

บทที่ 4

4. ผลการศึกษา

4.1 การเหนี่ยวนำให้ไก่เกิดภาวะ acute phase response (APR)

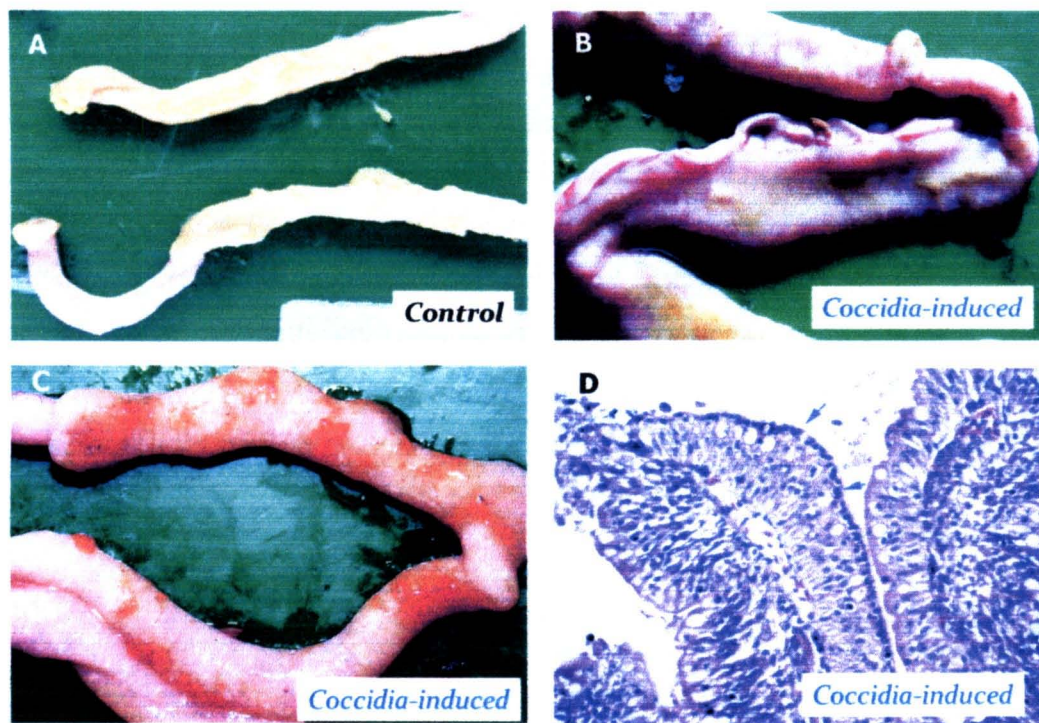
ตลอดระยะเวลาของการศึกษา ไก่ในกลุ่มควบคุมและไก่ในกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ APR ได้รับอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัดจำนวน ไม่พบปัญหาใด ๆ ในไก่ทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อไก่อายุได้ 21 วัน ในกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ APR ด้วยการป้อนเชื้อบิต พบว่าภายหลังจากป้อนเชื้อ ไก่บางส่วนแสดงอาการท้องเสีย อุจจาระเหลว มีสีส้มแดง หรือมีเลือดปน แสดงถึงภาวะการติดเชื้อบิต ได้ทำการเจาะเลือดทั้งก่อนและ หลังจากป้อนเชื้อ 7 วัน และนำไก่ทั้ง 2 กลุ่ม มาผ่าซากพิสูจน์รอยโรคโดยเฉพาะไก่ในกลุ่มที่ 2 เพื่อตรวจรอยโรคของการติดเชื้อบิต เพื่อบ่งชี้ถึงภาวะไก่ที่มีการติดเชื้อ มีการอักเสบ จากการผ่าซากพบว่า ไก่ในกลุ่มที่ 2 ทุกตัว มีรอยโรคของการติดเชื้อบิต ทั้งในส่วน of duodenum และ jejunum (รูปที่ 1 B และ C) เมื่อตัดชิ้นเนื้อในส่วน of รอยโรคนำไปตรวจรอยโรคระดับจุลพยาธิ พบว่าที่ enterocytes ในส่วน of duodenum พบเชื้อบิตจำนวนมากอยู่ในเซลล์ของลำไส้ (รูปที่ 1 D) ส่วนในไก่ในกลุ่มควบคุมไม่พบรอยโรคใด ๆ (รูปที่ 1 A)

4.2 ระดับความเข้มข้นของ TSP ในตัวอย่างซีรัม

นำซีรัมของไก่ทั้ง 2 กลุ่มมาตรวจหาความเข้มข้นของ TSP พบว่าที่ไก่อายุ 14 วัน ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น TSP ของไก่ทั้งสองกลุ่ม มีค่าใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกันกับค่าเฉลี่ยของ TSP ของไก่ในกลุ่มที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างจากไก่ในกลุ่มควบคุมภายหลังจากการติดเชื้อบิตไปแล้ว 7 วัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเข้มข้นของ TSP ในไก่ทั้งสองกลุ่ม

กลุ่ม	ความเข้มข้นของ TSP (mg/ml) (mean ± SD)	
	14 วัน	21 วัน
กลุ่มควบคุม	19.79 ± 3.76	21.00 ± 3.35
กลุ่มเหนี่ยวนำภาวะ APR	23.15 ± 4.07	20.54 ± 1.74



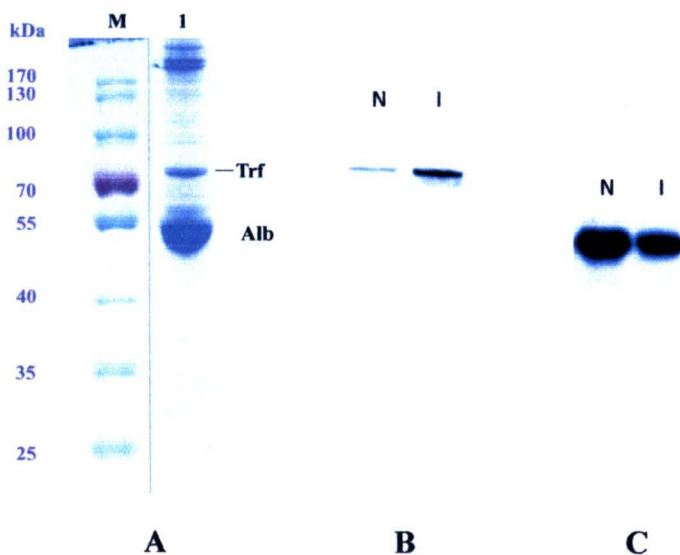
รูปที่ 1 แสดงรอยโรคของไ้ในกลุ่มที่เหนียวทำให้เกิดภาวะ APR โดยป้อนเชื้อบิดทำให้เกิดลำไส้อักเสบ พบจุดเนื้อมีตายที่บริเวณ duodenum (B) และ jejunum (C) และเมื่อนำลำไส้ส่วนที่มีรอยโรคไปตรวจด้วย จุลพยาธิวิทยาพบ เชื้อบิดจำนวนมากอยู่ในเซลล์ของลำไส้ (กำลังขยาย 400 เท่า) ส่วนไ้ในกลุ่มที่ 1 ไม่พบรอยโรคใด ๆ ที่ลำไส้

4.3 ผลการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ Trf ในตัวอย่างซีรัม

การบ่งชี้แถบโปรตีน Trf บนแผ่นเจลโดยวิธี Western blot analysis ร่วมกับใช้ rabbit anti-chicken Trf antibodies และใช้ Trf บริสุทธิ์ เป็นโปรตีนยืนยันอ้างอิงแถบโปรตีนบนแผ่นเจล และเป็น positive control ของแถบโปรตีน Trf พบว่าโปรตีน Trf มีขนาด 77.6 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย electrophoresis ในภาวะ non-reducing condition (รูปที่ 2 A และ B) ตัวอย่างซีรumnนำมาตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ Trf พบว่าไ้ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยของระดับ Trf ไม่แตกต่างกันเมื่ออายุ 14 วัน แต่พอหลังจากไ้กลุ่มที่ 2 ติดเชื้อบิดไปแล้ว 7 วันพบว่า มีค่าเฉลี่ยของ Trf เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า ของไ้ปกติ (ตารางที่ 2)

4.4 ผลการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ Alb ในตัวอย่างซีรัม

การบ่งชี้แถบโปรตีน Alb ในตัวอย่างซีรัม บนแผ่นเจลโดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ rabbit anti-chicken Alb antibodies พบว่า Alb มีขนาดประมาณ 49 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย electrophoresis ในภาวะ non-reducing condition (รูปที่ 2 A และ C) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแถบของโปรตีน ซีรัมจากไก่ปกติ (N) กับไก่ที่ติดเชื้อบิต (I) พบว่าไก่ที่ติดเชื้อมีปริมาณของแถบโปรตีน Alb น้อยกว่าไก่ปกติ (รูปที่ 2 C) ทำการหาความเข้มข้นของ Alb ด้วยวิธี cellulose acetate gel electrophoresis (รูปที่ 3) พบว่าค่าเฉลี่ยของ Alb ใน ไก่ที่ติดเชื้อมีค่าลดลง (ตารางที่ 3)



รูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ Trf ใน ซีรัมไก่ด้วย 15 % SDS PAGE แล้วนำเจลไปย้อมสี Coomassie brilliant blue (A) แสดงถึงตำแหน่งของ Trf และ Alb โดยที่ Trf มีขนาดโปรตีนประมาณ 77.6 kDa และยืนยันด้วยวิธี immunoblotting ร่วมกับ rabbit anti-chicken Trf antibodies (B) เมื่อเปรียบเทียบซีรัมจากไก่ปกติ (N) กับไก่ที่ติดเชื้อบิต (I) พบว่าไก่ที่ติดเชื้อมีปริมาณของแถบโปรตีน Trf เพิ่มขึ้น ส่วน Alb มีขนาดประมาณ 49 kDa และทำการยืนยันแถบโปรตีนด้วยวิธี immunoblotting ร่วมกับ rabbit anti chicken Alb antibodies พบว่าในไก่ที่ติดเชื้อบิตมีปริมาณของแถบโปรตีน Alb ลดลง (C)

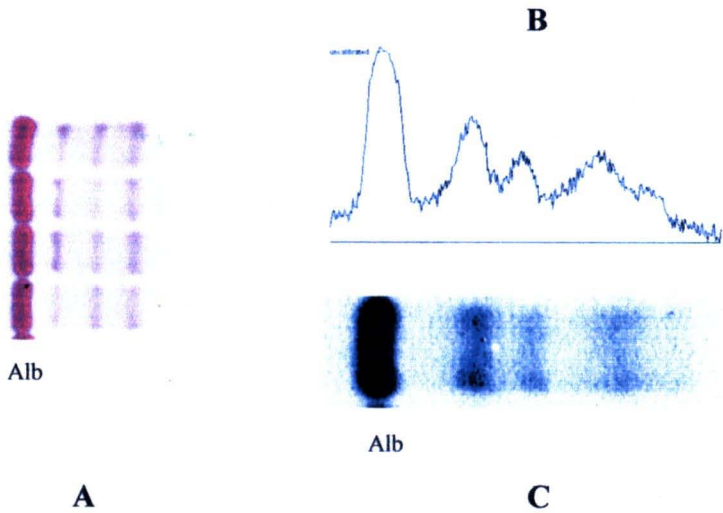
ตารางที่ 2 แสดงระดับความเข้มข้นของ Trf ในไก่ทั้งสองกลุ่ม

กลุ่ม	ความเข้มข้นของ Trf (mg/ml) (mean + SD)	
	14 วัน	21 วัน
กลุ่มควบคุม	1.96 ± 0.54	1.42 ± 0.03
กลุ่มเหนี่ยวนำภาวะ APR	1.95 ± 0.54	2.96 ± 0.13*

*p<0.05

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเข้มข้นของ Alb ในไก่ทั้งสองกลุ่ม

กลุ่ม	ความเข้มข้นของ Alb (mg/ml) (mean + SD)	
	14 วัน	21 วัน
กลุ่มควบคุม	9.5 ± 1.3	8.8 ± 1.3
กลุ่มเหนี่ยวนำภาวะ APR	9.7 ± 0.5	7.2 ± 1.3



รูปที่ 3 แสดงผลของการวัดความเข้มข้นของ Alb ในซีรัมด้วยวิธี cellulose acetate gel electrophoresis แล้วนำเจลนำมาย้อมด้วยสี ponceu S (A) แล้วนำไปหาความเข้มข้นโดยการหาพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของแถบโปรตีน Alb จากรูปแถบความเข้มข้นของโปรตีนในแผ่นเจล (C) ถูกแปลงเป็นกราฟที่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน (B) เพื่อที่คำนวณหาความเข้มข้นต่อไป



4.5 ผลการตรวจ SAA ในตัวอย่างซีรัม

การทำ 15% SDS-urea-PAGE เป็นวิธีการตรวจที่จำเพาะต่อการตรวจ SAA ในตัวอย่าง โดยทั่วไประดับของ SAA ในซีรัมมีปริมาณน้อย การนำแผ่นเจลไปย้อมสีจะไม่สามารถเห็นแถบโปรตีน SAA ได้ชัดเจน (รูปที่ 5 A) การตรวจหาระดับปริมาณ SAA จะต้องใช้วิธี immunoblotting ร่วมด้วย โดยจะพบแถบโปรตีน SAA ขนาด 14 kDa จากรูปที่ 5 B การทำ immunoblotting ด้วยการใช้ rabbit anti-AA antibodies จะพบว่าจะให้ผลบวกต่อโปรตีน ApopA-I ด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการนำ rchSAA มาใช้ในการผลิต rabbit anti-rchSAA antibodies พบว่า antibodies ที่ผลิตได้นั้นให้ปฏิกิริยาเพียงแถบโปรตีน SAA ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะเจาะจงสูงของ antibodies ที่ผลิตได้นี้ (รูปที่ 5 C) จากการตรวจซีรัมของไก่ปรกติและไก่ที่ติดเชื้อพบว่าโปรตีน SAA ตรวจพบเฉพาะในซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อเท่านั้น ไม่ว่าจะตรวจด้วย rabbit anti-AA antibodies หรือ rabbit anti-rchSAA antibodies

4.6 การตรวจระดับ ApoA-I ในตัวอย่างซีรัม

การบ่งชี้แถบโปรตีนในตัวอย่างซีรัมได้ใช้วิธี Western blot analysis โดยใช้ rabbit anti-AA fibrils antibodies เพราะ antibodies มีการ cross reaction กับโปรตีน ApoA-I พบแถบโปรตีนมีใหญ่กว่า 28 kDa ในแผ่นเจล SDS-urea-PAGE (รูปที่ 4 B) จากรูปจะพบว่า ApoA-I จะลดลงในซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อ ในส่วนของแผ่นเจล SDS PAGE under non-reducing condition แถบโปรตีน ApoA-I มีขนาดประมาณ 28 kDa (รูปที่ 5) และมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดในซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ (รูปที่ 5 infected group) ส่วนการผลิต antiserum ที่จำเพาะต่อ ApoA-I นั้นภายหลังจากการตัดแถบโปรตีน ApoA-I จากแผ่นเจลนำไปฉีดกระต่าย ภายหลังจากการฉีดไป 4 สัปดาห์ นำซีรัมมาทดสอบพบว่า ตรวจไม่พบ antibodies ต่อ ApoA-I ซึ่งเป็นไปได้ที่ปริมาณโปรตีนที่นำไปฉีดมีปริมาณน้อยเกินไป จำเป็นต้องหาวิธีอื่นต่อไป

4.7 ผลการคำนวณค่าดัชนีของการอักเสบ (API)

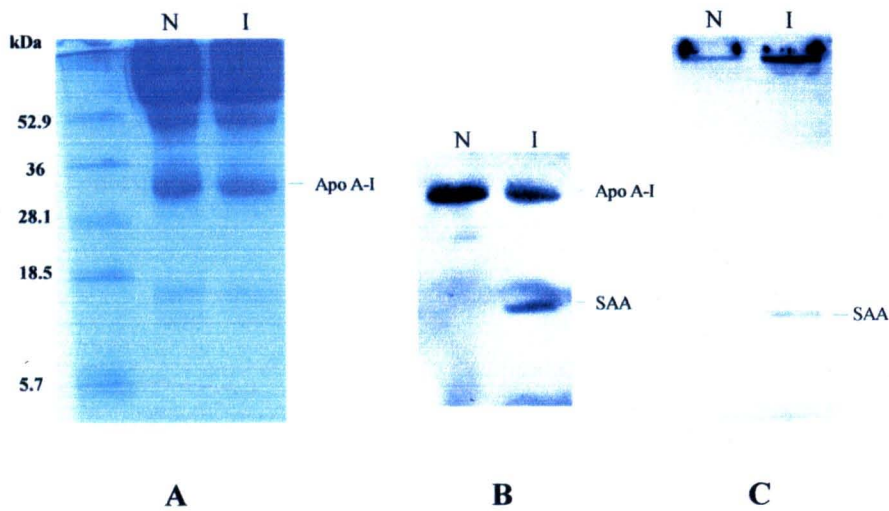
เมื่อนำค่า TSP Trf และ Alb มาเปรียบเทียบกับพบว่า ค่า Trf มีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อ และเมื่อนำค่าทั้งหมดมาคำนวณค่า API ในที่กำหนดเองไว้ พบว่าค่า API ของกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อเมื่อ 21 วันมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงถึงสูตรที่นำมาใช้ในการคำนวณมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ได้ในอนาคต (ตารางที่ 4) (รูปที่ 6)



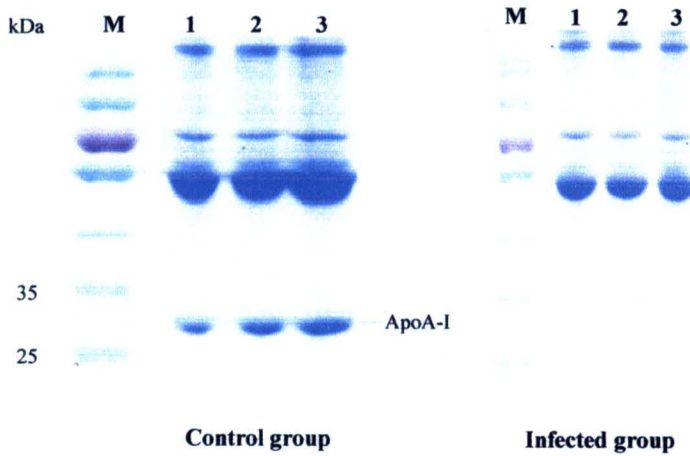
ตารางที่ 4 แสดงค่าดัชนีของการอักเสบ (API) ในไก่ทั้งสองกลุ่ม

กลุ่ม	ค่า API (mean + SD)	
	14 วัน	21 วัน
กลุ่มควบคุม	4.08 + 0.59	3.38 ± 0.09
กลุ่มเหนี่ยวนำภาวะ APR	4.18 + 1.60	8.44 + 0.17*

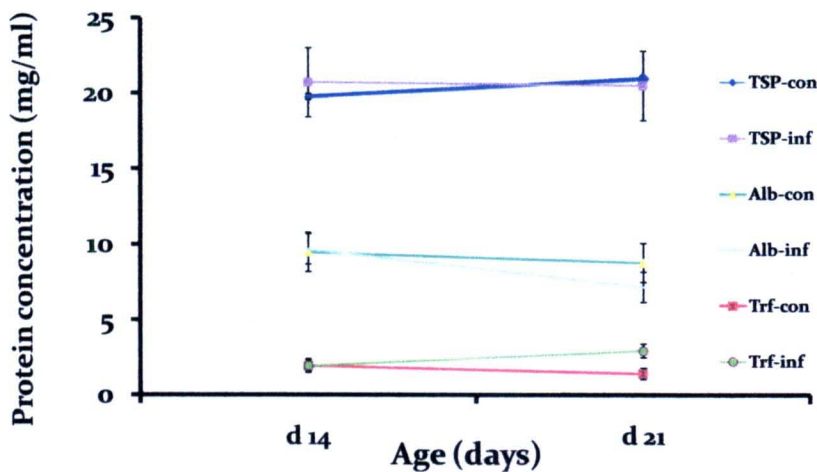
* $p < 0.05$



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจของ SAA ด้วย 15% SDS-6 M urea-PAGE ของซีรัมไก่ปกติ (N) และไก่ที่ติดเชื้อบิต (I) ผ่านเจลย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue (A) แสดงแถบโปรตีน ApoA-I มีขนาดโปรตีนใหญ่กว่า 28 kDa และมีปริมาณลดลงในไก่ที่ติดเชื้อ ส่วนแถบโปรตีน SAA ไม่สามารถเห็นได้บนแผ่นเจลที่ย้อมสี (B) แสดงผล immunoblotting ของตัวอย่างซีรัมโดยใช้ rabbit anti-AA fibrils antibodies พบว่า antibodies นี้ทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่ตำแหน่งประมาณ 14 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของ SAA และทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 28 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของ ApoA-I ด้วยเช่นกัน (C) แสดงแถบโปรตีน immunoblotting ของตัวอย่างซีรัมโดยใช้ rabbit anti-rchSAA antibodies ที่ผลิตได้ พบว่า antibodies นี้ทำปฏิกิริยาเฉพาะ SAA และไม่ทำปฏิกิริยาต่อแถบโปรตีนอื่น ๆ แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของ antibodies ที่ผลิตได้ ส่วนซีรัมไก่ปกติ (N) จะตรวจไม่พบแถบโปรตีนของ SAA ต่อการตรวจด้วย antiserum ทั้ง 2 ชนิด



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจ ApoA-I บน 15 % SDS-PAGE under non-reducing condition ของ ซีรัม ตัวอย่างไก่ที่อายุ 21 วันในกลุ่มควบคุม (control group) และ กลุ่มที่ติดเชื้อ (Infected group) พบว่า แอโปโปรตีน ApoA-I ของไก่ที่ติดเชื้อมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมของไก่ปกติ



รูปที่ 6 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ TSP, Alb และ Trf ในซีรัมของไก่กลุ่มควบคุม (con) และไก่กลุ่มที่ติดเชื้อ (inf) ค่าเฉลี่ยของระดับ TSP ในซีรัมของไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มติดเชื้อไม่แตกต่างกันทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อ ส่วนค่าเฉลี่ยของระดับ Alb ในซีรัมของไก่กลุ่มที่ติดเชื้อบิตมีแนวโน้มที่ค่าจะลดลงกว่าในไก่กลุ่มควบคุม และสุดท้ายค่าเฉลี่ยของระดับ Trf ในซีรัมของไก่กลุ่มที่ติดเชื้อบิตมีค่าสูงกว่าในไก่กลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด