เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

CMVJ

Chiang Mai Veterinary Journal

Volume : 15 Number : 2 (May-Aug) Year : 2560

ISSN; 1685-9502 (print)
2465-4604 (online)

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม 2560
ISSN 1685-9502 (print), 2465-4604 (online)
http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj/

เจ้าของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์

"เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" เป็นวารสารเพื่อการเผยแพร่เผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพในลักษณะต่างๆ เช่น บทความต้นฉบับ บทความปริทัศน์ รายงานฉบับย่อ และรายงานสัตว์ป่วย ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary Science) และวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการสัตว์ (Animal Science and Technology) ได้แก่ ชีววิทยา สรีรวิทยา จุลชีววิทยา พยาธิวิทยา โภชนาการศาสตร์ กายวิภาคศาสตร์ พันธุศาสตร์ อายุรศาสตร์ ศัลยศาสตร์ สูติศาสตร์ วิทยาศาสตร์ทางชีวภาพวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ระบาดวิทยาและแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว

บทความที่ได้รับการเผยแพร่ในเชียงใหม่สัตวแพทยสาร เป็นวารสารที่ผ่านการตรวจคุณภาพ โดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 ท่าน ที่ไม่ทราบชื่อผู้แต่งและผู้แต่งไม่ทราบชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ (Double-blind peer review) ความคิดเห็นของผู้เขียนแต่ละท่าน ทางกองบรรณาธิการไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป กรณีผู้ประสงค์จะนำบทความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่ง (รูป ตาราง ฯลฯ) ที่มีการเผยแพร่ไปแล้ว ต้องได้รับอนุญาตจากกองบรรณาธิการวารสาร "เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แม้ว่าจะเป็นผลงานจากงานของผู้เขียนเองผู้แจ้งให้

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รองคณบดีด้านวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บรรณาธิการ

รศ.น.สพ.ดร.กรกฎ	งานวงศ์พาณิชย์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

รองบรรณาธิการ

ผศ.น.สพ.ดร.อนุชา	สธนวงศ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

กองบรรณาธิการ

ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์	ธนาวงษ์นุเวช	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ศ.น.สพ.ดร.เผดิจ	ธรรมรักษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ศ.พญ.ผาสุก	มหรรฆานุเคราะห์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
รศ.น.สพ.ดร.ประภาส	พัชนี	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.กัมปนาท	สุนทรวิภาต	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ปิยนันท์	ทวีถาวรสวัสดิ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.วีรพล	ทวีนันท	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.วิน	สุรเชษพงษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ฏิลก	วงศ์เสถียร	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ฉัตรโชติ	ทิตาราม	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.พงศกร	เชื่อมไมตรี	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
อ.น.สพ.ดร.นิธิดล	บูรณพิมพ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
อ.สพ.ญ.ดร.จารุญลักษณ์	จิรภัทรเศรษฐ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
อ.ดร.กิตติศักดิ์	พุทธชาติ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประเทศไทย
สพ.ญ.ดร.ปิยพร	คงเมคี	องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ประเทศไทย
สพ.ญ.ดร.พัชราภรณ์	แก้วโม่ง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอันดามัน ประเทศไทย
Prof. Dr. Kazuyoshi	Taya	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Assoc. Prof. Dr. Ashraf	Abd El-Halim El-Sayed	Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt
Assoc. Prof. Dr. Nguyen	Trong Ngu	College of Agriculture & Applied Biology, Can Tho University, Vietnam
Assoc. Prof. Dr. Ayona	Silva-Fletcher	Department of Clinical Sciences and Services, The Royal Veterinary College, University of London, UK
Dr. Janine	L. Brown	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr. Edward	Peter Snelling	School of Physiology, University of the Witwatersrand, South Africa
Dr. Andrew	Paul Shinn	Fish Vet Group Asia Limited, Thailand

เจ้าหน้าที่ฝ่ายจัดการวารสาร

นายธนะพันธุ์	การคนซื่อ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางสาวสุลัดดา	เอี่ยมมาก	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางจิติรัตน์	โฆษณสันติ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นายธรนินทร์	เจริญสุข	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางสาวเดือนนภา	ตาอินทุ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สำนักงาน

กองบรรณาธิการ "เชียงใหม่สัตวแพทยสาร"
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100
จดหมายอิเล็กทรอนิกซ์ : cmuvetj@gmail.com
โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8070
โทรสาร. (66)-5327-4710

Chiang Mai Veterinary Medicine Journal

Volume 15 No.1 May-August 2017
ISSN 1685-9502 (print), 2465-4604 (online)
http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj/

Owner Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

About journal

"Chiang Mai Veterinary Journal" aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as original articles, review article, short communication, and case report in the field of veterinary science and animal science and technology, including biology, physiology, microbiology, pathology, nutrition, anatomy, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, and one health.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board. Any republication of a published article, or any part of published article (figure, table, etc.) must acquire permission from the editorial board of the Chiang Mai Veterinary Journal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University even though the individual who submits the request is the author himself/herself.

Executive editor

Dean, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Associate Dean for Research Affairs, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Editor-in chief

Assoc. Prof. Dr.Korakkot	Nganvongpanit	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Associate editor

Assist. Prof. Dr.Anucha	Sathanawongs	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Editor board

Prof. Dr. Roongroje	Thanawongnuwech	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Prof. Dr. Padet	Tummaruk	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Prof. Dr. Pasuk	Mahakknaukrauh	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assoc. Prof. Dr. Prapas	Patchanee	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Kumpanart	Soontornvipart	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Piyanan	Taweethavonsawat	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Weerapol	Taweenan	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Win	Surachetpong	Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Dilok	Wongsathein	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Chatchote	Thitaram	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Phongsakorn	Chuammitri	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Nithidol	Buranapim	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Charoonluk	Jirapattharasate	Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Thailand
Lect. Dr. Kittisak	Buddhachat	Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Thailand
Dr. Piyaporn	Kongmakee	The Zoological Park Organization under the Royal Patronage of His Majesty the King, Thailand
Dr. Patcharaporn	Keawmong	Phuket Marine Biological Center, Thailand
Prof. Dr. Kazuyoshi	Taya	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Assoc. Prof. Dr. Ashraf	Abd El-Halim El-Sayed	Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt
Assoc. Prof. Dr. Nguyen	Trong Ngu	College of Agriculture & Applied Biology, Can Tho University, Vietnam
Assoc. Prof. Dr. Ayona	Silva-Fletcher	Department of Clinical Sciences and Services, The Royal Veterinary College, University of London, UK
Dr. Janine	L. Brown	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr. Edward	Peter Snelling	School of Physiology, University of the Witwatersrand, South Africa
Dr. Andrew	Paul Shinn	Fish Vet Group Asia Limited, Thailand

Managing editor

Mr. Thanapun	Kankonsue	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Suludda	Aimmak	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mrs. Thitirat	Kosanasanti	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mr.Toranin	Charungsuk	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Duannapa	Ta-Inthu	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Address

Edit-in chief Chiang Mai Veterinary Medicine Journal
Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University
Chonpratan Road, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100 Thailand
E-mail : cmuvetj@gmail.com
Tel. (66)-5394-8057, 8070
Fax. (66)-5327-4710

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม 2560
http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj/

สารบัญ

โรคคอลัมนาริสในปลา 63
จาตุรนต์ ป้องน้ำไผ่, ชนกันต์ จิตมนัส์

ศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อการวินิจฉัยและป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม 79
ปองพล พงไธสงค์

กรณีศึกษา: การสำลักสิ่งแปลกปลอมที่มีลักษณะลื่น เข้าสู่ทางเดินหายใจในสุนัข 89
ลัดดาวรรณ สมรูป, ขัตติยา กุมเพ็ชร,
วันวิสาข์ ศรีสวัสดิ์, อารีรัตน์ อากาศวิภาต

การศึกษาความชุกและปัจจัยที่มีผลต่อโรคแท้งติดต่อในแพะ บริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ 99
ดุลยวัต กลัดเข็มเพชร, นิติศาสตร์ สมตัว, รักธรรม เมฆไตรรัตน์,
วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา, อนุชา สธนวงศ์

จุลกายพยาธิวิทยาของสมองและการฝ่อของออพติก โลบ ปลาทู (*Rastrelliger brachysoma*) ในบริเวณอ่าวไทยตอนบน 109
ศิลปชัย เสนารัตน์, วรรณีย์ จิรอังกูรสกุล,
ธีรกมล เพ็งสกุล, F. Gerald Plumley,
พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ, เจษฎ์ เกษตระทัต

Association analysis of candidate gene polymorphisms with egg production in Japanese quails (*Coturnix japonica*) 117
Ly Thi Thu Lan, Nguyen Thi Hong Nhan,
Dinh Thi Be Ngoc, Tran Trung Tin, Luu Huynh Anh,
Nguyen Hong Xuan, Nguyen Trong Ngu

Chiang Mai Veterinary Journal

Volume 15 No.2 May-August 2017
http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj/

CONTENS

Columnaris disease in fish 63
Jaturon Pongnumpai, Chanagun Chitmanat

The potential of antibacterial proteins for diagnosis and prevention of bovine mastitis 79
Pongphol Pongthaisong

A Case study: The slippery foreign body aspiration in a dog 89
Luddawon Somrup, Khuttiya Kompach, Wonvisa Srisawat, Areerath Akatvipatt

Seroprevalence and factors affecting brucellosis in goats in Chiang Mai Province 99
Doolyawat Kladkempetch, Nitisart Somtua, Raktham Maktrirat, Veerasak Punyapornwithaya, Anucha Sathanawongs

Brain histopathology and optic lobe atrophy of Short mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) in the Upper Gulf of Thailand 109
Sinlapachai Senarat, Wannee Jiraungkoorskul, Theerakamol Pengsakul, F. Gerald Plumley, Pisit Poolprasert, Jes Kettratad

Association analysis of candidate gene polymorphisms with egg production in Japanese quails (*Coturnix japonica*) 117
Ly Thi Thu Lan, Nguyen Thi Hong Nhan, Dinh Thi Be Ngoc, Tran Trung Tin, Luu Huynh Anh, Nguyen Hong Xuan, Nguyen Trong Ngu

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 63-78. DOI: 10.14456/cmvj.2017.6

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร
Chiang Mai Veterinary Journal
ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)
Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

โรคคอลัมนาริสในปลา

จาตุรนต์ ป้องน้ำไผ่ และ ชนกันต์ จิตมนัส *

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ *Flavobacterium columnare* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งยาว มีการรวมตัวกันเป็นลักษณะคล้ายกองฟางก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริส สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งปลาในแหล่งเลี้ยงเชิงพาณิชย์และปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จะมีแผลที่ผิวหนัง ครีบกร่อนและเหงือกเน่า มีอัตราการตายสูง การตรวจโรคจากอาการที่พบและลักษณะของแบคทีเรียจากบาดแผลโดยการทำสไลด์สด มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อเพื่อที่จะใช้ในการวิจัยและพัฒนาวัคซีน อย่างไรก็ตามการเกิดโรคคอลัมนาริส ไม่ใช่เกิดจาก *F. columnare* อย่างเดียว แต่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของตัวสัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมรอบตัว ปัจจุบันวิธีการป้องกันและรักษายังไม่มีประสิทธิภาพ การบริหารจัดการลูกพันธุ์ การลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินและน้ำ การจัดการระหว่างการเลี้ยงมีส่วนสำคัญในการป้องกันโรค

คำสำคัญ โรคปลา โรคคอลัมนาริส โรคเหงือกเน่า *Flavobacterium columnare*

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ชนกันต์ จิตมนัส คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
อีเมล์: chanagun1@hotmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 11 มีนาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 11 เมษายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 1 พฤษภาคม พ.ศ.2560*

Review article

Columnaris disease in fish

Jaturon Pongnumpai and Chanagun Chitmanat *

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290

Abstract *Flavobacterium columnare* is a long rod Gram negative bacterium with the haystack-like aggregation on wet mount specimen. It is the causative agent of columnaris disease. This bacterium brings about economic losses in both cultured and wild freshwater fish. Fish with *F. columnare* infection possibly result in skin lesions, fin erosion and gill necrosis, with a severe mortality. Diagnosis typically is based on clinical presentation and wet mount investigation. A culture medium has been modified to improve growth of *F. columnare* for research and vaccine development. However, a columnaris disease is not only caused by *F. columnare*, but the complex interactions between the environment and its host must take into account. At present, curative and preventive measures to combat this disease are not truly effective. Fingerling management, bacteria reduction in bottom ponds and water, good practices during rearing are important factors for this disease prevention.

Keywords; fish diseases, columnaris disease, gill rot disease, *Flavobacterium columnare*

* **Corresponding author**: Chanagun Chitmanat, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai
E-mail: chanagun1@hotmail.com

Article history; *received manuscript: 11 March 2017, accepted manuscript: 11 April 2017, published online: 1 May 2017*

บทนำ

Flavobacterium columnare เป็นเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์น้ำหลายชนิด บทความนี้เป็นการรวบรวมเรียบเรียงข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นมาของโรค ลักษณะของเชื้อและอาการของโรคคอลัมนาริส รวมทั้งการป้องกันรักษาโรค

ความเป็นมาของโรค

Davis (1922) ตรวจบาดแผลปลาที่เป็นโรคจากแม่น้ำมิสซิสซิปปีด้วยสไลด์สด (wet mount) แล้วพบแบคทีเรียแท่งยาว เคลื่อนที่ได้และมีการรวมกลุ่มเหมือนกองฟาง จึงตั้งชื่อแบคทีเรียว่า *Bacillus columnaris* โดยตั้งชื่อโรคว่า โรคคอลัมนาริส แต่ไม่สามารถเพาะเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ ต่อมา Ordal and Rucker (1944) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริสจากปลาแซลมอน *(Onchorhynchus nerka)* สำเร็จ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ๆ แบคทีเรียนี้จัดอยู่ในลำดับ (Order) Myxobacteria ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งยาว เคลื่อนที่แบบคืบคลานบนอาหารวุ้น และมีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Chondrococcus columnaris* ปีต่อมา Garnjobst (1945) จัดแบคทีเรียนี้ให้อยู่ในวงศ์ (Family) Cytophagaceae แล้วเปลี่ยนชื่อเป็น *Cytophaga Columnaris* หลังจากที่แยกปลาที่เป็นโรคแบคทีเรียที่รูปร่างคล้าย *Chondrococcus columnaris* แต่ไม่สร้างไมโครซีส (microcyst) Bernardet and Grimont (1989) ได้จัดกลุ่มแบคทีเรียใหม่แล้วให้อยู่สกุล (Genus) *Flexibacter* พร้อมทั้งเปลี่ยนชื่อเป็น *Flexibacter columnaris* ตั้งแต่ปี 1996 จนถึงปัจจุบันมีการเปลี่ยนชื่อแบคทีเรียนี้เป็น *Flavobacterium columnare* โดยใช้ข้อมูลทาง DNA-rRNA hybridization และองค์ประกอบของโปรตีนและกรดไขมัน (Bernardet *et al.*,1996)

ลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติทางเคมี

โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารจำเพาะ Cytophaga Agar มีลักษณะแบนและแผ่กระจายเป็นร่างแห ลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (ตารางที่ 1)

การระบาด

พบเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก โรคนี้ระบาดหนักในปลาที่อาศัยในเขตร้อน (Decostere *et al*., 1998; Morley and Lewis, 2010) โดยพบการติดเชื้อทั้งในปลาธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยง เช่น ปลา black mollies (*Poecilia sphenops*) (Decostere *et al*., 1998) ปลากดหลวง (Olivares-Fuster *et al*., 2011; Bullard *et al*.,2011; Darwish *et al*., 2012b; Thomas-Jinu and Goodwin, 2004) ปลาไหล (Kuo *et al*., 1981) ปลา golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) (Sink *et al*., 2007) ปลาคาร์พ (Tripathi *et al*., 2005) ปลาเทราท์ (Kunttu *et al*., 2011; Suomalainen *et al*., 2006; Suomalaien *et al* ,. 2005c; Kunttu *et al*., 2009), ปลานิล (Kuo *et al*., 1981) ปลาม้าลาย (Olivares-Fuster *et al*., 2011; Bullard *et al*., 2011) ปลากระโห้อินเดีย (*Catla catla) (*Sarker *et al*., 2017) ปลาซันฟิช (*sunfish*, *Lepomis* spp.) (Loch and Faisal, 2015) ปลากะพงเหลือง (*Yellow perch*, *Perca flavescens*) (Loch and Faisal, 2015)

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of *F. columnare*

Characteristic test	Results	Characteristic test	Results
Colony pigment on Shieh medium	yellow	**Acid production from:**	
Colony shape on Cytophaga agar	Flat,	Glucose (GLU)	–
	spreading	Mannitol (MAN)	–
	Rhizoidal	Inositol (INO)	–
	edges	Lactose (LAC)	–
Grams' stain	–	Sorbitol (SOR)	–
Morphology	Thin, long rods	Rhamnose (RHA)	–
Gliding Motility	+	Sucrose (SAC)	–
Oxidation-Fermentation (O/F)	– / –	Melibiose (MEL)	–
Sensitivity to O/129	+	Mannose	–
Production of:		Arabinose (ARA)	–
Cytochrome c oxidase	+	Amygdalin (AMY)	–
Catalase	+	**Degradation of:**	
Flexirubin-type pigment	+	Casein	+
Nitrate reduction	+	Gelatine (GEL)	+
Congo red adsorption	+	Starch	–
Beta-galactosidase (ONPG)	–	**Growth on:**	
Arginine dihydrolase (ADH)	–	Shieh agar (Tobramycin)	+
Lysine decarboxylase (LDC)	–	Shieh agar (Polymyxin and neomycin)	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	–	Trypticase soy agar	–
Urease production (URE)	–	Shotts_Waltman medium	–
Tryptophane deaminase (TDA)	–	0% NaCl	+
Indole (IND)	–	0.5% NaCl	+
Voges Proskauer reaction (VP)	–	1% NaCl	–
H_2S production	+	2% NaCl	–

(+): positive reaction; (-): negative reaction

(adapted from Bernardet and Bowman, 2006; Declercq *et al*., 2013a; Srisapoome and Nakharuthai, 2015; Sarker *et al*., 2017)

รวมทั้งมีการติดเชื้อในกบ เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สร้างความเสียหายให้กับการเลี้ยงปลากดหลวง (*Ictalurus punctatus*) ในประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นอันดับสองรองจากการติดเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* (Hawke and Thune, 1992; Wagner *et al*., 2002) โดยสร้างความเสียหายปีละ 30 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Shoemaker *et al*., 2011) สำหรับในประเทศไทยโรคเหงือกเน่า พบได้ตลอดปี แต่จะพบได้มากในช่วงมีอากาศแปรปรวน ในปี 2557 พบระบาดในปลานิลทั้งที่เลี้ยงในบ่อดินและในกระชัง ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม ปภาศิริ (2538) กล่าวว่า มักพบปัญหาโรคเหงือกเน่าช่วงที่มีการขนย้ายปลาในช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ปลาที่รอดตายจากการระบาดของโรคจะเป็นพาหะนำโรค (Suomalainen *et al*., 2005b) อย่างไรก็ตามเกษตรกรบางราย แจ้งว่า ลูกพันธุ์ปลานิลที่รอดตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ระหว่างการอนุบาลเมื่อนำมาเลี้ยงจะมีอัตรารอดที่สูง Fujihara and Nakatani

(1971) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่รอดตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถปล่อยเชื้อออกสู่แหล่งน้ำได้ถึง $5x10^3$ colony forming units/mL/h โดยเหงือกปลาที่เป็นโรคนี้เป็นแหล่งปล่อยเชื้อมากที่สุด ในขณะที่ปลาที่ตายจากโรคนี้สามารถแพร่เชื้อโรคได้มากกว่าปลาที่เป็นโรคและยังมีชีวิต (Kunttu *et al*., 2009) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแยกเอาปลาที่เป็นโรคและปลาตายออกจากแหล่งเลี้ยงโดยเร็วที่สุด

เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดในน้ำเป็นเวลานานมากน้อยขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของน้ำ Fijan (1969) กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดได้นาน 16 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในน้ำที่สารอินทรีย์เยอะและเป็นด่างสูง (Hard water) ในขณะที่น้ำอ่อน (Soft water) ซึ่งมี $CaCO_3$ปริมาณ 10 mg/L และมีสารอินทรีย์ต่ำ ไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียนี้ Straus *et al*. (2015) กล่าวว่า เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จะมีความสามารถในการยึดเกาะเหงือกได้น้อยลงในน้ำอ่อน Chowdhury and Wakabayashi (1990) กล่าวว่า แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และโซเดียมไอออน มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในน้ำ แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในน้ำจากทะเลสาบในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาอย่างน้อย 5 เดือน (Kunttu *et al*., 2012) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถอยู่รอดในโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วได้ (Bullock *et al*.,1986) เพราะโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วยังคงมีสารอาหารเพียงพอต่อเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งสามารถอยู่รอดได้นานกว่าในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การรอดตายในโคลนที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 5 องศาเซลเซียส (Declercq *et al*., 2013a) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถปรับเปลี่ยนความรุนแรงให้มีความรุนแรงน้อยลงได้ เพื่อประหยัดพลังงานเมื่ออยู่นอกโฮสต์หรือตัวสัตว์น้ำ (Kunttu *et al*., 2012) สายพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและคุณภาพน้ำของฟาร์มเลี้ยงปลา (Kunttu *et al*., 2012; Pulkkinen *et al*.,2010)

อาการ รอยโรค และการเกิดโรค

อาการ รอยโรค

เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มักจะส่งผลเสียต่อเหงือก ผิวหนังและครีบสัตว์น้ำ อาการของโรคคอลัมนาริส ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย Rucker *et al*. (1954) กล่าวว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ (low virulence) จะติดเชื้อได้ช้าและจะสร้างความเสียหายต่อเนื้อเยื่อก่อนจะทำให้ปลาตาย ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง (high virulence) ทำให้เกิดการติดเชื้ออย่างรวดเร็ว และสร้างความเสียหายในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ภายใน 12 – 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยปลาจะไม่แสดงอาการ แต่เนื้อเยื่อจะถูกทำลาย นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอายุของปลา โดยปลาวัยอ่อนมักจะเกิดโรคแบบเฉียบพลันทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็ว ส่วนปลาโตเต็มวัย อาจทำให้ปลาเป็นโรคทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และเรื้อรัง (subacute or chronic) ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายโดยเฉพาะบริเวณเหงือกที่ถูกทำลาย (Bernardet and Bowman, 2006; Decostere, 2001)

อาการแบบเรื้อรัง จะใช้ระยะเวลานานก่อนที่เหงือกปลาจะเน่าและเป็นแผลตามลำตัว (Bernardet and Bowman, 2006; Decostere, 2001) อาการเริ่มจากเป็นแผล สีลำตัวซีดจางลง ตกเลือดอย่างเห็นได้ชัด ครีบหลังกร่อน โดยเริ่มกร่อนจากโคนครีบไปยังปลายครีบ แผลเริ่มลามจากครีบหลัง เรียกว่า “saddle-back” โรคนี้จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “saddle-back disease” (Bernardet and Bowman, 2006) ปลาบางตัวมีอาการครีบเน่า (Finrot) (Decostere and Haesebrouck,

1999) บางตัวเกิดอาการอักเสบในเยื่อบุช่องปาก ทำให้ปากเปื่อย จึงเรียกว่า “cotton wool disease” หรือ “mouth fungus” (Bernardet and Bowman, 2006) โดยแผลที่ปากทำให้ปลาตายมากกว่าเป็นแผลที่ผิวหนัง เพราะปลาไม่อยากกินอาหาร และตายจากการขาดอาหาร การติดเชื้อนี้สามารถเกิดร่วมกับปรสิต เชื้อรา หรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Ferguson *et al*., 2006) แต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่า ปลาที่เป็นโรคเกิดจากการติดเชื้อเห็บระฆัง (*Trichodina* spp.) ทำให้เหงือกกร่อนแล้วเชื้อ *Flavobacterium columnare* เข้าแทรก หรือปลาติดเชื้อแบคทีเรียนี้ก่อนแล้วอ่อนแอ ทำให้เห็บระฆังเข้าเกาะ

Declercq *et al.* (2013b) กล่าวว่า ผิวหนังและเหงือกจะต้องเกิดการถลอกหรือเป็นแผลก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย ในวันแรกหลังจากที่ปลาเกิดการติดเชื้อเกิดการขยายตัวของเซลล์เหงือกที่ผิดปกติและมีเมือกเพิ่มขึ้น (Foscarini, 1989) การขยายตัวของซี่เหงือกไปติดกับซี่เหงือกที่อยู่ติดกัน เกิดการอุดตันทั่วซี่เหงือก เนื่องจากการสะสมของเลือด ทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เหงือกบวมและเกิดการอักเสบอย่างเห็นได้ชัด (Ferguson *et al*., 2006; Decostere *et al*., 1997) โรคคอลัมนาริสทำให้ปลาเกิดแผลเปื่อยลึกลงไปในชั้นผิวหนังและกล้ามเนื้อ การรวมตัวของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนังและเหงือกบริเวณบาดแผลมีลักษณะคล้ายกองฟาง (hay-stack-like) อัตราการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10 – 100%

การเกิดโรค

จากการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge) ในปลาคาร์พ พบว่า ปลาที่ติดเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงของเลือด โดยปริมาตรเซลล์อัดแน่น (packed cell volume, PCV) ความเข้มข้นของฮีโมโกบิน ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลง เกิดภาวะโซเดียมในเลือดต่ำ (Hyponatremia) ภาวะมีคลอไรด์ในเลือดต่ำ (Hypochloremia) และภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) ระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมลดลงเพียงเล็กน้อย ค่า Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) และ creatine kinase (CK) หลั่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Tripathi *et al*., 2005) การศึกษาทางโลหิตวิทยา ของ Rehulka and Minarik (2007) ในปลาเทราท์ (brook trout) ที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แบบเฉียบพลัน ซึ่งระบาดในธรรมชาติ พบว่า ปลามีอาการโรคโลหิตจาง (anemia) ระดับโปรตีนในเลือดลดลง ความเข้มข้นของ ALP ลดลง และภาวะน้ำตาลสูง

การวินิจฉัยโรค

สังเกตอาการ รอยโรค

การสุ่มตรวจโรคปลาเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคซึ่งจะนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา โดยเราสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จากแผลภายนอกของปลาป่วย เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ๆ แต่ไม่เจริญบนอาหาร trypticase soy agar (TSA), brain heart infusion (BHI), nutrient agar หรือ Marine 2216 agar (Bernardet and Bowman, 2006) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ถูกเพาะบนอาหาร Cytophaga agar สำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1944 ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารน้อย ตั้งแต่นั้นมาได้มีการปรับสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดรวมทั้ง Shieh (Shieh, 1980) และ TYES (Holt, 1987) ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แต่เชื้อแบคทีเรียนี้จะไม่เจริญบนสูตรอาหารที่มี NaCl มากกว่า 5% และมี pH ต่ำกว่า 6 (Bernardet and Bowman, 2006) และเจริญที่อุณหภูมิ 15 – 37 องศาเซลเซียส (Triyanto, 1999; Decostere *et al*., 1998) โดยเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส (Decostere *et al*.,

1998) กลูโคสไม่ได้ช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แบคทีเรียเจริญได้ดีเมื่อเขย่าด้วยเครื่อง shaker (Olivares-Fuster *et al*., 2011; Bullard *et al*., 2011; Tripathi *et al*., 2005; Arias *et al*., 2012) ต่อมามีการพัฒนาอาหารจำเพาะ (selective media) โดยอาศัยความแตกต่างของการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น polymyxin และ neomycin มาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียนี้ ออกจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (Bullock *et al*., 1986; Bernardet and Grimont, 1989) แต่ขัดแย้งกับ Gao *et al.* (2006) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีส่วนผสมของ neomycin ต่อมา Decostere *et al*. (1998) ได้เติม tobramycin 1 µg/mL ในอาหาร modified Shieh medium ทำให้เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ยิ่งขึ้น

การตรวจทางจุลชีววิทยา

ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *F. columnare* เจริญบนอาหารวุ้น (solid media) 2 แบบ คือโคโลนีเรียบ (smooth colony) และเจริญเป็นร่างแห (rhizoid colony) (Bader, 2005) อย่างไรก็ตาม Kunttu *et al*. (2011) พบการสร้างโคโลนีแบบขรุขระ (rough colony) สายพันธุ์ที่เจริญเป็นร่างแหมีความรุนแรงและสามารถยึดเกาะปานกลาง ส่วนที่สร้างโคโลนีขรุขระไม่มีความรุนแรงแต่มีสามารถยึดเกาะสูง สำหรับแบคทีเรียโคโลนีเรียบไม่มีความรุนแรงและการยึดเกาะไม่ดี (Kunttu *et al*., 2011) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* บางครั้งสามารถยึดเกาะแน่นบนอาหารวุ้น ในอาหารเหลว (broth) มีสีเหลือง เซลล์เป็นก้อนเส้นใยของเซลล์แบคทีเรีย สามารถสร้างแหวนหนาที่พื้นผิวขอบแก้ว (Decostere *et al*., 1998; Bernardet, 1989) ความสามารถในการยึดเกาะจะหายไป เมื่อต่อเชื้อ (subculture) หลายครั้ง ส่วนโคโลนีมีสีเหลือง เกิดจาก flexirubin pigments (Bernardet and Bowman, 2006)

การตรวจทางอณูชีววิทยา

สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้โดยการวิเคราะห์โปรตีน (Bernardet *et al*., 1996) การใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ *Hae* III ตัดแล้วแบ่งเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้เป็น 3 จีโนโมวา (genomovar) ตามความรุนแรงของเชื้อ (Triyanto, 1999) เทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) มีความละเอียดกว่า RFLP หากต้องการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Olivares-Fuster *et al*., 2007) ส่วน Polymerase chain reaction (PCR) ได้รับความสนใจ เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ขึ้นอยู่กับการเลือกเพิ่มจำนวนยีน 16S ribosomal RNA โดยใช้ species-specific primers (Darwish *et al*., 2004; Welker *et al*., 2005) เทคนิคนี้จะช่วยให้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้ในไม่กี่ชั่วโมง และลดความยุ่งยากในการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งบางครั้งอาจจะไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน (Darwish *et al*., 2004)

การตรวจทางซีรั่มวิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อนี้ สามารถใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (Shoemaker et al., 2003b) และวิธี fluorescent antibody test (Panangala *et al*., 2006; Speare *et al*., 1995) ทั้งสองได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพและรวดเร็ว สำหรับการวินิจฉัยโรคคอลัมนาริส เทคนิค A loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) สำหรับการตรวจสอบอย่างรวดเร็วของ *F. columnare* จากการติดเชื้อของอวัยวะ (เหงือก ผิวหนัง หัว และไต) ในปลากดหลวง มีรายงานว่า PCR ช่วยตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Darwish *et al*., 2004; Welker *et al*., 2005) ต่อมา Panangala *et al*. (2006) ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan-based real-time PCR เป้าหมาย 113 bp nucleotide ตำแหน่ง chondroitin

AC lyase ของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เทคนิค PCR นี้ มีความเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ ยิ่งไปกว่านั้น เทคนิค Real-time PCR-based มีข้อได้เปรียบอย่างเห็นได้ชัดมากกว่าเทคนิค PCR แบบเดิม เพราะไม่จำเป็นต้องทำ gel electrophoresis ดังนั้นจึงลดค่าใช้จ่าย เวลาและแรงงาน เทคนิค Length heterogeneity PCR (LH-PCR) เป็นการเปรียบเทียบความยาวที่แตกต่างกันของยีน 16S rDNA PCR products ระหว่างกลุ่มของแบคทีเรีย (Suzuki *et al*., 1998) โดย LH-PCR ได้พิสูจน์แล้วว่ายังมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลา (Suomalainen *et al*., 2005a) อันที่จริงโรคนี้สามารถสังเกตได้จากอาการของสัตว์น้ำที่เป็นโรคและการตรวจลักษณะของแบคทีเรียจากตัวอย่างสดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็เพียงพอ แต่สาเหตุเหนี่ยวนำอะไรที่ทำให้เชื้อนี้สร้างความเสียหายให้กับสัตว์น้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาแนวทางในการป้องกันโรค

ผลของสิ่งแวดล้อมต่อการติดเชื้อ

ผลกระทบของภาวะโลกร้อน ทำให้ปรสิตและเชื้อแบคทีเรียในปลาแต่ละชนิดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (Karvonen *et al*., 2010) เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อาจจะได้ประโยชน์จากภาวะโลกร้อนนี้ จึงทำให้โรคคอลัมนาริสระบาดมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Pulkkinen *et al*., 2010; Suomalainen *et al*., 2005c) ในปี 1975 Holt และคณะทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลาเทราท์ (steelhead trout, *Salmo gairdneri*) และปลาแซลมอน (*O. kisutch*) ที่อุณหภูมิน้ำ 12 – 20 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ โดยการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* กับเหงือกของสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงจะมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Decostere *et al*.,1999b) และ การทำงานของ chondroitin AC lyase activity ในเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ (Suomalainen *et al*., 2006) Suomalaien *et al*. (2005c) กล่าวว่า การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราท์ ที่อุณหภูมิสูง (23 องศาเซลเซียส) ทำให้ปลาเป็นโรคคอลัมนาริสและตาย ในขณะที่การเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (18 องศาเซลเซียส) ไม่ทำให้ปลาตาย แต่ยังคงทำให้ปลาเป็นโรคคอลัมนาริส

คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยการเกิดโรคคอลัมนาริส โดยโรคคอลัมนาริสมักจะเกิดหลังที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและคุณสมบัติของน้ำอย่างเฉียบพลันหลังฝนตก Decostere *et al*. (1999a) พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สูงขึ้นบริเวณเหงือก เมื่อมีปริมาณสารอินทรีย์และสารไนไตรต์ในน้ำสูง เนื่องจากสารอินทรีย์มีสารอาหารสำหรับแบคทีเรียและเอนไซม์สำหรับย่อยเนื้อเยื่อโฮสต์ Bandilla *et al*. (2006) กล่าวว่า การติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* พร้อมกับเห็บปลา (*Argulus coregoni*) ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกกับเชื้อในปลาเรนโบว์เทราท์ จะแสดงอาการของโรคเร็วกว่าและอัตราการตายสูงกว่า เมื่อเทียบกับการติดเชื้อชนิดเดียว Decostere *et al*. (1999a) รายงานว่า ปลาที่เลี้ยงในแหล่งน้ำนิ่งจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียตัวนี้มากกว่าปลาในแหล่งน้ำไหล โดยเขาตั้งสมมุติฐานว่าแบคทีเรียจะเข้ายึดเกาะเหงือกและผิวตัวปลาได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ ความเครียดของปลาที่เกิดจากความหนาแน่นและปริมาณแอมโมเนียในน้ำสูงจะเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำของการเกิดโรค (Decostere *et al*., 1998)

การป้องกันและรักษาโรค

การป้องกันโรคให้ผลดีกว่าการรักษา เกษตรกรจึงควรเลือกลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพ ระมัดระวังในการลากอวน คัดและขนส่งลูกพันธุ์ไปยังบ่อเลี้ยง Cunningham *et al*. (2012) กล่าวว่า วิธีการผลิต (ความลึกของบ่อ อัตราการปล่อย การให้อาหารและปริมาณแอมโมเนีย) มีความสัมพันธ์กับการระบาดของโรคคอลัมนาริส

Conrad *et al*.(1975) กล่าวว่า การบำบัดน้ำด้วยโอโซนสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* หรือการแช่อุปกรณ์ในน้ำที่เป็นกรดและที่มีความเค็มสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ปนเปื้อนได้ (Suomalainen *et al*., 2005b) Suomalainen *et al*. (2005c) รายงานว่า การลดความหนาแน่นของปลาที่เลี้ยง สามารถป้องกันโรคคอลัมนาริสได้ โดยความหนาแน่นในการเลี้ยงที่ลดลง สามารถลดการติดเชื้อปรสิตภายนอกซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ปริมาณไนไตรท์และสารอินทรีย์ที่สูงสามารถกระตุ้นการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Decostere *et al*., 1999a) จึงจำเป็นต้องควบคุมคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อและมีการบำบัดน้ำก่อนปล่อยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ

การป้องกัน

ในการทดลองความต้านทานโรคของปลากดหลวงและปลาทองด้วยการแช่ (immersion challenge) กับเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* พบว่า อัตราการตายของปลาลดลง เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น และไม่มีการตายเกิดขึ้น เมื่อมีความเค็มระหว่าง 3 – 9% (Altinok and Grizzle, 2001) Decostere *et al*. (1998) รายงานว่าเชื้อ *F. columnare* ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็ม 1% ซึ่งนำไปปรับเพื่อป้องกันโรคคอลัมนาริส โดย Davis (1922) กล่าวว่า การนำปลาไปแช่ในคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 37 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที หรือเติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในบ่อเลี้ยง การแช่ปลา 1 ครั้ง ในคอปเปอร์ซัลเฟต 1:2000 เป็นเวลา 1 – 2 นาที สามารถป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสได้ Darwish *et al*. (2009) รายงานว่า การใช้ด่างทับทิมปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถป้องกันโรคได้ การรักษาป้องกันโรคในปลากดหลวง โดยใช้ chloramine-T ช่วยลดการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จากร้อยละ 84 – 100 เหลือร้อยละ 6 – 14 (Riley, 2000) Thomas-Jinu and Goodwin (2004) ได้ใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ป้องกันโรค และลดการตายของปลากดหลวง แต่จากการศึกษาของ Declercq et al. (2013a) ชี้ว่า แบคทีเรีย *F. columnare* ร้อยละ 11 ดื้อยา oxytetracycline และร้อยละ 10 ดื้อยา enrofloxacin

การให้วัคซีนเป็นวิธีการป้องกันโรคคอลัมนาริส ซึ่งมีการใช้ในสัตว์น้ำเศรษฐกิจบางชนิด แต่ยังติดปัญหาเรื่องต้นทุนและผลที่ได้ยังไม่แน่นอน โดยการพัฒนาวัคซีนระยะแรกจะเตรียมมาจากเชื้อแบคทีเรียเชื้อตายที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน (formalin killed) หรือที่ได้ทำให้อ่อนกำลังลง และมักเรียกชื่อว่า แบคทีริน (bacterin) การสร้างภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อตายผสมกับแอนจูแวนท์ (formalin-killed sonicated cells in Freund's complete adjuvant) เข้าช่องท้อง สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ใน 2 สัปดาห์ โดยแอนติบอดีเพิ่มเป็น 3 เท่า ใน 10 สัปดาห์ สำหรับการฉีดครั้งที่ 2 (Grabowski *et al*., 2004) Bader *et al*. (1997) กล่าวว่า ฟอร์มาลินจะทำลายแอนติเจนที่มีความสำคัญทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง ต่อมามีการใช้ยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) เพื่อทำให้เชื้ออ่อนกำลังแล้วนำมาพัฒนาเป็นวัคซีน (Zhang *et al*., 2006) มีการขึ้นทะเบียนวัคซีนเชื้ออ่อนแรงแต่ยังมีชีวิตอยู่แบบแช่ (attenuated immersion vaccine) เพื่อใช้ป้องกันโรคปลากดหลวงที่สหรัฐอเมริกา (Shoemaker *et al*., 2011) ส่วนการใช้วัคซีนป้องกันโรคในปลานิลของไทย มีการใช้น้อยมาก เนื่องจากยังไม่เห็นผลที่แตกต่างชัดเจนระหว่างปลานิลที่ให้วัคซีนกับที่ไม่ได้ให้วัคซีน ความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียทำให้ยากในการพัฒนาวัคซีนเพื่อนำไปใช้ครอบคลุมทุกพื้นที่การเลี้ยง Shoemaker *et al*. (2007) ทดลองให้วัคซีนป้องกันโรคคอลัมนาริสพร้อมกับโรคเอ็ดเวิร์ด (Edwardsiellosis) ในระยะตั้งแต่ไข่ใกล้ฟักเป็นตัว (eyed-egg stage) โดยการแช่ ช่วยป้องกันโรคได้ มีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำวัยอ่อนและน่าจะเป็นวิธีการที่จะนำไปใช้ได้จริงในทางปฏิบัติ ไม่ต้องจับปลา

ฉีดแต่ละตัว โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์(outer membrane protein, OMP) จากเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ช่วยป้องกันโรคในปลากดอเมริกันและปลา Bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีน (Luo *et al*., 2016)

เหงือก เกล็ดและผิวหนังปลาจะเป็นปราการด่านแรกในการป้องกันโรค การให้อาหารเสริมภูมิคุ้มกันเป็นอีกทางหนึ่งของการป้องกันโรค มีการใช้พรีไบโอติกและโปรไบโอติกในการป้องกันโรคสัตว์น้ำหลายชนิด แต่งานวิจัยด้านการป้องกันโรคคอลัมนาริสมีน้อย Boutin *et al*.(2012) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียไม่ก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ จากผิวหนังปลาเทราท์ (*Salvelinus fontinalis*) พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ ส่วน Zhao *et al.* (2015) ทดลองใช้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์และผลผลิตที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อราร้อยละ 5-10 ให้ปลากดหลวง นาน 9 สัปดาห์ พบว่า ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้น มีการใช้บีตา-กลูแคน (β-glucan) และบีตา-ไฮดรอกซิล-บีตา-เมททิลบูไทเลท (β-hydroxy-β-methylbutyrate) ผสมอาหารให้ปลาเทร้าต์ พบว่าช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ไลโซไซม์ คอมพลีเมนต์) แต่ไม่ได้เพิ่มอัตรารอดหลังทดลองการต้านทานเชื้อ *F. columnare* (Challenge) (Kunttu *et al*., 2009)

การรักษา

การรักษาโรคคอลัมนาริสด้วยสารเคมีและยาปฏิชีวนะให้ผลที่แตกต่างกัน การรักษาภายนอกใช้ได้ผลในระยะเริ่มเป็นโรคและมีติดเชื้อภายนอกตัวปลา (Bullock *et al*., 1986) ยาที่มีประสิทธิภาพในการแช่ คือ oxolinic acid (Soltani *et al*., 1995) ส่วนยาปฏิชีวนะผสมอาหาร ที่ใช้ คือ oxytetracycline ผสมอาหารให้ปลากินเป็นเวลา 10 วัน ในช่วงแรกของการเป็นโรค (Bullock *et al*., 1986) แต่มีรายงานว่า การใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ผสมอาหารไม่ประสบผลสำเร็จ (Koski *et al*., 1993) อาจเนื่องจากปลาที่ติดเชื้อมีอาการรุนแรงจนไม่กินอาหาร ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides เช่น sulfamerazine และ sulfamethazine สามารถนำมาใช้ด้วยการให้กิน แต่จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่ายาชนิดอื่น (Bullock *et al*., 1986) Gaunt *et al*.(2010) แนะนำให้ใช้ florfenicol ผสมอาหารให้ปลากดหลวงกิน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม นาน 10 วัน เมื่อปลาเป็นโรคคอลัมนาริส Darwish *et al*.(2012a) ใช้ florfenicol ใช้ป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในปลา Sunshine bass (hybrid striped bass, *Morone chrysops* female × *Morone saxatilis* male) การใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากเกินไป จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ดื้อยาปฏิชีวนะ (Shoemaker *et al*., 2011) รวมทั้งอาจจะทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้ในหลังรับประทานปลา (Serrano, 2005) เกิดความเสี่ยงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมลักษณะดื้อยาไปสู่แบคทีเรียในมนุษย์และสิ่งแวดล้อม Thomas-Jinu and Goodwin (2004) ใช้สารกำจัดวัชพืชไดควอท (Diquat) ลดการตายของปลากดหลวง มีการใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate) (Davis,1922) และด่างทับทิม (potassium permanganate) (Rogers, 1971) ในการรักษาและป้องกันโรคคอลัมนาริสของปลาที่เลี้ยงในบ่อ Xu *et al*. (2015) รายงานว่า การใช้ฟอร์มาลินฆ่าเชื้อเห็บระฆังช่วยลดปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อย่างไรก็ตามสารอินทรีย์ในน้ำมีผลต่อประสิทธิภาพของฟอร์มาลินและด่างทับทิม มีการใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) ในควบคุมเชื้อแบคทีเรียเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการป้องกันโรคระบาดในสัตว์น้ำ Laanto *et al.* (2011) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. phage lysates สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Prasad *et al.* (2011) ได้ใช้ *F. columnare* phage FCP1 รักษาโรคคอลัมนาริสในปลาดุกด้าน (*Claries batrachus*) ทำให้รอยโรคหายไป ซึ่งวิธีการนี้อาจจะเป็นวิธีการในการ

ลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามควรจะคัดกรองเฟจที่ใช้ว่า ไม่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะหรือยีนสร้างสารพิษ

สรุป

โรคคอลัมนาริสเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อม บนผิวและเนื้อเยื่อเหงือกปลา แต่ปัจจัยแวดล้อมและความแตกต่างของพันธุกรรมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* มีผลต่อความรุนแรงของการเกิดโรค ความยุ่งยากในการเตรียมเชื้อและความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในแต่ละงานวิจัยทำให้ยากที่จะนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรค การเตรียมบ่อ การจัดหาลูกพันธุ์ที่ดี ปรับความหนาแน่นของปลาและควบคุมคุณภาพน้ำเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการควบคุมโรคคอลัมนาริส นอกจากนั้น วัคซีน ยา สารเคมี พรีไบโอติกและโปรไบโอติกมีส่วนช่วยในการป้องกันและควบคุมโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร ศิษย์ก้นกุฎิ บัณฑิตวิทยาลัย คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนและสถานที่ทำการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Altinok, I., Grizzle, J., 2001. Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection of euryhaline and freshwater stenohaline fish. J Fish Dis. 24, 361-367.

Arias, C.R., Cai, W., Peatman, E., Bullard, S.A., 2012. Catfish hybrid *Ictalurus punctatus*× *I. furcatus* exhibits higher resistance to columnaris disease than the parental species. Dis. Aquat. Org. 100, 77-81.

Bader, J., Klesius, P.H., Vinitnantharat, S., 1997. Comparison of whole-cell antigens of pressure- and formalin-killed *Flexibacter columnaris* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Am J Veter Res. 58, 985 - 958.

Bader, J., Shoemaker, C., Klesius, P., 2005. Production, characterization and evaluation of virulence of an adhesion defective mutant of *Flavobacterium columnare* produced by β-lactam selection. Lett. Appl. Microbiol. 40, 123-127.

Bandilla, M., Valtonen, E., Suomalainen, L.-R., Aphalo, P., Hakalahti, T., 2006. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. Int. J. Parasitol. 36, 987-991.

Bernardet, J.F., Bowman, J.P., 2006. The genus Flavobacterium, In:The prokaryotes. Springer, 481-531.

Bernardet, J.F., Grimont, P.A., 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 39, 346-354.

Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus Flavobacterium, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of Flavobacterium hydatis nom. nov.(basonym, Cytophaga aquatilis Strohl and Tait 1978). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 46, 128-148.

Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., Derôme, N., 2012. Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. Vet. Microbiol. 155, 355-361.

Bullard, S.A., McElwain, A., Arias, C.R., 2011. Scanning electron microscopy of "saddleback" lesions associated with experimental infections of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Siluriformes: Ictaluridae), and zebrafish, *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae). J World Aquac Soc. 42, 906-913.

Bullock, G., Hsu, T.C., Shotts Jr, E., 1986. Columnaris disease of fishes. US Fish & Wildlife Publications, Lincoln.

Chowdhury, M., Wakabayashi, H., 1990. Survival of four major bacterial fish pathogens in different types of experimental water [in Japan]. Banglad J Microbiol. (Bangladesh).

Conrad, J., Holt, R., Kreps, T., 1975. Ozone disinfection of flowing water. The Progressive Fish-Culturist 37, 134-136.

Cunningham, F.L., Jack, S.W., Hardin, D., Wills, R.W., 2012. Pond-Level risk factors associated with columnaris disease on Mississippi commercial catfish farms. J. Aquat. Anim. Health. 24, 178-184.

Darwish, A., Bebak, J., Schrader, K., 2012a., Assessment of Aquaflor®, copper sulphate and potassium permanganate for control of *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection in sunshine bass, *Morone chrysops* female× *Morone saxatilis* male. J Fish Dis. 35, 637-647.

Darwish, A.M., Mitchell, A., Straus, D.L., 2012b. Evaluation of a 4-h static copper sulphate treatment against experimental infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquac. Res. 43, 688-695.

Darwish, A., Mitchell, A., Straus, D., 2009. Evaluation of potassium permanganate against an experimental subacute infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J Fish Dis. 32, 193-199.

Darwish, A.M., Ismaiel, A.A., Newton, J.C., Tang, J., 2004. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. Mol. Cell. Probes. 18, 421-427.

Davis, H.S., 1922. A new bacterial disease of fresh-water fishes. By H.S. Davis., United States Bureau of fisheries.Doc. 924. Government Printing Office., Washington.

Declercq, A., Boyen, F., den Broeck, W., Bossier, P., Karsi, A., Haesebrouck, F., Decostere, A., 2013a. Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. J Fish Dis. 36, 45-55.

Declercq, A., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P., Decostere, A., 2013b. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Vet. Res. 44, 27 - 43.

Decostere, A., 2001. *Flavobacterium columnare* infections in fish: the agent and its adhesion to the gill tissue. Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België 64, 421-430.

Decostere, A., Haesebrouck, F., 1999. Outbreak of columnaris disease in tronical aquarium fish. Vet. Rec. 144, 23-24.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Charlier, G., Ducatelle, R., 1999a. The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*). Vet. Microbiol. 67, 287-298.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Van Driessche, E., Charlier, G., Ducatelle, R., 1999b. Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter*

columnaris) to gill tissue. J Fish Dis. 22, 465-474.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L., 1997. Development of a medium for the selective isolation of *Flavobacterium columnare* from diseased fish. J Clin Microbiol 35, 322-324.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L., 1998. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. Vet. Microbiol. 62, 35-45.

Ferguson, H., Bjerkas, E., Evensen, O., 2006. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissue Responses in Teleosts, and Their Responses in Disease, 2nd ed. Scotian Press, London.191-214.

Fijan, N.N., 1969. Antibiotic additives for the isolation of *Chondrococcus columnaris* from fish. Appl. Microbiol. 17, 333.

Foscarini, R., 1989. Induction and development of bacterial gill disease in the eel (*Anguilla japonica*) experimentally infected with *Flexibacter columnaris*: pathological changes in the gill vascular structure and in cardiac performance. Aquac. 78, 1-20.

Fujihara, M., Nakatani, R., 1971. Antibody production and immune responses of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. Journal of the Fisheries Board of Canada. 28,1253-1258.

Gao, D.X., Gaunt, P.S., 2016. Development of new G media for culture of *Flavobacterium columnare* and comparison with other media. Aquac. 463, 113 – 122

Garnjobst, L., 1945. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: a myxobacterium pathogenic to fish. J. Bacteriol. 49, 113.

Gaunt, P.S., Gao, D., Sun, F., Endris, R., 2010. Efficacy of florfenicol for control of mortality caused by *Flavobacterium columnare* infection in channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 22, 115-122.

Grabowski, L., LaPatra, S., Cain, K., 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. J Fish Dis. 27, 573-581.

Hawke, J.P., Thune, R.L., 1992. Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 4, 109-113.

Holt, R., Sanders, J., Zinn, J., Fryer, J., Pilcher, K., 1975. Relation of water temperature to *Flexibacter columnaris* infection in steelhead trout (*Salmo gairdneri*), coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*O. tshawytscha*) salmon. Journal of the Fisheries Board of Canada 32, 1553-1559.

Holt, R.A., 1987. Cytophaga psychrophila, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. Dissertation Abstracts International, B (Sciences and Engineering). 49, 605.

Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., Valtonen, E.T., 2010. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: climate change increases the risk of some, but not all, diseases. Int. J. Parasitol. 40, 1483-1488.

Koski P, Hirvelä-Koski V, Bernardet JF. 1993. Flexibacter columnaris infection in arctic char (*Salvelinus alpinus* (L.)). First isolation in Finland. Bull Eur Ass Fish Pathol. 31, 66–69.

Kou, S., Chung, H., Kou, G., 1981. Studies of artificial infection of the gliding bacteria in cultured fish. Fish Pathol. 15, 309-314.

Kunttu, H., Jokinen, E., Valtonen, E., Sundberg, L.R., 2011. Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. J. Appl. Microbiol. 111, 1319-1326.

Kunttu, H.M., Sundberg, L.R., Pulkkinen, K., Valtonen, E.T., 2012. Environment may be the source of

Flavobacterium columnare outbreaks at fish farms. Environ Microbiol Rep. 4, 398-402.

Kunttu, H.M., Valtonen, E.T., Jokinen, E.I., Suomalainen, L.R., 2009. Saprophytism of a fish pathogen as a transmission strategy. Epidemics 1, 96-100.

Laanto, E., Sundberg, L.-R., Bamford, J.K.H., 2011. Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7868–7872.

Loch, T.P., Faisal, M., 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. J Adv Res. 6, 283 - 300.

Luo, Z., Fu, J., Li, N., Liu, Z., Qin, T., Zhang, X., Nie, P., 2016. Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. Aquaculture and Fisheries 1, 1 - 8.

Morley, N., Lewis, J., 2010. Consequences of an outbreak of columnaris disease (*Flavobacterium columnare*) to the helminth fauna of perch (*Perca fluviatilis*) in the Queen Mary reservoir, south-east England. J. Helminthol. 84, 186-192.

Olivares-Fuster, O., Baker, J.L., Terhune, J.S., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Arias, C.R., 2007. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. Syst. Appl. Microbiol. 30, 624-633.

Olivares-Fuster, O., Bullard, S.A., McElwain, A., Llosa, M.J., Arias, C.R., 2011. Adhesion dynamics of *Flavobacterium columnare* to channel catfish *Ictalurus punctatus* and zebrafish *Danio rerio* after immersion challenge. Dis. Aquat. Org. 96, 221-227.

Ordal, E.J., Rucker, R.R., 1944. Pathogenic myxobacteria. Experimental Biology and Medicine 56, 15-18.

Panangala, V.S., Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Mitra, A., Morrison, E.E., 2006. Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. Dis. Aquat. Org. 68, 197-207.

Prasad, Y., Arpana, null, Kumar, D., Sharma, A.K., 2011. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, Clarias batrachus (Linn.) from columnaris disease. J Environ Biol 32, 161–168.

Pulkkinen, K., Suomalainen, L.-R., Read, A., Ebert, D., Rintamäki, P., Valtonen, E., 2010. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. Proc R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 277, 593-600.

Rehulka, J., Minarík, B., 2007. Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease. Aquac. Res. 38, 1182-1197.

Riley, T.A., 2000. Treatment of *Flavobacterium columnare* and toxicity of chloramine-T in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Thesis (M.S.)--Auburn University, Auburn, Alabama.

Rogers, W.A., 1971. Principal diseases of catfish: how to identify and fight them. Fish Farming Ind,

Rucker, R.R., Earp, B.J., Ordal, E.J., 1954. Infectious diseases of Pacific salmon. Trans. Am. Fish. Soc. 83, 297-312.

Sarker, S., Abraham, T.J., Banerjee, S., Adikesavalu, H., Patra, A. 2017. Characterization, virulence and pathology of *Flavobacterium* sp. KG3 associated with gill rot in carp, *Catla catla* (Ham.). Aquac. 468, 579 - 584.

Serrano, P.H., Nations, F. and A.O. of the U., 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Food & Agriculture Org, Rome.

Shieh, H., 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, Flexibacter columnaris. Microbios Letters 13, 129-133.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Drennan, J.D., Evans, J.J., 2011. Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. Fish Shellfish Immunol. 30, 304-308.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Evans, J.J., 2007. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent

Flavobacterium columnare vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. Vaccine 25, 1126-1131.

Shoemaker, C.A., Shelby, R.A., Klesius, P.H., 2003b. Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Flavobacterium columnare* infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J App Aquac. 14, 43-52.

Sink, T.D., Lochmann, R.T., Goodwin, A.E., Marecaux, E., 2007. Mortality rates in golden shiners fed high-fat diets with or without a dairy-yeast prebiotic before challenge with *Flavobacterium columnare*. N Am J Aquac. 69, 305-308.

Soltani, M., Shanker, S., Munday, B., 1995. Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. J Fish Dis. 18, 555-565.

Speare, D.J., Markham, R., Despres, B., Whitman, K., MacNair, N., 1995. Examination of gills from salmonids with bacterial gill disease using monoclonal antibody probes for *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris*. J. Vet. Diagn. Invest. 7, 500-505.

Srisapoome, P., Nakharuthai C., 2015. Isolation and identification of causative bacteria of columnaris disease in cultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. Fish Sci J. 1-2, 78 - 100.

Straus, D.L., Farmer, B.D., Beck, B.H., Bosworth, B.G., Torrans, E.L., Tucker, C.S., 2015. Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. Aquaculture 435, 252 - 256.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005a. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. Dis. Aquat. Org. 63, 61-68.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005b. Treatment of columnaris disease of rainbow trout: low pH and salt as possible tools? Dis. Aquat. Org. 65, 115-120.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2005c. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis. 28, 271-277.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M., Valtonen, E., 2006. Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. J Fish Dis. 29, 757-763.

Suzuki, M., Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4522-4529.

Thomas-Jinu, S., Goodwin, A., 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. J Fish Dis. 27, 23-28.

Tripathi, N.K., Latimer, K.S., Gregory, C.R., Ritchie, B.W., Wooley, R.E., Walker, R.L., 2005. Development and evaluation of an experimental model of cutaneous columnaris disease in koi *Cyprinus carpio*. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 45-54.

Triyanto, W.H., 1999. Genotypic Diversity of Strains of *Flavobacterium columnare* from Diseased Fishes. Fish Pathol. 34, 65-71.

Wagner, B.A., Wise, D.J., Khoo, L.H., Terhune, J.S., 2002. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 14, 263-272.

Welker, T.L., Shoemaker, C.A., Arias, C.R., Klesius, P.H., 2005. Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Dis. Aquat. Org. 63, 129-138.

Xu, D.-H., Shoemaker, C.A., Zhang, D., 2015. Treatment of *Trichodina* sp reduced load of *Flavobacterium*

columnare and improved survival of hybrid tilapia. Aquaculture Reports. 2, 126-131.

Zhao, H., Li, C., Beck, B.H., Zhang, R., Thongda, W., Davis, D.A., Peatman, E., 2015. Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. Fish & shellfish immunology. 46, 624-637.

Zhang, Y., Arias, C.R., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2006. Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between *Flavobacterium columnare* strains from different genomovars. J Fish Dis 29, 657 - 663.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 63-78. DOI: 10.14456/cmvj.2017.7

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร
Chiang Mai Veterinary Journal
ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)
Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

ศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อการวินิจฉัยและป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

ปองพล พงไธสงค์

หน่วยวิจัยสุขภาพเต้านมและน้ำนมคุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ โปรตีนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียรวมถึงเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโค เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้ามาที่เต้านม โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียจะทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อทั้งทางตรงด้วยการทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียฉีกขาดเสียหายด้วยกลไกต่างๆขึ้นกับชนิดของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียหรืออาจผ่านการทำงานทางอ้อมสนับสนุนขบวนการของระบบภูมิคุ้มกัน ข้อมูลที่ได้จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการกระตุ้นจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกันส่งผลต่อการรับรู้จากเซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกันไปด้วย นอกจากนี้งานวิจัยจำนวนมากยังชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนและความรุนแรงของโรคเต้านมอักเสบ ดังนั้นบทความปริทัศน์นี้จึงเขียนขึ้นเพื่อนำเสนอผลงานวิจัยใหม่ที่แสดงถึงศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อการวินิจฉัยและการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม ข้อมูลของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวอาจช่วยพัฒนาแนวทางสำคัญในการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันโรคเต้านมอักเสบในอนาคตและท้ายสุดคือช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

คำสำคัญ แบคทีเรีย สุขภาพเต้านม ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โคนม

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ปองพล พงไธสงค์ หน่วยวิจัยสุขภาพเต้านมและน้ำนมคุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000 โทรศัพท์ 043-742823 โทรสาร043-742823 อีเมล์: pongphol.p@msu.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 25 มีนาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 15 พฤษภาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 22 พฤษภาคม พ.ศ.2560*

Review article

The potential of antibacterial proteins for diagnosis and prevention of bovine mastitis

Pongphol Pongthaisong

Udder Health and Milk Quality Research Unit,

Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Talad, Muang, Mahasarakham 44000

Abstract Antibacterial proteins are the proteins that able to act against bacteria and bovine mastitis pathogens. While the bacteria are invading in mammary gland, antibacterial proteins will eliminate in direct or indirect actions. Firstly, they kill by being the causes of the bacterial cell wall rupture via various mechanisms. Secondly, indirect kill by facilitate the host immune responses. According to literature review, it is indicated that different structural cell wall of the bacteria stimulate different responses of mammary gland including mammary epithelium and white blood cell recognition. This difference resulted in divergent antibacterial protein expression. In addition, several reports showed the relationship of the antibacterial protein amount and the severity of bovine mastitis. Therefore, this review proposes recent evidences indicating the potential of antibacterial proteins for diagnosis and prevention of bovine mastitis. Knowledge about these proteins may be important in developing effective diagnostic approaches and lead to the further mastitis prevention, and finally reduced antibiotic usage.

Keywords: bacteria, udder health, non-specific immunity, dairy cattle

* **Corresponding author**: Pongphol Pongthaisong, Udder health and milk quality research unit, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Nakhonsawan road, Talad, Muang, Mahasarakham, 44000, Tel. 043-742823, Fax. 043-742823, E-mail: pongphol.p@msu.ac.th

Article history; *received manuscript: 25 March 2017, accepted manuscript: 15 May 2017, published online: 22 May 2017*

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งในวงการการเลี้ยงโคนมทั่วโลก ในประเทศสหรัฐอเมริกาในฐานะประเทศชั้นนำด้านการผลิตน้ำนมดิบมีรายงานความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรคเต้านมอักเสบสูงถึง 2,000 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ซึ่งความสูญเสียที่มากมายนี้ประมาณร้อยละ 54.9 เป็นผลมาจากเนื้อเยื่อเต้านมเสียหายจากการถูกเชื้อแบคทีเรียทำลายทำให้ความสามารถในการผลิตน้ำนมลดลง (Guimaraes et al., 2017) นอกจากนี้ความสูญเสียทางเศรษฐกิจยังรวมถึงค่าใช้จ่ายจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติที่ใช้ในการแก้ปัญหาโรคเต้านมอักเสบ การใช้ยาปฏิชีวนะยังอาจส่งผลสืบเนื่องให้เกิดปัญหายาตกค้างในน้ำนมและปัญหาเชื้อดื้อยาได้ในภายหลัง ทั้งนี้ Leelahapongsathon et al. (2014) ได้รายงานทางระบาดวิทยาของของโรคเต้านมอักเสบในประเทศไทยว่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบที่เป็นปัญหาหลัก ได้แก่กลุ่ม Streptoccocci (16.7%), *Streptococcus uberis* (9.4%), *Streptococcus agalactiae* (7.1%) และ *Streptococcus* dysgalactiae (4.0%) ซึ่งเชื้อชนิด *Streptococcus uberis* เริ่มมีความดื้อยาปฏิชีวนะ (Suriyasathaporn, 2011) ดังนั้นจึงควรมีแนวทางอื่นๆ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น การใช้สารเคมีเคลือบปลายเต้านม การใช้วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ และการเพิ่มศักยภาพของกลไกการป้องกันการติดเชื้อภายในเต้านมเอง

กลไกการป้องกันการติดเชื้อภายในเต้านมนอกเหนือจากการใช้โครงสร้างทางกายภาพเป็นด่านป้องกันการติดเชื้อ เช่น กล้ามเนื้อหูรูดของหัวนม (teat sphincter) และ คลองหัวนม (teat canal) ภายในเต้านมยังสามารถหลั่งสารโปรตีนซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อที่รุกรานเข้าสู่เต้านม โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เหล่านี้ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อที่บุกรุกเข้ามาตามพื้นผิวเยื่อบุเนื้อเยื่อเต้านมซึ่งการทำงานของ มีทั้งการกำจัดเชื้อโดยตรง และการกำจัดเชื้อให้หมดไปทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Hancock and Sahl, 2006) การศึกษาการตอบสนองของเต้านมต่อการเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ของเชื้อ *E.coli* โดย Boehmer et al. (2008) พบการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันกลุ่ม transthyretin และ complement C3 precursor อีกทั้งยังได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า พบโปรตีน acute phase protein **α**-1-acid glycoprotein อีกทั้งพบการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น cathelicidin, indolicidin, bactenectin, **α**-2-HS-glycoprotein, S100A12 และ **α**-1-antiproteinase เป็นต้น เมื่อมีเชื้อจุลชีพบุกรุกเข้าไปในเต้านม การตอบสนองของเต้านมจะเกิดขึ้นเห็นได้จากการเพิ่มปริมาณโซมาติกเซลล์ (Somatic cell count; SCC) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาและส่งมายังเต้านมเพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพที่บุกรุก ปริมาณโซมาติกเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในน้ำนมเป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อในเต้านมจึงเป็นประโยชน์ในการประเมินสุขภาพเต้านมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการนอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ยังพบการตอบสนองในระดับโปรตีนโดยพบมีโปรตีนในน้ำนม (milk proteins) อยู่หลายชนิด

แม้ว่าภายในเต้านมมีการสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ยังคงพบว่าโอกาสในการเกิดเต้านมอักเสบในโคนมมีแตกต่างกันไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคนมอาจมีคุณสมบัติด้านความไวในการเกิดโรค (susceptibility) หรือ ความต้านทานโรค (resistance) ได้แตกต่างกัน คุณสมบัติดังกล่าวนี้อาจสัมพันธ์กับกลไกการตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่มีอยู่ในเต้านม (Hogarth et al., 2004, Smolenski et al., 2007) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ภายในเต้านมจึงอาจเป็นจุดเริ่มต้นของแนวทางการควบคุมโรคเต้านมอักเสบแบบไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ และโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่พบอาจมีประโยชน์ในแง่เครื่องมือช่วยวินิจฉัยการเกิด

เต้านมอักเสบได้ (Almeida et al., 2015) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของบทความฉบับนี้ จึงเป็นการเพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่โคสร้างขึ้นเพื่อการวินิจฉัยและการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากร่างกายสิ่งมีชีวิตเพื่อทำหน้าที่ในการปกป้องตัวมันเองจากการบุกรุกของเชื้อจุลชีพที่จะเข้ามาก่ออันตราย และเนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นในการกำจัดเชื้อจุลชีพจึงอาจเรียกโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial proteins /peptides) แหล่งสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีอยู่ 2 แหล่งคือ 1) เซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ 2) เซลล์เยื่อบุต่างๆ ที่มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อที่บุกรุกเข้ามาในเต้านมโค เซลล์เยื่อบุในส่วนต่างๆของโครงสร้างเต้านม รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มายังเต้านมเป็นแหล่งสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน ซึ่งในน้ำนมโคพบโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดและสามารถจำแนกกลุ่มของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียตามรูปแบบการทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อจุลชีพตาม Sima et al. (2003) เป็น 3 กลุ่มดังนี้ เช่น 1) กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) 2) กลุ่มที่แย่งจับกับธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น แลคโตเฟอริน (lactoferrin) 3) กลุ่มที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเสียสภาพไป เช่น defensin, cathelicidin เป็นต้น ทั้ง 3 กลุ่มนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทการกำจัดเชื้อโดยตรง อย่างไรก็ตามนอกจากหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโดยตรงด้วยรูปแบบต่างๆ ดังที่ Sima et al. (2003) กล่าวไว้แล้ว ยังพบว่า โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ยังช่วยการกำจัดเชื้อให้หมดไปทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล โมโนไซต์ และลิมโฟไซต์ ซึ่งมีบทบาทการกำจัดเชื้อโดยตรงโดยการทำลายสภาพของเซลล์และกำจัดเชื้อผ่านการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยการทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเรียกเซลล์เหล่านี้เข้ามายังบริเวณที่มีการบุกรุกและกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกันทำการกำจัดเชื้อ (Hancock and Sahl, 2006)

กลไกการทำงานของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียในการตอบสนองต่อการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมโค

การตอบสนองของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อเพื่อให้การกำจัดเชื้อภายในเต้านมหมดไปภายในระยะเวลาอันสั้น โดยมีขั้นตอนการทำงานแบบด้านการตรวจจับ (sensing arm) และด้านการตอบสนอง (effector arm) โดยตัวรับ (receptors) ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุเต้านมทำหน้าที่ในการรับรู้ว่ามีเชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้ามาในเต้านม ตัวอย่างตัวรับ เช่น Toll-like receptor (TLRs) ในเต้านมโคมักถูกรายงานชนิดของ TLR 2 ชนิด คือ TLR2 และ TLR4 โดย TLR2 ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ TLR4 ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จากความแตกต่างของตัว TLR นี้เองทำให้การตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน

TLR ที่ ปรากฏอยู่บนเซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจรับรู้ (recognize) การมีอยู่ของเชื้อโดยการตรวจสอบโมเลกุลจำเพาะที่อยู่บนผิวของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เรียกว่า pathogen associated molecular patterns (PAMP) หลังจากการรับรู้ PAMP ด้วย TLR แล้วส่วนของ effector arm จะเริ่มทำงานโดยกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ (signaling cascade) คือ nuclear factor **κ**B (NF**κ**B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ไปควบคุมการแสดงออก

ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ proinflammatory cytokines และ chemokines ทำให้เซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจหลั่ง proinflammatory cytokines และ chemokines ซึ่งได้แก่ tumor necrosis factor-α, IL-1β, และ IL-6 เพื่อส่งสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเข้ามายังบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียปรากฏอยู่ในเยื่อบุเต้านม (Oviedo-Boyso et al., 2007) ผลที่ตามมาคือ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น แลคโตเฟอริน β-defensin, cathelicidins, และไลโซไซม์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การศึกษาในโคนมในวันคลอดของ Crookenden et al. (2016) พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมีการแสดงออกของยีน BDBD4, BEFB10 และDEFB1เพิ่มมากขึ้นโดยยีนเหล่านี้ล้วนเป็นยีนที่สำคัญต่อการสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม β-defensin ซึ่งคาดหมายได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เหล่านี้เป็นไปเพื่อการกำจัดเชื้อออกจากเยื่อบุเต้านม การรับรู้และตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อตามโมเดลดังกล่าวและทำให้มีโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Boehmer et al. (2008) ที่พบว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำให้โคติดเชื้อ *E. coli* จะมีการแสดงออกของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมเพิ่มขึ้นซึ่งได้แก่ cyclic dodecapeptide (cathelicidin-1), indolicidin (cathelicidin-4), bactenecin-5 (cathelicidin-2), และ bactenecin-7(cathelicidin-3) นอกจากโคนมแล้วยังมีรายงานในสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นอีกที่แสดงให้เห็นว่า cathelicidin สามารถเหนี่ยวนำให้แสดงออกเพิ่มขึ้นได้จากการกระตุ้นของ lipopolysaccharide ในแพะจะพบการเพิ่มขึ้นของ cathelicidin ภายใน4 ชั่วโมงหลังจากที่เต้านมแพะได้รับการฉีด lipopolysaccharide เข้าไป

การทำหน้าที่กำจัดเชื้อของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียตามที่ได้กล่าวมาในเบื้องต้นว่ามี 2 แบบ คือ การกำจัดเชื้อโดยตรงและการทำงานทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ในการกำจัดเชื้อโดยตรงโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีกลไกการทำงานเป็น 3 กลุ่ม คือ

1) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ เช่น โปรตีนไลโซไซม์ทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วยการจับกับ peptidoglycans ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวก แล้วเกิดการ hydrolysis ของพันธะ glycosidic bond ของ peptidoglycans ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายและเชื้อถูกทำลายไป สำหรับแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ไม่ได้มี peptidoglycans เป็นองค์ประกอบหลัก การทำงานของไลโซไซม์ในการกำจัดเชื้อจึงไม่ได้ผลดี (Levy, 2000)

2) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่แย่งจับกับธาตุที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น การทำงานของโปรตีนแลคโตเฟอรินจะแย่งจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{2+}, Fe^{3+}) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีพของแบคทีเรียจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ นอกจากนี้แลคโตเฟอริน ยังมีหน้าที่ในการทำลายเชื้อแบบที่ไม่ขึ้นกับเหล็ก (Iron-independent killing) ได้ กล่าวคือ เมื่อ แลคโตเฟอริน จับกับส่วนที่เป็น lipoteichoic acid ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะทำให้ประจุของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไปส่งผลดึงดูดให้โมเลกุลอื่นเช่นโปรตีนไลโซไซม์เข้ามาทำลายเชื้อที่บุกรุก และหากแลคโตเฟอริจับกับผนังเซลล์ของเชื้อแกรมลบจะอาศัยความมีความเป็นประจุบวกของแลคโตเฟอรินผลักกับประจุบวก (Ca^{2+} หรือ Mg^{2+}) ที่ฝังอยู่ที่ผนังเซลล์เชื้อแกรมลบส่งผลให้ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์หลุดออกไปเมื่อเกิดการผลักกันของประจุบวกดังกล่าวและเกิดการเสียสภาพและเซลล์แบคทีเรียแตกในที่สุด (Gonzalez-Chavez et al, 2009)

3) เปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อเสียสภาพไปโดยตรง เช่น defensin และ cathelicidin ซึ่ง Brogden (2005) ได้เสนอแนวคิดที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับกลไก

การทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ดังนี้ 1) Attraction คือ การจับกันของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยแรงดึงดูด (electrostatic) ระหว่างประจุของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรีย 2) Attachment คือขั้นตอนของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการผ่านเข้าไปหาเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยการฝังบางส่วนของโครงสร้างลงไปและ 3) Insertion คือ การสอด โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการยืดออกและเสียคุณสมบัติในการเลือกผ่าน กลไกการทำงานของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่ไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและทำให้เริ่มปฏิกิริยาการอักเสบโดยการหลั่ง proinflammatory cytokines เช่น histamine, prostaglandins รวมทั้ง chemokines เพื่อส่งเสริมการทำงานของ phagocytic cells (Hancock and Diamond, 2000) นั้น โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย อาจเกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งในรูปแบบเกิดขึ้นทันที (acute) หรือแบบเรื้อรัง (chronic) ในแบบทันทีเริ่มต้นจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียกระตุ้นการปลดปล่อย histamine จากแมสต์เซลล์ทำให้เกิดผลจาก histamine คือ การขยายขนาดของหลอดเลือด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลผ่านออกจากหลอดเลือดเข้ามาบริเวณเยื่อบุเต้านมที่อักเสบและเกิด phagocytosis หรือการยับยั้งการสลาย fibrin clot เพื่อใช้เป็นด่านกักเก็บเชื้อแบคทีเรียไม่ให้กระจายออกไป นอกจากนี้ยังยับยั้งความเสียหายของเนื้อเยื่อโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส ส่วนบทบาทของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการอักเสบแบบเรื้อรังจะเกิดขึ้นเมื่อการตอบสนองแบบ acute imflammation ไม่สามารถเกิดอย่างมีประสิทธิภาพ การตอบสนองแบบเรื้อรังนั้นเริ่มจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้รับการกระตุ้นแล้วมีการสร้าง chemokine เพิ่มขึ้นและทำให้การแบ่งตัวของ T lymphocyte **ชนิด** T-helper cells มากขึ้นเพื่อผลิต Immunoglobulin G และกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดการกำจัดเชื้ออย่างสมบูรณ์

การเพิ่มปริมาณโซมาติกเซลล์มีเป็นการตอบสนองเพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพที่บุกรุก นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ยังพบการตอบสนองในระดับโปรตีน โดยพบมีโปรตีนในน้ำนม (milk proteins) หลายชนิดอยู่ในน้ำนมเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการติดเชื้อในเต้านม โปรตีนหลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามายังเต้านม บทความของ Isobe (2017) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นทำงานในตำแหน่งและช่วงเวลาของการตอบสนองที่แต่ต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน ชนิดของโปรตีนที่เคยมีรายงานได้แก่ haptoglobin (Åkerstedt et al., 2009), lipopolysaccharide–binding protein (Schroedl et al., 2001), Serum amyloid A (Eckersall et al.,2001; Eckersall et al., 2006) โปรตีนที่กล่าวมาเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการอักเสบซึ่งเป็นกลไกกำจัดเชื้อผ่านการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณที่มีการบุกรุกและทำการกำจัดเชื้อภายในเต้านม นอกจากนี้ยังมีโปรตีนและเปปไทด์ในน้ำนมที่มีฤทธิ์กำจัดแบคทีเรีย(antibacterial proteins) ได้แก่ cathelicidin1, 2, 4, 6 และ 7 Peptidoglycan recognition receptor protein (Boehmer et al., 2008; Boehmer et al., 2010) ซึ่งโปรตีนบางชนิดที่แสดงออกมาในน้ำนมอาจมีศักยภาพเป็น biomarker ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยเต้านมอักเสบได้ แต่อย่างไรตามโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้นนั้นเป็นโปรตีนที่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงในเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จากการทบทวนเอกสารพบว่าขาดข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนที่แสดงออกเมื่อโคเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ซึ่งจำเป็นต่อการทำความเข้าใจเกี่ยวกับโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อภายในเต้านมและอาจประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกเริ่ม

(early diagnostic biomarker) ของเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้

นอกเหนือจากโปรตีนทั้งสองกลุ่มที่เคยมีรายงานว่าอาจมีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกเริ่มแล้ว ยังมีโปรตีนบางชนิดที่อาจมีศักยภาพในการใช้ประเมินระดับความรุนแรงของเต้านมอักเสบได้ Furukawa et al. (2011) ที่รายงานไว้ว่า ในน้ำนมจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ coagulase negative staphylococci ตามธรรมชาติพบปริมาณของ high-mobility group box 1 (HMGB1) protein มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนม แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการใช้โปรตีนที่พบในน้ำนมเป็น biomarker เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการประเมินความรุนแรงของเต้านมอักเสบ เนื่องจากวิธีการประเมินความรุนแรงของเต้านมอักเสบด้วยเครื่องตรวจเซลล์อัตโนมัติที่มีข้อจำกัดเนื่องจากมีราคาแพง รายงานของ Pongthaisong et al. (2015b) ที่พบ cathelicidin ในน้ำนมของโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* รวมทั้งได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด cathelicidin อาจใช้บ่งชี้ระดับความรุนแรงของเต้านมอักเสบได้เนื่องจากระดับของโปรตีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าโซมาติกเซลล์ของน้ำนมจากเต้าที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (Pongthaisong et al. 2015a, Addis et al., 2016)

การประยุกต์ใช้โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้นำเสนอไปนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีศักยภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาภายในเต้านม และด้วยหลักฐานที่พบว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียอาจถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มปริมาณขึ้นได้จึงอาจเป็นไปได้ที่จะเพิ่มการแสดง ออกของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียให้การกำจัดเชื้อภายในเต้านมหมดไปได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งชนิดของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการทำงานเพิ่มขึ้นได้นั้นได้แก่ แลคโตเฟอริน, defensin และ cathelicidin

แลคโตเฟอริน มีการศึกษาเกี่ยวกับแนวทางในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ โดยการทำสัตว์ดัดต่อพันธุกรรมในการศึกษาของ Hyv**Ö**nen (2006) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดเชื้อของโคที่ผ่านการดัดต่อพันธุกรรมโดยใส่ยีน recombinant human lactoferrin พบว่าปริมาณ แลคโตเฟอริน ที่สร้างขึ้นมีปริมาณสูงขึ้นแต่ไม่สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* ที่ฉีดเข้าไปในเต้านมได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวนี้อาจเป็นเพียงต้นแบบที่ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการเพิ่มการตอบสนองของเต้านมเพื่อประโยชน์ในการกำจัดเชื้อภายในเต้านมด้วยโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวเอง นอกจากนี้ Kawai et al. (2015) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของแลคโตเฟอรินกับค่าโซมาติกเซลล์ เมื่อได้รับการรักษาเต้านมอักเสบด้วยการสอดเต้านมชนิด cefazolin ขนาด 150 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าเมื่อค่าโซมาติกเซลล์ลดลงจะส่งผลให้เห็นความแตกต่างของระดับแลคโตเฟอรินในน้ำนมที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รักษาแสดงให้เห็นภาพของการลดความรุนแรงของเต้านมภายหลังการรักษามีความสอดคล้องกับระดับระดับแลคโตเฟอริน ในด้านการเก็บรักษาน้ำนม Hisaeda et al. (2016) พบว่าน้ำนมโคที่มีระดับแลคโตเฟอริน อยู่สูงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจะพบปริมาณของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ที่ลดลง ดังนั้นอาจนับได้ว่าแลคโตเฟอรินเป็นโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่อาจมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยการเกิดเต้านมอักเสบ การพยากรณ์ผลที่เกิดจากการรักษา และมีประโยชน์ด้านการเก็บรักษา

Defensins เป็น กลุ่มของเปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลของโคซึ่งโดยปกติจะมีการผลิตออกมาอยู่ในระดับหนึ่ง (constitutively expressed) แต่เมื่อเซลล์ถูก

กระตุ้นจะสามารถผลิตออกมาเพิ่มมากขึ้นได้ มีการศึกษาเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพื่อกำจัดเชื้อเช่น Fehlbaum et al. (2000) ศึกษาในเซลล์เยื่อบุลำไส้พบว่าการแสดงออกของ β-defensin สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยการกระตุ้นจากกรดอะมิโน Isoleucine แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานว่ากรดอะมิโนดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ β-defensin ในเต้านมได้ ในขณะที่การศึกษาทางด้านโภชนศาสตร์ในโคนมที่ได้รับเสริมวิตามินดี3 ในอาหารระดับ 60 IU/กิโลกรัมน้ำหนักตัวของโคนมระยะกำลังให้นมพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมชนิดโมโนไซต์มีตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide พบการเพิ่มการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง β-defensin แสดงให้เห็นถึงบทบาทของวิตามินดี3ในการเพิ่มการผลิตโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด β-defensin (Merriman et al., 2015)

Bac5 เป็นเปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด cathelicidin ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาคุณสมบัติของความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นได้ โดยมีรายงานการศึกษาที่ใช้เชื้อ *E.coli* และ lipopolysaccharide กระตุ้นให้ Bac5 มีแสดงออกมากขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล โดยการแสดงออกของ Bac5 จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับการกระตุ้น

นอกจากโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่สร้างขึ้นเองได้ในร่างกายสัตว์แล้ว มีการรายงานที่อาจใช้เป็นต้นแบบของการพัฒนาการเพิ่มศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดย Kerr et al. (2001) ศึกษาโปรตีนที่ได้จากการถ่ายยีนของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่หนูทำให้สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเชื้อสาเหตุที่สำคัญของเต้านมอักเสบ เช่น โปรตีนชนิด lysostaphin ซึ่งงานวิจัยของ Kerr et al. (2001) ชี้เห็นว่า หนูทดลองที่ได้รับการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง lysostaphin จะมีจำนวนเต้าที่ติดเชื้อน้อยกว่าหนูปกติ

สรุป

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เต้านม มีแหล่งที่มาจาก 2 แหล่งสำคัญ คือ เนื้อเยื่อเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาว การทำงานของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีทั้งการทำลายเชื้อโดยตรงและการสนับสนุนส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้กำจัดเชื้อ ณ บริเวณที่มีการตรวจพบว่ามีเชื้ออยู่ในเต้านม ปัจจัยจากตัวเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดความแตกต่างในการตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากการทบทวนเอกสารดังกล่าวนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและทำความเข้าใจเพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่แนวทางในการควบคุมปัญหาเต้านมอักเสบด้วยการพึ่งพาความสามารถที่เต้านมมีอยู่เพื่อลดปัญหาและผลกระทบที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมปัญหาเต้านมอักเสบ

เอกสารอ้างอิง

Addis M.F., Tedde, V., Puggioni, G.M., Pisanu, S., Casula, A., Locatelli, C., Rota, N., Bronzo, V., Moroni, P., Uzzau, S., 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 99, 8250-8258.

Åkerstedt, M., Waller K.P., Sternesjö, A., 2009.Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk in relation to raw milk quality. J. Dairy Res. 76, 483-489.

Almeida, A.M., Bassols,A., Bendixen, E., Bhide, M.,Ceciliani, F., Cristobal, S., Eckersall, P.D., Hollung, K., Lisacek, F., Mazzucchelli, G., McLaughlin, M., Miller, I., Nally, J. E., Plowman, J., Renaut, J.,Rodrigues, P., Roncada, P., Staric J., Turk, R., 2015. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. Animal. 9, 1–17.

Boehmer, J.L., Bannerman, D.D., Shefcheck, K., Ward, J. L., 2008. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced Escherichia coli mastitis. J. Dairy Sci. 91, 4206-4218.

Boehmer, J.L., Ward, J.L., Peters, R.R., Shefcheck, K.J., McFarland, M.A., Bannerman, D.D., 2010. Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification. J Dairy Sci. 93, 593-603.

Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptide: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nature. 3, 238-248.

Crookenden, M.A., Heiser, A., Murray, A., Dukkipati, V.S.R., Kay, J.K., Loor J.J., Meier, S., Mitchell M.D.,Moyes, K.M., Waler, C.G., Roche, J.R., 2016. Parturition in dairy cows temporarily alters the expression of genes in circulating neutrophils. J. Dairy Sci. 99, 6470–6483

Eckersall, P.D., Young, F.J., Nolan, A.M., Knight, C.H., McComb, C., Waterston, M.M., Hogarth, C.J., Scott, E.M., Fitzpatrick, J.L., 2006. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 89,1488-1501.

Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb,C. Hogarth, C.J., Safi, S. , Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L., 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Vet. Rec. 148, 35–41.

Fehlbaum, P., Rao, M., Zasloff,M. Anderson, G. M., 2000. An essential amino acid induces epithelial β-defensin expression. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 12723-12728.

Furukawa, Y., Hayashi, T., Mizuta, M., Ebara, S., Kiku, Y., Ozawa, T., Matsubara, T., Ito, I., Kitamura, D., Mizuta, R., 2011. Increased concentration of high-mobility group box 1 protein in milk is related to the severity of bovine mastitis. Vet. Res. Commun. 35, 47-54.

Gonzalez-Chavez, S. A., Arevalo- Gallegos, S., Rascon-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. Intern. J. of Antimicrob. Agents. 33, 301.e1– 301.e8

Guimaraes, J.L.B., Brito, M. A.V.P., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonca, L. C., Mendonca, J.F.M. Souza., G.N., 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: a case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. Prev. Vet. Med. 142, 46-50.

Hancock, R. E., Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol. 9, 402-410.

Hancock, R. E., Sahl, H.G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol. 24, 1551 – 1557.

Hisaeda, K., Koshiishi, T., Watanabe, M., Miyake, H., Yoshimura, Y., Isobe, N., 2016. Change in viable bacterial count during preservation of milk derived from dairy cows with subclinical mastitis and its relationship with antimicrobial components in milk. J. Vet. Med. Sci. 78, 1245–1250.

Hogarth, C. J., Fitzpatrick, J. L., Nolan, A., Young, M., Pitt, F. J., Eckersall, P.D., 2004. Differential protein composition of bovine whey: A comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. Proteomics. 4, 2094-2100.

HyvÖnen, P., Suojala, L., Orro, T., Haaranen, J., Simola,O., Røntved, C., PyÖrälä, S., 2006. Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental Escherichia coli intramammary infection. Infect. Immun. 74, 6206–6212.

Isobe, N., 2017. Control mechanisms for producing antimicrobial factors in ruminant mammary gland. Anim. Sci. J. doi:10.1111/asj.12808.

Kawai, K., Korematsu, K., Akiyama, K., Okita, M., Yoshimura, Y., Isobe, N., 2015. Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. Anim. Sci. J. 86,153–158.

Kerr, D.E., Plaut, K., Bramley, A.J., Williamson, C.M., Lax, A.J., Moore, K., Wells, K.D., Wall, R.J., 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotechnol. 19, 66–70.

Leelahapongsathon, K., Schukken,Y. H. Suriyasathaporn, W., 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. Trop. Anim. Health Prod. 46, 1067–1078.

Levy, O., 2000. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. Blood. 96, 2664-2672.

Lin, J., Hogan, J., Aslam M., Smith K., 1998: Immunization of cows with ferric enterobatin receptor from coliform bacteria. J. Dairy Sci. 81, 2151–2158.

Merriman, K. E., Kweh, M. F., Powell, J. L., Lippolis, J. D., Nelson, C. D., 2015. Multiple β-defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 154, 120–129.

Oviedo-Boyso, J., Valdes-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa- Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., Baizabal- Aguirre, V.M., 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect. 54, 399–409.

Pongthaisong, P., Katawatin, S., Thamrongyoswittayakul, C., 2015. Cathelicidin responded to *Streptococcus agalactiae* and associated with the severity of subclinical mastitis. Thai J. Vet. Med. 45, 651-655.

Pongthaisong, P., Katawatin, S., Thamrongyoswittayakul, C., Roytrakul S., 2015. Milk protein profiles in response to *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis in dairy cows. Anim Sci J. 87, 92-98.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., Done, S.H., 2008. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th ed. Elsevier Saunders, New York.

Schroedl, W., Fuerll,B., Reinhold, P., Krueger, M., Schuett. C., 2001. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). J. Endotoxin Res. 7, 49–52.

Síma, P., Trebichavský, I., Sigler, K., 2003. Mammalian antibiotic peptides. Folia Microbiol. (Praha) 48, 123–137.

Smolenski, G., Haines, S., Kwan, F.Y., Bond, J., Farr, V., Davis, S.R., Stelwagen, K., Wheeler, T.T., 2007. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. J. Proteome Res. 6, 207-215.

