%, 19%, 3% และ 3% ตามลำดับ ในขณะที่ *E. praecox* คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อบิดอีก 1 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ด้วย เนื่องจากขนาดผลิตภัณฑ์ PCR 422 bp ที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II เป็นขนาดที่มีความจำเพาะต่อ *E. praecox* ซึ่งโดยปกติทั่วไปเชื้อบิดที่เป็นส่วนประกอบภายในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) มีด้วยกัน 4 ชนิด คือ *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* (Vermeulen et al., 2001) ส่วน *E. praecox* เป็นเชื้อบิดชนิดที่ไม่ปรากฏว่าเป็นส่วนประกอบของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่ายังไม่มีผู้ใดทำการศึกษการแยกชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของเชื้อบิดในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) แต่ในวัคซีนเชื้อเป็น Coccivac-D และ Coccivac-B You-Chi และคณะ (2003) สามารถแยกชนิดเชื้อบิด *E. acervulina*, *E. brunette*, *E. maxima*, *E. necatrix* และ *E. tenella* ที่บริเวณ ITS-1 ได้ด้วยวิธี PCR

ดังนั้นเหตุผลของการเลือกศึกษาวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในครั้งนี้ เนื่องจากปัจจุบันการนำยากันบิดมาใช้ในการเลี้ยงไก่ลดน้อยลง เพราะเชื้อบิดเกิดการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น (drug resistance) (Allen et al., 1997; Chapman et al., 2002; Sangster et al., 2002) จึงทำให้มีผู้นิยมนำวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดรุนแรง (virulent vaccine) มาใช้ในการป้องกันโรคบิดในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เพิ่มมากขึ้น (Shirley, 1993; Danforth, 1998) และเนื่องจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) มีองค์ประกอบของเชื้อบิดชนิดที่มีความสำคัญและก่อโรครุนแรงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ ได้แก่ *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina* และ *E. maxima* ที่เรียงตามลำดับความรุนแรง (Roberson, 1995) จึงทำให้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากการศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิดด้วยวิธี PCR-RFLP แล้วยังทำการศึกษาในเชิงปริมาณ (Quantitative) เพื่อหาอัตราส่วนชนิดของเชื้อบิดที่เป็นองค์ประกอบของแหล่งเชื้อบิดที่นำมาศึกษาไม่ว่าจะเป็นเชื้อบิดของ *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) เพราะบางครั้งการเกิดโรคบิดในไก่อาจเป็นผลมาจากการใช้วัคซีนก็ได้ (Berta et al., 1998 and Shirley et al., 1983) ดังนั้นผู้ใช้ต้องมีการควบคุมปริมาณของวัคซีนที่ใช้อย่างระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดโรครุนแรง (Shirley, 1992) ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 25, 50 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ให้ผลในการตรวจหาเชื้อบิดด้วยวิธี PCR ในแต่ละวันไม่แตกต่างกัน

รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดรอยโรคที่มีระดับคะแนนรอยโรคที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นคล้ายคลึงกัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสัมพัทธ์ของเชื้อบิตแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบภายในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่พบว่าเชื้อบิตชนิด *E. acervulina* เป็นส่วนประกอบมากที่สุด ดังนั้นการที่ไก่ได้รับวัคซีนในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อผลผลิตที่ได้รับ เช่น สูญเสียอัตราการแลกเนื้อ มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และระยะเวลาการวางไข่ครั้งแรกล่าช้า เป็นต้น แต่ถ้าไก่ได้รับวัคซีนในระดับปริมาณที่เหมาะสมก็จะก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันในไก่ได้เป็นอย่างดี เพราะเชื้อบิตแต่ละชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในไก่เพื่อตอบสนองเชื้อบิตแต่ละชนิดได้เท่ากัน หรือที่เรียกว่า Non cross-reactivities (Shirley, 1992; William, 1998)

ในขณะที่ผลการตรวจหาเชื้อบิตในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่ตรวจสอบหาเชื้อบิตด้วยวิธี PCR และนำมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจรอยโรคบริเวณลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตัน ด้วยตาเปล่า และการตรวจหาเชื้อบิตด้วยการขูดเนื้อเยื่อผนังลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ ที่ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อบิตหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ ได้ไวกว่าการตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่า โดยพบว่าไก่ทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน สามารถตรวจพบรอยโรคได้วันแรกในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ส่วนการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบว่าผลจากการป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25, 50 และ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบเชื้อบิตได้ที่ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ส่วนกลางที่ 2 และส่วนท้าย ได้ในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) และพบเชื้อบิตที่ไส้ตันได้ในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีน Immucox<sup>®</sup> (I) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp ได้วันแรกในวันที่ 1 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ที่ไส้ตันเป็นส่วนแรก จากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว และในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อบิตจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้วันแรก ที่ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 ของกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 25 และ 50 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว ส่วนกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณ 100 เท่าของ dose ปกติ/ไก่ 1 ตัว สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้ 3 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางที่ 1 และส่วนกลางที่ 2 ในขณะที่ลำไส้ส่วนท้าย ตรวจพบเชื้อบิตได้วันแรกในวันที่ 4 หลังการป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

และจากการศึกษาแยกชนิดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) หลังป้อนให้ไก่ ด้วยวิธี PCR-RFLP ในครั้งนี้ พบว่าวิธี PCR-RFLP สามารถแยกชนิดเชื้อบิดในลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ได้ โดยพบว่าเชื้อบิดชนิด *E. acervulina* สามารถตรวจพบได้ที่ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลางที่1 และลำไส้ส่วนท้าย เชื้อบิดชนิด *E. maxima* สามารถตรวจพบได้ทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตัน เชื้อบิดชนิด *E. necatrix* สามารถตรวจพบได้ที่ไส้ตัน และ *E. tenella* สามารถตรวจพบได้ทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตัน ยกเว้นลำไส้ส่วนต้น โดยเชื้อบิดแต่ละชนิดที่แยกได้ในแต่ละส่วนของลำไส้และไส้ตัน พบว่าไม่สอดคล้องกับ McDougald and Reid (1991) ซึ่งจากผลการศึกษการแยกชนิดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) หลังป้อนให้ไก่ ช่วยยืนยันได้ว่าการแยกชนิดเชื้อบิดจากขนาดรูปร่างโอโซซิสต์และตำแหน่งรอยโรคให้ผลที่คลาดเคลื่อนได้มากกว่า (Barta et al., 1997) วิธี PCR-RFLP ที่มีความจำเพาะสูง (Sangster et al., 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้การแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อบิดจากสิ่งแวดล้อม ที่เป็นผลมาจากห้องเลี้ยงที่ไม่ได้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อ วัสดุรองนอน น้ำและอาหาร (Ruff, 1993) สามารถทำได้โดยทำห้องเลี้ยงไก่ให้สะอาดและผ่านกระบวนการฆ่าเชื้ออย่างดีด้วยการใช้โซดาไฟที่ผสมกับน้ำและการใช้น้ำที่ผสม chlorox ร่วมกับการใช้น้ำร้อน และการฆ่าเชื้อด้วย formaldehyde ในอัตราส่วนต่างทับทิม 1 ส่วน : ฟอรัมาลิน 2 ส่วน รวมทั้งการเลี้ยงในกล่องกระดาษลูกฟูกที่ผ่านการประดิษฐ์ขึ้น เพื่อง่ายและสะดวกต่อการเก็บตัวอย่างอุจจาระ และช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อบิดที่ปล่อยออกมาจากอุจจาระหลังป้อนเชื้อบิดที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไก่ติดเชื้อบิดได้ เพราะการศึกษานี้เป็นการศึกษาการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดจาก *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) หลังจากป้อนเชื้อบิดให้ไก่ ดังนั้นการทำให้ไก่ทดลองที่เลี้ยงปราศจากเชื้อบิดก่อนได้รับการป้อนเชื้อบิด จะทำให้ผลการทดลองมีประสิทธิภาพ และความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งเห็นได้จากหลายๆ การทดลองของการป้อนเชื้อบิดในไก่ ปัจจัยที่สำคัญ คือการทำความสะอาดห้องเลี้ยงไก่ และการใช้ไก่ทดลองที่สะอาดปราศจากเชื้อบิด (Barta et al., 1998; Fernandez et al., 2003; Williams et al., 2003)

จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาวิธี PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene เพื่อแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) พบว่าวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการแยกชนิดเชื้อบิดไก่ ที่สามารถแยกชนิดเชื้อบิดจาก เชื้อบิด *E. tenella* CB38 ได้ 3 ชนิด คือ *E. tenella* มีปริมาณสัมพัทธ์มากที่สุดคือ 64%, *E. necatrix* 32% และ *E. maxima* 4% และเชื้อบิดที่ประกอบอยู่ในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup>(I) มีอย่างน้อย 4 ชนิด คือ *E. acervulina* มีปริมาณสัมพัทธ์มากที่สุดคือ 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% และ *E. tenella* 3% และสามารถแยกชนิดเชื้อบิดจากลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากได้รับ

เชื้อบิด *E. tenella* CB38 ได้ โดยในการศึกษาค้างนี้สามารถพบเชื้อบิดชนิด *E. tenella* ได้ทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตันของไก่ ส่วนเชื้อบิดชนิด *E. maxima* สามารถพบได้ทุกส่วนของลำไส้ และไส้ตันของไก่ ได้ด้วยเช่นกัน หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ดังนั้นจึงควรที่จะพัฒนาวิธี PCR-RFLP เพื่อนำไปใช้งานทางด้านพยาธีกำเนิด ด้านระบาดวิทยา หรือการให้วัคซีน และการตรวจหาชนิดของเชื้อบิดที่ปล่อยออกมาหลังการให้วัคซีน หรือ ศึกษาการดื้อยาของเชื้อบิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

การศึกษากการแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ครั้งนี้ได้ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ถึง 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ตัดลำดับเบส 4 ตัว ซึ่งต่อไปอาจจะเลือกใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่น ที่มีความจำเพาะในการแยกชนิดเชื้อบิดแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาจากตำแหน่งของสายพันธุกรรมที่บริเวณ 18S rRNA gene ของเชื้อบิดที่แยกได้จากเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) และเชื้อบิดระยะต่างๆ จากบริเวณลำไส้ส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังป้อนเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) สำหรับการศึกษาในครั้งต่อไปควรมีการศึกษาจากโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ เพื่อที่จะได้ทราบถึงประสิทธิภาพความไวและความจำเพาะของวิธี PCR-RFLP

จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาการแยกชนิดเชื้อบิดแต่ละชนิดจากบริเวณ 18S rRNA gene เพียงตำแหน่งเดียวของ *Eimeria* spp. ดังนั้นในการศึกษาค้างต่อไปควรทำการศึกษาเพิ่มเติมที่บริเวณส่วนอื่นของ ribosomal RNA เช่น Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) หรือ Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2) เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะของเชื้อบิดที่แยกได้เพิ่มมากขึ้นและแม่นยำขึ้น

จากการศึกษาการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในไก่หลังป้อนเชื้อบิด *E. tenella* CB38 และวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I) ในครั้งนี้พบว่า นอกจากสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp บนแผ่นเจล ยังสามารถตรวจพบ Non specific band ที่มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 510 bp โดยโปรแกรม PCR ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้พบว่า annealing ที่ใช้คือ 54 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing เป็น 56 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ขึ้นได้

และจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาจากเชื้อบิดหลายชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปน่าจะมีการ clone เชื้อบิดแต่ละชนิด เพื่อนำมาใช้เป็นตัวควบคุมและช่วยในการวิเคราะห์ผลการทดลองให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ถวิล คุปตบุตร. 2498. โรคบิดและการป้องกัน. สัตวแพทยสาร 6 (เมษายน-มิถุนายน) : 15-17.
- ประจักษ์ พุ่มวิเศษ. 2525. โรคบิดในไก่. ข่าวห้องสมุดคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 8 (มกราคม-กุมภาพันธ์) : 1-6.
- ผ่องพรรณ พรชัยวัฒนากร, ชัตรโชติ ทิตาราม และกฤษณ์ หล่อราประเสริฐ. 2537. วงชีวิตและพยาธิวิทยาของเชื้อบิด *Eimeria maxima* ในไก่. รายงานวิชา Clinical conference คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Allen, P. C. and Fetterer, R. H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian Parasites of poultry. Clinical Microbiol Rev. 15 : 58-65.
- Allen, P. C., Danforth, H. D. and Levander, O. A. 1997. Interaction of dietary flaxseed with coccidian infection in chickens. Poult. Sci. 76 : 822-827.
- Ananias, A. E. and Francisco, J. A. 1994. Phylogenetic of the malarial genus *Plasmodium*. In derived from rRNA gene sequences. pp. 11,373-11,377. Proc, Natl. Acad. Sci. USA.
- Bains, B. S.. 1979. Coccidiosis. In Roche (ed.), A Manual of Poultry Diseases, pp. 162-166. Basle : F. Hoffmann-La Roche & Co. Limited Company.
- Barta, J. R., Jenkins M. C. and Danforth, H. D. 1991. Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other Apicomplexa protozoa : Monophyly of the Apicomplexa is supported. Molecular Biology and Evolution. 8 : 345-355.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., et al. 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J. Parasitol. 83 : 262-271.
- Barta, J. R., Coles, B. A., Schito, M. L., Fernando, M. A., Martin, A. and Danforth, H. D. 1998. Analysis of infraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America. Int. J. Parasitology. 28 : 485-492.
- Brown, T. A. 1999. Genomes. Vol. I. New York : John Wiley & Sons.

- Campbell, N. A., Reece, J. B. and Mitchell L. G. 1999. Biology. 5<sup>th</sup> edition .And imprint of addision westey Longman.
- Cere, N., Licois, D. and Lambert, J. F. 1995. Study of the inter-and intraspecific variation of *Eimeria* spp. from rabbit using random amplified polymorphic DNA. Parasitol Res. 81 : 324-328.
- Chapman, H. D. 1982. The use of enzyme electrophoresis for the identification of the species of *Eimeria* present in field isolates of coccidia. Parasitology 85 : 437-442.
- Chapman, H. D., Cherry, T. E., Danforth, H. D., Richards, G., Shirley, M. W. and William, R.B. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production the role of live vaccine. Int. J. Parasitol. 32 : 617-629.
- Conway, D.P., McKenzie E. M. and Dayton, A. D. 1990. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infection of *Eimeria*. Avian Pathol. 19 : 489-496.
- Conway, D.P. and McKenzie E. M. 1991. Poultry Coccidiosis-Diagnosis and Testing Procedures. Pfizer Inc., New York.
- Costa, C. A. F., Gomes, R. F., Melo, M. N. and Riberiro, M. F. B. 2001. *Eimeria* parasites of domestic fowl : genetic relationships of different isolates estimated from random amplified polymorphic DNA. Parasitol Res. 87 : 459-466.
- Danforth, H. D. 1998. Use of live oocyst vaccines for the control of avian coccidiosis; experimental studies and field trials. Int. J. Parasitol. 28 : 1099-1109.
- Duraisingh, M. T., Curtis, J. and Warhurst, D. C. 1998. Plasmodium falciparum : detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and retriction digestion. Exp. Parasitol. 89 : 1-8.
- Ellis, J. and Bumstead, J. 1990. *Eimeria* species : studies using rRNA and rDNA probes. Parasitology. 101 : 1-6.
- Fernando, M. A. and Pasternak, J. J. 1991. *Eimeria* spp. of the domestic fowl : resdution of chromosome by field inversion gel electrophoresis. Exp. Parasitol. 72 : 306-310.
- Fernandez S., Costa A.C., Katsuyama A.M., Medeira A.M.B.N. and Gruber A. 2003. A survey of the inter-and intraspecific RAPD marker of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. Parasitol Res. 89(6) : 437-445.



- Gasser, R. B., Wood, W. G., Wood, J. M., Ashdown, L., Richards, G. and Whithear, K. G. 2001. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. Electrophoresis. 22 : 3546-3550.
- Guo, Z. G. and Johnson, A. M. 1995. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitology. 111 : 127-132.
- Hnida, J., Duszynski, D., 1999. Taxonomy and systematics of some *Eimeria* species of murid rodents as determined by the ITS-1 region of the ribosomal gene complex. Parasitology. 119, 349-357.
- Idris, A.B., Bounous, D.I., Goodwin, M.A., Brown, J. and Krushinskie, E.A. 1997. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially growth broilers examined for small intestinal eimeria spp. coccidiosis. Avian Dis. 41 : 388-391.
- Jinnemen, K. C., Wetherington, J. H., Adams, A. M., et al. 1996. Differentiation of *Cyclospora* sp. And *Eimeria* spp. by using the polymerase chain reaction amplification products and restriction fragment length polymorphism. Laboratory Information Bulletin : 1-8.
- Johnson, J. and Reid, M. 1970. Anticoccidial drugs scoring technique in battery and floor-pen experiment with chicken. Exp. Parasitol. 28 : 30-36.
- Johnston D.A. and Fernando M.A. 1995. *Eimeria* spp. of the domestic fowl : analysis of genetic variability between species and strains using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and denaturing gradient-gel electrophoresis. Parasitol Res. 81 : 91-97.
- Johnston, D. A. and Fernando, M. A. 1997. Isoenzymes of *Eimeria* from the domestic fowl : electrophoretic variants among species, strains and clones. Parasitol Res. 60 : 31-37.
- Joyner, L. P. and Norton, C. C. 1973. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. Parasitology. 67: 907-913.
- Joyner, L. P. 1985. The development of knowledge on the speciation of coccidia. In L. R. McDougald, L. P. Joyner and P. L. Long (eds.), Research in avian coccidiosis. pp. 1-12. Georgia : Proceeding of the Georgia coccidiosis conference.

- Kohler, B. 2000. *Clostridium perfringens* intoxication affects bird performance. World Poultry. 16(5) : 57-59.
- Kogut, M. H. and Powell K. C. 1993. Preliminary findings of alterations in serum alkaline phosphatase activity in chickens during coccidial infections. J. Comp. Pathol. 108 : 113-119.
- Kucera, J. 1991. Enzyme variants of *Eimeria* parasitizing the domestic fowl and possibilities of species diagnostics. Folia Parasitol (Praha). 38 : 193-199.
- Long, P. L. and Joyner, L. P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. J. Protozool. 31 : 535-541.
- Long, P. L., Johnson, J., McKenzie, M. E., Perry, E., Crane, M. J. and Murry, P. K. 1986. Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. Avian Pathol. 15: 217-278.
- Mattiello, R., Boviez, J. D. and McDougald, L. R. 2000. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and Confirmation of seven species of *Eimeria*. Avain Dis. 44 : 711-714.
- McDonald, V. and Shirley, M. W. 1987. The endogenous development of virulent strains and attenuated precocious lines of *Eimeria tenella* and *E. necatrix*. Parasitology. 73 : 993-997.
- McDougald, L. R. and Reid, W. M. 1991. Coccidiosis. In B. W. Calnek, H. J. Barns, C. W. Reid and H. W. Yoder jr (eds.), Disease of Poultry. 9 edition. pp. 780-792. Iowa State Uni : Press Ames.
- McPherson J. M. and Gajadhar A. A. 1993. Differentiation of seven *Eimeria* species by random amplified polymorphic DNA. Vet. Parasitol. 45 : 257-266.
- Medlin, L., Et wood, H.J., Stickel, S. and Sogin, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified 16S-like rRNA coding region. Gene. 71 : 491-499.
- Molloy, J. B., Eaves, F. W., Jeston, P. J., et al. 1998. Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. Avain Dis. 42 : 119-123.
- Patel, S., Pedraza-Diaz, S. and McLauchlin, J. 1999. The identification of *Cryptosporidium species* and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. Int J Parasitol. 29(8) : 1241-1247.

- Procunier J. D., Fernando M. A., Barta J.R. 1993. Species and strain differentiation of *Eimeria spp.* of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. Parasitol Res. 79 : 98-102.
- Roberson, E. L. 1995. Antiprotozoan drugs. In Booth, N. H. And McDonald, L. E. (eds.), Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5<sup>th</sup> ed, pp. 962-966. The Iowa State University Press. U.S.A.
- Rose, M. E. and Long, P. L. 1980. Vaccination against coccidiosis in chickens. In Taylor, A. E. R., Moller, R. (eds.), Vaccination against Parasites, pp. 57-74. Oxford : Blackwell Scientific.
- Ruff, M. D. 1993. External and internal factors affecting the severity of avian coccidiosis. In Proceedings of the sixth international coccidiosis conference, Guelph, Ont., Canada, pp. 73-79.
- Sangster, N., Batterham, P., Chapman, H. D., Duraisingh, M., Jambre, L. L., Shirley, M., Upcroft, F. and Upcroft, P. 2002. Resistance to antiparasitic drugs : the role of molecular diagnosis. Int. J. Parasitol. 32 : 637-653.
- Schnitzler, B. E., Thebo, P. L., Mattsson, J. G., Tomley and Shirley M. W. 1999. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. Avian Pathol. 28: 89-93.
- Shirley, M. W. 1975. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. Parasitology. 71 : 369-376.
- Shirley, M. W., Jeffers, T. K. and Long, P. L. 1983. Studies to determine the taxonomic status of *Eimeria mitis*, Tyzzer 1929 and *E. mivati*, Edgar and Seibold 1964. Parasitology. 87 : 185-198.
- Shirley, M. W., Kemp, D.J., Pallister, J. and Prowse, S. J. 1990. A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. Mol. Biochem. Parasitol. 38 : 169-174.
- Shirley, M. W. 1992. Research on avian coccidia : an update. British Vet Journal. 148: 479-499.
- Shirley, M. W. 1993. Live vaccines for the control of coccidiosis. In Barta, J. R., Fernando, M. A. (eds), Proceedings VIth International Coccidiosis Conference. pp 61-72. Guelph : University of Guelph.

- Schito, M. L. and Barta, J. R. 1997. Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice. Infect. Immun. 65 : 3165-3170.
- Shirley M.W., Bumstead N. 1994. Intra-specific variation within *Eimeria tenella* detected by random amplification of polymorphic DNA. Parasitol Res. 80 : 346-351.
- Shirley, M. W. 1994a. Coccidial parasites from the chicken discrimination of different populations of *Eimeria tenella* by DNA hybridization. Research on Veterinary Sciences. 57 : 10-14.
- Shirley, M. W. 1994b. The genome of *Eimeria tenella* : further studies on its molecular organization. Parasitol Res. 80 : 366-373.
- Shirley, M. W. 1996. Research on coccidiosis in the EU and USA. Misset Poultry, pp. 4-6.
- Shirley, M. W. 1997. *Eimeria spp.* from the chicken : occurrence, identification and genetics. Acta Vet. Hungarica. 45 : 331-347.
- Shirley M.W. 2000. The genome of *Eimeria spp.* With special reference to *Eimeria tenella* – a coccidium from the chicken. Int. J. Parasitol. 30 : 485-493.
- Shotysek. 1973. Ultrastructure. In D. M., Hammond and P. L., Long. (eds.), The coccidian, pp. 81-144. University Park Press.
- Sogin, M. L. 1989. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. American Zoologist. 29 : 487-499.
- Stucki, U., Braun, R. and Roditi, I. 1993. *Eimeria tenella* : Characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. Experimental Parasitology. 76 : 68-75.
- Thebo, P., Uggla, A. and Hooshmand-Rad, P. 1998. Identification of seven *Eimeria* species in Swedish domestic fowl. Avian Pathol. 27 : 613-617.
- Tsuji, N., Kawazu, S., Ohta, M., et al. 1997. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. J. Parasitol. 83 : 966-970.
- Vermeulen, A. N., Schaap, O. C. and Schetters, Th. P. M. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. Vet Parasitol. 100: 13-20.
- Van der Stroom, J.H. and van der Sluis, W. 1999. The effect of intercurrent diseases on coccidiosis. In van der Sluis, W. (ed.), World Poultry. pp. 13-14. Amsterdam :Elsevier.

- Water, A. P., Higgins, D. G. and Mccutchan, T. F. 1991. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human host. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88 : 3140-3144.
- Williams, R. B. 1998. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. Int. J. Parasitol. 28 :1089-1098.
- Williams, R. B. 2001. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl : its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. Int. J. Parasitol. 31 : 1056-1069.
- Williams, R. B., Marshall. R. N., La Ragione, R. M. and Catchpole J. 2003. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. Parasitol Res. 90 (1) : 19-26.
- Woods, W. G., Whithear, K. G., Richard, D. G., Anderson, G. R., Jorgensen, W. K. and Gasser, R. B. 2000. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chicken in Australia. Int. J. Parasitol. 30: 1019-1023.
- Weiss, J. B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clinical Microbiol Rev. 8 : 113-130.
- Yao-Chi, S., Andrew Chang-Young, F. and Fang-Mei, T. 2003. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS 1) sequence. Vet. Parasitol. 117 : 221-227.
- Zhoa, X. Duszynski, D.W. and Loker, E. S. 2001. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. J. Microbiological methods. 44 : 131-137.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก

### การเตรียม Cetyl – Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

CTAB	2	กรัม
NaCl	8.2	กรัม
$\beta$ -Mercapto-ethanol	0.2	มิลลิลิตร
EDTA	0.74	กรัม
Tris	1.214	กรัม
เติม sterile water จนครบ 100 มิลลิลิตร		

### การเตรียม lysis buffer

EDTA	24.6	กรัม
N-lauroylsarcosine	1.3	กรัม
ทำการเติม NaOH ลงใน lysis buffer เพื่อปรับให้มีค่า pH = 9		
เติม sterile water จนครบ 100 มิลลิลิตร		

### การเตรียม Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol

Saturated Phenol	25	มิลลิลิตร
Chloroform	24	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	1	มิลลิลิตร

### การเตรียม 50x Tris-acetate EDTA (TAE)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
EDTA	100	มิลลิลิตร
เติม sterile water จนครบ 1000 มิลลิลิตร		

### การเตรียม 1x TAE

นำ 50x TAE 10 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

**การเตรียม 2% Agarose gel**

ชั่ง Agarose 0.6 กรัม ละลายใน 1x TAE ให้มีปริมาตรทั้งหมด 30 มิลลิลิตร

**การเตรียม 2.5% Agarose gel**

ชั่ง Agarose 0.45 กรัม ละลายใน 1x TAE ให้มีปริมาตรทั้งหมด 30 มิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารเคมีและแหล่งที่มา

สารเคมี	แหล่ง
EDTA	Pharmacia Biotech
Tris base	Amresco
Agarose	USB
Ethidium bromide	Bio-Red
1.5 Kbp DNA ladder	Pacifiscience
CTAB	Sigma
N-laurolsarcosine	Amresco
$\beta$ -Mercapto-ethanol	Pharmacia Biotech
Proteinase K	USB
Phenol	Amresco
Chloroform	Merck
Isoamyl alcohol	Sigma
Absolute ethanol	Merck
Bromphenol blue	USB
Sodium chloride	Sigma
dNTP	eppendorf
Taq DNA polymerase	invitrogen
Primers	Proligo

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เครื่องมือ

เครื่อง Thermal Cycler, Gene Amp. 2700

Gel electrophoresis apparatus, Mini-Sub Cell GT ของ BioRad

UV Transilluminator, 3-3102; Foto Dyne Incorporated

กล้องถ่ายภาพรูปโพลาไรซ์, 5-533; Foto Dyne Incorporated

ฟิล์มโพลาไรซ์, No.667; Fabriqu' au Royaume-Uni par Polaroid, Ltd

Laminar Flow, 5000E; Astecair

หน้ากากกันแสงอัลตราไวโอเล็ต, Foto Dyne Incorporated

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, PHM 83 Autocal pH meter ; Radiometer

ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส, UE 650; Kelvinator

ตู้แช่เย็น -70 องศาเซลเซียส, Forma Scientific

Micropipettes, Gibthai

เครื่อง vortex, G-560E; Scientific Industries

Magnetic stirrer, pyro-magnestir No. 1267; Lab-line instruments, Inc

Microwave, R-4A52, Carousel; Sharp

เครื่องชั่งแบบละเอียด, BP 310S; Sartorius

Hair Dryer, EH5741 ; National; Matsushita Electric Work.Ltd.

Water bath, GFL-1086 ; GESELLSCHATT Fur Labortechnik mbH

Microcentrifuge tube 1.5 ml, Bioactive

หลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร, Bioactive

Pipette tips 0.5-10 ul, Bioactive

Pipette tips 200 ul, Bioactive

Pipette tips 1000 ul, Bioactive

ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล, Bio-Genomid

**ภาคผนวกที่ 1** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อบิด *Eimeria acervulina* (Accession number U67115) ขนาด 422 bp และตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu I*, *Hha I* และ *Hpa II*

Forward primer *Hha I*

361 attccggaga **gggagcctga gaaacggcta** ccacatctaa ggaaggcagc aggcgcgcaa

421 attacccaat gaaaacagtt tcgaggtagt gacgagaaat aacaatacag ggcatcttat

481 gctttgtaat tggaatgatg ggaatgtaaa acccttccag agtaacaatt ggagggcaag

*Alu I*

541 tctggtgcca gcagccgcgg taattccagc tccaatagtg tatattagag ttgttgcagt

*Alu I* *Hha I* *Hha I*

601 taaaaagctc gtagttggat ttctgtcgtg gtcagcctgc gctgcccgta tgggtgtgcg

*Hha I*

661 cgtggtttgc cctcggcttt tttctggtag cctcctgcgc ttaattgctg gggctgggtg

*Hpa II* Reverse primer

721 tccggaactt ttactttgag aaaaatagag tgtttcaagc aggcttgtcg **ccctgaatac**

781 **tgcagcatgg**

**ภาคผนวกที่ 2** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อบิด *Eimeria maxima* (Accession number U67117) ขนาด 422 bp และตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu I*, *Hha I* และ *Hpa II*

Forward primer *Hha I*

361 cgattccgga **gaggagcct gagaaacggc** taccacatct aaggaaggca gcagggcgcgc

421 aaattacca atgaaaacag tttcaggta gtgacgagaa ataacaatac agggcatttt

481 atgctttgta attggaatga tgggaatgta aaacccttcc agagtaacaa ttggagggca

*Alu I*

541 agtctgggtgc cagcagccgc ggtaattcca gctccaatag tgtatattag agttgttgca

*Alu I* *Alu I* *Hha I*

601 gttaaaaagc tcgtagttgg atttctgtcg tggtcagctt gctgcccgt tatgggtgtg

*Hha I* *Hpa II* *Alu I* *Hha I*

661 cgctgggtt gccctcggca ttcttccggt agcttgtggc gcttaattgc gtctgcaagt

Reverse primer

721 gccctggaac ttttactttg agaaaaatag agtgtttcaa gcaggcttgt **cgccctgaat**

781 **actgcagcat ggaataatag**

**ภาคผนวกที่ 3** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อปรสิต *Eimeria necatrix* (Accession number U67119) ขนาด 422 bp และตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu I*, *Hha I*, *Hpa II* และ *Hae III*

Forward primer *Hha I*

361 ttcgattccg gagaggggagc **ctgagaaacg** gctaccacat ctaaggaagg cagcagggcgc  
*Alu I*

421 gcaaattacc caatgaaaac agcttcgagg tagtgacgag aaataacaat acagggcatt

481 ttatgctttg taattggaat gatggaaatg taaaaccctt ccagagtaac aattggaggg  
*Hpa II*

541 caagtctggg gccagcagcc gcggtaattc cggctccaat agtgtatatt agagttggtg  
*Alu I* *Hpa II Hha I*

601 cagttaaaaa gctcgtagtt ggattttctgt cgtgggtcatc cggcgccgccc cgtatggggtg  
*Hae III* *Hpa II* *Hha I*

661 tgggcctggc atgccctcgg cttat<sup>ttt</sup>ccg gtagccttcc gcgcttaatt gcgtgtggtg

721 gtgttctgga acttttactt tgagaaaaat agagtgtttc aagcaggcctt gtc**gccctga**

Reverse primer

781 **atactgcagc atggaataat**

**ภาคผนวกที่ 4** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อปรสิต *Eimeria tenella* (Accession number U67121) ขนาด 422 bp และตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu I*, *Hha I* และ *Hpa II*

Forward primer *Hha I*

361 ttcgattccg gagaggggagc **ctgagaaacg** gctaccacat ctaaggaagg cagcagggcgc  
*Alu I*

421 gcaaattacc caatgaaaac agcttcgagg tagtgacgag aaataacaat acagggcatt

481 ttatgctttg taattggaat gatgggaatg taaaaccctt ccagagtaac aattggaggg  
*Alu I*

541 caagtctggg gccagcagcc gcggtaattc cagctccaat agtgtatatt agagttggtg  
*Alu I* *Hpa II*

601 cagttaaaaa gctcgtagtt ggattttctgt cgtgggtcatc cggcgctcggc cgtatggggtg  
*Hpa II* *Hha I*

661 tgtgcctggc atgccctcgg cttat<sup>ttt</sup>ccg gtagccttcc gcgcttaatt gcgtgtggtg

721 gtgttctgga acttttactt tgagaaaaat agagtgtttc aagcaggcctt gtc**gccctga**

Reverse primer

781 **atactgcagc atggaataat**

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจหาโอซิสต์ในอุจจาระไก่ด้วยวิธี floatation Concentration และนับจำนวนโอซิสต์ด้วยวิธี McMaster chamber หลังจากป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38

DPI	Floatation Concentration technique				McMaster chamber method (OPG)			
	กลุ่มควบคุม	10 <sup>2</sup> โอซิสต์/ตัว	10 <sup>3</sup> โอซิสต์/ตัว	10 <sup>4</sup> โอซิสต์/ตัว	กลุ่มควบคุม	10 <sup>2</sup> โอซิสต์/ตัว	10 <sup>3</sup> โอซิสต์/ตัว	10 <sup>4</sup> โอซิสต์/ตัว
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	1,350 <sup>a</sup>	19,850 <sup>a</sup>
6	-	+	+	+	-	7,700	574,000 <sup>a</sup>	4,215,000 <sup>a</sup>
7	-	+	+	+	-	109,300 <sup>a</sup>	453,000 <sup>a</sup>	1,108,000 <sup>a</sup>

DPI : Day Post Infection

OPG : Oocyst Per Gram

+ : ตรวจพบโอซิสต์ในอุจจาระไก่

<sup>a</sup> : ค่าเฉลี่ยของจำนวนโอซิสต์ต่ออุจจาระ 1 กรัม

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการตรวจพบระยะของเชื้อบิต ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และคะแนนรอยโรค ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อนเชื้อบิต *E. tenella* CB38 ในระดับปริมาณที่แตกต่างกัน

DPI	เบอร์ ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
0	1/23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ ไก่อ	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	3/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ โก	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	3/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection



ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	4/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/12	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	+1
	3/11	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	+1
	3/10	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	-
	4/12	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	-
	4/11	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	+1
	4/10	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

S/M : Schizont/Merozoite

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค					
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน	
5	1/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/9	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	-	-
	3/8	-	-	-	-	S/M	-	-	-	-	-	-
	3/7	-	-	-	-	S/M,Z	-	-	-	-	-	-
	4/9	Z	-	Z	-	Z	-	-	-	-	-	+2
	4/8	Z	Z	-	-	S/M,Z	-	-	-	-	-	+2
	4/7	-	-	-	-	S/M,Z	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

S/M : Schizont/Merozoite

Z : Zygote

+2 : มีรอยโรคปานกลาง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไข่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ ส่วนกลางที่1	ลำไส้ ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
6	1/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/6	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	2/5	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	2/4	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	-
	3/6	Z	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	3/5	O	-	-	-	O	-	-	-	-	+1
	3/4	-	-	-	-	O	-	-	-	-	+1
	4/6	-	-	-	-	O	-	-	-	-	+3
	4/5	Z,O	-	-	-	Z,O	+	-	-	-	+3
	4/4	Z,O	-	Z,O	Z,O	O	-	-	-	-	+2

DPI : Day Post Infection

Z : Zygote

O : Oocyst

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

+2 : มีรอยโรคปานกลาง

+3 : มีรอยโรครุนแรง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไข่	กลัองจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค					
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน	
7	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/3	-	-	-	-	O	-	-	-	-	-	+1
	2/2	-	-	-	-	O	-	-	-	-	-	+1
	2/1	-	-	-	-	O	-	-	-	-	-	+1
	3/3	Z	-	-	O	O	+	-	-	-	-	+1
	3/2	Z	-	-	O	O	-	-	-	-	-	+1
	3/1	-	O	-	O	O	-	-	-	-	-	+2
	4/3	Z	O	-	-	O	-	-	-	-	-	+3
	4/2	Z,O	O	-	-	O	+	-	-	-	-	+3
	4/1	-	-	-	-	O	-	-	-	-	-	+2

DPI : Day Post Infection

Z : Zygote

O : Oocyst

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

+2 : มีรอยโรคปานกลาง

+3 : มีรอยโรครุนแรง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางภาคผนวกที่ 3** ผลการตรวจหาโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่ด้วยวิธี floatation Concentration และนับจำนวนโอโอซิสต์ด้วยวิธี McMaster chamber หลังจากป้อนวัคซีนเชื้อเป็น Immucox<sup>®</sup> (I)

DPI	floatation Concentration technique			McMaste chamber method (OPG)				
	กลุ่มควบคุม	25 เท่าของ dose	50 เท่าของ dose	100 เท่าของ dose	กลุ่มควบคุม	25 เท่าของ dose	50 เท่าของ dose	100 เท่าของ dose
		ปกติ	ปกติ	ปกติ		ปกติ	ปกติ	ปกติ
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	+	-	30,600 <sup>a</sup>	75,800 <sup>a</sup>	80,650 <sup>a</sup>
6	-	+	+	+	-	1,064,000 <sup>a</sup>	2,047,000 <sup>a</sup>	847,500 <sup>a</sup>
7	-	+	+	+	-	453,000 <sup>a</sup>	991,000 <sup>a</sup>	988,000 <sup>a</sup>

DPI : Day Post Infection

OPG : Oocyst Per Gram

+ : ตรวจพบโอโอซิสต์ในอุจจาระไก่

<sup>a</sup> : ค่าเฉลี่ยของจำนวนโอโอซิสต์ต่ออุจจาระ 1 กรัม

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการตรวจพบระยะของเชื้อบิต ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ ด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และคะแนนรอยโรค ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ และไส้ตันของไก่ หลังจากป้อน Immucox<sup>®</sup> (I) ในระดับปริมาณที่ต่างกัน

DPI	เบอร์ ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
0	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

DPI : Day Post Infection

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

DPI	เบอร์ ไม้	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

DPI	เบอร์ ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	3/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

DPI	เบอร์ ไม้	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค					
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง	ลำไส้ส่วนกลาง	ลำไส้ส่วน	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง	ลำไส้ส่วนกลาง	ลำไส้	ไส้ตัน	
			ที่1	ที่2	ท้าย			ที่1	ที่2	ส่วนท้าย		
	4/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/12	S/M	S/M	S/M	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/13	S/M	S/M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/14	S/M	-	-	S/M	-	-	-	-	-	-	-
	3/12	S/M	S/M	S/M	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/13	S/M	S/M	S/M	-	-	-	-	-	-	-	-
	3/14	S/M	S/M	S/M	-	-	-	-	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

S/M : Schizont/Merozoite

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ ส่วนกลางที่1	ลำไส้ ส่วนกลางที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
6	1/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/6	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	2/5	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	2/4	-	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	-
	3/6	Z	-	-	-	Z,O	-	-	-	-	+1
	3/5	O	-	-	-	O	-	-	-	-	+1
	3/4	-	-	-	-	O	-	-	-	-	+1
	4/6	-	-	-	-	O	-	-	-	-	+3
	4/5	Z,O	-	-	-	Z,O	+	-	-	-	+3
	4/4	Z,O	-	Z,O	Z,O	O	-	-	-	-	+2

DPI : Day Post Infection

Z : Zygote

O : Oocyst

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

+2 : มีรอยโรคปานกลาง

+3 : มีรอยโรครุนแรง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	4/15	O	O	O	O	O	+2	+1	-	-	-
	4/16	Z,O	O	O	O	O	+2	-	-	-	-
	4/17	Z,O	Z,O	O	-	O	+1	-	-	-	-
6	1/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/18	O	O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	2/19	O	O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	2/20	O	Z,O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	3/18	Z,O	Z,O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	3/19	Z,O	O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	3/20	O	O	O	O	O	+1	-	-	-	-
	4/18	O	O	O	O	O	+1	-	-	-	-

DPI : Day Post Infection

Z : Zygote

O : Oocyst

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

+2 : มีรอยโรคปานกลาง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

DPI	เบอร์ไก่	กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง					คะแนนรอยโรค				
		ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ส่วน ท้าย	ไส้ตัน	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนกลาง ที่1	ลำไส้ส่วนกลาง ที่2	ลำไส้ ส่วนท้าย	ไส้ตัน
	4/19	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	4/20	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
7	1/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2/21	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	2/22	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	2/23	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	3/21	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	3/22	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	3/23	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	4/21	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	4/22	0	0	0	0	0	+1	-	-	-	-
	4/23	0	0	0	0	0	-	+1	-	-	-

DPI : Day Post Infection

0 : Oocyst

+1 : มีรอยโรคเล็กน้อย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกรูปภาพที่ 1 ลักษณะภายในของกล่องกระดาษสำหรับเลี้ยงไก่ทดลอง



ภาคผนวกรูปภาพที่ 2 การเลี้ยงไก่ทดลองในกล่องกระดาษ

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง เกิดวันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเกษตร สาขาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2543 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาสัตวบาล สาขาพยาบาลสัตวแพทย์ หน่วยประสิทธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2544



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย