

### บทคัดย่อ

เพื่อให้การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่มีประสิทธิภาพ ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและไม่ต้องใช้ไก่เป็นจำนวนมากโดยไม่จำเป็น จึงได้ทำการพัฒนาต้นแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เริ่มตั้งแต่การผลิต oocyst ให้ได้ปริมาณมากต้องทำการเลี้ยงไก่อายุ 1 วันด้วยอาหารที่ผสมยากันบิดไปจนถึงน้ำหนัก 500 กรัมแล้วหยุดยา 3 วันจึงป้อนเชื้อบิดพบไก่ที่ขับเชื้อบิดถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์และช่วงที่พบการขับเชื้อจะแคบเข้าโดยพบในช่วงวันที่ 7 ถึง 10 หลังได้รับเชื้อ จากนั้นทำการเก็บ oocyst โดยขูดจากผนังไส้ตันย่อยเมือกด้วย pepsin และแยก oocysts ออกจากกากอาหาร ด้วย Clorox<sup>®</sup> เย็น นำ oocysts ไปกระตุ้นให้เกิดการ sporulate โดยการแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_4$ ) นาน 48 ชั่วโมงแล้วทำให้เปลือกของ sporulated oocysts แตกโดยการกระแทกด้วย glass beads ขนาด 0.5 mm 10 ถึง 12 SI จะได้ sporocysts ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการย่อยเปลือกหุ้ม sporocysts ด้วย Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) ผสมกับ trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสพบว่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 90 ถึง 120 นาที เพราะเป็นช่วงเวลาที่มียเปอร์เซ็นต์ของ sporozoites สูงที่สุด จากนั้นแยก sporozoites ออกจากเปลือก ด้วย column separation technique โดยทำการบรรจุ nylon wool และ DEAE-cellulose (Sigma) ในกระบอกฉีดขนาด 3 มล. ใน PBSG buffer pH 8.0 จะได้ sporozoites ซึ่งไม่มีเปลือก oocysts และ sporocysts เจือปน รวมทั้งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยลงสามารถนำมาเติมในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

จากผลการ infection เซลล์เพาะเลี้ยงด้วย sporozoites พบว่า sporozoites infection เซลล์ MDBK ได้ดีที่สุด เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นต้นแบบการทดสอบ

สำหรับการแช่แข็ง sporozoites โดยใช้ DMSO เป็น cryoprotectant พบว่าสามารถป้องกันการแตกสลายของ sporozoites ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม cryoprotectant อย่างไรก็ตามเมื่อนำ sporozoites เหล่านี้มาทดสอบการ infection กับ MDBK เซลล์แล้วพบว่า การ infection ลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีการแช่แข็งดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา sporozoites เพื่อใช้ในการ infection เซลล์