

เอกสารอ้างอิง

- Adler, K.L., Peng, P.H., Peng, R.K., Klasing, K.C., 2001, The kinetics of hemopexin and alpha1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. *Avian Dis* 45, 289-296.
- Badolato, R., Wang, J.M., Murphy, W.J., Lloyd, A.R., Michiel, D.F., Bausserman, L.L., Kelvin, D.J., Oppenheim, J.J., 1994, Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 180, 203-209.
- Badolato, R., Wang, J.M., Stornello, S.L., Ponzi, A.N., Duse, M., Musso, T., 2000, Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J. Leukoc. Biol.* 67, 381-386.
- Boosman, R., Niewold, T.A., Mutsaers, C.W., Gruys, E., 1989, Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant. *Am J Vet Res* 50, 1690-1694.
- Chamanza, R., Toussaint, M.J., van Ederen, A.M., van Veen, L., Hulskamp-Koch, C., Fabri, T.H., 1999, Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet. Q.* 21, 158-162.
- Chambers, R.E., MacFarlane, D.G., Whicher, J.T., Dieppe, P.A., 1983, Serum amyloid-A protein concentration in rheumatoid arthritis and its role in monitoring disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* 42, 665-667.
- Coetzee, G.A., Strachan, A.F., van der Westhuyzen, D.R., Hoppe, H.C., Jeenah, M.S., de Beer, F.C., 1986, Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem* 261, 9644-9651.
- de Beer, M.C., Kindy, M.S., Lane, W.S., de Beer, F.C., 1994, Mouse serum amyloid A protein (SAA5) structure and expression. *J. Biol. Chem.* 269, 4661-4667.
- Ericsson, L.H., Eriksen, N., Walsh, K.A., Benditt, E.P., 1987, Primary structure of duck amyloid protein A. The form deposited in tissues may be identical to its serum precursor. *FEBS Lett.* 218, 11-16.
- Gabay, C., Kushner, I., 1999, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448-454.
- Gorevic, P.D., Greenwald, M., Frangione, B., Pras, M., Franklin, E.C., 1977, The amino acid sequence of duck amyloid A (AA) protein. *J. Immunol.* 118, 1113-1118.
- Griener, G., Liang, T.J., Beuving, G., Goldfarb, V., Metcalfe, S.A., Muller-Eberhard, U., 1986, Hemopexin is a developmentally regulated, acute-phase plasma protein in the chicken. *J Biol Chem* 261, 15719-15724.

- Gruys, E., 2002. Acute phase proteins in bovine medicine. In: The 139th American Veterinary Association Annual Convention Notes, Nashville, July 13–17, pp. 317–321.
- Guo, J.T., Aldrich, C.E., Mason, W.S., Pugh, J.C., 1996, Characterization of serum amyloid A protein mRNA expression and secondary amyloidosis in the domestic duck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14548–14553.
- Hatanaka, E., Furlaneto, C.J., Ribeiro, F.P., Souza, G.M., Campa, A., 2004, Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human neutrophils. *Immunol Lett* 91, 33–37.
- Heegaard, P.M., Godson, D.L., Toussaint, M.J., Tjornehoj, K., Larsen, L.E., Viuff, B., Ronsholt, L., 2000, The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77, 151–159.
- Hermann, M., Lindstedt, K.A., Foisner, R., Morwald, S., Mahon, M.G., Wandl, R., Schneider, W.J., Nimpf, J., 1998, Apolipoprotein A-I production by chicken granulosa cells. *Faseb J* 12, 897–903.
- Hulten, C., Johansson, E., Fossum, C., Wallgren, P., 2003, Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 95, 75–89.
- Ingenbleek, Y., Carpentier, Y.A., 1985, A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 55, 91–101.
- Ingenbleek, Y., Young, V., 1994, Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 495–533.
- Jacobsen, S., Niewold, T.A., Kornalijslijper, E., Toussaint, M.J., Gruys, E., 2005, Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 21–31.
- Kindy, M.S., Rader, D.J., 1998, Reduction in amyloid A amyloid formation in apolipoprotein-E-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 152, 1387–1395.
- Kumon, Y., Hosokawa, T., Suehiro, T., Ikeda, Y., Sipe, J.D., Hashimoto, K., 2002, Acute-phase, but not constitutive serum amyloid A (SAA) is chemotactic for cultured human aortic smooth muscle cells. *Amyloid* 9, 237–241.
- Lannergard, A., Friman, G., Larsson, A., 2003a, Serum amyloid A: a novel serum marker for the detection of systemic inflammatory response in cystitis. *J Urol* 170, 804–806.
- Lannergard, A., Larsson, A., Kraghsbjerg, P., Friman, G., 2003b, Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 63, 267–272.

- Liang, J.S., Schreiber, B.M., Salmona, M., Phillip, G., Gonnerman, W.A., de Beer, F.C., Sipe, J.D., 1996, Amino terminal region of acute phase, but not constitutive, serum amyloid A (apoSAA) specifically binds and transports cholesterol into aortic smooth muscle and HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 37, 2109-2116.
- Liang, J.S., Sipe, J.D., 1995, Recombinant human serum amyloid A (apoSAAp) binds cholesterol and modulates cholesterol flux. *J. Lipid Res.* 36, 37-46.
- Lumeij, J.T., de Bruijne, J.J., Kwant, M.M., 1990, Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Pathol.* 19, 255-261.
- Maury, C.P., Teppo, A.M., 1984, Comparative study of serum amyloid-related protein SAA, C-reactive protein, and beta 2-microglobulin as markers of renal allograft rejection. *Clin. Nephrol.* 22, 284-292.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004, Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28-40.
- Nielsen, B.H., Jacobsen, S., Andersen, P.H., Niewold, T.A., Heegaard, P.M., 2004, Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet Rec* 154, 361-365.
- Ogasawara, K., Mashiba, S., Wada, Y., Sahara, M., Uchida, K., Aizawa, T., Kodama, T., 2004, A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 174, 349-356.
- Olsson, N., Siegbahn, A., Nilsson, G., 1999, Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 143-146.
- Ovelgönne, J.H., Landman, W.J., Gruys, E., Gielkens, A.L., Peeters, B.P., 2001, Identical amyloid precursor proteins in two breeds of chickens which differ in susceptibility to develop amyloid arthropathy. *Amyloid* 8, 41-51.
- Patterson, L.T., Mora, E.C., 1964, Occurrence Of A Substance Analogous To C-Reactive Protein In The Blood Of The Domestic Fowl. *Tex. Rep. Biol. Med.* 22, 716-721.
- Pepys, M.B. 1989. Acute phase proteins in the acute phase response (London, Springer-Verlag), p. 210.
- Rajavashisth, T.B., Dawson, P.A., Williams, D.L., Shackelford, J.E., Lebherz, H., Lusi, A.J., 1987, Structure, evolution, and regulation of chicken apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 262, 7058-7065.
- Rath, N.C., Anthony, N.B., Kannan, L., Huff, W.E., Huff, G.R., Chapman, H.D., Erf, G.F., Wakenell, P., 2009, Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poult Sci* 88, 2069-2074.

- Raynes, J.G., Cooper, E.H., 1983, Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein concentrations in cancer and non-malignant disease. *J. Clin. Pathol.* 36, 798-803.
- Ribeiro, F.P., Furlaneto, C.J., Hatanaka, E., Ribeiro, W.B., Souza, G.M., Cassatella, M.A., Campa, A., 2003, mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators Inflamm* 12, 173-178.
- Sasaki, K., Ma, Z., Khatlani, T.S., Okuda, M., Inokuma, H., Onishi, T., 2003, Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci* 65, 545-548.
- Shephard, E.G., de Beer, F.C., de Beer, M.C., Jeenah, M.S., Coetzee, G.A., van der Westhuyzen, D.R., 1987, Neutrophil association and degradation of normal and acute-phase high-density lipoprotein 3. *Biochem J* 248, 919-926.
- Sondergaard, H.P., Hansson, L.O., Theorell, T., 2004, The inflammatory markers C-reactive protein and serum amyloid A in refugees with and without posttraumatic stress disorder. *Clin Chim Acta* 342, 93-98.
- Steel, D.M., Donoghue, F.C., O'Neill, R.M., Uhlar, C.M., Whitehead, A.S., 1996, Expression and regulation of constitutive and acute phase serum amyloid A mRNAs in hepatic and non-hepatic cell lines. *Scand. J. Immunol.* 44, 493-500.
- Steel, D.M., Sellar, G.C., Uhlar, C.M., Simon, S., DeBeer, F.C., Whitehead, A.S., 1993, A constitutively expressed serum amyloid A protein gene (SAA4) is closely linked to, and shares structural similarities with, an acute-phase serum amyloid A protein gene (SAA2). *Genomics* 16, 447-454.
- Steinmetz, A., Hocke, G., Saile, R., Puchois, P., Fruchart, J.C., 1989, Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 173-178.
- Stewart, A.J., Blindauer, C.A., Berezenko, S., Sleep, D., Sadler, P.J., 2003, Interdomain zinc site on human albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3701-3706.
- Syversen, P.V., Saeter, U., Cunha-Ribeiro, L., Orvim, U., Sletten, K., Husby, G., Sakariassen, K.S., 1994, The effect of serum amyloid protein A fragment-SAA25-76 on blood platelet aggregation. *Thromb Res* 76, 299-305.
- Thibodeau, S.N., Lee, D.C., Palmiter, R.D., 1978, Identical precursors for serum transferrin and egg white conalbumin. *J Biol Chem* 253, 3771-3774.
- Upragarin, N., Toussaint, M.J.M., Tooten, P.C.J., van Asten, A.J.A.M., Wajjwalku, W., Gruys, E., 2005a, Acute phase reaction in layer chickens. A calculated acute phase index to assess health during the rearing period. In: *The 14th Congress of the World Veterinary Poultry Association Istanbul, 22 - 26 Aug 2005*, p. 344.

- Upragarin, N., van Asten, A.J., Tooten, P.C., Landman, W.J., Gruys, E., 2005b, Serum amyloid A production by chicken fibroblast-like synoviocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 39-51.
- van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H., 1994, Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 8, 531-552.
- Whitehead, A.S., de Beer, M.C., Steel, D.M., Rits, M., Lelias, J.M., Lane, W.S., de Beer, F.C., 1992, Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 267, 3862-3867.
- Xie, H., Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M., Holt, P., Rath, N.C., 2002a, Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poult Sci* 81, 112-120.
- Xie, H., Newberry, L., Clark, F.D., Huff, W.E., Huff, G.R., Balog, J.M., Rath, N.C., 2002b, Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases. *Avian Dis* 46, 122-131.
- Yamamoto, K., Migita, S., 1985, Complete primary structures of two major murine serum amyloid A proteins deduced from cDNA sequences. 82, 2915-2919.
- Yang, C.Y., Gu, Z.W., Patsch, W., Weng, S.A., Kim, T.W., Chan, L., 1987, The complete amino acid sequence of proapolipoprotein A-I of chicken high density lipoproteins. *FEBS Lett* 224, 261-266.
- Zimlichman, S., Danon, A., Nathan, I., Mozes, G., Shainkin-Kestenbaum, R., 1990, Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J Lab Clin Med* 116, 180-186.

บทที่ 6

การประเมิน acute phase proteins และค่าดัชนีของการอักเสบในไก่เนื้อ ที่ติดเชื้อ *Clostridium perfringens*

Evaluation of acute phase proteins and acute phase indexes in broilers infected with *Clostridium perfringens*

นรินทร์ อู่ประกรินทร์¹ วรวิทย์ วัชชวัลคุ² รุ่งโรจน์ แจ่มอัน¹ นวลอนงค์ สินวัต¹ เกริญไกร วิฑูรย์เสถียร¹
อรรวรรณ บุตรดี¹ ภัทรา มูลจิตร¹ ศรีสมัย วิริยารัมภา³ และ Erik Gruys⁴
Narin Upragarin¹, Worawidh Wajjwalku², Rungroj Jam-on¹, Nuananong Sinwat¹, Kriangkrai
Witoonsatian¹ Orawan Booddee¹, Pathaa Muljitr¹, Srisamai wiriyarampa³ Erik Gruys⁴

¹Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

³Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

⁴ Veterinary Extension Services, 3971HJ 9, The Netherlands

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาระดับของ acute phase proteins (APPs) และประเมินค่า acute phase index (API) ในกระแสน้ำของในไก่เนื้อที่ติดเชื้อ *Clostridium perfringens* วิธีการทดลองใช้ไก่เนื้อ 80 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 40 ตัว) คือกลุ่มควบคุม และกลุ่มเหนี่ยวนำให้เกิดโรค necrotic enteritis (NE) โดยการป้อนเชื้อ 10^{10} CFU/ *C. perfringens* ที่แยกได้จากไก่ป่วย ทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการป้อนเชื้อจนถึงสิ้นสุดการทดลอง นำตัวอย่างเลือดมาแยกซีรัมเพื่อตรวจความเข้มข้นของ total serum protein (TSP) serum transferrin (Trf) และ serum albumin (Alb) และทำการผ่าซากให้คะแนนรอยโรคและเพาะหาปริมาณเชื้อ *C. perfringens* เมื่ออายุ 21 วันและ 42 วัน ผลการศึกษาพบว่าในไก่กลุ่มที่ติดเชื้อมีรอยโรค NE ที่อายุ 21 วันและ 42 วัน ในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อมีค่าดัชนีการผลิตไก่เนื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุม Trf เป็น positive APP ในภาวะปกติมีค่าประมาณ 1 mg/ml ในไก่ที่มีรอยโรค NE มีค่าสูงถึง 2-2.5 mg/ml ส่วน Alb เป็น negative APP ในภาวะปกติมีค่าประมาณ 10 mg/ml เมื่อมีปัญหา NE Alb มีค่าลดลง การประเมินค่า API พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มไก่ปกติและไก่ที่มีปัญหา NE ได้ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำค่า API ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปพัฒนาใช้ในการประเมินสุขภาพของฝูงไก่เนื้อได้

คำสำคัญ : *Clostridium perfringens*, necrotic enteritis, transferrin, albumin, acute phase proteins, acute phase index, broiler

*Corresponding author. E-mail: fvetnru@ku.ac.th

Abstract

The objective of the study was to determine levels of acute phase proteins (APPs) and acute phase index (API) in the blood circulation of broilers infected with *Clostridium perfringens*. Eighty broilers were divided into two groups (40 birds each) in which necrotic enteritis group inoculated orally by field isolated of 10^{10} CFU/ bird *C. perfringens* while control group was in a healthy condition. Blood was collected individually from birds of each group before and during the experimental period and the serum samples were obtained for analysis of total serum protein (TSP), serum transferrin (Trf), and serum albumin (Alb). Necropsy was performed on 10 birds per group for necrotic enteritis (NE) score at age of 21 day and 42 day, respectively. The results showed that all birds infected with *C. perfringens* had NE lesion but not in control birds. The mean serum Trf levels in all chicken groups about 1 mg/ml at normal conditions and increased to 2–2.5 mg/ml in birds with NE lesion. Alb is a negative APP and its level is about 10 mg/ml at normal conditions. In this experiment, birds with NE lesion had lower level of Alb. The API values in healthy birds were lower than Birds with NE lesion. The API is a suitable biomarker to assess the chicken health conditions.

Keywords: *Clostridium perfringens*, necrotic enteritis, transferrin, albumin, acute phase proteins, acute phase index, broiler

6.1 บทนำ

โรคลำไส้อักเสบแบบมีเนื้อตาย (Necrotic enteritis, NE) เป็นโรคที่มีรายงานครั้งแรกในปี 1961 ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* (Nairn and Bamford, 1967; Parish, 1961a, b, c) โรคนี้ก่อให้เกิดอาการได้ 2 แบบ คือ แบบแสดงอาการ และ แบบเกือบมีอาการ (subclinical signs) แบบแสดงอาการจะก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากเนื่องมาจากเป็นสาเหตุให้ไก่ตายสูง ซึ่งมักพบในฝูงไก่ที่มีปัญหาในส่วนของการเดินทางอาหารมาก่อนและมักพบในโรงเรือนที่มีการจัดการไม่ได้มาตรฐาน ในอดีตที่ผ่านมาการควบคุมป้องกันโรคนี้ จะใช้ยาต้านจุลชีพผสมลงในอาหารสัตว์ ตลอดระยะการเลี้ยง แต่ในภายหลังจากการที่มีการประกาศห้ามใช้ antibiotic growth promoters ผสมในอาหารสัตว์ ในกลุ่มประเทศยุโรปและประเทศอื่นๆ (McDevitt et al., 2006) รวมทั้งประเทศไทย พบว่าโรคนี้มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะแบบเกือบมีอาการ ซึ่งมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก เนื่องจากเป็นลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดอาการเด่นชัด แต่ทำให้ไก่เจริญเติบโตช้าลง ไม่ได้น้ำหนักตามอายุ และพบว่าการรายงานการเกิดโรคเพิ่มสูงมากขึ้น มีปัจจัยหลายอย่างที่เป็นสาเหตุร่วมกันทำให้เกิดปัญหา NE เช่น สัตว์ปีกมีปัญหาการติดเชื้อบิดมาก่อน การเปลี่ยนแปลงของโปรแกรมการให้อาหารอย่างเฉียบพลัน การให้อาหารที่มีระดับโปรตีนในปริมาณที่สูงเกินไป หรือโรคที่ก่อกวนภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Williams, 2005)

เชื้อ *C. perfringens* ที่เป็นสาเหตุของ NE นั้นเคยคาดว่าเกิดจากสายพันธุ์ชนิด type A และ C ที่สามารถผลิต alpha toxin ได้ แต่ในภายหลังพบว่าเชื้อที่ก่อปัญหาเป็นเชื้อที่สามารถผลิต toxin ชนิดใหม่ ชื่อ Necrotic enteritis toxin B (NetB) (Keyburn et al., 2008) จากรายงานพบว่า NetB มีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของเชื้อ *C. perfringens* ที่ทำให้เกิด NE (Keyburn et al., 2010) ฝูงสัตว์ที่มีปัญหา NE แบบเกือบแสดงอาการนั้น สัตว์ไม่แสดงอาการชัดเจน จึงไม่สามารถสังเกตอาการป่วยได้ และการประเมินระดับความรุนแรงของปัญหาจะต้องอาศัยการตรวจรอยโรคของทางเดินอาหารจากการชันสูตรซากของไก่ในฝูง ส่วนการเพาะแยกหาเชื้อ *C. perfringens* จากภายในลำไส้ ก็ไม่สามารถระบุได้ว่า เชื้อที่แยกได้จะเป็นเชื้อที่ก่อโรคหรือเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ได้ (Keyburn et al., 2008) จึงทำให้มีความยากลำบากในการวินิจฉัยโรค NE แบบเกือบแสดงอาการในฝูงไก่ที่เป็นปัญหา

Acute phase proteins (APPs) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ในกระแสเลือด ที่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการที่ร่างกายมีการติดเชื้อหรือเกิดการอักเสบ (Kushner and Rzewnicki, 1994) (Gabay and Kushner, 1999) ซึ่งคาดว่ามีความบทบาทในการรักษา homeostasis ภายในกระแสเลือด (Tilg, 1997) สำหรับในสัตว์ปีก APPs ที่มีรายงานการศึกษาไว้คือ serum transferrin (Trf) serum amyloid A (SAA) albumin (Alb) ซึ่งพบว่าจะมีระดับที่เปลี่ยนแปลงไปขึ้นเมื่อมีการอักเสบและติดเชื้อ (Xie et al., 2002a) (Xie et al., 2002b) ดังนั้น จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ก็เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ Trf และ Alb ต่อการติดเชื้อ *C. perfringens* ในไก่เนื้อและเป็นแนวทางในการประเมินสุขภาพของสัตว์ที่มีปัญหา NE แบบเกือบแสดงอาการภายในฝูงสัตว์ปีกต่อไป

6.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

6.2.1 สัตว์ทดลองและอาหาร

ลูกไก่เนื้ออายุ 1 วัน สายพันธุ์ Ross จำนวน 80 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (40 ตัว) แต่ละกลุ่มใหญ่ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 20 ตัว (2×2) กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมส่วนกลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ acute phase responses (APR) โดยใช้โมเดลการทำให้เกิด subclinical necrotic enteritis ไก่ทุกตัวเลี้ยงอยู่ในโรงเรือนระบบ evaporative cooling system พื้นเล้ามีแกลบเป็นสิ่งปูลรอง แต่ละกลุ่มแยกเลี้ยงในเล้าที่เป็นอิสระออกจากกัน ทุกกลุ่มได้รับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะและยาต้านบิด ให้น้ำกินแบบไม่จำกัด ไก่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อนัดเชื้อเป็นที่อายุ 1 วัน วัคซีนโรคบิดที่อายุ 9 วัน วัคซีนป้องกันโรคกัมโบโรเชื้อเป็นที่อายุ 12 วัน ทำการเลี้ยงไก่จนถึงอายุ 42 วัน จึงสิ้นสุดการทดลอง

6.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens*

เชื้อ *C. perfringens* ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้มาจากลำไส้ไก่ป่วยที่มีปัญหา NE เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นี้ได้ทำการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการเพาะเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน เชื้อแบคทีเรียที่ใช้นี้ได้ทำการยืนยันโดยการทดสอบป้อนเชื้อในไก่แล้วพบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคแบบ NE จากการทดลองก่อนหน้านี้ นำเชื้อมาเพิ่มจำนวน โดยนำเชื้อแบคทีเรียไปเพาะใน thioglycolate broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำ broth ที่ได้นำมาเพาะลงใน cooked meat broth ที่มีส่วนผสมของ thioglycolate ปริมาณ 6 กรัม/ลิตร และมีแป้งเป็นส่วนผสม แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำ broth พร้อมเชื้อไปใช้สำหรับทดลองโดยแบ่งส่วนหนึ่งนำไปเพาะนับปริมาณเชื้อที่แน่นอนต่อไป

6.2.3 การเหนี่ยวนำให้ไก่เกิดโรค NE จากการติดเชื้อ *C. perfringens* และการพิสูจน์โรค

ใช้วิธีการของ Prescott และคณะ (1978) โดยไก่ทุกตัวในกลุ่มที่ 2 ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรค NE แบบ subclinical จะได้รับวัคซีนเชื้อบิตชนิดเชื้อเป็นเมื่อไก่อายุ 9 วัน และทำการป้อนเชื้อ *C. perfringens* ปริมาณ 10^{10} CFU ต่อตัว ติดต่อกัน 3 วันเมื่อไก่อายุ 16, 17 และ 18 วัน ตามลำดับ

ภายหลังจากการป้อนเชื้อ *C. perfringens* ครึ่งสุดท้าย (วันที่ 18 ของการเลี้ยง) ณ เวลา 72 ชั่วโมง (วันที่ 21 ของการเลี้ยง) จะทำการสุ่มไก่เพื่อผ่าซากพิสูจน์โรคทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว (กลุ่มย่อยละ 10 ตัว) เพื่อวัดระดับความรุนแรงของ necrotic enteritis lesion โดยใช้วิธีการให้คะแนนตามที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ (Prescott et al., 1978) ซึ่งมีเกณฑ์ดังต่อไปนี้

0 =no gross lesions

1 =thin walled or friable

2 =focal necrosis or ulceration

3 =large patches of necrosis

4 =severe extensive necrosis

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระภายใน cecum ของไก่ที่ผ่าซากพิสูจน์รอยโรค (8 ตัวจาก 10 ตัว) นำไปเพาะเชื้อและหาปริมาณของ *C. perfringens* ส่วนในวันที่ 42 ของการเลี้ยงได้ดำเนินการผ่าซากพิสูจน์รอยโรคทั้ง 2 กลุ่มเช่นเดียวกันกับ วันที่ 21

6.2.4 การวัดดัชนีการผลิตในการเลี้ยงไก่เนื้อ

ทำการเก็บข้อมูล สูตรอาหาร ปริมาณการกินอาหารในแต่ละวัน และทำการชั่งน้ำหนักไก่ทุกกลุ่มเมื่อไก่อายุได้ 1, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ตามลำดับ แล้วนำมาคำนวณหาค่า feed consumption และ feed conversion efficiency

6.2.5 การเก็บตัวอย่างซีรัม

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดไก่ทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัวอย่างต่อวัน เมื่อไก่อายุได้ 14 วัน (ก่อนเหนียนำโรค) จนถึงอายุ 23 วัน (ช่วงเวลาเหนียนำโรค) และอายุ 25, 28, 32, 36, 39 และ 42 ตามลำดับ วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดได้ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 3 ml และเข็มเบอร์ 23 เจาะจาก brachial wing vein แล้ววางปล่อยให้เลือดแข็งตัวประมาณ 3 ชั่วโมง จึงนำตัวอย่างเลือดไปปั่นแยกเก็บซีรัม ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

6.2.6 การตรวจหาระดับความเข้มข้นของ total serum protein (TSP) ในตัวอย่างซีรัม

การวัดปริมาณ TSP ในตัวอย่างซีรัมของไก่ได้ใช้วิธีการ bicinchoninic acid (BCA) protein assay โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Company) ในการตรวจแต่ละครั้ง ได้ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานสำหรับเทียบความเข้มข้นของตัวอย่างซีรัม

6.2.7 การตรวจหาระดับความเข้มข้นของ Trf

การบ่งชี้โปรตีน Trf ในตัวอย่างซีรัมได้ใช้วิธีพัฒนามาจากวิธีการของ Chamanza (Chamanza et al., 1999) โดยมีขั้นตอนเบื้องต้นดังนี้ นำตัวอย่างซีรัมเจือจาง 1:25 ด้วย non-reducing sample loading buffer แล้วนำไปแยกแถบของโปรตีนด้วยวิธี 15 % Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เสร็จแล้วทำการย้ายแถบโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น Hybond membrane (Amersham, Bioscience) ด้วยเครื่อง semi-dry electrophoresis transfer cell (Bio-rad) เสร็จแล้วทำการบ่งชี้ตำแหน่งโปรตีน Trf บนแผ่น membrane ด้วยวิธี Western blot analysis โดยใช้ rabbit anti-chicken Trf antibodies (Inter-cell Technologies, NJ) ปริมาณเจือจาง 1:2000 เป็น primary

antibodies ร่วมกับชุดตรวจ Western blotting ECL-kit (Amersham, Bioscience) ปริมาณความเข้มข้นของ Trf ในตัวอย่างซีรัม ได้มาจากการวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีน Trf ภายหลังจากที่ทำการแยกโปรตีนในตัวอย่างซีรัมผ่าน 15% SDS PAGE ภายใต้อาภาวะ non-reducing condition และนำเจลมาย้อมด้วยสีด้วย Coomassie brilliant blue อบให้ gel แห้งแล้วนำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Geldoc imaging densitometer (Bio-rad) โดยใช้โปรตีน Trf (Conalbumin, Sigma) ที่ทราบความเข้มข้นเป็น ค่ามาตรฐานทั้งตำแหน่งและความเข้มข้นในแผ่นเจล

6.2.8 การตรวจหาระดับความเข้มข้นของ Alb

การบ่งชี้โปรตีน Alb ในตัวอย่างซีรัมมีขั้นตอนเบื้องต้นดังนี้ นำตัวอย่างซีรัม เจือจาง 1:25 ด้วย non-reducing sample loading buffer แล้วนำไปแยกแถบของโปรตีนด้วยวิธี 15% SDS-PAGE เสร็จแล้วทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น Hybond membrane (Amersham, Bioscience) ด้วยเครื่อง semi-dry electrophoresis transfer cell (Bio-rad) เสร็จแล้วทำการบ่งชี้ตำแหน่งโปรตีน Alb บนแผ่น membrane ด้วยวิธี Western blot analysis โดยใช้ rabbit anti-chicken Alb antibodies (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg) ร่วมกับชุดตรวจ Western blotting ECL-kit (Amersham, Bioscience) ปริมาณความเข้มข้นของ Alb ในตัวอย่างซีรัมได้มาจากการวัดความเข้มข้นของ Alb band ภายหลังจากที่ทำการแยกโปรตีนในตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี cellulose acetate gel electrophoresis

6.2.9 การคำนวณค่าดัชนีของการอักเสบ (acute phase index, API)

ค่าดัชนีของการอักเสบ API คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$API = \frac{\text{Trf (mg/ml)} \times \text{TSP (mg/ml)}}{\text{Alb (mg/ml)}}$$

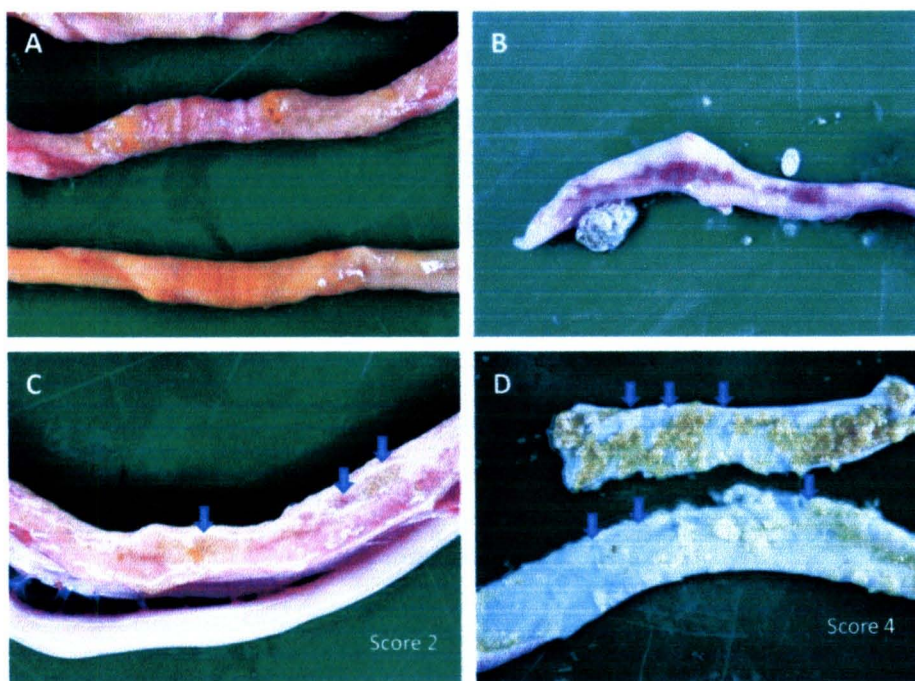
6.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลความเข้มข้นของค่า APPs ที่ได้จากการศึกษาโดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ และระหว่างกลุ่มทดสอบที่แตกต่างกัน นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way ANOVA และ วิเคราะห์แต่ละกลุ่มที่จุดเวลาต่าง ๆ ด้วย Student's *t* test การวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 12.0.1 for Windows (SPSS Chicago, IL)

6.3 ผลการศึกษา

6.3.1 ผลการเหนี่ยวนำให้ไก่ติดเชื้อ *C. perfringens* และพิสูจน์รอยโรค

หลังจากป้อนเชื้อ *C. perfringens* ในกลุ่มทดลองไปแล้ว 3 วัน (ไก่อายุ 21 วัน) ทำการผ่าซากเพื่อตรวจรอยโรคที่เกิดขึ้นในลำไส้เล็กโดยเปรียบเทียบกับลำไส้เล็กในกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มที่ติดเชื้อ *C. perfringens* มีปัญหาลำไส้อักเสบจากแบบไม่รุนแรงไปจนถึงเห็นแผ่นเนื้อตายปกคลุมผิวเยื่อชุ่มของลำไส้ (รูปที่ 6.1) ทำการให้คะแนนรอยโรคของลำไส้ในไก่ทุกตัวที่ผ่าซาก พบว่าในไก่กลุ่มควบคุมมีค่าผลรวมของรอยโรค 15 และค่าเฉลี่ยของรอยโรคเท่ากับ 0.75 ± 0.17 ซึ่งไม่พบลักษณะรอยโรค NE แต่ส่วนในไก่ที่ติดเชื้อมีค่าผลรวมรอยโรคเท่ากับ 48 และค่าเฉลี่ยของรอยโรค 2.40 ± 0.15 ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในส่วนของวันที่ 42 กลุ่มควบคุมมีผลรวมของรอยโรคเท่ากับ 18 และมีค่าเฉลี่ยของรอยโรคเท่ากับ 0.90 ± 0.07 ส่วนกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อมีค่าผลรวมรอยโรคเท่ากับ 34 และค่าเฉลี่ยของรอยโรคเท่ากับ 1.70 ± 0.13 ตามลำดับ (ตารางที่ 6.1) จากผลของรอยโรคจะพบว่าในไก่ที่ติดเชื้อ *C. perfringens* พบรอยโรค NE อย่างเด่นชัดชี้ให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองมีความรุนแรงสามารถทำให้เกิดรอยโรคได้



รูปที่ 6.1 แสดงรอยโรคของลำไส้ของไก่ในกลุ่มที่ติดเชื้อ *C. perfringens* เหนี่ยวนำให้เกิด subclinical necrotic enteritis พบรอยโรคของผิวเยื่อชุ่มลำไส้อักเสบหนาตัว (A) หรือมีการคั่งเลือดและมีจุดเลือดออก (B) ในไก่บางตัวพบจุดเนื้อตายและแผลหลุมซึ่งเป็นระดับรอยโรค NE เท่ากับ 2 (ตำแหน่งลูกศร) (C) บางตัวมีรอยโรคของ NE อย่างชัดเจนมีผนังลำไส้บางและมีแผ่นเนื้อตายปกคลุม ซึ่งเป็นระดับรอยโรค NE เท่ากับ 4 (ตำแหน่งลูกศร) (D)

ตารางที่ 6.1 แสดงผลคะแนนรอยโรค NE ของไก่ทั้ง 2 กลุ่มที่อายุ 21 วันและอายุ 42 วัน

อายุ	กลุ่มควบคุม			กลุ่มติดเชื้อ		
	จำนวน (ตัว)	ผลรวม lesion scores	mean±SEM	จำนวน (ตัว)	ผลรวม lesion score	mean±SEM
21	20	(15)	0.75±0.17	20	(48)	2.40±0.15*
42	20	(18)	0.90±0.07	20	(34)	1.70±0.13*
รวม	40	(33)		40	(82)	

* ค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

6.3.2 ผลของการเพาะนับปริมาณเชื้อ *C. perfringens* ใน cecum ของไก่

ทำการเก็บอุจจาระที่อยู่ใน cecum ไปเพาะหาปริมาณเชื้อ *C. perfringens* ในวันที่ 21 และ 42 พบว่าในวันที่ 21 พบเชื้อ *C. perfringens* จากไก่ในกลุ่มควบคุม 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของเชื้อเท่ากับ 2.92 log₁₀CFU /g ส่วนตัวอย่างในกลุ่มที่ติดเชื้อพบเชื้อ *C. perfringens* 4 ตัวอย่างจากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.04 log₁₀CFU /g โดยในแต่ละตัวอย่างที่พบเชื้อนั้นมีค่า CFU/g สูงกว่าตัวอย่างไก่ในกลุ่มควบคุม สำหรับในวันที่ 42 ตัวอย่างทั้งหมดจากกลุ่มควบคุมเพาะไม่พบเชื้อ *C. perfringens* (0/8 ตัวอย่าง) แต่ในกลุ่มทดลองนั้น พบตัวอย่างที่มีเชื้อ *C. perfringens* จำนวน 6 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.61 log₁₀CFU /g ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพบว่ากลุ่มที่ติดเชื้อมีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์สอดคล้องกับผลของการผ่าซากและ lesion score ของลำไส้ในกลุ่มที่ติดเชื้อมีรอยโรค NE ที่รุนแรงกว่า (ตารางที่ 6.2)

ตารางที่ 6.2 แสดงผลของการนับจำนวนเชื้อ *C. perfringens* ใน cecum (log₁₀CFU/g content) ของไก่ที่ผ่าซากในแต่ละกลุ่มที่อายุ 21 วันและ 42 วัน

กลุ่ม	ปริมาณเชื้อ <i>C. perfringens</i> (log ₁₀ CFU/g) ในตัวอย่างที่								mean*	+ / total
	1	2	3	4	5	6	7	8		
อายุ 21 วัน										
กลุ่มควบคุม	3.52	2.48	3.11	2.15	3.32	0	0	0	2.92	5/8
กลุ่มติดเชื้อ	2.58	2.89	4.59	2.11	0	0	0	0	3.04	4/8
อายุ 42 วัน										
กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0	0	0	0	–	0/8
กลุ่มติดเชื้อ	4.79	2.18	6.18	2.60	3.04	2.87	0	0	3.61	6/8

* mean log₁₀ CFU/ g of cecal content from only *C. perfringens*-positive birds

6.3.3 ผลของค่าดัชนีของการผลิตของไก่เนื้อ

ตลอดระยะเวลาการศึกษาทั้ง 42 วันการกินอาหารสะสมของทั้ง 2 กลุ่ม แตกต่างกันเล็กน้อย (ตารางที่ 6.3) ไก่ทั้ง 2 กลุ่มได้บันทึกน้ำหนักไก่ทุกสัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบการเติบโต ไก่ในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักสูงกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 6.4) และเมื่อคำนวณค่าอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion) พบว่าค่าเฉลี่ยการแลกเนื้อในกลุ่มควบคุมดีกว่าของกลุ่มที่ติดเชื้อ (ตารางที่ 6.5)

ตารางที่ 6.3 แสดงค่าเฉลี่ยของการกินอาหารสะสมต่อตัว (feed consumption) ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่ม	feed consumption (g) (mean+SEM)	
	1-21 วัน	1-42 วัน
กลุ่มควบคุม	1008.44±29.98	3853.06±129.91
กลุ่มติดเชื้อ	993.61±31.78	3795.30±144.62

ตารางที่ 6.4 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักร่างกายต่อตัวของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

อายุ (วัน)	น้ำหนักตัว (mean ± SEM (gram /bird)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มติดเชื้อ
1	40.25±0.10	40.38±0.12
14	431.25±6.92	428.00±10.98
21	799.38±20.32	776.53±21.62
28	1346.83±47.16	1317.32±51.02
35	2005.17±83.60	1940.94±100.84
42	2599.00±121.98	2544.33±133.09

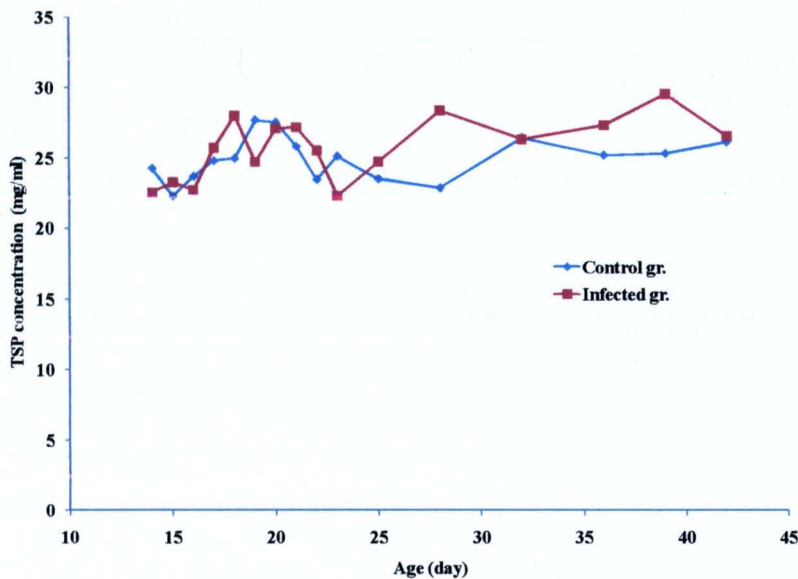
ตารางที่ 6.5 แสดงค่าเฉลี่ย อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion) ของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของ feed conversion (mean ± SEM) ในแต่ละช่วงเวลา			
	1- 14	14-28	28-42	1-42
กลุ่มควบคุม	1.317±0.005	2.022±0.031	2.328±0.100	2.025±0.048
กลุ่มติดเชื้อ	1.306±0.040	2.161±0.078	2.308±0.085	2.048±0.051

6.3.4 ผลของระดับ TSP

นำตัวอย่างซีรัมของไก่ทั้ง 2 กลุ่มตรวจหาความเข้มข้นของ TSP ในช่วงระยะเวลาของการทดลองพบว่า ระดับ TSP ของไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นและลดลงเป็นไปในแนวทางเดียวกันในช่วงต้นของการทดลอง แต่พอหลังจากวันที่ 25 ค่า TSP ในกลุ่มติดเชื้อมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม น่าจะเป็นผลมาจากการที่กลุ่มติดเชื้อได้รับเชื้อ *C. perfringens* ซึ่งร่างกายสัตว์มีการปรับตัวเข้าสู่ภาวะติดเชื้อ (รูปที่ 6.2)

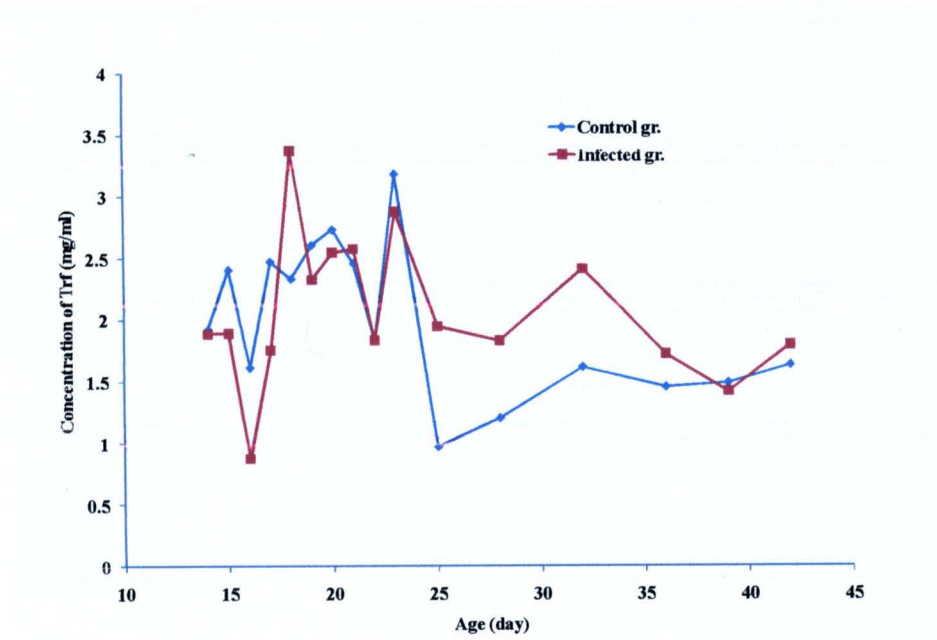
รูปที่ 6.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มข้น TSP ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



6.3.5 ผลการตรวจระดับความเข้มข้นของ Trf

เมื่อนำซีรัมของไก่ทั้ง 2 กลุ่มตรวจระดับของ Trf พบว่า Trf ในไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าไปในแนวทางเดียวกันในช่วงต้น (ก่อนอายุ 25 วัน) แต่พอหลังจากนั้นค่าเฉลี่ยของ Trf ของไก่ในกลุ่มควบคุมมีค่าลดลงอยู่ในระดับปกติ ส่วนค่าเฉลี่ย Trf ของไก่ในกลุ่มที่ติดเชื้อมีค่าลดลงแล้วกลับเพิ่มขึ้นแล้วค่อยลดลงในระยะท้ายของการทดลอง แสดงว่าไก่ในกลุ่มที่ติดเชื้อมีการเพิ่มขึ้นของ Trf ซึ่งเกิดมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *C. perfringens* ซึ่งมีค่าสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมประมาณ 1 เท่า ส่วนการที่ไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีค่า Trf สูงในช่วงแรกนั้นอาจเนื่องมาจากสาเหตุที่ไก่ทั้ง 2 กลุ่มได้รับวัคซีนเชื้อเป็นป้องกันโรคคัมโบโรเมื่ออายุ 12 วัน

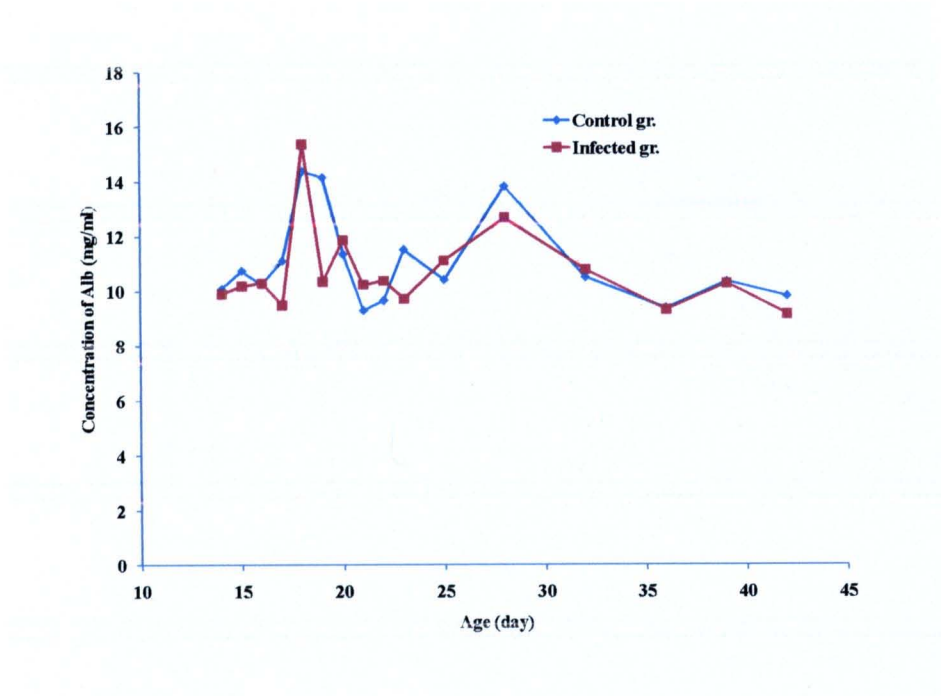
รูปที่ 6.3 แสดงกราฟของการเปลี่ยนแปลงของระดับ Trf ก่อนและภายหลังจากป้อนเชื้อ C. perfringens ของไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



6.3.6 ผลการตรวจระดับความเข้มข้นของ Alb

ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ Alb ของไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีแนวโน้มไปในแนวทางเดียวกันตลอดการศึกษาและมีแนวโน้มลดลงเมื่อไก่อายุมากขึ้น ในช่วงอายุ 15-20 วัน ที่ค่า Alb มีค่าลดลงทั้งสองกลุ่ม น่าจะมาจากการตอบสนองต่อการทำวัคซีนในวันที่ 12 (รูปที่ 6.4)

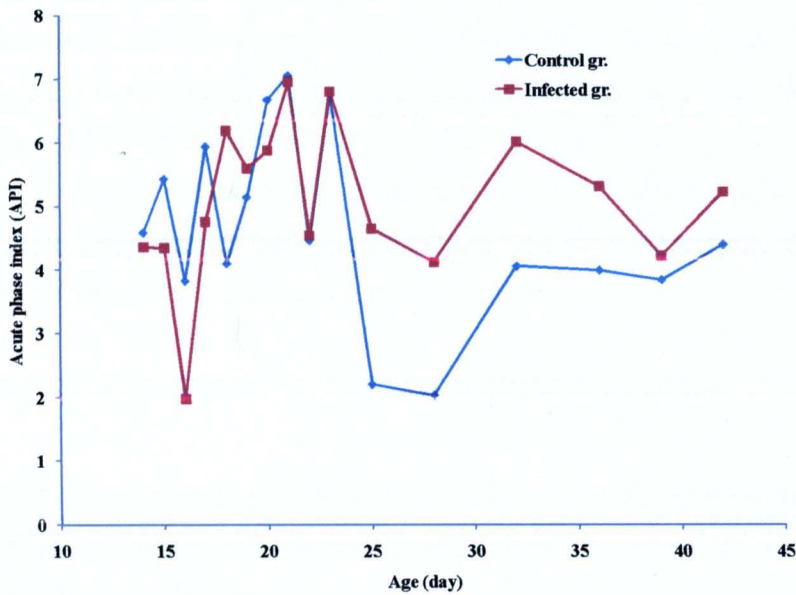
รูปที่ 6.4 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ Alb ของไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



6.3.7 ผลการคำนวณค่าดัชนีของการอักเสบ (API) จากค่า APPs ที่ตรวจ

เมื่อนำค่า TSP Trf และ Alb ของไก่แต่ละตัวมาคำนวณหาค่า API พบว่าค่าเฉลี่ย API ของกลุ่มที่ติดเชื้อมีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วงหลังจากวันที่ 21 ซึ่งค่า API ในกลุ่มควบคุมมีค่าลดลงเช่นเดียวกับค่า Trf และ Alb ค่า API ที่สูงขึ้นในช่วงอายุ 15-20 วัน น่าจะเกิดมาจากการทำวัคซีนเชื้อเป็นจากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สูตรการคำนวณหาค่า API ที่กำหนดไว้ มีความไวในการวัดการเปลี่ยนแปลงของ APPs เมื่อฝูงไก่มีภาวะ APR (รูปที่ 6.5)

รูปที่ 6.5 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยดัชนีของการอักเสบ (API) ของไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



6.4 วิจัยผลการศึกษา

ในการออกแบบการทดลองโรค NE เพื่อศึกษาปัจจัย และ pathogenesis ที่เกี่ยวข้องนั้น ในการศึกษาที่ผ่านมาค่อนข้างยุ่งยากและมักจะไม่สามารถประสบความสำเร็จ เพราะเนื่องมาจากการสร้างโมเดลที่จะเหนี่ยวนำให้ไก่ป่วยเป็นโรค NE ในห้องทดลอง จะเป็นไปได้ลำบาก หรือมีความสำเร็จไม่แน่นอน เพราะว่า ตัวเชื้อ *C. perfringens* เป็นเชื้อฉกฉวยโอกาสที่ต้องมีสาเหตุอื่น ซึ่งตัวสาเหตุเหล่านี้ยังต้องมีการศึกษา ความรู้ความเข้าใจถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค NE อีกมาก ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเหนี่ยวนำโรคเพราะว่าได้ใช้เชื้อ *C. perfringens* ที่แยกได้มาจากไก่ที่ป่วย ซึ่งโดยปกติแล้ว เชื้อ *C. perfringens* สามารถพบได้ทั่วไปทั้งภายในลำไส้ แต่เชื้อที่ก่อโรคนั้นมีความจำเพาะบางสายพันธุ์เท่านั้น (Keyburn et al., 2006; Sawires and Songer, 2006)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระดับ TSP ในไก่เนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 20-25 mg/ml ในกลุ่มไก่ติดเชื้อมีค่า TSP สูงกว่าเล็กน้อย ส่วนค่า Trf ในสัตว์ปีกพบว่าเป็น positive APP สำหรับไก่เนื้อนั้นในสภาวะปกติมีค่า Trf ประมาณ 1 mg/ml และเมื่อมีติดเชื้อ Trf จะมีค่าเพิ่มขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาของโรคและ ชนิดของการติดเชื้อ (Rath et al., 2009) ในการศึกษาครั้งนี้ ระดับ Trf ในกลุ่มติดเชื้อ มีค่าสูงขึ้นจะถึงระดับสูงสุด 2-2.5 mg/ml เมื่อมีการติดเชื้อ *C. perfringens* ผ่านไปแล้ว 3-5 วัน แล้วลดลงมาจนมีค่าอยู่ในระดับใกล้เคียงกับค่า Trf ของไก่ปกติ นั้นใช้เวลาถึง 20 วันหลังจากการติดเชื้อ

ส่วนระดับของ Alb ในไก่เนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 10-15 mg/ml และเป็น negative APP จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับ Alb ลดลงไม่เด่นชัดนัก ซึ่งมีความแตกต่างกันไม่เกิน 1-3 mg/ml ระหว่างกลุ่มปกติและกลุ่มที่ติดเชื้อ อาจเป็นเพราะว่า Alb เป็นโปรตีนหลักของในกระแสเลือด การเพิ่มขึ้นหรือลดลงจะมีผลกระทบต่อ สมดุลและความดันในเส้นเลือดสูง

ส่วนการคำนวณค่า API ในสูตรที่กำหนดขึ้นในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า API มีค่าสูงขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของค่า APPs ที่วัด และมีค่าแตกต่างเด่นชัดมากขึ้นถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของ APPs มาขึ้น จากการศึกษาพบว่า ค่า API มีความไวในการประเมินภาวะ APR มากกว่าการพิจารณาจากค่า APPs เพียงตัวใดตัวหนึ่งเช่น ถ้าประเมินภาวะ APR ของสัตว์โดยการดูที่ ระดับของ Alb อย่างเดียว จะไม่พบ ความแตกต่างของไก่ปกติกับไก่ที่ติดเชื้อ หรือแม้กระทั่งค่า Trf ก็เพิ่มขึ้นไม่มากนัก ดังนั้นการใช้ค่า API ในการประเมินภาวะสุขภาพของฝูงสัตว์ จะมีส่วนช่วยในการบ่งชี้ของภาวะ APR ในฝูงสัตว์ได้ดีกว่าการ ประเมินจากค่าระดับของ APPs เพียงอย่างเดียว

6.5 สรุป

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ TSP Trf และ Alb ต่อการติดเชื้อ *C. perfringens* ในไก่เนื้อและเพื่อพัฒนาค่า API สำหรับใช้เป็นแนวทางในการประเมินสุขภาพของฝูงไก่เนื้อที่มีปัญหา NE แบบเกือบแสดงอาการ

ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเหนี่ยวนำโรค NE ด้วย *C. perfringens* เพราะเชื้อที่ใช้ในการศึกษานั้นแยกได้มาจากลำไส้ของไก่ป่วย กลุ่มไก่ที่ติดเชื้อมีค่าดัชนีการผลิตไก่เนื้อต่ำกว่า กลุ่มควบคุม ระดับ TSP ในไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน Trf เป็น positive APP ในภาวะปกติมีค่าประมาณ 1 mg/ml ในไก่ที่มีรอยโรค NE มีค่า Trf สูงถึง 2-2.5 mg/ml Alb เป็น negative APP ในภาวะปกติมีค่าประมาณ 10 mg/ml เมื่อมีปัญหา NE Alb มีค่าลดลง การพัฒนาสูตรคำนวณ API เพื่อนำไปใช้ พบว่าค่า API สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มไก่ปกติและไก่ที่มีปัญหา NE ได้ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำสูตร API ที่ได้ออกแบบไว้ นำไปพัฒนาใช้ในการประเมินสุขภาพของฝูงไก่เนื้อที่ปกติและที่อยู่ในภาวะ APR ได้

6.6 กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และขอขอบคุณบริษัท Eli Lilly Asia, Inc. (Thailand branch) ที่ให้ทุนสนับสนุนการสร้างโมเดลการทดลองการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค NE ในไก่เนื้อ ขอขอบคุณ คุณสุชาติ สงวนพันธุ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาทกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง และนิสิตคณะสัตวแพทย์ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่าง

6.7 เอกสารอ้างอิง

- Chamanza, R., Toussaint, M.J., van Ederen, A.M., van Veen, L., Hulskamp-Koch, C., Fabri, T.H., 1999, Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet. Q.* 21, 158-162.
- Gabay, C., Kushner, I., 1999, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448-454.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008, NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 4, e26.
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E., Williamson, M.M., Awad, M.M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2006, Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun* 74, 6496-6500.
- Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., 2010, Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res* 41, 21.
- Kushner, I., Rzewnicki, D.L., 1994, The acute phase response: general aspects. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 8, 513-530.
- McDevitt, R.M., Brooker, J.D., Acamovic, T., Sparks, N.H.C., 2006, Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World's Poultry Sci. J.* 62, 221-247.
- Naim, M.E., Bamford, V.W., 1967, Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia. *Aust Vet J* 43, 49-54.
- Parish, W.E., 1961a, Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol* 71, 377-393.
- Parish, W.E., 1961b, Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol* 71, 394-404.
- Parish, W.E., 1961c, Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. *J Comp Pathol* 71, 405-413.
- Prescott, J.F., Sivendra, R., Barnum, D.A., 1978, The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. *Can Vet J* 19, 181-183.

- Rath, N.C., Anthony, N.B., Kannan, L., Huff, W.E., Huff, G.R., Chapman, H.D., Erf, G.F., Wakenell, P., 2009, Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poult Sci* 88, 2069-2074.
- Sawires, Y.S., Songer, J.G., 2006, *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 12, 23-43.
- Tilg, H., 1997, New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 112, 1017-1021.
- Williams, R.B., 2005, Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 34, 159-180.
- Xie, H., Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M., Holt, P., Rath, N.C., 2002a, Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poult Sci* 81, 112-120.
- Xie, H., Newberry, L., Clark, F.D., Huff, W.E., Huff, G.R., Balog, J.M., Rath, N.C., 2002b, Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases. *Avian Dis* 46, 122-131.

ภาคผนวก

1. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ตารางภาคผนวก 1: เปรียบเทียบวัตถุประสงค์เดิม/ ใหม่ของโครงการ

วัตถุประสงค์เดิม	วัตถุประสงค์ใหม่
1. เพื่อศึกษาและตรวจหาค่า acute phase proteins (APPs) ที่สำคัญของไก่สายพันธุ์ไข่ ที่มีการเลี้ยงอยู่ในอุตสาหกรรมไก่ในประเทศไทย	1. เพื่อศึกษาและตรวจหาค่า acute phase proteins (APPs) ที่สำคัญของไก่สายพันธุ์เนื้อ ที่มีการเลี้ยงอยู่ในอุตสาหกรรมไก่ในประเทศไทย
2. ทำการศึกษาจากจนศาสตร์ ของ serum amyloid A (SAA) และ APPs ที่สำคัญ	2. ทำการศึกษาจากจนศาสตร์ ของ Total serum protein (TSP) serum transferring (Trf) และ serum albumin (Alb)
3. ศึกษาความไวในการใช้ ค่าดัชนีการอักเสบ acute phase index (API) มาบ่งชี้ สภาวะการติดเชื้อ หรือการอักเสบในไก่	3. ศึกษาความไวในการใช้ ค่าดัชนีการอักเสบ acute phase index (API) มาบ่งชี้ สภาวะการติดเชื้อ หรือการอักเสบในไก่

ตารางภาคผนวกที่ 2: แสดงกิจกรรมที่วางแผน / กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. การพัฒนาการตรวจ SAA ในตัวอย่างซีรัม	1. การพัฒนาการตรวจ SAA ในตัวอย่างซีรัม	1. วิธีการตรวจ SAA
1.1 ผลิต recombinant protein rchSAA	1.1 นำเวกเตอร์ pGEX-rchSAA เพิ่มปริมาณและผลิตโปรตีนในเชื้อ E. coli และทำการสกัดแยก rchSAA เพื่อนำไปใช้	1.1 ได้ recombinant protein ของ rchSAA ไว้ใช้ตลอดการศึกษา
1.2 นำ rchSAA ที่ผลิตได้นำไปผลิต antiserum ต่อ rchSAA	1.2 นำ rchSAA ที่สกัดได้ นำมาฉีดในกระต่าย และนำซีรัมกระต่ายมาทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีน SAA ในตัวอย่าง	1.2 ได้ antiserum ที่ใช้ในการตรวจ โปรตีน SAA ในตัวอย่างซีรัมไก่
1.3 นำ antiserum ที่ได้ มาใช้ในการทดสอบ การตรวจซีรัมตัวอย่าง ด้วยวิธี Western blot analysis		1.3 ได้ dilution ที่เหมาะสมในการใช้ antiserum ที่ผลิตได้ในการตรวจ SAA ในตัวอย่าง

	1.3 นำ antiserum ที่ได้มาทดสอบหา อัตราส่วนการเจือจางในการตรวจ Western blot analysis เพื่อที่จะลด background และให้ได้ signal ต่อ SAA ในตัวอย่าง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพที่เหมาะสมที่สุด	
2. การพัฒนาการตรวจ Trf ในตัวอย่างซีรัม โดยใช้ anti-Trf polyclonal antibodies ที่ซื้อมาทดสอบวิธีการตรวจซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี Western blot analysis และ นำ conalbumin (Trf) มาฉีดในกระต่ายเพื่อผลิต anti-Trf antiserum	2 นำ antiserum ที่ซื้อมาและที่ผลิตได้มาทดสอบหา อัตราส่วนการเจือจางในการตรวจหา Trf ในตัวอย่าง ซีรัมด้วยวิธี Western blot analysis	2. ได้ dilution ที่เหมาะสมในการใช้ antiserum ที่ซื้อมาและผลิตเองในการตรวจ Trf ในตัวอย่างซีรัม
3. การพัฒนาการตรวจ Alb ในตัวอย่างซีรัม โดยใช้ anti-Alb polyclonal antibodies ที่ซื้อมาทดสอบวิธีการตรวจซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี Western blot analysis	3. นำ anti Alb antiserum ที่ซื้อมาหาอัตราส่วนการเจือจางในการตรวจหา Alb ในตัวอย่าง ซีรัมด้วยวิธี Western blot analysis เพื่อหา conditions ที่เหมาะสม ส่วนวิธีในการตรวจหาความเข้มข้น Alb ได้ใช้วิธี bromocresol green dye binding method และ cellulose acetate gel electrophoresis	3. ได้ dilution ที่เหมาะสมในการใช้ antiserum ที่ซื้อมาในการตรวจ Alb ในตัวอย่างซีรัม และพบว่า วิธี bromocresol green dye binding method ใช้ไม่ได้ผลต่อซีรัมไก่ แต่วิธี cellulose acetate gel electrophoresis สามารถใช้ได้ดี
4. การพัฒนาการตรวจ ApoA-I ในตัวอย่างซีรัม โดยการผลิต rabbit anti-ApoA-I polyclonal antibodies ใช้สำหรับทดสอบวิธีการตรวจซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี Western blot analysis	4. ทำการตัดแยกโปรตีน ApopA-I จาก 15% SDS PAGE แล้วนำไปฉีดเข้ากระต่าย และทำการเก็บซีรัมตรวจความจำเพาะ	4. ซีรัมที่ได้จากการ immunized พบว่าไม่มีความจำเพาะต่อ ApopA-I จึงจำเป็นต้องหาวิธีแก้ไขต่อไป

5. การทดลองและเก็บตัวอย่าง เริ่มการทดลองในไก่เนื้อโดย เหนี่ยวนำทำให้เกิดภาวะลำไส้ อักเสบแล้วทำการเก็บตัวอย่าง เลือดก่อน และหลังการ เหนี่ยวนำ	5. ทำการทดลองโดยแบ่งไก่เนื้อ ออกเป็น 2 กลุ่ม ๆละ 10 ตัว เมื่อ อายุ 14 วัน ทำการป้อน oocysts ของ <i>Eimeria</i> spp. ในกลุ่มที่ 2 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ APR จากลำไส้อักเสบ ทำการเก็บเลือด ไก่ทุกตัวเมื่ออายุ 14 วันและ 21 วัน	5.ได้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 40 ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่ เกี่ยวข้อง
6. ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ซีรัม	6. นำตัวอย่างซีรัมมาตรวจหา ปริมาณของ TSP, Trf, และ Alb	6. ได้ค่าระดับความเข้มข้นของ TSP, Trf และ Alb
7. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้	7. นำค่าความเข้มข้นของ TSP Trf และ Alb มาวิเคราะห์การ เปลี่ยนแปลงจากการทดลองและ คำนวณหา ค่า API จากค่าที่ได้	7. ได้ผลการศึกษา ผลของการ เหนี่ยวนำทำให้เกิดลำไส้อักเสบทำ ให้มีการเปลี่ยนแปลงของค่า APPs และการเพิ่มขึ้นของค่า API



