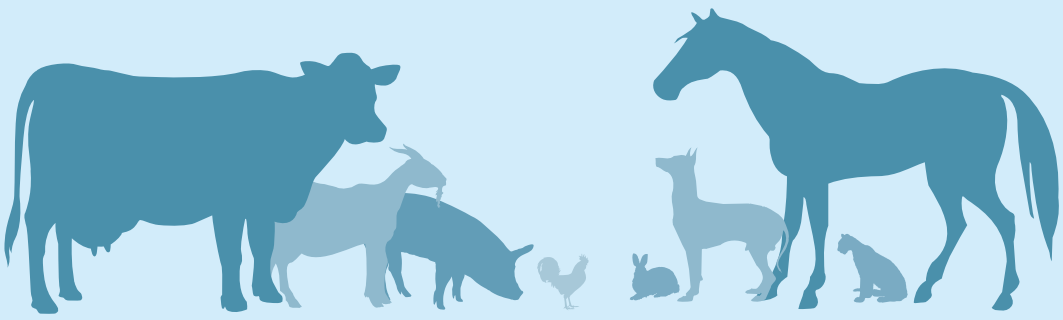
สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ปีที่ 12 ฉบับที่ 1
มกราคม - มิถุนายน 2560

Volume 12 Number 1
January - June 2017



Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology
www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm
ISSN : 1905-7571

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม – มิถุนายน 2560

Volume 12 No. 1 January – June 2017

ISSN: 1905-7571

www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ได้จัดทำวารสารทางวิชาการขึ้นด้วยวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิชาการ รวมถึงกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสาขาสัตวแพทยศาสตร์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้อง ส่งเสริมความสัมพันธ์อันดีระหว่างนักวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิชาชีพสัตวแพทย์ สัตวบาล และเพื่อเผยแพร่เกียรติคุณของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สำนักงาน: **คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร**
140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

โทร: 0-2988-3655
โทรสาร: 0-2988-4040

กำหนดตีพิมพ์: ปีละ 2 ฉบับ **ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม – มิถุนายน**
ฉบับที่ 2 เดือน กรกฎาคม – ธันวาคม

ค่าสมาชิก:

1 ปี	**140**	**บาท**
2 ปี	**280**	**บาท**
3 ปี	**420**	**บาท**
ตลอดชีพ	**1,000**	**บาท**
ราคาฉบับละ	**70**	**บาท**

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

คณะที่ปรึกษา / Advisory Committee

อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — President of Mahanakorn University of Technology

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Dean of Faculty of Veterinary Medicine

รองคณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Associate Dean of Faculty of Veterinary Medicine

บรรณาธิการ / Editor

ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย — Assist.Prof.Dr.Jamlong Mitchaothai
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

ผู้ช่วยบรรณาธิการ / Assistant Editor

ผศ.รัชกฤช เลิศภัทรโกมล — Assist.Prof.Rachakris Lertpatarakomol
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

กองบรรณาธิการ / Editorial Board

ผศ.สพ.ญ.ดร.จิตรบรรจง เวียงเจริญ — Assist.Prof.Dr.Jitbanjong Wiengcharoen
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.ธนากร พจน์ประสาท — Thanakorn Pojprasath
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

สพ.ญ.ภควดี คำพลงาม — Pakawadee Kumpolngam
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น — Anusorn Jasancheun
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.เกียรติชัย โรจนมงคล — Kiatchai Rojanamongkol
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.น.สพ.อดิศร ยะวงศา
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ผศ.น.สพ.ดร.สรรเพชญ อังกิติตระกูล
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

น.สพ.ดร.วีรพงศ์ ตั้งจิตเจริญ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผศ.ดร.เฉลิมพล เยื้องกลาง
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
วิทยาเขตสกลนคร

Prof.Dr.Kazuyoshi Taya
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Prof.Dr.Kazuyuki Taniguchi
Faculty of Agriculture,
Iwate University

Prof.Dr.Anton C. Beynen
Faculty of Natural Resources,
Rajamangala University of Technology-Isan,
Sakon Nakhon campus

Assoc.Prof.Dr.Nantarika Chansue
Faculty of Veterinary Medicine
Chulalongkorn University

Assist.Prof.Adisorn Yawongsa
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University, Kamphaengsaen campus

Assist.Prof.Dr.Sunpetch Angkittitrakul
Faculty of Veterinary Medicine
Khon Kaen University

Dr.Weerapongse Tangjitjaroen
Faculty of Veterinary Medicine
Chiangmai University

Assist.Prof.Dr.Chalermpon Yuangklang
Faculty of Natural Resources
Rajamangala University of Technology Isan,
Sakon Nakhon Campus

Prof.Dr.Kazuaki Takehara
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Assoc.Prof.Dr.Kazumi Taniguchi
School of Veterinary Medicine,
Kitasato University

ฝ่ายทะเบียนวารสาร / JMVM Member Registration

จุฬาภา สอนกลิ่น
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สพ.ญ.สุวริน ภาวสุทธิไพศิฐ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Chulabha Sonklein
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

Suvarin Pavasutthipaisit
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

ฝ่ายจัดการเว็บไซต์ / JMVM Website Administrator

ฟารีส ชื่นภักดี
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Faris Cheunpakdee
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

ผู้ทรงคุณวุฒิประจำฉบับ / Issue Reviewers

สพ.ญ.ดร.สุรีรัตน์ หนูมี
ผศ.น.สพ.ดร.ชนาธิป ธรรมการ
ผศ.น.สพ.ดร.วิศณุ บุญญาวิวัฒน์
สพ.ญ.ฐนิดา เหตระกูล
ผศ.น.สพ.ดร.สำราญ บรรณจิรกุล
น.สพ.ดร.สิทธิชน รัตนจันทร์
ผศ.ดร.ศศิพันธ์ วงศ์สุทธาวาส
พิเชษฐ ศรีบุญยงค์

บทบรรณาธิการ

สวัสดีผู้อ่านทุกท่าน

วารสารสัตวแพทย์มหานครสารย่างเข้าสู่ปีที่ 12 แล้ว โดยฉบับนี้เป็นปีที่ 12 ฉบับที่ 1 ซึ่งทางกองบรรณาธิการวารสารได้พยายามมุ่งมั่นพัฒนาวารสารให้คุณภาพสูงยิ่งขึ้นตามลำดับ ซึ่งที่ผ่านมาทางศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (TCI) โดยร่วมมือกับศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC) ได้จัดทำระบบตรวจสอบรูปแบบบทความสำหรับวารสารใน TCI (TCI Format Checker) ขึ้น เพื่อตรวจสอบรูปแบบบทความของวารสารว่าสามารถสกัดข้อมูลออกมาได้ถูกต้องและครบถ้วนแล้วหรือไม่ หากการสกัดเป็นไปโดยสมบูรณ์ จะส่งผลประโยชน์ให้สามารถบันทึกข้อมูลเข้าสู่ฐานข้อมูล TCI โดยไม่ผ่านการพิมพ์จากคน โดยรูปแบบบทความของวารสารสัตวแพทย์มหานครสารได้ผ่านการพิจารณาดังกล่าวข้างต้น

วารสารฉบับนี้ยังคงมีบทความที่น่าสนใจหลากหลายเรื่อง ซึ่งทางกระผมและกองบรรณาธิการของวารสารหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ท่านผู้อ่านทุกท่านจะได้รับความรู้ที่นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

สุดท้ายนี้กระผมและกองบรรณาธิการ ขออาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัยอำนวยพรให้ท่านผู้อ่านทุกท่านจงประสบแต่ความสุข ความเจริญ ความก้าวหน้าในหน้าที่การงาน มีสุขภาพกายและใจแข็งแรง และมีครอบครัวที่อบอุ่น

จำลอง มิตรชาวไทย

บรรณาธิการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม – มิถุนายน 2560

ISSN: 1905 – 7571 **www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm**

สารบัญ

บทความวิจัย

ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน รัชกฤช เลิศภัทรโกมล ปฏิภาณ ใจเป็ง และกรกมล ปดิฐพร 1

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อเชื้อไวรัสต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อในไก่เนื้อที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับสูงภายหลังการได้รับวัคซีนชนิดไวรัสเชื้อเป็น ชนิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูน และชนิดดีเอ็นเอสายผสม

ศักดิ์ชัย เรือนเพชร กรกมล ปดิฐพร และจำลอง มิตรชาวไทย 11

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในปูทะเล *(Scylla sp.)*

ภัทราวดี ศรีมีเทียน จิติมา สุวรรณมาลา และสุริยัน ธัญกิจจานุกิจ 19

บทความวิชาการ

โรค Koi sleepy disease (KSD)

สำราญ บรรณจิรกุล 29

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

Volume 12 No. 1 January – June 2017

ISSN: 1905 – 7571 www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

Contents

Research article

Effect of Nucleotides Supplementation on Growth Performance, Humoral Immunity, and Intestinal Morphological Structure of Broiler Chickens

Tassanee Trairatapiwan, Rachakris Lertpatarakomol, Patiparn Jaipeng and Kornkamon Paditporn 1

Humoral Immune Response against Infectious Bursal Disease Using Live Attenuated, Live Immune Complex and Recombinant Vaccines in Broilers with High Maternal Derived Antibody Level

Sakchai Ruenphet, Kornkamon Paditporn and Jamlong Mitchaothai 11

Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* in Mud Crab (*Scylla* sp.)

Pattarawadee Srimeetian, Jitima Suwanmala and Suriyan Tunkijjanukij 19

Review article

Koi sleepy disease (KSD)

Sumrarn Bunnajirakul 29

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วัตถุประสงค์และขอบเขตของเนื้อหา (Aim and Scope)

สัตวแพทย์มหานครสารเป็นวารสารทางวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร จัดทำขึ้นเพื่อเผยแพร่ผลงานการค้นคว้าวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับสัตวแพทยศาสตร์ สัตวศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสัตว์ โดยเนื้อหาจะครอบคลุมตั้งแต่ระดับโมเลกุลและเซลล์ วิทยาศาสตร์พื้นฐาน ชีววิทยาของสัตว์ พฤติกรรมสัตว์ พืชอาหารสัตว์ วิทยาศาสตร์การผลิตสัตว์ วิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ (พื้นฐาน พรีคลินิก และคลินิก) ระบาดวิทยาในสัตว์ สัตวแพทยสาธารณสุข และวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ตลอดจนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแขนงอื่นๆ ที่มีโอกาสในการพัฒนาและ/หรือประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ได้

คำแนะนำสำหรับการเตรียมบทความ

กองบรรณาธิการวารสาร สัตวแพทย์มหานครสาร ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ให้ความสนใจ และกรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการพิจารณา กองบรรณาธิการมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำส่งลงตีพิมพ์

1.1 บทความวิจัย (Research article หรือ Original article) เป็นงานค้นคว้าทดลอง หรืองานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและ/หรือต่างประเทศ

1.2 บทความวิจัยขนาดสั้น (Short communication) เป็นรายงานผลการวิจัย หรือผลงานทดลองทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เพื่อการเผยแพร่โดยสังเขป หรือเพื่อการนำเสนอประเด็นที่ค้นพบใหม่โดยเผยแพร่เฉพาะส่วนสำคัญอย่างกระชับ

1.3 รายงานสัตว์ป่วย (Case report) เป็นรายงานที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อนและเกี่ยวข้องกับโรคหรือปัญหาที่พบในสัตว์ ซึ่งทางกองบรรณาธิการพิจารณาเห็นประโยชน์ต่อทางวิชาการสัตวแพทย์

1.4 บทความวิชาการ (Review article) เป็นบทความหรือย่อเอกสารที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการทางสัตวแพทย์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้องทุกสาขา โดยการรวบรวมและเรียบเรียงจากเอกสารทางวิชาการ

1.5 บทความปกิณกะ (Miscellany article) เป็นบทความที่เกี่ยวกับการให้ข้อมูลทางวิชาการสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น ปริศนาสัตว์ป่วย ปริศนาเซลล์วิทยาวินิจฉัย

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะส่งมาลงพิมพ์ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างพิจารณาเพื่อลงในหนังสือหรือวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับพิมพ์เป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ด้วยอักษร Browallia new 16 บนกระดาษขาวเอ 4 เว้นขอบกระดาษด้านซ้าย และด้านบน 1.5 นิ้ว ด้านขวาล่าง และด้านล่าง 1 นิ้ว โดยความยาวของเรื่องพร้อมตารางและภาพประกอบรวมแล้วไม่เกิน 12 หน้า และให้ใส่หมายเลขหน้าตามลำดับ โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word (Window 98 หรือเวอร์ชั่นที่สูงกว่า)

2.3 หากต้นฉบับที่จะส่งมีรูปภาพประกอบด้วย ให้แทรกรูปภาพดังกล่าวในตำแหน่งที่เหมาะสมในต้นฉบับ และ Save ไฟล์ต้นฉบับของรูปภาพที่มีความละเอียดสูงลงในแผ่นซีดีข้อมูลแยกจากไฟล์ต้นฉบับ โดยตั้งชื่อไฟล์ของรูปภาพให้สามารถสอบทวนได้ว่าเป็นรูปภาพใดในต้นฉบับ

2.4 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ ในกรณีที่ไม่ผ่านการพิจารณาแต่จะแจ้งให้ทราบ

3. การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สอดคล้อง สื่อความหมายได้ดีกับเนื้อหาในเรื่อง

3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมเขียน (Author and Co-authors) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก และกรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรือโทรสาร และ E-mail ของผู้รับผิดชอบ (Corresponding author) เพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ โดยให้ระบุอยู่ใต้คำสำคัญ

3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด ในกรณีที่ต้นฉบับภาษาไทยจะต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษ และต้นฉบับภาษาอังกฤษต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาไทย บทคัดย่อให้เขียนไว้หน้าสุดท้ายของเรื่องเป็นหน้าหนึ่งต่างหาก

3.4 คำสำคัญ (Keywords) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ ระบุอยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมา และควรมีการตรวจเอกสาร (Literature review) ประกอบด้วย รวมทั้งอธิบายถึงจุดประสงค์ของการทดลอง

3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและเคยมีผู้ตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำควรเขียนในลักษณะอ้างอิง และอธิบายเฉพาะส่วนที่ดัดแปลงหรือเพิ่มเติม พร้อมทั้งวิธีวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วย

3.7 ผลการทดลอง (Results) การรายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยายควรให้ละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตารางควรให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าหนังสือ ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาวดำหรือสไลด์ หากต้องการให้ตีพิมพ์ภาพสี ทางคณะผู้จัดทำจะพิจารณาถึงความเหมาะสมและค่าใช้จ่าย หากมีหลายรูปต้องเรียงลำดับก่อนหลังพร้อมทั้งมีเครื่องหมายกำหนดบอกด้านบนของรูปด้วยดินสอ และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูป คำอธิบายประกอบรูปภาพและตาราง รวมทั้งองค์ประกอบในตารางและรูปภาพให้ใช้เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด โดยรวบรวมและเรียงตามลำดับให้สอดคล้องกับหมายเลขของรูปภาพและตารางที่นำเสนอ ควรระบุความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ ในกรณีที่กำหนดเครื่องหมายแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ให้กำกับ *P*-value ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ทั้งนี้การกล่าวถึงค่า *P*-value ในเนื้อหาของบทความให้ใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เอียง เช่น *P*-value, $P \leq 0.05$ และ $P > 0.05$

3.8 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงาน

การวิจารณ์ผลควรเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.9 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่ก็ได้ หากเป็นบทความ การตรวจเอกสาร หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจมากขึ้น

3.10 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือในการสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัย

3.11 เอกสารอ้างอิง (References)

4. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิงดังนี้

- **การอ้างอิงให้เขียนเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด** ทั้งการอ้างอิงในเนื้อหาบทความ และในส่วนของเอกสารอ้างอิงด้านท้ายบทความ โดยหากเนื้อหาของเอกสารที่นำมาใช้อ้างอิงเขียนเป็นภาษาอื่น ที่ไม่ใช่ภาษาอังกฤษ ให้เขียนอ้างอิงเป็นภาษาอังกฤษ พร้อมระบุภาษาที่ใช้เขียนในบทความนั้นๆ ไว้ในวงเล็บด้านท้ายสุดของรายการเอกสารอ้างอิงนั้นๆ ตัวอย่างเช่น

Mitchaothai, J., Wiengchareon, J., Chaiworaporn, J., Srenanuan, P. and Yuangklang, C. 2005. Balantidiasis in growing pigs: A case report. *KKU. Vet. Journal*. Vol.15 No.1: 166-174. (in Thai)

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากบทความภาษาไทย :

จำลอง มิตรชาวไทย จิตรบรรจง เวียงเจริญ จุฑามาศ ชัยวรภร ไพวัลย์ ศรีนานวล และ เฉลิมพล เยื้องกลาง. 2548. ภาวะการติดเชื้อ Balantidium ในสุกรรุ่น: รายงานสัตว์ป่วย. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 15 (1): 166-174. }

- กรณีอ้างอิงจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่นให้ใช้ คำว่า อ้างถึงโดย (Cited by)

- ผู้รายงานเอกสารทั้งที่เป็นคนไทยและชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยคให้ใช้ Mitchaothai *et al.* (2005), Tomato and Danny (2006), Taylor *et al*. (2006) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางและท้ายประโยคให้ใช้ (Mitchaothai *et al.*, 2005), (Tomato and Danny, 2006), (Taylor *et al*., 2006) ตามลำดับ โดยหากในประโยคหรือส่วนของประโยคที่มีเอกสารอ้างอึงมากกว่าหนึ่งเอกสารให้คั่นระหว่าเอกสารด้วยเครื่องหมาย “ ; ”)

- อ้างถึงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อน (Personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

- การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายบทความ ให้เขียนเรียงลำดับพยัญชนะภาษาอังกฤษของชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง (หากมีผู้แต่งมากกว่าหนึ่งคนให้คั่นระหว่างผู้แต่งด้วยเครื่องหมาย “ , ”) ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Everts, H., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., Hovenier, R. and Beynen, A.C. 2008. Digestion and deposition of individual fatty acids in growing-finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 92 (4): 502-510.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา ครั้งที่พิมพ์และชื่อบรรณาธิการ (หากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ และจำนวนหน้าทั้งหมด ดังตัวอย่าง คือ

Mamom, T. 2008. Basic Veterinary Histopathology and Practice. 1st ed. Mahanakorn University of Technology publishing. Bangkok. 227 p.

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากหนังสือภาษาไทย :
ทนงศักดิ์ มะมม. 2551. ตำราจุลพยาธิวิทยาขั้นพื้นฐานทางสัตวแพทย์และบทปฏิบัติการ (Basic Veterinary Histopathology and Practice). พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร. กรุงเทพมหานคร. 227 หน้า. }

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากการประชุมวิชาการ (Conference proceedings) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Lertpatarakomol, R., Mitchaothai, J., Trairatapiwan, T. and Lukkananukool, A. 2010. Preliminary survey on intestinal parasite infestation in natural Thai indigenous beef cattle from Kanchanaburi province at a slaughterhouse. Proceedings of the 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP), Pingtung, Taiwan, ROC, 23-27 August 2010: 468.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากอินเตอร์เน็ท (Internet) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่เผยแพร่ทางอินเตอร์เน็ท (สืบค้นข้อมูลเมื่อ วัน-เดือน-ปี) ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., and Beynen, A.C. 2005 (cited 21 December 2010). Mathematical modelling between Pork Colour and Pork and Carcass Qualities in commercial finishing pigs. Available from: http:// www.scisoc.or.th/stt/31/ sec_f/paper/stt31_F0043.pdf.

5. การพิจารณาบทความ

บทความทุกบทความที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสาร เป็นบทความที่ผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญ (Referees) สำหรับแต่ละสาขาอย่างน้อย 2 ท่านต่อบทความ ยกเว้นบทความปกิณกะผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญอย่างน้อย 1 ท่าน

6. การส่งต้นฉบับบทความ

เอกสารที่ต้องส่ง คือ บทความต้นฉบับจริง ที่จัดเตรียมตามคำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วิธีการส่งบทความ คือ ส่งผ่านระบบออนไลน์ ได้ที่ http://www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

7. ชื่อ-ที่อยู่ สำหรับติดต่อวารสาร

บรรณาธิการ สัตวแพทย์มหานครสาร
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
140 ถ. เชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530
โทร. 0-2988-3655 ต่อ 5102-3, โทรสาร 0-2988-4040

หมายเหตุ

1. ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรเอียง
2. ไม่มีค่าเรื่องลงพิมพ์และผู้เขียนต้องรับผิดชอบค่าพิมพ์ภาพสี หากเป็นความต้องการของผู้เขียน และผู้เขียนผู้รับผิดชอบทุกเรื่องจะได้รับสำเนาพิมพ์
3. ความคิดเห็นใดๆ ที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสารในแต่ละฉบับเป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นที่กองบรรณาธิการของวารสารฯ และผู้ทรงคุณวุฒิต้องเห็นด้วยเสมอไป

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน[1,#] รัชกฤช เลิศภัทรโกมล[1] ปฏิภาณ ใจเป็ง[2] และกรกมล ปดิฐพร[2]

[1]สาขาวิชาสัตวบาลและพื้นฐานวิชาชีพคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานครกรุงเทพมหานคร 10530

[2]สาขาวิชาคลินิกคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานครกรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: การเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารมีส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหาร และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์อายุน้อยได้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารที่ระดับต่างๆ ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตของไก่เนื้อการทดลองนี้ใช้ไก่เนื้อคละเพศ อายุ 1 วัน (Ross 308) จำนวน 180 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำ จำนวนซ้ำละ 15 ตัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (CRD) กลุ่มทดลองแบ่งออกเป็น กลุ่มที่ไม่เสริมนิวคลีโอไทด์กลุ่มที่เสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารที่ระดับ 1.5% ในช่วงอายุ 7 วันแรกและกลุ่มที่เสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารที่ระดับ 1.5% ในช่วงอายุ 14 วันแรกอาหารทดลองแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ อาหารสำหรับไก่เล็ก (1-21 วัน) และอาหารสำหรับไก่ใหญ่ (21-42 วัน) ผลการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 42 วัน การเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มปริมาณอาหารที่กินประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว และระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล อย่างไรก็ดีพบว่าที่อายุ 28 วัน ไก่เนื้อในกลุ่มที่เสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารมีความสูงของวิลไลสูงกว่าไก่เนื้อในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากผลการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าการเสริมนิวคลีโอไทด์ในอาหารที่ระดับ 1.5% มีแนวโน้มช่วยปรับปรุงสมรรถภาพการเจริญเติบโตและลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ

คำสำคัญ: นิวคลีโอไทด์ สมรรถภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน จุลกายวิภาคของลำไส้เล็ก ไก่เนื้อ

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(1): 1-10.

E-mail address: tas_tt@yahoo.com

Effect of Nucleotides Supplementation on Growth Performance, Humoral Immunity, and Intestinal Morphological Structure of Broiler Chickens

Tassanee Trairatapiwan[1,#], Rachakris Lertpatarakomol[1], Patiparn Jaipeng[2] and Kornkamon Paditporn[2]

[1]Department of Animal Science & Veterinary Basic Science, [2]Department of Clinical Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

Abstract: Feeding nucleotides in young animals is believed to have benefit effects such as improving growth rate, enhancing gut health and immune system. Thus, the aim of this present study was to evaluate the effect of nucleotides supplementation in diets at difference periods on growth performance of broiler chickens. A total of 180 Ross 308 (mixed sex), one-day-old broiler chickens were randomly distributed in completely randomized experimental design (CRD) into 3 treatments with 4 replicates of 15 birds in each. The experimental treatments consisted of: birds fed control diet, birds fed 1.5% nucleotides for the first 7 days of age and birds fed 1.5% nucleotides for the first 14 days of age. The dietary period was divided in two phases: starter diet (1 to 21 days) and grower diet (21 to 42 days). The result showed that, at 42 days of ages, there were no significantly difference (P>0.05) in body weight gain, feed intake, feed conversion ratio and HA-HI titer of broiler serum antibodies specific to ND virus between treatments. However, broilers fed with nucleotides had a significant higher (P<0.05) villus height than those fed with control diet. In conclusion, the current study demonstrated that feeding broiler chickens with 1.5%nucleotides in the diet tended to improve growth performance and intestinal morphology of broiler chickens.

Keywords: Nucleotides, Growth performance, Humoral immunity, Intestinal morphology, Broiler

[#]Corresponding author

E-mail address: tas_tt@yahoo.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(1): 1-10.

Introduction

Antibiotic growth promoters (AGP) in animal diets have been banned in the recent years due to the public concern over possible antibiotic residual effects and the development of drug resistant bacteria

(Butaye *et al*., 2003). Animal fed AGP free diets are more susceptible to infections caused by pathogens that cause enteric diseases, which may compromise nutrient absorption, growth performance and immune systems (Chiofalo *et al*., 2011; Pelicia *et al*., 2010). Nutritional strategies are being developed to overcome these problems. One possibility is supplementing young animal with bioactive components such as nucleotides (Sauer *et al*., 2009).

Nucleotides are low-molecular-weight intracellular compounds. They are composed of a nitrogenous base (pyrimidine and purine) linked to a pentose (ribose or deoxyribose) sugar (nucleoside) to which at least one, two or three phosphate groups are attached. The pyrimidine consists of cytosine (C), uridine (U) or thymine (T). The purine consists of adenine (A), guanine (G) and hypoxanthine (I) (Alberts *et al*., 2008; Sauer *et al*., 2009). Nucleotides participate in many intracellular biochemical processes as carries of activated metabolites for biosynthesis, as structural moieties of co-enzymes, and as metabolic regulators and signal molecules (Mathews and van Holde, 1990). The major nucleotides include adenosine 5′monophosphate (AMP), cytosine 5′monophosphate (CMP), guanosine 5′monophosphate (GMP), inosine 5′monophosphate (IMP) and uridine 5′monophosphate (UMP) (Mateo *et al*., 2004).

Nucleotides present in colostrum and milk, and the concentration of most nucleotides change during the lactation period (Mateo *et al*., 2004; Sauer *et al*., 2009). Particularly, IMP is mainly found in food with high protein content such as organ meat, poultry, and seafood. Yeast protein sources (baker's or brewer's yeast and yeast extract) are ingredients that also a relatively high concentration of nucleotides (Sauer *et al*., 2009).

Nucleotides are substances that are synthesized endogenously. They have important effects on growth and development of cells which have rapid turnover rate such as in the immune or gastrointestinal system (Sauer *et al*., 2009). However, under certain circumstances (e.g. rapid growth, deficient diet, stress and immune suppression) exogenous nucleotides may be semi-essential, optimizing the function of the immune system and energy utilization when the endogenous supply may limit the synthesis of nucleotides (Jung and Batal, 2012; Sauer *et al*., 2009; Sauer *et al*., 2012).

Young birds have a gastrointestinal tract with a limited capacity (Leeson and Summers, 2005; Kleyn, 2013). Thus, feeding nucleotides in young animals is believed to have benefit effects such as improving growth rate, enhancing gut health and immune system

(Pelícia *et al*., 2010; Chiofalo *et al*., 2011). The objective of this present study is to evaluate the effect of nucleotides supplementation at difference periods on growth performance, humoral immunity and intestinal morphological structure of broiler chickens.

Materials and Methods

Animals and experimental diets

A total of 180 Ross 308 (mixed sex), one-day-old broiler chickens (average body weight 48.43 ± 0.81 g) were randomly distributed in completely randomized experimental design (CRD) into 3 treatments with 4 replicates of 15 birds in each, totaling 60 birds per treatment. The experimental treatments consisted of: basal diet (control), birds fed 1.5% nucleotides (Hilyses®) in basal diet for the first 7 days of age (1.5% N; 7 d), and birds fed 1.5% (Hilyses®) nucleotides in basal diet for the first 14 days of age (1.5% N; 14 d). The dietary period was divided in two phases: starter (1-21 days) and grower (21-42 days) which are 22% CP; 3,100 Kcal ME/kg and 20% CP; 3,150 Kcal ME/kg, respectively. Feeds based on corn and soybean meal, and were formulated to meet the requirements according to the (NRC, 1994). All diets were pelleted with steam; starter diet was fed as crumbles.

All birds were given *ad libitum* access to feed and water. Routine medication, vaccination and husbandry practices were administered. Growth performance data were collected and analyzed for accumulated periods of 1 to 21, 21 to 42, and 1 to 42 days of age. The body weight (BW), body weight gain (BWG), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) were analyzed.

Quantitative assessment of humoral immunity

Blood samples were collected from the wing veins of 2 birds selected randomly from each replication of the following ages: 14, 28 and 42 days. Serum was separated from the blood sample and stored individually for each bird at -20°C to allow for analysis at the same time. Haemagglutination-Haemagglutination inhibition (HA-HI) titers of serum antibodies specific to the Newcastle disease (ND) virus were quantities in the serum samples (OIE Terrestrial Manual, 2012).

Examination of intestinal morphological structure

At 14, 28 and 42 days of age, two birds of each replication were randomly dissected to collect small intestinal samples. All samples were fixed in 10% formalin. After fixation, the samples were dehydrated by increasing concentration of alcohol and embedded in paraffin. The middle of jejunum samples were sectioned horizontally in 2 cm

length (Hu and Guo, 2000). The villus height and crypt depth were determined in cross section using inverted microscope by using image-analysis software. The measurements were examined on eight villi and eight crypts for each segment. The villus height-to-crypt depth ratios were calculated.

Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA using the General Linear Models (GLM) procedure of the statistical software program. The means were separated by means of the Least Significant Difference (LSD) test when a significant ($P \leq 0.05$) treatment was observed.

Results and Discussion

Growth performance

The effect of nucleotides (Hilyses®) supplementation at different feeding periods on growth performance of broilers was shown in Table 1. There was no significant different ($P>0.05$) among dietary treatments on growth performance parameters analyzed at 1-21, 21-42 and 1-42 days of age. Previous studies showed regarding results of nucleotides supplementation in broilers. (Pelicia *et al*., 2010) reported that no effect on performance parameters of broilers fed diet supplemented with 0.00%, 0.00% + AGP, 0.04%, 0.05%, 0.06% and 0.07% nucleotides. Whereas (Rutz *et al*., 2004) observed in broilers fed 2% NuPro® (yeast extract) from 1-7 days and 38-42 days of age resulted in improvement growth performance. Furthermore, (Wang *et al*., 2009) reported that birds fed diets with 2% NuPro® for the first 7 days or for the first 7 days followed by feeding from 35-42 days had significantly lower feed conversion than those fed the control.

The present study, however, supplementation of 1.5%nucleotides for the first 7 and 14 days of age helped to slightly improve growth performance of broilers. (Pelicia *et al*., 2010) suggested that yeast extract contains other nutrients in addition to nucleotides, such as amino acids, vitamins and minerals, which may contribute to increase growth performance.

Humoral Immunity

The effect of nucleotides supplementation at different feeding periods on humoral immunity of broilers was shown in Table 2.There was no significant different ($P>0.05$) among dietary treatments on HA-HI titer of broiler serum antibodies specific to ND virus analyzed at day 14, 28 and 42 of age. Various studies investigated the effect of supplemented nucleotides on the immune function of several species such as pigs and infants. The study of (Sauer *et al*., 2012) indicated that plasma IgA concentrations of newly weaned pigs increased with age and were greater in the nucleotide ($P<0.05$)

Table 1 Mean of body weight (BW), body weight gain (BWG), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) of broiler in periods of 1 to 21, 21 to 42, and 1 to 42 days of age.

Parameter	Group			Pool	P-value
	Control	1.5% N; 7 d	1.5% N; 14 d	SEM	
1 to 21 days of age					
Initial weight, g	48.50	48.34	48.46	0.23	0.97
BW, g/bird	901.31	916.48	960.85	13.05	0.15
BWG, g/bird	852.81	868.14	912.39	12.09	0.16
FI, g/bird	1,305.97	1,329.83	1,295.35	18.09	0.77
FCR	1.53	1.53	1.42	0.03	0.17
21 to 42 days of age					
BW, g/bird	2,576.73	2,721.18	2,859.88	58.93	0.14
BWG, g/bird	1,675.42	1,804.69	1,899.03	55.61	0.28
FI, g/bird	3,389.42	3,465.59	3,580.62	47.74	0.28
FCR	2.04	1.92	1.89	0.04	0.45
1 to 42 days of age					
BW, g/bird	2,576.73	2,721.18	2,859.88	58.93	0.14
BWG, g/bird	2,528.18	2,672.84	2,811.42	58.92	0.14
FI, g/bird	4,695.39	4,795.42	4,875.97	52.92	0.42
FCR	1.86	1.80	1.73	0.03	0.29

compared with the control group, but there were no treatment differences in plasma IgG and IgM. Greater plasma IgA concentrations indicate that adding nucleotides in the weaning diet supported humoral immunity. In contrast, the study of (Hawkes *et al*., 2006), nucleotides supplementation did not influence the growth of formula fed infants or any markers of immunity measured at 7 weeks of age. In that way, however, (Kulkarni *et al*., 1994) reported that nucleotides were not needed for normal growth and development, but there need for nucleotides in the response to immunological challenges.

Intestinal Morphological Structure

The effect of nucleotides supplementation at different feeding periods on intestinal morphological structure of broilers was shown in Table 3. There was no significant different ($P>0.05$) among dietary treatments on intestinal morphology structure at day 14

Table 2 Mean HA-HI titers (log^2) of broiler$^{\Psi}$ serum antibodies specific to ND virus in days 14, 28 and 42.

Days	Group			Pool	P-value
	Control	1.5% N; 7 d	1.5% N; 14 d	SEM	
14	3.50	2.75	2.83	6.29	0.10
28	7.08	6.75	7.08	3.42	0.66
42	7.50	7.46	7.92	1.23	0.09

$^{\Psi}$Broilers were administered killed ND and live ND & IB at day 14 of age.

Table 3 Mean of villus height, crypt depth and villus height-to-crypt depth (V : C) ratios of broiler in days 14, 28 and 42 of age.

Parameter	Group			Pool	P-value
	Control	1.5% N; 7 d	1.5% N; 14 d	SEM	
Day 14 of age					
Villus (µm)	499.60	520.76	547.51	16.78	0.51
Crypt (µm)	58.57	66.93	67.72	2.93	0.38
V : C ratio	9.36	9.35	8.51	0.61	0.82
Day 28 of age					
Villus (µm)	1,090.17^{a}	1,307.85^{b}	1,473.01^{b}	51.13	<0.01
Crypt (µm)	198.52	201.66	192.81	8.00	0.91
V : C ratio	5.92	7.15	8.07	0.38	0.06
Day 42 of age					
Villus (µm)	1,743.50	1,931.76	1,881.74	52.47	0.32
Crypt (µm)	233.95	255.85	259.77	8.67	0.44
V : C ratio	7.98	7.76	7.35	0.29	0.69

^{a,b}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$)

and 42 of age. At day 21 of age, broilers fed diet with 1.5%nucleotides for the first 7 and 14 days of age had significantly higher ($P<0.05$) villus height than those fed control diet. Whereas, no significant different ($P>0.05$) on crypt depth and villus height-to-crypt depth ratios between the treatments. Similarly result, (Sauer *et al*., 2012) observed that no differences in gut morphology of newly weaned pigs fed diet with and without mixture of nucleotides. In the

present study, supplementation of nucleotides in the diet at 21 day of age showed beneficial effects. It might be due to the depressed conditions such as stress and climate change may enhance the effect of nucleotide on intestinal morphology.

Several studies reviewed of how nucleotides stimulate development of broiler gastrointestinal tract. Within a few hours post-hatch, villi height and area increase rapidly. Development is complete at 6-8 days in duodenum and 10 days in the jejunum and ileum. Crypts increase in number and size, proliferating rapidly during the first day post-hatch. Alterations in the enterocytes, villi and crypts are influenced by diet (Geyra *et al*., 2001; Rutz *et al*., 2007; Uni *et al*., 1998). Feeding nucleotides stimulate the development of cell and protein synthesis involves digestion and absorption of the animals. (Rutz *et al*., 2007) reported that the synthesis of rRNA in the crypts of jejunum dependent on dietary pyrimidine.

Conclusion

In summary, the current study demonstrated that supplementing the diet of broiler chickens with 1.5% nucleotides resulted in improve growth performance and intestinal morphology, but did not influence broiler humoral immunity.

Acknowledgement

The authors would like to thanks Mahanakorn University of Technology and personnel involved in this study for facilitating and assisting with the collection of data and Behn Meyer Co., Ltd for financial and product support.

References

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.. 2008. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Butaye, P., Devriese, L.A. and Haesebrouck, F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. 16(2): 175–188.

Chiofalo, B., Presti, V.L., Savoini, G., D'Alessandro, E., Chiofalo , V. and Liotta., L. 2011. Nucleotides in broiler chicken diet: effect on breast muscle quality. *Czech J. Food Sci.* 29: 308-317.

Geyra, A., Uni, Z. and Sklan, D. 2001. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poult. Sci.* 80: 776-782.

Hawkes, J.S., Gibson, R.A., Roberton, D. and Makrides, M. 2006. Effect of dietary nucleotide supplementation on growth

and immune function in term infants: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60: 254-264.

Hu, Z. and Guo, Y. 2007. Effects of dietary Sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in Chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 240 - 249.

Jung, B. and Batal, A.B. 2012. Effect of dietary nucleotide supplementation on performance and development of the gastrointestinal tract of broilers. *Br. Poult. Sci.* 53: 98-105.

Kulkarni, A.D., Rudolph, F.B. and van Buren, C.T. 1994. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. *J. Nutr.* 124: 1442S-1446S.

Mateo, C.D., Peters, D.N. and Stein, H.H. 2004. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. *J. Anim. Sci.* 82: 1339-1342.

Mathews, C.K. and van Holde, K.E. 1990. Biochemistry. Redwood city, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press.

OIE Terrestrial Manual. 2012. Newcastle disease. [Online] Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf

Pelicia, V.C., Sartori, J.R., Zavarize, K.C., Pezzato, A.C., Stradiotti, A.C., Araujo, P.C., Mituo, M.A.O. and Madeira, L.A. 2010. Effect of nucleotides on broiler performance and carcass yield. *Braz. J. Poult. Sci.* 12: 31-34.

Rutz, F., Anciuti, M.A., Rech, J.L., Goncalves, F.M., Delgado, A.D., Rosa, E.R., Zauk, N., Ribeiro, C.L.G. and Da Silva, R.R. 2004. Performance and carcass traits of broilers fed diets containing yeast extract (NuPro®). *Proc. Aust. Poult. Symp.*, Sydney, NSW, Australia: 77-79.

Rutz, F., Xavier, E.G., Anciuti, M.A., Roll, V.F.B. and Rossi, P. 2007. The role of nucleotides in improving broiler prestarter diets: the Brazilian experience. Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 23rd Annual Symposium. The new energy crisis: food, feed or fuel? 2007 pp. 175-181.

Sauer, N., Bauer, E. and Mosenthin, R. 2009. Dietary nucleotides: potential contenders as feed additive for monogastrics? Proceedings of the 18th international scientific symposium on nutrition of domestic animals. Radenci, Slowenia.

Sauer, N., Eklund, M., Bauer, E., Gänzle, M.G., Field, C.J., Zijlstra, R.T. and Mosenthin, R. 2012. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 90: 3126-3134.

Uni, Z., Ganot, S. and Sklan, D. 1998. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult. Sci.* 77: 75-82.

Wang, Z., Cerrate, S., Coto, C., Sacakli, P., Yan, F., Costa, F.G.P. and Waldroup, P.W. 2009. Evaluation of Nupro® yeast product in diets for broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 8: 515-520.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อเชื้อไวรัสต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อในไก่เนื้อที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับสูงภายหลังการได้รับวัคซีนชนิดไวรัสเชื้อเป็น ชนิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูน และชนิดดีเอ็นเอสายผสม

ศักดิ์ชัย เรือนเพชร[1,#] กรกมล ปดิฐพร[2] และจำลอง มิตรชาวไทย[3]

[1]ภาควิชาภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา, [2]คลินิกสำหรับสัตว์ปีก, [3]คลินิกสำหรับสุกร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: การศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อเชื้อไวรัสต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อในไก่เนื้อที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับสูงลูกไก่อายุ 1 วันจำนวน 1,200 ตัวถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 300 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีนไวรัสต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ Winterfield 2512 โดยการผสมน้ำดื่มเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้รับวัคซีนชนิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูน (Live immune complex vaccine) และชนิดดีเอ็นเอสายผสม (recombinant vaccine) ตามลำดับโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังเมื่อไก่อายุ 1 วัน ทำการเจาะเก็บเลือดไก่ก่อนและหลังการทำวัคซีนทุกสัปดาห์เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการทดสอบพบว่าระดับภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับวัคซีน 1 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ใช้วัคซีนชนิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูนและวัคซีนชนิดดีเอ็นเอสายผสมมีระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ Winterfield 2512 ภายหลังที่ไก่ได้รับวัคซีน 3 สัปดาห์ แต่ระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูนและวัคซีนชนิดดีเอ็นเอสายผสมที่อายุ 5 สัปดาห์ (5 สัปดาห์หลังได้รับวัคซีน) นอกจากนี้อัตราส่วนของต่อมเบอร์ซ่าต่อน้ำหนักตัวไก่ที่อายุ 5 สัปดาห์ พบว่ามีค่าเท่ากับ1.30±0.49, 1.35±0.72, 1.32±0.54 และ 1.64±0.44 สำหรับกลุ่มที่ 1-4 ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติซึ่งแปลผลที่ได้ว่าวัคซีนต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาต่อมเบอร์ซ่าในไก่การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าวัคซีนต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อทั้ง 3 ชนิดมีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งไม่มีผลรบกวนต่อการพัฒนาต่อมเบอร์ซ่าในไก่ที่มีภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับสูง

คำสำคัญ: โรคต่อมเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อ วัคซีนชนิดสายพันธุ์ Winterfield 2512 วัคซีนชนิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูน วัคซีนชนิดดีเอ็นเอสายผสม

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: rsakchai@hotmail.com

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(1): 11-18.

Humoral Immune Response against Infectious Bursal Disease Using Live Attenuated, Live Immune Complex and Recombinant Vaccines in Broilers with High Maternal Derived Antibody Level

Sakchai Ruenphet[1,#], Kornkamon Paditporn[2] and Jamlong Mitchaothai[3]

[1]Immunology and Virology, [2]Clinic for Poultry, [3]Clinic for Swine, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong Chock, Bangkok 10530 Thailand.

Abstract: The aim of present study was to evaluate the immunological response of 3 difference Infectious bursal disease (IBD) vaccines in broiler chickens, even with high maternal derived antibody level. One thousand and two hundreds1-day-old broilers were divided into 4 groups. The chickens in the first group were unvaccinated with any IBD vaccine. The chickens in the second were vaccinated by the use of live attenuated vaccine Winterfield 2512 strain in drinking water at 2-week-old. The chickens in the third and fourth groups were vaccinated with live immune complex and recombinant vaccines by subcutaneous injection at 1-day-old, respectively. Chicken blood samples were collected at 1-day-old chick, once a week after vaccination and weekly until slaughtering. Subsequently, IBD antibody titer levels were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The chickens were vaccinated with both live immune complex-, as well as recombinant-vaccinated showed statistically significant high immune response compared with those in the unvaccinated group. However, all 5-week-old vaccinated chickens showed no difference of IBD antibody titer level. In addition, Bursa of Fabricius to body weight (B:BW) ratio at 5-week-old, were showed to be 1.30±0.49, 1.35±0.72 1.32±0.54 and 1.64±0.44 for the first to fourth group respectively, meaning that this parameter did not interfere with the Bursa of Fabricius developing after IBD vaccination. The present study indicated that all tested types of IBD vaccine generated significant responsiveness in term of humoral immunity and did not impair the Bursa of Fabricius development, even in the presence of high level of maternal derived antibody in broilers.

Keywords: Infectious bursal disease, Live attenuated vaccine, Live immune complex vaccine, Recombinant vaccine

[#]Corresponding author
J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(1): 11-18.
E-mail address: rsakchai@hotmail.com

Introduction

Gumboro disease or Infectious bursal disease (IBD), is a serious problem for the poultry industry, due to significant economic losses resulting from high mortality and immunosuppression, especially in young chickens. However, IBD virus is very resistant under environmental conditions, and as a result, the pathogens still persist in chicken houses. Therefore, controlling and prevention of this disease depend mainly on vaccination (Al-Natour *et al*., 2004).

Currently, the commercial vaccines can be classified into 3 groups, depending on the virulence of virus, namely mild, intermediate and intermediate-plus. The main problem of mild and intermediate vaccines concerns vanishing maternal derived antibodies (MDA) in young chicks, so these vaccines should be applied when MDA level became low (Tsukamoto *et al*., 1995) while re-vaccination in next 2 weeks is needed for optimal antibody protection against IBD infection. Nevertheless, several researchers reported that the intermediate-plus vaccine could be applied even during high MDA chickens (Haddad *et al*., 1997), because the vaccine virus could break through the MDA, and also stimulate the active immunity and enhance antibodies against the IBDV (Chansiripornchai and Wanasawaeng, 2009).

Nowadays, there are several technologies for IBD vaccines development, such as an immune complex vaccine to lessen the neutralizing effect between IBDV and MDA (Chansiripornchai and Sasipreeyajan, 2009; Haddad *et al*., 1997), including a genetically modified vaccine, especially regarding the VP2 gene of viral RNA (Chang *et al*., 2002) namely recombinant vaccine.

The objective of the present study was to evaluate the immunological response of difference 3 IBD vaccine types: live attenuated, live immune complex and recombinant vaccine, in commercial broiler chickens even when possessing high maternal derived antibody.

Materials and Methods

Chickens and feeding

One thousand and two hundred, 1-day-old mixed breed (Cobb 500 and Ross 308) of broiler chickens, were obtained from a commercial hatchery (Saraburi, Thailand). The chickens were fed *ad libitum* (Betagro, Bangkok, Thailand).

Vaccines

The commercial IBD vaccines representative for a live attenuated Winterfield 2512 strain, a live immune complex, and a recombinant vaccine which is turkey Herpesvirus expressing the VP2 gene of the IBDV, were used for the present study.

Experimental designs

One thousand and two hundred broilers, were divided into 4 groups of 300 each. The first group was not vaccinated with any IBD vaccine, being a control group. The second group was vaccinated with live attenuated vaccine by drinking water at 14-day-old. The third and fourth group, were vaccinated with live immune complex and recombinant vaccine by subcutaneous injection at 1-day-old, respectively. Thirty broilers in each group, were randomly selected for weighting and serum collection at 0, 1, 2, 3, 4 and 5-week-old. The collected sera were tested for IBD antibodies measuring using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit by ProFLOK® PLUS (Synbiotics Corp, USA) and then antibody titers were express as $\log_{10}$.

Bursa:bodyweight ratios

In each group, chicken and Bursa of Fabricius were weighted at 5-week-old for calculation of the bursa/body weight (B:BW) ratios for 10 chickens. The B:BW ratios were calculated by the Bursa of Fabricius weight(g) × 1,000 / body weight (g).

Statistical analysis

All data were entered into a spreadsheet program (Excel 2000; Microsoft Corporation) and transferred to Program R software. Data of different parameters were analyzed using analysis of variance (ANOVA) as repeated measurement with Turkey HSD's multiple range test. The difference between parameters was regarded as significant when the p value was less than 0.05.

Results

Table 1showed the mean and standard deviation of IBD antibody titers in the present study. At 1-day-old, the antibody titers of all chicken before dividing and vaccination, were detected at the high level of 4.23±0.05 $\log_{10}$. This result indicated that chickens received the passive immunity from breeding hens. Since 3-week-old, all 3 vaccinated groups, possessed statistically significantly (P<0.05) higher antibody level than the unvaccinated group while no difference was found among all of vaccinated group (Table 1).

Table 2 shows the body weight, Bursa of Fabricius weight and Bursa to body weight (B:BW) ratios at 5-week-old. All of vaccinated groups showed no difference in body weight and B:BW ratio, including in comparison with unvaccinated chickens.

Summary and Discussion

Generally, the MDA is of benefit against IBDV infection in chickens, especially during the first month of age (Al- Natour *et al*., 2004). The ELISA titer of the MDA was divided into 3

Table 1. Mean ± SD of IBD antibody titer (as log_{10}) in unvaccinated and vaccinated chickens

	Chicken age					
Group	0-wk	1-wk	2-wk	3-wk	4-wk	5-wk
Unvaccinated	4.23±0.05	4.23±0.03^{a}	4.16±0.08^{ab}	3.21±0.33^{b}	2.86±0.44^{c}	2.67±0.68^{b}
Live attenuated	4.23±0.05	4.23±0.03^{a}	4.16±0.08^{ab}	3.76±0.33^{a}	3.57±0.30^{a}	3.67±0.25^{a}
Live immune complex	4.23±0.05	4.17±0.05^{b}	4.10±0.18^{b}	3.69±0.69^{a}	3.28±0.58^{b}	3.70±0.35^{a}
Recombinant	4.23±0.05	4.17±0.09^{b}	4.20±0.05^{a}	3.90±0.24^{a}	3.64±0.26^{a}	3.88±0.20^{a}

^{a,b,c} Values within the same column with different superscripts mean statistically significant difference (P<0.05)

Table 2. Mean ± SD of chicken body weight, Bursa of Fabricius weight and Bursa to body weight (B:BW) ratio at 5-week old

Group	Body weight (g)	Bursa weight (g)	B:BW ratio
Unvaccinated	1,480±0.17^{b}	1.90±0.70^{b}	1.30±0.49
Live attenuated	1,980±0.20^{a}	2.70±1.40^{ab}	1.35±0.72
Live immune complex	2,050±0.20^{a}	2.72±1.14^{ab}	1.32±0.54
Recombinant	2,000±0.17^{a}	3.24±0.91^{a}	1.64±0.44

^{a,b} Values within the same column with different superscripts mean statistically significant difference (P<0.05)

level; the low level (<3,000 or <3.48 log_{10}), intermediate level (3,000- 5,000 or 3.48-3.78 log_{10}) and high level (>6,000 or >3.78 log_{10}) (Kreider *et al*. 1991). The present study shows the average MDA of all 1-day-old chickens as 4.23±0.05 log_{10}, which was categorized within the high level of MDA. At 5-week-old, live attenuated, live immune complex and recombinant vaccine group, showed ELISA titer as 3.67±0.25, 3.70±0.35 and 3.88±0.20, respectively, indicating intermediate, intermediate and high level, respectively. However, the unvaccinated group, with 2.67±0.68 log_{10} indicated the negativity of IBD antibody (<3.48 log_{10}) (Table 1). These results indicate that all vaccinated groups showed statistically significant high immune responsiveness, compared with unvaccinated group, however each vaccinated group was not significant difference from the other two.

Chansiripornchai and Wanasawaeng (2009) reported that the IBD-Blen® (Merial, USA) vaccine produced from Winterfield 2512 IBD virus strain, which is a commercial live attenuated IBD vaccines belong to intermediate-plus or hot vaccines group.

These strains should not be recommended to vaccinate younger than 10-day-old of chickens. (Chansiripornchai and Wanasawaeng, 2009; Haddad *et al*., 1997). The major problem of this virus group, is the interference with MDA, including possible neutralization of the vaccine virus. Thus the timing of IBD vaccine administration is crucial (Saif, 1998; van den Berg, 2000; Müller *et al*., 2003). The present study also showed significant humoral antibody response against IBD 1-week-post vaccination with live attenuated Winterfield 2512 strain by drinking water at 14-day-old.

The present study also applied IBD vaccine using live immune complex in a single administration by subcutaneous route at 1-day-old chicks. This vaccine contains the Winterfield 2512 strain of IBD live virus in complex with IBD antibodies. The humoral immunity in the present study showed significant titer 1-week post vaccination. Several researches such as Herczeg *et al*. (2011) reported that Cevac®Transmune IBD vaccine (CEVA, Hungary), which is live attenuated immune complex vaccine, could be fully protective against IBD, in term of mortality prevention, less severe clinical disease and weight loss, including reduced acute lesions of Bursa of Fabricius due to very virulent IBDV infection; it also provides homogenous flock protection in the presence of highly varying maternally derived antibody levels (Herczeg *et al*., 2011).

The final group, was vaccinated by recombinant vaccine, that is turkey Herpesvirus (HVT) expressing the VP2 gene of the IBDV. This recombinant vaccine could not only prevent IBD, but also protected against Marek's disease at the same time, after applied by the subcutaneous route at 1-day-old (Rashid *et al*., 2013). The present study also indicated that humoral immunity could be induced by vaccination at 1-day-old with recombinant vaccine.

In addition, Bursa of Fabricius to body weight (B:BW) ratios were shown to be 1.30±0.49, 1.35±0.72 1.32±0.54 and 1.64±0.44 for the first to fourth groups respectively, interpreted that among all groups in the present study, there were no significant differences, meaning that this parameter did not effect or interfere with the development of Bursa of Fabricius after IBD vaccination, compared with unvaccinated group.

Conclusion

The humoral immune reaction against IBD of all vaccinated broiler chickens, subsequent to use live attenuated, live immune complex and recombinant vaccine, was significant responsiveness with no difference for ratio of Bursa to body indicated that all vaccines did not interfere with the

Bursa of Fabricius development after vaccination. Thus, all types of IBD vaccine tested in the current study generated significant responsiveness in terms of humoral immunity and did not impair the Bursa of Fabricius development, even in the presence of high level of maternal derived antibody in broilers.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dr. DanyShoham, Bar Ilian University, Israel, for the grammatical review of the manuscript. This study was supported by Mahanakorn University of Technology, Thailand.

References

Al-Natour, M.Q., Ward, L.A., Saif, Y.M., Stewart-Brown, B. and Keck, L.D. 2004. Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on Protection Against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian dis.*, 48: 177-182.

Chang, H.C., Lin, T.L. and Wu, C.C. 2002. DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *J. Vaccine*. 20(3-4): 328-335.

Chansiripornchai, N. and Wanasawaeng, W. 2009. Avian immune system. In: Avian Immune System and Serum Interpretation. Chansiripornchai, N. (ed), Trionasarn Co. Ltd., Bangkok. 27-74.

Haddad, E.E., Whitfill, C.E., Avakian, A.P., Ricks, C.A., Andrews, P.D., Thoma, J.A. and Wakenell, P.S. 1997. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis*. 41(4): 882-889.

Herczeg, J., Nagy, M., Makranszki L., Balla, E., Kustos, K., Foucauld J.D., Thevenon, J. and Alva, B. 2011. Laboratory efficacy testing of subcutaneously administered Cevac®Transmune vaccine in broiler chickens. Proceedings of the XVII Congress of the World Veterinary Poultry Association, August 14-18, Cancun, Mexico.

Müller, H., Islam, M.R. and Raue R. 2003. Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97(1-2):153-165.

Kreider, D.L., Skeeles, J.K., Parsley, M., Newberry, L.A. and Story, J.D. 1991. Variability in a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay system: I. Assay variability. *Avian Dis*. 35(2): 276-287.

Rashid, M.H., Luo, H., Akhter, J.,Islam, M.T., Islam, M.R., Rahman, M.M., Cao, Y. and Xue, C. 2013. Protective effect of Vaxxitek HVT+IBD vaccine against

Infectious Bursal Disease in broiler chickens. *Progress. Agric.* 24(1&2): 69–78.

Saif, Y.M. 1998. Infectious bursal disease and hemorrhagic enteritis. *Poult. Sci.* 77(8):1186-9.

Tsukamoto, K., Tanimura, N., Kakita, S., Ota, K., Mase, M., Imai, K. and Hihara, H. 1995. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Dis*. 39(2): 218-229.

van den Berg, TP. 2000. Infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol*. 29: 175-194.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในปูทะเล (*Scylla* sp.)

ภัทราวดี ศรีมีเทียน[1,#] จิติมา สุวรรณมาลา[2] และสุริยัน ธัญกิจจานุกิจ[3]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส 96000

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. เมือง จ. ปัตตานี 96000

[3]ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: การศึกษาการก่อให้เกิดโรคในปูทะเล (*Scylla* sp.) ที่ได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการนำปูทะเลสุขภาพดีมาทำการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณความเข้มข้น 10^1-10^{10} CFU (Colony Forming Unit) ต่อมิลลิลิตรหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ปริมาณความเข้มข้น 10^8-10^{10} พบว่าปูมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 1 วัน และความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 วัน ส่วนที่ความเข้มข้นเชื้อปริมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูมีอัตราการตายสะสม 22.22 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 วัน นอกจากนี้ที่ปริมาณความเข้มข้น 10^1-10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูไม่มีอัตราการตายสะสมเกิดขึ้นซึ่งการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดความรุนแรงถึงขั้นทำให้ปูทะเลตายได้อย่างรวดเร็ว

คำสำคัญ: ความรุนแรงของเชื้อ ปูทะเล วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: srimeetian1212@gmail.com

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(1): 19-27.

Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* in Mud Crab (*Scylla* sp.)

Pattarawadee Srimeetian[1,#], Jitima Suwanmala[2] and Suriyan Tunkijjanukij[3]

[1]Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, Narathiwas 96000, Thailand
[2]Faculty of Sciences and Technology, Prince of Songkla University, Pattani 94000, Thailand
[3]Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: The study on virulence of *Vibrio parahaemolyticus* was challenged by experimental study against mud crab (*Scylla* sp.). The healthy mud crabs were injected with *V. parahaemolyticus* at 10^1-10^{10} CFU (Colony Forming Unit) per milliliter (ml). After injected for 1 day, the cumulative mortality of crabs was 100% at 10^8-10^{10} CFU per ml of bacteria. After injected for 2 days, the cumulative mortality was 100% at 10^7 CFU per ml of *V. parahaemolyticus*. During 30 days, the cumulative mortality was 22.22% at 10^6 CFU per ml of bacteria. Furthermore, during 30 days, the cumulative mortality was 0.00% at 10^5-10^1 CFU per ml of *V. parahaemolyticus*. This study suggesting that the virulence of *V. parahaemolyticus* causes for rapid mass mortality of mud crab.

Keywords: Virulence, Mud crab, *Vibrio parahaemolyticus*

[#]Corresponding author
E-mail address: srimeetian1212@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(1): 19-27.

บทนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาสูง คลอเรสเตอรอลต่ำ และอุดมไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม ไคติน ฟอสฟอรัส สังกะสี เหล็ก ไอโอดีน และแมกนีเซียม จึงเป็นที่นิยมบริโภคทั้งชาวไทยและต่างประเทศ การเพาะเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยมีมานานกว่า 20 ปี ในหลายจังหวัด เช่น ตราด จันทบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร ระนอง ตรัง เป็นต้น ซึ่งปูที่จำหน่ายในท้องตลาดมี 3 รูปแบบด้วยกัน คือ ปูเนื้อ (ปูขุน) ปูไข่ และปูนิ่ม โดยเกษตรกรนิยมเลี้ยงปูเนื้อและปูไข่ในบ่อหรือเลี้ยงปูนิ่มในกล่องพลาสติกลอยน้ำ โดยปูหนึ่งตัวต่อหนึ่งกล่องพลาสติกเพื่อสะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและป้องกันการทำร้ายกันเอง (Srimeetian and Tunkijjanukij, 2016) เนื่องจากปูทะเลมีนิสัยก้าวร้าวและดุร้ายมาก

ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงปูทะเล เช่น พันธุ์ปู อาการผิดปกติและโรค เป็นต้น ซึ่งโรคในการเพาะเลี้ยงปูทะเลพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อจุลชีพต่างๆ เช่น ไวรัส โปรโตซัว และแบคทีเรีย (Srimeetian, 2010) เป็นต้น โดย Vogan and Rowley (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม

Vibrio ทำให้โครงร่างของปูชนิด *Cancer pagurus* มีลักษณะเป็นจุดสีดำทั่วร่างกาย และกระดองเปราะบาง เรียกโรคดังกล่าวว่า shell disease หรือ black spot (Ayres and Edwards, 1982) นอกจากนี้ (Laoprasert *et al*., 2010) ยังรายงานพบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในปูระยะวัยอ่อนชนิด *Scylla* sp. เช่นเดียวกับ Laoprasert and Laoprasert (2010) ที่รายงานว่า ปูวัยอ่อนในโรงอนุบาลตั้งแต่เริ่มฟักออกจากไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (nauplius) ระยะที่ 2 (zoea) ระยะที่ 3 (magalopa) และตัวเต็มวัย พบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. ซึ่งเชื้อโรคที่พบเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลให้ลูกปูมีอัตราการรอดตายต่ำ โดยชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. ที่ก่อโรคในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (กุ้ง-ปู) ได้แก่ *V. harveyi, V. carchariae, V. fluvalis, V. mefiteranci, V. splendidus, V. metschnikovii, V. cholera, V. oventalis* และ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น Intanakom (2010) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของอาการอกท้องแดงในปูชนิด *Scylla* sp. ซึ่งเมื่อปูมีอาการดังกล่าวจะมีลักษณะเป็นอัมพาตและตายในที่สุด โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปแท่ง เจริญเติบโตได้ในน้ำทะเลและน้ำกร่อยมีมากตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งฝั่งทะเลไทย (Somjetlertcharoen, 1993) ซึ่ง *V. parahaemolyticus* จะฉวยโอกาสในขณะที่สัตว์น้ำอยู่ในสภาวะเครียดหรือภูมิคุ้มกันลดต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างหนาแน่นหรือเลี้ยงในที่กักขัง นอกจากนี้การสะสมของเสียพวกสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ก้นบ่อก็เป็นการเพิ่มโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายปูได้ง่ายด้วยเช่นกัน โดย Ruangpan *et al*. (1997) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ Somjetlertcharoen (1993) ยังรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตับของกุ้งกุลาดำที่มีอาการป่วย ขณะที่ Chaweepack (2007) รายงานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของกุ้งแชบ๊วยบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกส่วน Sudheesh and Xu (2001) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุการตายของกุ้งชนิด *P. monodon* สำหรับ Davis and Sizemore (1982) รายงานว่าปูชนิด *Callinectes sapidus* มีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงที่สุดในฤดูร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วงซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะทำให้ปูป่วยและตายในที่สุด นอกจากนี้ Plainpun (2014) ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุการตายของปูทะเลชนิด *Scylla* sp. อีกด้วย

โดยจะเห็นได้ว่า *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนซึ่งเป็นปัญหาที่พบในการเลี้ยงสัตว์น้ำกลุ่มดังกล่าว ซึ่งปัจจุบันการรายงานเกี่ยวกับความรุนแรงของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในปูทะเลยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปูทะเลที่ติดเชื้อปริมาณความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงระดับความรุนแรงของแบคทีเรียดังกล่าวต่อปูทะเล และศึกษาลักษณะอาการ พฤติกรรมของปูทะเลหลังการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วย ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปูทะเล เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาหาวิธีการป้องและรักษาในปูทะเลที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างปูทะเล น้ำหนัก 304-400 กรัม นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส ที่ความเค็มน้ำ 25 ส่วนในพันส่วน มีการให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 14 วัน เพื่อปรับสภาพปู โดยระยะเวลา 14 วัน เป็นการตรวจสอบว่าปูจะไม่มีอาการเครียดและไม่ตาย ซึ่งจะยังคงเหลือไว้เฉพาะปูที่สุขภาพแข็งแรงเท่านั้น เพื่อตรวจสอบก่อนทำการทดลองว่าปูตัวอย่างจะไม่มีการตายเกิดขึ้นจากสาเหตุอื่น ก่อนที่จะนำปูตัวอย่างมาศึกษาการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปูทะเล โดยมีการให้ปลาสดเป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง ซึ่งปลาสดก่อนนำไปให้เป็นอาหารปูนั้นจะนำมาแช่ใน 1 ppm (part per million) คลอรีน (Calcium hypochlorite) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (Direkbusarakom, and Rojanapitayakul, 1998) โดยหลังจากนั้นก่อนนำปูทะเลไปทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียงดให้อาหารปูเป็นเวลา 1 วัน

การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย V. parahaemolyticus

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ลงเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่เติม 3 เปอร์เซ็นต์ NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร tryptic soy broth (TSB) ที่เตรียมขึ้นจาก 3 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างตะกอนของแบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl จำนวน 3 ครั้ง แล้วเจือจางตะกอนของแบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ให้ได้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปริมาณความเข้มข้น $6.1x10^1$, $5.7x10^2$, $7.0x10^3$, $5.0x10^4$, $1.97x10^5$, $2.8x10^6$, $5.7x10^7$, $4.6x10^8$, $3.69x10^9$และ $7.88x10^{10}$ colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียวัดจากค่า optical density (O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร (Intanakom, 2010)

การเหนี่ยวนำสารแขวนลอยเชื้อ V. parahaemolyticus โดยวิธีการฉีดเข้าไปในปูทะเล

ทำการเหนี่ยวนำด้วยวิธีการฉีดแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าไปในบริเวณขาว่ายน้ำของปูทะเล (Figure 1) (Srimeetian, 2010) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 11 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปูทะเลที่ฉีดด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl (กลุ่มควบคุม) และชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เท่ากับ $6.1x10^1$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $5.7x10^2$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 4 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $7.0x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 5 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $5.0x10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 6 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $1.97x10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 7 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $2.8x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 8 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $5.7x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 9 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย $4.6x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลอง

ที่ 10 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 3.69×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 11 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 7.88×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแต่ละชุดการทดลองทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปูทดลอง 3 ตัว หลังจากนั้นทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปูทะเลทุกวันเป็นเวลา 30 วัน

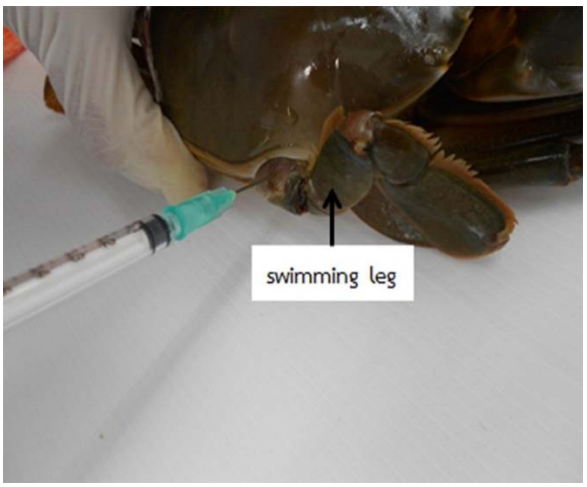


Figure 1 The injection of *Vibrio parahaemolyticus* into swimming leg of mud crab

การสังเกตลักษณะ พฤติกรรม และการคำนวณอัตราการตายสะสมของปูทะเลหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ V. parahaemolyticus

สังเกตลักษณะอาการ พฤติกรรม และอัตราการตายของปูทะเล ระหว่างการทดลอง และทำการจดบันทึกลักษณะอาการ พฤติกรรมของปูทดลอง นอกจากนี้ยังทำการบันทึกจำนวนปูทะเลที่ตายในระยะเวลา 30 วัน แล้วนำข้อมูลจำนวนปูทะเลที่ตายหลังการทดลองมาคำนวณหาอัตราการตายสะสมของปูทะเลในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยใช้สูตรดังนี้ (Promchairat *et al*., 2013)

$$\text{อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปูทะเลที่ตายสะสมในแต่ละระยะเวลา (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปูทะเลเริ่มต้นการทดลอง}}$$

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปูทะเลได้รับเท่ากับ 10^{10}-10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูทดลองตายทั้งหมดภายใน 1 วัน ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าภายใน 1 วัน ทำให้ปูทดลองตาย 8 ตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 88.88 เปอร์เซ็นต์ และภายใน 2 วัน พบว่าปูทดลองตายทั้งหมด ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูทดลองตาย 1 ตัว ภายใน 1 วัน ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 11.11 เปอร์เซ็นต์ และภายในเวลา 2 วัน พบว่าปูทดลองมีการตายเพิ่มขึ้นอีก 1 ตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายเท่ากับ 22.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจนกระทั่งถึงวันที่ 30 ของการทดลองพบว่าไม่มีการตายของปูทะเลเกิดขึ้นอีก นอกจากนี้ปูทะเลที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียปริมาณเท่ากับ 10^5-10^1 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูทดลองไม่มีอัตราการตายสะสมภายในเวลา 30 วัน เนื่องจากเมื่อปูได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่พบการตายของปูทะเล ซึ่งเหมือนกันกับกลุ่มควบคุมที่ไม่พบการตายของปูทะเลเช่นกัน

ลักษณะอาการของปูทะเลที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีดังนี้ คือ อาการขั้นแรกพบว่าปูจะไม่กินอาหาร มีการเคลื่อนที่แต่ไม่รวดเร็วปราดเปรียว ใช้ก้ามในการป้องกันตนเอง ดุร้าย ส่วนอาการขั้นที่ 2 พบว่า ปูจะเก็บก้ามบ้าง ชูก้ามบ้าง เมื่อใช้สิ่ง

เร้ากระตุ้นก็จะชูก้ามในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า การเคลื่อนที่เริ่มจะไม่คล่องแคล่วไม่รวดเร็ว ขณะที่อาการขั้นที่ 3 พบว่า ปูเก็บพับก้ามไว้ใต้ลำตัวตลอดเวลา ไม่ชูก้ามเมื่อมีสิ่งกระตุ้น การเคลื่อนที่เริ่มช้าหรือไม่ค่อยเคลื่อนที่ สำหรับอาการขั้นที่ 4 พบว่า ปูไม่เคลื่อนที่กางก้ามออกวางไว้กับพื้น และอาการขั้นที่ 5 พบว่า ปูมีลักษณะเป็นอัมพาต แน่นิ่ง ก้ามแข็งไม่พับงอ ขาว่ายน้ำและขาเดินมีลักษณะอ่อนล้าไม่มีแรง สุดท้ายอาการขั้นที่ 6 พบว่า ปูจะแสดงอาการ คือคายพ่นเมือกหรือน้ำที่มีลักษณะสีดำอมน้ำตาลแก่ออกมาจากปาก หลังจากนั้นประมาณ 3 นาที ปูก็ตาย ส่วนปูทะเลที่มีชีวิตรอดหลังจากการได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีพฤติกรรมอาการคล้ายกับปูที่ได้รับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl คือ กินอาหารปกติ เคลื่อนที่คล่องแคล่วว่องไว กระโดด ใช้ก้ามตอบสนองต่อสิ่งเร้าได้อย่างรวดเร็ว และดุร้ายมาก

ตารางที่ 1 อัตราการตายสะสมของปูทะเล ที่ฉีดด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาณต่างๆ กัน ในระยะเวลา 30 วัน

ระดับความเข้มข้นของ *Vibrio parahaemolyticus* (CFU ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)
0 (0.85% NaCl; กลุ่มควบคุม)	0.00±0.00
$6.1x10^{1}$	0.00±0.00
$5.7x10^{2}$	0.00±0.00
$7.0x10^{3}$	0.00±0.00
$5.0x10^{4}$	0.00±0.00
$1.97x10^{5}$	0.00±0.00
$2.8x10^{6}$	22.22±15.71
$5.7x10^{7}$	100.00±0.00
$4.6x10^{8}$	100.00±0.00
$3.69x10^{9}$	100.00±0.00
$7.88x10^{10}$	100.00±0.00

สรุปและวิจารณ์ผล

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำเค็มทั่วไป โดยเฉพาะสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (Somjetlertcharoen, 1993) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปูที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นของ *V. Parahaemolyticus* เท่ากับ 10^{1}-10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ไม่พบอัตราการตายของปูทะเล และที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูมีอัตราการตาย 22.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของแบคทีเรีย 10^{7}-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Aguirre-Guzmán *et al*. (2001) ที่ทำการทดลองความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^{3}, 10^{5} และ 10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ในกุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* ผลการทดลองพบว่า กุ้งมีอัตราการตายสูงสุดที่ 10^{7}, 10^{5} และ 10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ Sudheesh and Xu (2001) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้กุ้งชนิด *P. monodon* ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Aguirre-Guzmán *et al*. (2010) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้กุ้งชนิด *L. vannamei* มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl) ที่ไม่พบอัตราการตายของกุ้งชนิดดังกล่าว จากการทดลองในครั้งนี้จะสังเกตได้ว่าปูทะเลมีการตายอย่างรวดเร็วหลังการติดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูง (10^{7}-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร) อาจเนื่องมาจากที่ความเข้มข้นเชื้อดังกล่าวเป็นการเพิ่มความรุนแรงของ

แบคทีเรีย ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อเข้าไปอาศัยอยู่ในสัตว์น้ำจะผลิตเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีพิษสามารถทำลายเซลล์ของสัตว์น้ำได้ (Sudheesh and Xu, 2001) ดังนั้นเมื่อ *V. parahaemolyticus* มีระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นอาจเป็นการเพิ่มปริมาณ protease ด้วยเช่นกัน Aguirre-Guzmán *et al*. (2001) รายงานว่าเชื้อ *V.parahaemolyticus* สร้างความเสียหายทำลายเซลล์ heptopencreas ของกุ้งชนิด *L. vannamei* ซึ่งทำให้ heptopencreas ไม่สามารถทำงานได้ส่งผลให้กุ้งตายในที่สุด นอกจากนี้การทดลองในครั้งนี้ยังพบว่า ก่อนตายปูทะเลจะแสดงลักษณะอาการคือเป็นอัมพาต ไม่สามารถเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหวได้และมีการพ่นเมือกสีดำออกมา ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Costa-Ramosand Rowley (2004) ที่รายงานว่าปูชนิด *Cancer pagurus* เมื่อได้รับเชื้อ *Pseudoalteromonas atlantica* ปูจะมีลักษณะอาการเป็นอัมพาตหลังจากนั้นปูจะตายลงในที่สุด

จากการศึกษาการก่อให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าในปูทะเลทำให้ทราบถึงระดับความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อปูทะเล โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียสูงมีผลทำให้ปูมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอาจนำข้อมูลการวิจัยในครั้งนี้ไปใช้ในการแนะนำเกษตรกรเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงปูทะเล ซึ่งอาจโดยการสังเกตลักษณะอาการของปูที่อาจมีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในฟาร์มเลี้ยงปูทะเล หรืออาจทำการตรวจเช็คเชื้อแบคทีเรียจากน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือจากปูทะเลโดยตรง นอกจากนี้จากผลการทดลองในครั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปูทะเลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปูทะเลหลังการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และควรมีการศึกษาการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับปูทะเลได้อันจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในปูทะเลต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R. and Ascencio, F. 2001. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 215-219.

Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, G. J., Perez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T. and Cruz-Hernández, I. N. 2010. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 41(3): 464-470.

Ayres, P.A. and Edwards, E. 1982. Notes on the distribution of black spot shell disease in crustacean fisheries. *Chem. Ecol*. 1: 125-130.

Chaweepack, T., Ruangpan, L. and Nuphin, V. 2007. Parasites and vibrio flora of wild broodstock banana shrimp (*Penaeus merguiensis*) from eastern gulf of Thailand. Technical paper. Coastal

Fisheries Research and Development Bureau. Chanthaburi Coastal Fisheries Research and Development Center; Department of Fisheries, Chanthaburi (Thailand). (in Thai)

Costa-Ramos, C. and Rowley, A. F. 2004. Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus. Appl. Environ. Microbiol*. 70(2): 729-735.

Davis, W. J. and Sizemore, K. R.1982. Incidence of *Vibrio* species associated with Blue Crabs *Callinectes sapidus* collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol*. 43(5): 1092-1097.

Direkbusarakom, S. and Rojanapitayakul, S. 1998. Effect of chlorine (Calcium hypochlorite) in seawater and seawater with soil on *Vibrio harveyi*. Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference: Abstracts. (in Thai)

Intanakom, J. 2010. Study on morphological, bacterial identification and histology in mud crab (*Scylla* sp.) with red thoracic-abdominal syndrome. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Laoprasert, T. and Laoprasert, S. 2010. Diseases in mud crab, *Scylla* sp. Thai Fisheries Gazette (Thailand). 63: 265-267. (in Thai)

Laoprasert, T., Laoprasert, S., Soonthornwit, S. and Phonwari, N. 2010. Study on bacterial flora in mud crab (*Scylla* sp.). Thai Fisheries Gazette (Thailand). 63: 238-241. (in Thai)

Plainpun, N. 2014. Induction of red thoracic – abominal syndrome with bacteria isolated from mud crab (*Scylla* sp.). The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Promchairat., J., Limsuwan, C. and Chuchird, N. 2013. Experimental exposure and evaluation of *Artemia* sp. to *Vibrio* sp. As possible vectors of pathogenic bacteria. Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine, Fisheries. (in Thai)

Ruangpan, L., Tanasomwang, W. and Sangrungruang, K. 1997. Bacterial flora of intensively cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Science, Engineering, Environmental Management, Home Economics, Education and Economics. (in Thai)

Somjetlertcharoen, A. 1993. Study on Vibrio species and oxolinic acid residues from Penaeus monodon Fabricius in intensive culture ponds. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Srimeetian, P. 2010. Antioxidant and lipid peroxidation in molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). The

thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Srimeetian, P., and Tunkijjanukij, S. 2016. Differential protein expression in haemolymph of first-stage red sternum mud crabs (*Scylla serrata*). *Thai J. Vet. Med*. 46(3): 401-407.

Sudheesh, P.S. and Xu, H.S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*.196: 37-46.

Vogan, C.L. and Rowley, A.F. 2002. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. *Aquaculture*. 205: 237–252.

บทความวิชาการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

โรค Koi sleepy disease (KSD)

สำราญ บรรณจิรกุล[1,#]

[1]คลินิกสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: Carp edema virus (CEV) ซึ่งเป็น poxvirus อยู่ในครอบครัวของ *Chordopoxvirinae* ทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพอย่างมากโดยเฉพาะในปลาคาร์พระยะวัยรุ่น ในทวีปเอเชียมีการตรวจพบในประเทศญี่ปุ่น ส่วนการระบาดในทวีปยุโรปมีรายงานการตรวจพบในประเทศอังกฤษ เนเธอร์แลนด์ ออสเตรีย สาธารณรัฐเชค สหพันธรัฐเยอรมันนี ตามลำดับ ปลาที่ป่วยจะแสดงอาการเฉื่อยชา ไม่เคลื่อนไหวมีลักษณะตาจม ซี่เหงือกบวมและเนื้อเยื่อซี่เหงือกตาย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปลาไม่สามารถใช้เหงือกในการหายใจ เหนี่ยวนำให้ร่างกายขาดอากาศ และเสียชีวิตในที่สุด อัตราการตายอาจสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ การตรวจหาเชื้อไวรัส CEV ในปลาที่แสดงอาการด้วยวิธี PCR และ nested PCR นั้นยังไม่มีความไว (sensitivity) สูงเพียงพอ จึงมีพัฒนาการตรวจหาเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี real-time PCR ซึ่งทำให้มีความไวในการตรวจมากขึ้นและยังสามารถตรวจวัดปริมาณของไวรัสในตัวอย่างที่ส่งตรวจได้อีกด้วย

คำสำคัญ: Koi sleepy disease Carp edema virus อาการทางคลินิก การตรวจวินิจฉัย

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(1): 29-34.

E-mail address: sumrarn@mut.ac.th

Koi sleepy disease (KSD)

Sumrarn Bunnajirakul[1,#]

[1]Aquatic Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, 140 Cheumsamphan Road, Nong Chok, Bangkok 10530 Thailand

Abstract: Carp edema virus (CEV) is a poxvirus, which is classified in family *Chordopoxvirinae*. CEV causes a serious health impact on juvenile carp. In some several countries of Asia, Japan for instant, CEV was commonly detected in several fish farms. This is consistent with the epidemiological data in Europe such as in England, Netherland, Austria and Germany respectively. Affected fish show lethargic movement, enopthalamia, swollen and necrotic gill, which induced anoxia and subsequently cause death, which more than 80 % mortality rate was found. Detection of CEV in sickness fish with PCR and nested PCR showed low sensitivity of detection. Therefore, real-time PCR was developed for detection of CEV. This method has more sensitivity response and could detect viral load in sample.

Keywords: Koi sleepy disease, Carp edema virus, Clinical sign, Diagnostic method

[#]Corresponding author

E-mail address: sumrarn@mut.ac.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(1): 29-34.

บทนำ

การติดเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุของโรคที่รุนแรงที่ทำให้อัตราป่วยและอัตราการตายที่สูงในปลา (Amita *et al*., 2002; Hedrick *et al*., 2000; Oyamatsu *et al*., 1997) ทั้งนี้ Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV–3, KHV) เป็นเชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อโรคในปลาคาร์พ (fancy carp) (*Cyprinus carpio*) ทำให้เกิดโรค Koi herpes viral disease (KHVD) นอกจากนั้นเชื้อ Spring viremia of carp virus (SVSV) ที่ก่อโรค Spring viremia of carp (SVC) จัดเป็นโรคที่สำคัญมากที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World organization for animal health หรือ Office International des Epizooties; OIE (OIE: Aquatic Animal Health Code, 2012) และสหภาพยุโรป (Council Directive 2006/88/EC, 2006) ตลอดจนประเทศแถบเอเชียที่มีการเพาะเลี้ยงปลาคาร์พให้ความสำคัญ ปลาที่ติดเชื้อ KHV แสดงอาการภายนอกบริเวณผิวหนังร่วมกับภาวะเนื้อตายที่เหงือก (gill necrosis) ตั้งแต่การพบอุบัติการณ์ของโรคในราวช่วงปลายปี ค.ศ. 1990 ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อวงการอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงทั่วโลกอย่างมากทั้งปลาคาร์พที่มาจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง

นอกจากนั้นการติดเชื้อจาก carp edema virus (CEV) ซึ่งเป็น poxvirus ที่ทราบกันดีว่าทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพอย่างมากโดยเฉพาะในปลาคาร์พ ด้วยอุบัติการณ์ที่เด่นชัดปรากฏขึ้นในแต่ละพื้นที่ การติดเชื้อ CEV มีการตรวจพบในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974 โดยเฉพาะฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงที่อุณหภูมิน้ำระหว่าง 15 – 25 องศาเซลเซียส เมื่อมีการขนย้ายปลาจากบ่อดินไปยังบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำใหม่ ในปลาระยะโตเต็มวัย จะพบอาการเฉื่อยชา ไม่เคลื่อนไหว ซึ่งจัดเป็นอาการทางคลินิกที่สำคัญในโรคดังกล่าว และเป็นที่มาของชื่อ “Koi sleepy disease” (KSD) (Ono *et al*., 1986)

สาเหตุ

Carp edema virus (CEV) จัดเป็น poxvirus ที่อยู่ในครอบครัวของ *Chordopoxvirinae* ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่และมีความซับซ้อน ประกอบด้วยส่วนของจีโนมแบบดีเอ็นเอสายคู่ ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง แบ่งตัวได้ใน cytoplasm และก่อโรคในพวกที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดรวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้น poxvirus-like particles ตรวจพบในปลาคาร์พ koi carp จากฟาร์มที่ป่วย นอกจากนั้นพบในปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) และปลา Atlantic salmon (Gjessing *et al*., 2015)

ระบาดวิทยา

การระบาดในแถบเอเชียซึ่งเป็นจุดกำเนิดของโรค KSD มีรายงานการพบครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นในช่วงปี ค.ศ. 1970 ในปลาคาร์พวัยรุ่น จัดเป็นโรคระบาดร้ายแรง (epizootic disease) ในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งก่อความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาของญี่ปุ่นอย่างมาก (Oyamatsu *et al*., 1997a; Miyazaki *et al*., 2005) ส่วนการระบาดในทวีปยุโรปมีรายงานการตรวจพบตั้งแต่ปี ค.ศ.2013 ในประเทศอังกฤษ (Way and Stone, 2013) หลังจากนั้นไม่นานพบการระบาดของไวรัสนี้ในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Haenen *et al*., 2014) และประเทศออสเตรีย (Lewisch *et al*., 2015) ส่วนในช่วงฤดูใบไม้ร่วงของปี ค.ศ. 2014 พบการระบาด KSD ในฝูงปลา koi ของสหพันธรัฐเยอรมันนีตามลำดับ (Jung-Schroers *et al*., 2015) จนกระทั่งมีการระดมความคิดเห็นจากผู้เชี่ยวชาญ เพื่อหามาตรการเฝ้าระวังและการตรวจติดตามควบคุมโรค KSD ให้เกิดขึ้นอย่างรัดกุม (Haenen *et al*., 2016)

อาการทางคลินิก

การระบาดของโรคครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นพบปลาคาร์พระยะรุ่นแสดงอาการขาดอากาศหายใจว่ายบริเวณผิวน้ำหรือบริเวณทางน้ำเข้าส่วนการระบาดในทวีปยุโรปพบในช่วงปลาที่มีอายุ ทั้งในปลาคาร์พทั่วไป และปลาคาร์พสวยงาม โดยปลาที่ป่วยจะนอนนิ่งบริเวณพื้นบ่อ เคลื่อนไหวช้าลงคล้ายอาการง่วงนอน เป็นที่มาของชื่อโรค Koi sleepy disease (KSD) จากการศึกษาที่ผ่านมา (Ono *et al*., 1986; Oyamatsu *et al*., 1997a; Miyazaki *et al*., 2005) ส่วนมากพบ CEV จากเนื้อเยื่อของเหงือกปลาที่ป่วย อาจพบได้บ้างในส่วนของผิวหนัง ตับ หรือม้าม (Amita *et al*., 2002)

ปลาที่ป่วยมีลักษณะตาจม (enophthamalia) ซี่เหงือกบวม (gill edema) และเนื้อเยื่อซี่เหงือกตาย (necrotic lamellae) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปลาไม่สามารถใช้เหงือกในการหายใจ เหนี่ยวนำให้ร่างกายขาดอากาศ และเสียชีวิตในที่สุดส่วนพยาธิ

สภาพอื่นที่เด่นชัดที่ผิวหนังที่พบบ่อยบริเวณรอบปากและส่วนฐานครีบ อัตราการตายอาจสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบการติดเชื้อร่วมจากปรสิต เชื้อรา รวมถึงแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรงปริมาณจำนวนมากในปลาชนิดนี้ (Jung-Schroers *et al*., 2015)

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจคัดกรองโรคใช้การซักประวัติ อาการทางคลินิก ร่วมกับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของปลาที่มีอาการ พบการเพิ่มขึ้นและรวมตัวกันของซี่เหงือก มีการหนาตัวและบวมน้ำของเซลล์บุผิวของซี่เหงือกย่อย รวมทั้งมีการลอกหลุดของเซลล์บุผิว (Miyazaki *et al*., 2005; Oyamatsu *et al*., 1997a; Jung-Schroers *et al*., 2015) ทั้งนี้การยืนยันการติดเชื้อในฝูงปลาที่ยังไม่แสดงอาการนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำการควบคุมไม่ให้แพร่ระบาดในวงกว้างขึ้น

การแยก virus จากตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาป่วยสามารถทำได้ใน Common Carp Brain (CCB) cells รวมทั้ง EPC, BF-2, RTG-2 และ CHSE cells แต่ตรวจไม่พบ Cytopathic effect (Lewisch *et al*., 2015)

การตรวจทางชีวโมเลกุลเพื่อพิสูจน์ทราบ viral genome ด้วยขบวนการทางชีวโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้ยืนยันการพบ CEV ในตัวอย่างที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคนี้ การเก็บตัวอย่างสำหรับการส่งตรวจมีความสำคัญอย่างยิ่ง พบว่าการเก็บตัวอย่างจากเมือกของผิวหนัง ซี่เงือก และเลือด สามารถตรวจพบ CEV ได้ดี ส่วนตัวอย่างที่ได้มาจากอวัยวะภายใน เช่น ไต ม้าม ถุงลม ให้ผลบวกที่ไม่ชัดเจน

ปัจจุบันการตรวจหา CEV ในปลาที่แสดงอาการด้วย PCR และ nested PCR นั้นอาจจะยังไม่พบ CEV ในปลาทุกตัวที่สงสัยได้ทั้งที่ผลการตรวจหา carp herpesvirus แบคทีเรียหรือปรสิตอื่นๆให้ผลเป็นลบ อาจจะเป็นเพราะปริมาณของไวรัสในปริมาณที่ต่ำ (Jung-Schroers *et al*., 2015) ดังนั้นจึงมีพัฒนาการตรวจหาเชื้อดังกล่าวด้วย real-time PCR ซึ่งช่วยให้ทราบสภาวะของ viral load เชิงคุณภาพในตัวอย่างที่ส่งตรวจได้ดียิ่งขึ้น และสามารถประเมินถึงความสำคัญของไวรัสต่อสาเหตุการเกิดโรคทำให้สามารถสืบสวนถึงการเปลี่ยนแปลงของการติดเชื้อของไวรัสในฝูงปลาที่แสดงอาการป่วย (Adamek *et al*., 2016)

การควบคุมป้องกัน

โรค KSD สามารถก่อความสูญเสียได้สูงถึง 80 % ในฝูงปลา koi พื้นเมืองที่มีการเลี้ยงในญี่ปุ่นจึงจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงปลา koi จากการสังเกตพบปลาป่วยที่แช่ด้วยเกลือความเข้มข้น 0.5 % จะช่วยทำให้ซี่เหงือกสะอาดและสามารถแลกเปลี่ยนอากาศได้มากขึ้น สามารถลดการสูญเสียของเจ้าของฟาร์มปลาในญี่ปุ่นได้อย่างดี (Miyazaki *et al*., 2005; Seno *et al*., 2003) และช่วยให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาสามารถวางแผนควบคุมป้องกันโรค KSD เป็นไปได้ดี ในส่วนสหภาพยุโรปหลังจากอุบัติการณ์ที่พบในหลายประเทศ เช่น อังกฤษ ออสเตรีย และสหพันธรัฐเยอรมันนีหน่วยงานที่ดูแลสุขภาพปลาได้วางมาตรการเฝ้าระวังโรคนี้อย่างเข้มข้น ตามระเบียบของ EU directive 2006/88/EG ในการวางมาตรการจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส CEV ในฝูงปลาคาร์พที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายหลายประเทศในยุโรปตระหนักถึงการแพร่กระจายของโรคไวรัสที่สำคัญในปลา เช่น โรค KHVD ซึ่งจัดเป็นโรคอันตรายที่เคยพบอุบัติการณ์มา

ก่อน ดังนั้นการตรวจคัดกรองโรค KSD จึงถูกจัดเป็นโปรแกรมตรวจคัดกรองโรคสำหรับการตรวจสุขภาพปลาทั้งในห้องปฏิบัติการตรวจโรคปลาระดับชาติและภูมิภาค (Jung-Schroers *et al*., 2015)

References

Adamek, M., Jung-Schroers, V., Hellmann, J., Teitge, F., Bergmann, S. M., Runge, M., Kleingeld, D. W., Way,K., Stone, D. M. andSteinhagen, D. 2016. Quantitative detection of CEV in koi tissues *Dis. Aquat. Org*. 119: 245–251.

Amita, K., Oe, M., Matoyama, H., Yamaguchi, N. and Fukuda, H. 2002. A survey of koi herpesvirus and carp edema virus in color carp cultured in Niigata Prefecture. *Japan Fish Pathol*. 37(4):197–198.

Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for Aquaculture animals and products there of, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. 2006: 1–56.

Gjessing, M. C., Yutin, N., Tengs, T., Senkevich, T., Koonin, E., Rønning, H. P., Alarcon, M., Ylving, S., Lie, K. I., Saure, B., Tran, L., Moss, B. and Dale, O. B. 2015. Salmon gillpoxvirus, the deepest representative of the *Chordopoxvirinae*. *J. Virol.* 89: 9348–9367.

Haenen, O., Way, K., Stone, D. and Engelsma, M. 2014. 'Koi Sleepy Disease' voor het eerst in Nederland aangetoond in koikarpers. *Tijdschr Diergeneeskd.* 139: 26–29.

Haenen, O., Way, K., Gorgoglione, B., Ito, T., Paley, R., Bigarré, L. and Waltzek, T. 2016. Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 36(1): 11-23.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J. V., Marty, G.D. and Nordhausen, R. W. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi,a strain of Common carp. *J. Aquat. Anim. Health.* 12(1): 44–57.

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Teitge, F., Hellmann, J., Bergmann, S. M., Schütze, H., Kleingeld, D. W., Way, K., Stone, D., Runge, M., Keller, B., Hesami, S., Waltzek, T. and Steinhagen, D. 2015. Another potential carp killer?: carp edema virus disease in Germany. *BMC Vet. Res*. 11(114): 1-4.

Lewisch, E., Gorgoglione, B., Way, K. and El-Matbouli, M. 2015. Carp edema virus/koi sleepy disease:an emerging disease in Central-East Europe. *Transbound. Emerg. Dis*. 62: 6–12.

Miyazaki, T., Isshiki, T. andKatsuyuki, H. 2005.Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease

of koi Cyprinuscarpio koi in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 65: 197–207.

OIE: Aquatic Animal Health Code. 2012. Chapter 10.6. *Koi Herpesvirus Disease*: 1–6.

Ono, S., Nagai, A. and Sugai, N. 1986. A histopathological study on juvenile color carp, *Cyprinus carpio*, showing edema. *Fish Pathol*. 21: 167–175.

Oyamatsu, T., Hata, N., Yamada, K., Sano, T. and Fukuda, H. 1997a. An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish Pathol.* 32: 81–88.

Seno, R. N., Hata, T., Oyamatsu T. and Fukuda, H. 2003. Curative effect of 0.5% salt water treatment on Carp, *Cyprinuscarpio*, infected with Carp Edema Virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host. *Suisan Zoshoku*. 51: 123-124.

Way, K. and Stone, D. 2013. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *CEFAS Finfish News*. 15: 32–34.

JMVM
JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ISSN: 1905-7571