Suriyasathaporn, W., 2011. Epidemiology of subclinical mastitis and their antimicrobial susceptibility in small holder dairy farm, Chiang Mai province, Thailand. J. Anim. Vet. Adv. 10, 316-321.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 89-97. DOI: 10.14456/cmvj.2017.8

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

Case report

A Case study: The slippery foreign body aspiration in a dog

Luddawon Somrup[1,*], **Khuttiya Kompach**[1], **Wonvisa Srisawat**[1] **and Areerath Akatvipat**[2]

[1]*Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200*

[2]*Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mia 50100*

Abstract A three-years-old spayed female golden retriever was presented with a history of acute cough. The lateral view of thoracic radiograph revealed an approximately 15 mm diameter of the circular foreign body that resided in the proximal cervical trachea. The dog was referred to the small animal hospital, Chiang Mai University for further management. Radiography was re-performed. While the patient was repositioned for a ventrodorsal radiograph, the circular foreign body was migrated to the thoracic trachea. An emergency generalized anesthesia was needed to perform. The surgical management was preceded. The right thoracotomy and tracheotomy was performed. The foreign body was not found inside the thoracic trachea. Due to lack of Fluoroscope in the hospital, the radiographs were repeatedly performed during surgery. The result found that the foreign body was migrated further down into the left bronchus. Bronchotomy was performed and the foreign body was removed from that site. The intrathoracic drainage tube was placed to monitor the intrathoracic effusion and air. The slippery foreign body aspiration is life-threatening due to the potential cause of acute airway obstruction, respiratory compromise and rapidly death. The carefully positioning the dog for radiograph and removal the foreign body as soon as possible should be prioritized.

Keywords: aspiration, trachea, bronchus, slippery foreign body

* **Corresponding author**: Luddawon Somrup, Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100 Tel. 053-948036 E-mail: ludda108@gmail.com

Article history; *received manuscript: 4 April 2017, accepted manuscript: 29 May 2017, published online: 6June 2017*

รายงานสัตว์ป่วย

กรณีศึกษา: การสำลักสิ่งแปลกปลอมที่มีลักษณะลื่นเข้าสู่ทางเดินหายใจในสุนัข

ลัดดาวรรณ สมรูป[1,*] ขัตติยา กุมเพ็ชร[1] วันวิสาข์ ศรีสวัสดิ์[1] อารีรัตน์ อากาศวิภาต[2]

[1]โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[2]ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

บทคัดย่อ สุนัข อายุ 3 ปี เพศเมีย ทำหมันแล้ว พันธุ์โกลเด้นทีรีทรีฟเวอร์ เข้ารับการรักษาด้วยประวัติอาการไออย่างเฉียบพลัน จากภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยในท่านอนตะแคงข้าง พบสิ่งแปลกปลอม ลักษณะเป็นวงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 มิลลิเมตรที่หลอดลมบริเวณลำคอส่วนต้น สุนัขถูกส่งตัวมารับการรักษาต่อที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุนัขได้ถูกนำตัวไปถ่ายภาพรังสีเพื่อหาตำแหน่งของสิ่งแปลกปลอม ในขณะที่จับสุนัขนอนหงายเพื่อถ่ายภาพรังสี สิ่งแปลกปลอมได้มีการเคลื่อนลงไปยังตำแหน่งของหลอดลมส่วนที่อยู่ภายในช่องอก สุนัขได้ถูกนำตัวเข้าห้องผ่าตัดและวางยาสลบทั้งตัวอย่างรวดเร็วเพื่อนำเอาสิ่งแปลกปลอมออกด้วยวิธีการ ผ่าตัดเปิดช่องอกและหลอดลม แต่ไม่พบสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว เนื่องจากทางโรงพยาบาลไม่มีฟลูโอโรสโคป จึงได้ทำการเอกซเรย์ในระหว่างผ่าตัด พบว่าสิ่งแปลกปลอมได้เคลื่อนลงสู่ขั้วปอดส่วนต้นด้านซ้าย จึงได้พิจารณาทำการเปิดขั้วปอดซ้าย และได้นำเอาสิ่งแปลกปลอมซึ่งมีลักษณะคล้ายลูกแก้วถูกคีบออกมาจากตำแหน่งดังกล่าว สุนัขได้รับการใส่ท่อระบายของเหลวช่องอก เพื่อเฝ้าระวังของเหลวและอากาศภายในช่องอก การสำลักเอาสิ่งแปลกปลอมที่มีลักษณะลื่นเข้าไปในทางเดินหายใจ ถือเป็นภาวะฉุกเฉิน ซึ่งเป็นเหตุทำให้สัตว์เสียชีวิตได้จากการขาดอากาศหายใจ การจัดท่าเพื่อถ่ายภาพทางรังสีอย่างระมัดระวังและการนำเอาสิ่งแปลกปลอมออกอย่างทันท่วงทีเป็นสิ่งสำคัญ

คำสำคัญ การสำลัก หลอดลม ขั้วปอด สิ่งแปลกปลอมที่มีลักษณะลื่น

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ลัดดาวรรณ สมรูป โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ 053-948036 อีเมล์: ludda108@gmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 4 เมษายน พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 29 พฤษภาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 6 มิถุนายน พ.ศ.2560*

Introduction

Foreign body aspiration has been reported in small animals and can cause deleterious consequences if it is not removed (Tenwolde et al., 2010, Paláez & Joliffe, 2012). Many types of foreign bodies have been reported including plants, pin or plastic material (Peláez & Jolliffe, 2012, Tenwolde et al., 2010). The aspiration of a foreign body can cause damage to the airway and pulmonary parenchyma. The effects can be primarily due to the physical presence of the foreign body and/or secondary due to the inflammatory response. The pathological changes include bronchoconstriction, pulmonary hemorrhage, increase mucous production and pulmonary edema. These derangements can result in clinical signs such as labored breathing, cough, or respiratory distress (Schulze & Rahilly 2012, Tenwolde et al., 2010). Foreign body aspiration is life-threatening that requires immediate diagnosis and treatment to achieve a good outcome (Goodnight et al. 2010). The diagnosis confirms by using radiography, bronchoscopy, or CT scan (Tenwolde et al., 2010). Several techniques are available for removing foreign bodies that include bronchoscopy, fluoroscopy, balloon wedge pressure catheter and surgery. Surgery has become a promising technique for retrieval of foreign body aspiration. However, postoperative complications and proper management should always be considered.

The aim of this case report is to present the diagnosis and surgical removal of tracheal thoracic foreign body in a dog.

History, Clinical diagnosis and findings

A three-year old spayed female golden retriever, weighing 44 kg was presented with a history of an acute cough at the primary veterinary hospital. The lateral view thoracic radiographs were taken. An increasing radiopacity of foreign body at the cranial part of the trachea was found. Attempts to retrieve the foreign body under general anesthesia with a long forceps were unsuccessful. The patient was referred to further treatment at the small animal hospital, Chiang Mai University (CMU).

On the presentation, the dog showed clinical signs of dyspnea, shallow breathing, and tachypnea. Hydration status was normal. Mucous membrane was pink and CRT was less than 2 sec. The mental status of the dog was alert and had good response to the environment. The thoracic radiographs were re-performed to confirm the position of the foreign body. A 15.2 millimeter diameter circular foreign body in the cervical trachea was found (Figure 1). Complete blood count and basic blood chemistry profile were unremarkable. Anesthesia and surgical intervention via a cervical tracheotomy was decided.

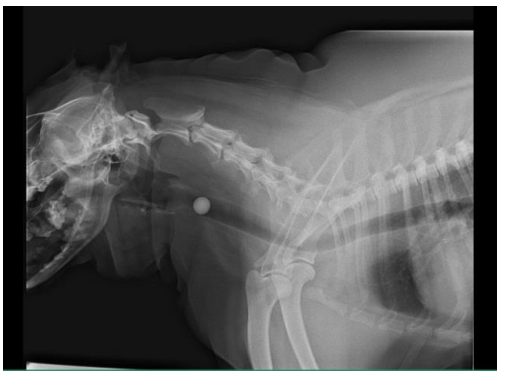


Figure 1. A lateral view radiograph showed a 15.2 mm diameter, the radiooplacity of circular foreign body in the cervical trachea.

Case management

The initial treatments for this patient were performed by oxygen therapy, the intravenous 5 ml/kg of Lactate's ringer solution. Broad spectrum antibiotic amoxicillin-clavulanic acid (Augmentin®) 15 mg/kg was given intravenously. The patient was premedicated with diazepam 0.1 mg/kg intravenously, followed by Propofol® 5 mg/kg intravenously for induction. Morphine 0.5 mg/kg and fentanyl citrate (Fentanyl®) 10 μg/kg were intravenously administered. Anesthesia was maintained with isoflurane (Forane®) 1.5% in an O_2 flow rate 40 ml/kg/min with an average respiratory rate of 12 breaths per minute (IPPV). Mechanical ventilation was used to maintain positive pressure ventilation during the thoracotomy procedure. Additional analgesia was provided with intercostals nerve block by using lidocaine hydrochloride (1.5 mg/kg).

After generalized anesthesia was performed, the dog was placed on the operating table. The plain radiograph was taken to define the exact location of the foreign body. The radiographs revealed that the slippery circular foreign body was migrated to the lower part of the trachea (Figure. 2), thus the surgical removal was decided. Thoracotomy and tracheotomy were performed to remove the foreign body.

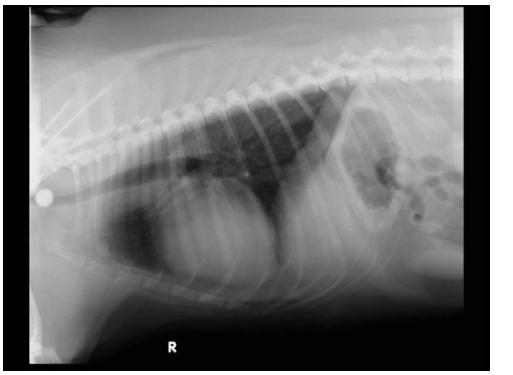


Figure 2. Lateral view thoracic radiograph was performed to define the location of foreign body prior to surgery and the radiographs showed a foreign body slipped from the proximal to the intra-thoracic part of trachea.

The patient was positioned in left lateral recumbency and prepared the surgical area. The thoracotomy was performed by located the 5th intercostal space. The incision was made through skin, subcutaneous tissues, muscle, and enter the thoracic cavity then the trachea was identified. The trachea was approached and incised 2/3 of the tracheal ring at the exact position that the foreign body resided in the lateral view of the radiograph. The foreign body was not found at the incision site; another radiograph was performed due to lack of fluoroscope in the hospital. The radiograph showed the foreign body was migrated further down into the bronchus (Figures 3A and 3B). The foreign body was identified and removed by inserting the straight artery forceps

from the first incision site into the left bronchi (Figure. 4).

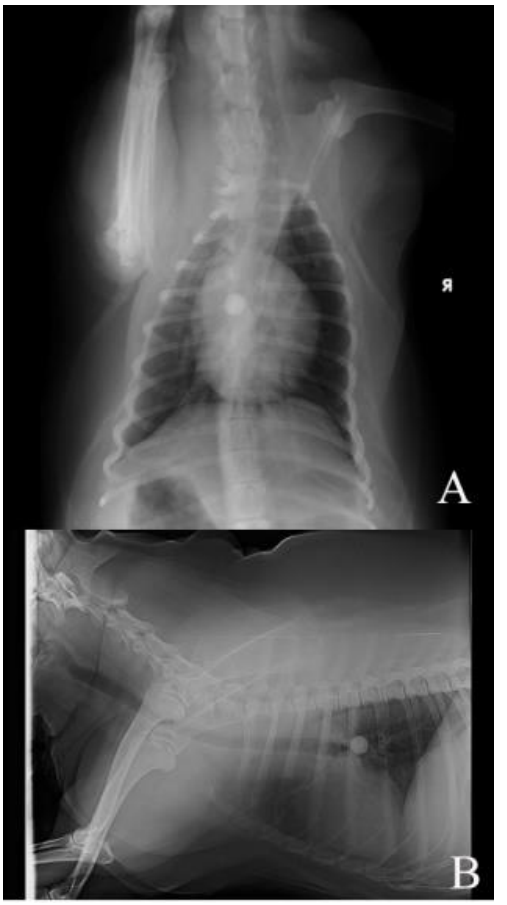


Figure 3. Dorso-ventral view thoracic radiograph (A) showed a circular radioplacity foreign body at the proximal left bronchi. Right Lateral view thoracic radiograph (B) showed a circular foreign body obstruction in the bronchus.

Figure 4. Showing the circular foreign body; a child's marble.

The incision was closed in a routine fashion, using simple interrupted with 3/0 polydioxanone (PDS) absorbable to suture the trachea and Kirchner-cerclage wire was used to close the intercostal ribs by circumcostal technique. The muscles were closed individually to prevent air leakage by simple interrupted suture with polyglactin 910 (vicry® 2/0). Nylon (Ehicon®) 3/0 was used to close the skin layer by simple interrupted. The chest tube was placed to monitor the thoracic fluid or air to prevent the complication from pleural effusion or pneumothorax.

Postoperative care, dexamethasone was given immediately after the endotracheal tube was removed to prevent tracheal inflammation and cause obstruction. The patient was admitted to the intensive care unit to evaluate physical condition, pain, surgical wound and respiratory function. Oxygen supplements by naso-oxygen tube.

An antibiotic were administrated; amoxicillin-clavulanic acid (Augmentin®) was given intravenously for 3 days and followed by per oral prescription for 7 days. Pain was controlled by Fentanyl® 5 µg/kg/hr; CRI for the first 24 hours postoperatively. Fentanyl patch® was placed postoperatively for 3 days and renew at the later 3 days. Morphine was given to intramuscular route every 6 hours for 5 days. At the third-day, postoperation blood work was performed, and no remarkable abnormality was found.

The thoracotomy tube was monitored every 2 hours for first 24 hours post operation, subsequently, 4 times/day until the thorax was no present of fluid and air or sign of respiratory discomfort. The thoracic radiograph was

performed to determine the lung capacity and the result was within a normal limit (Figure.5A and 5B). The chest tube was removed at 3 days post surgery.

The dog recovered to a better respiratory condition and surgical site had good wound healing, the stitches were removed at ten days after surgery. The patient went home at 10 days postoperatively and followed upon the 1st and the 2nd week twice a day after discharged; no complications were found

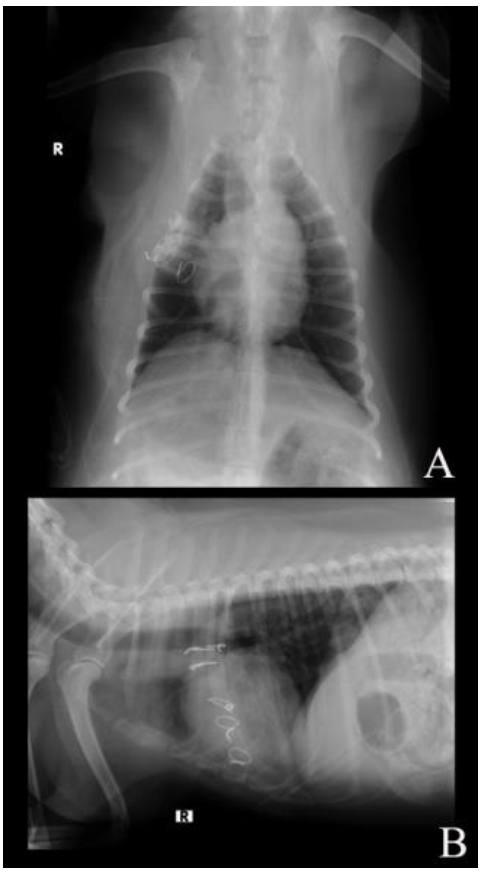


Figure 5. Ventro-dorsal (A) and lateral view (B) thoracic radiograph were performed prior to chest tube removal; there were no presenting of pneumotrorax or pleural effusion.

Discussion

The movable foreign body in the respiratory tract is an emergency situation. In this case, the foreign body was migrated from upper to lower respiratory tract; this movement was demonstrated while taking the radiograph. The emergency surgery to remove this foreign body was set up to prevent life threatening from obstruction. The alteration of the patient position was effect the location of the foreign body; the gentle manipulation was a concern not to increase the chance of obstruction. However, the determination of the location was important for surgical approach and retrieve the foreign body.

The tracheal foreign bodies in dogs are rare but potentially life-threatening. The ability for rapid evaluation, diagnosis, and treating respiratory distress are crucial for a preferable outcome (Goodnight et al. 2010). In this case, the rapid set up for removing the foreign body was performed due to the potential of obstruction was observed while changing the position during the radiograph was taken. The decision of setting up the surgery as an emergency case was made base on the radiograph and the changing of clinical signs.

There are many options for removing foreign bodies a bronchoscope, fluoroscope, balloon wedge pressure catheter and surgery. The bronchoscope, fluoroscope and balloon wedge pressure catheter are less invasive approach when compared to the surgery (Tenwolde et al. 2012, Goodnight et al. 2010, Peláez & Jolliffe 2012, Nutt et al. 2014).

Bronchoscopy is suggested as the primary intervention for retrieving the foreign body (Tenwolde et al., 2010). However, surgery is the promising procedure for retrieving foreign bodies, but the consequence of the postoperative complications and managements have to be account. In this case, surgery was chosen due to the requirement of the rapid approach to remove the foreign body to decrease the period that the obstruction happen. The bronchoscopy retrieval was not chosen due to the foreign body was the movable circular object and it has a large diameter. We thought to remove the slippery object by using the basket or others bronchoscopy device has a few chance to success and it was time consuming method.

Thoracotomy approach has higher complications when compare to bronchoscopy approach (Tenwolde et al. 2012, Goodnight et al. 2010, Peláez & Jolliffe 2012, Nutt et al. 2014). Fluoroscope is one of a specific device that could help surgeon to find the location of the foreign body during the thoracotomy and it helps to decrease the duration of the operation. Fluoroscope may not available in every small animal hospital. Small animal hospital, Chiang Mai University also doesn't have it. Multiple radiographs needs to be performing during the surgery instead of using Fluoroscopy. The thoracotomy technique is time consuming surgery, and a complicated technique. These disadvantages are likely to improve with operator experience and skill (Paláez & Joliffe, 2012). The complications due to the postoperative lateral thoracotomy were reported 47% in small animals (Moores et al. 2007). Hemorrhage, pain, air leakage, seroma, wound infection dehiscence and ipsilateral thoracic lameness are potentiated to happen even though it is rare (Orton 1995, 2003; Bonath 1996; Tattersall & Welsh 2006; Moores et al. 2007). In this case, the patient showed the sign of respiratory distress and hyperventilation 48 h postoperatively. This complication may result from pneumothorax or pain. The pneumothorax may contribute from the leakage of the air according to the tracheal opening or the thoracic area. The air was removed every 2 h via the thoracic tube and a small amount of air was found then diminished after 24 h. The air leakage may not be the major cause of this hyperventilation. Pain is the possible cause of the hyperventilation. The circumcostal technique that used in this patient is potentiated pain due to the Kirchner-cerclage wire that use for closing thorax may entrap the intercostal nerve (Paláez & Joliffe, 2012). This intercostal nerve entraption was also found in small animal patient more than 70 % that received circumcostal technique (Paláez & Joliffe, 2012). The requirement of postoperative analgesia was higher in the patient that had circumcostal technique when compare to the transcostal technique. The transcostal technique was developed to decrease the nerve entrapment; this technique may help manage the postoperative complication (Rooney et al. 2004). Postoperative analgesia management in this case, was planned by using multimodal techniques. Opioids including morphine and fentanyl were applied during preoperative and postoperative within several routes i.e. intramuscular, intravenous both

as bolus and (continuous rate infusion; CRI), and in the patch form. The intercostal block with lidocaine was performed prior the surgery. The patient was also breath with high concentration of oxygen; this may help to decrease the respiratory effort. As a result, the trauma of surgical wound while breathing and pain decreased. Even though the analgesia was applied, but the patient still response to pain by showed the signs of hyperventilation. The pain assessment and management may help to correct this complication. The others approach to manage pain are using prolong local action analgesia such as bupivacaine or ropivacaine for intercostal block prior the surgery, administration of bupivacaine and lidocaine intrapleural, or opioids administration epidurally (Berge&Orton 1986; Popilskis et al. 1991, Thompson &Johnson 1991; Conzemius et al. 1994; Stobie et al. 1995)

To the author knowledge, the circular foreign body structure is unique; it is rapidly moveable in the respiratory tract. While the dog's position is changed, the foreign body could slip from upper to lower respiratory airway and cause acute life-threatening from its obstruction. This case report reveal that the patient should be manipulated gently, decision making for remove foreign body have to be fast to prevent the airway blockage, the intervention technique has to be chosen judiciously, and prevention for postoperative complication have to be planned especially the pain management.

Reference

Berge, R.J., Orton, E.C., 1986. Pulmonary function in dogs after intercostal thoracotomy: comparison of morphine, oxymorphone, and selective intercostal nerve block. Am J of Vet Res. 47, 471-474.

Bonath, K.H., 1996. Thoracic wall closure. In: Lipowitz, A.J. (Ed.), Complications in small animal surgery: diagnosis, management, prevention. Williams & Wilkins, Baltimore. 229-239.

Conzemius, M.G., Brockman, D.J., King, L.G., Perkowski, S.Z., 1994. Analgesia in dogs after intercostal thoracotomy: a clinical trial comparing intravenous buprenorphine and interpleural bupivacaine. Vet Surg 23, 291–298.

Goodnight, M.E., Scansen, B.A., Kidder, A.C., Cooper, E.S., Butler, A.L., 2010. Use of a unique method for removal of a foreign body from the trachea of a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 237, 689–694.

Moores, A.L., Halfacree, Z.J., Baines, S.J., Lipscomb, V.J., 2007. Indications, outcomes and complications following lateral thoracotomy in dogs and cats. J Small Anim Pract 48, 695–698.

Nutt, L.K., Webb, J.A., Prosser, K.J., Defarges, A., 2014. Management of dogs and cats with endotracheal tube tracheal foreign bodies. Can. Vet. J. 55, 565–568.

Orton, C.E., 1995. Disorders of the thoracic wall. In: Orton, C.E., McCracken, T.O., Cann, C.C. (Eds), Small animal thoracic surgery. Williams & Wilkins, Malvern.

Peláez, M.J., Jolliffe, C., 2012. Thoracoscopic foreign body removal and right middle lung lobectomy to treat pyothorax in dog. J Small Anim Prac. 53, 240-244.

Popilskis, S., Kohn, D., Sanchez, J..A., Gorman, P., 1991. Epidural vs. intramuscular oxymorphone analgesia after thoracotomy in dogs. Vet Surg 20, 462–467.

Rooney, M.B., Mehl, M., Monnet, E., 2004. Intercostal thoracotomy closure: transcostal sutures as a

less painful alternative to circumcostal suture placement. Vet Surg. 33, 209-213.

Schulze, H.M., Rahilly, L.J., 2012. Aspiration pneumonia in dogs: pathophysiology, prevention, and diagnosis. Compend Contin Educ Vet. 34(12), E5.

Stobie, D., Caywood, D.D., Rozanski, E.A., Bing, D.R., Dhokarikar, P., Raffe, M.R., Kannan, M.S., King, V.L., Hegstad, R.L., Randall, D.A., 1995. Evaluation of pulmonary function and analgesia in dogs after intercostal thoracotomy and use of morphine administered intramuscularly or intrapleurally and bupivacaine administered intrapleurally. Am. J. Vet. Res. 56, 1098–1109.

Tattersall, J.A., Welsh, E., 2006. Factors influencing the short-term outcome following thoracic surgery in 98 dogs. J small Anim Prac. 47, 715-720.

Tenwolde, A.C., Johnson, L.R., Hunt, G.B., Vernau, W., Zwingenberger, A.L., 2010. The role of bronchoscopy in foreign body removal in dogs and cats: 37 cases (2000-2008). J. Vet. Intern. Med. 24, 1063–1068.

Thompson, Se., Johnson, JM,. 1991. Analgesia in dogs after intercostal thoracotomy: A comparison of morphine, selective intercostals nerve block, and intrapleural regional analgesia with bupivacaine. Vet Surg. 20, 73-77.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 99-107. DOI: 10.14456/cmvj.2017.9

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร
Chiang Mai Veterinary Journal
ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)
Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความต้นฉบับ

การศึกษาความชุกและปัจจัยที่มีผลต่อโรคแท้งติดต่อในแพะ บริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

ดุลยวัต กลัดเข็มเพชร[1] นิติศาสตร์ สมตัว[1] รักธรรม เมฆไตรรัตน์[2] วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา[3] อนุชา สธนวงศ์[2,*]

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

[2]หน่วยพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

[3]คลินิกสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

บทคัดย่อ โรคแท้งติดต่อ เป็นโรคติดต่อที่สำคัญในแพะ มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Brucella melitensis* ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตและเพิ่มต้นทุนในการเลี้ยง วัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อหาความชุกและปัจจัยที่มีผลต่อโรคแท้งติดต่อในแพะบริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อใช้ในการวางแผนป้องกันโรคและลดการสูญเสียที่จะเกิดขึ้นกับเกษตรกร โดยได้ทำการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะ จำนวน 500 ตัวอย่างจาก 12 ฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด 9 อำเภอได้แก่ ในเขตอำเภอเมือง แม่ออน แม่ริม ฝาง ดอยสะเก็ด สันกำแพง จอมทอง สันทราย และดอยหล่อ เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อบรูเซลลาด้วยวิธี Rose Bengal test เมื่อพบผลบวกจะทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Complement fixation test การศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแท้งติดต่อโดยใช้แบบสอบถามโดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ผลพบว่า ความชุกของโรคแท้งติดต่อรายตัวร้อยละ 0.60 (3/500) ระดับฝูงร้อยละ 16.67 (2/12) ผลของปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพบว่ามี 5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ขนาดฝูง ปัญหาระบบสืบพันธุ์ การตรวจโรคก่อนนำเข้าฝูง แหล่งที่มาของแพะใหม่เข้าฝูง และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อภายในฟาร์ม สรุปข้อมูลเรื่องปัจจัยต่อการเกิดโรคแท้งติดต่อสามารถที่จะนำไปใช้ในการวางแผนการจัดการฟาร์มเพื่อควบคุม และป้องกัน การเกิดโรคแท้งติดต่อในแพะบริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

คำสำคัญ โรคแท้งติดต่อ แพะ ความชุก ปัจจัย เชียงใหม่

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** อนุชา สธนวงศ์ หน่วยพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100 โทรศัพท์ 053-948040 อีเมล์:anucha.sa@cmu.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 4 มิถุนายน พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 6 กรกฎาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 12 กรกฎาคม พ.ศ.2560*

Original Article

Seroprevalence and factors affecting brucellosis in goats in Chiang Mai Province

Doolyawat Kladkempetch[1], Nitisart Somtua[1], Raktham Maktrirat[2], Veerasak Punyapornwithaya[3] and Anucha Sathanawongs[2,*]

[1] *Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100*

[2] *Division of Veterinary Preclinic, Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100*

[3] *Ruminant Clinic, Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100*

Abstract Brucellosis in goat is zoonotic disease caused by *Brucella melitensis*. It is an important persistent disease of goats that affects reproduction and productivity. The objective of this study was to determine seroprevalence of brucellosis and factors affecting brucellosis in goats in Chiang Mai province. A cross-sectional study was set up in 9 districts of Chiang Mai: Mueng, Mae-On, Mae Rim, Fang, Doi Saket, Sankhampaeng, Chomthong, San Sai, and Doi Lo. Blood samples from 500 goats from 12 farms were collected. All of the serum was tested sequentially positive for *Brucella spp.* antibodies and analyzed using Rose Bengal test and confirmed by complement fixation test. Factors associated with the seropositivity from questionnaire were determined with 95% confidence. The results showed that seroprevalence of Brucellosis in animal level were 0.60 % (3/500) and 16.67 % (2/12) for herd level. Five factors associated with seropositive were herd size, reproductive problem, brucellosis test program, source of a new goat, and disinfection in farm. In conclusion, the data of risk factors associated with seropositive can be used for surveillance management to control and prevention of brucellosis in goat in Chiang Mai province.

Keywords: brucellosis, goat, prevalence, factor, Chiang Mai

*** Corresponding author**: Anucha Sathanawongs, Division of Veterinay Preclinic, Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50100 Tel. 053-948040 E-mail: anucha.sa@cmu.ac.th

Article history; *received manuscript: 4 June 2017, accepted manuscript: 6 July 2017, published online: 12 July 2017*

บทนำ

ปัจจุบันเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่มีความสนใจการเลี้ยงแพะมากขึ้นเนื่องจากเนื้อและนมแพะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แพะเป็นสัตว์ที่โตไว เลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์ได้เร็ว และทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง แต่สามารถติดโรคและแพร่กระจายโรคภายในฝูงและนำโรคติดต่อมาสู่มนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะโรคแท้งติดต่อ (Brucellosis) มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Brucella melitensis* ส่งผลให้เกิดความสูญเสียเชิงเศรษฐกิจแก่เกษตรกรมาก จากการที่แพะแท้งลูกในระยะท้ายของการตั้งท้อง (late pregnancy) มดลูกอักเสบ (metritis) อัณฑะอักเสบ (orchitis) การอักเสบของท่อพักตัวอสุจิ (epididymitis) ทำให้เกิดการเป็นหมัน (sterility) ขาเจ็บ (lameness) หรือข้ออักเสบ (arthritis) ส่งผลให้ผลผลิตลดลง ผสมไม่ติดหรือผสมติดยาก การแพร่ระบาดของโรคแท้งติดต่อในฟาร์มแพะ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรค การรักษาและการกำจัดสัตว์ที่เป็นโรค การติดโรคจากแพะสู่มนุษย์ มักเกิดกับผู้ที่ทำงานใกล้ชิดกับสัตว์ที่เป็นโรคจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงจากการสัมผัสโดยตรงกับรกหรือลูกแท้ง ซึ่งอาจติดเชื้อโดยการกินหรือทางการหายใจ (Kaewket, 2008) บุคคลทั่วไปติดเชื้อได้โดยบริโภคน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนมที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (Leong et al., 2015) มนุษย์ที่ติดจะมีอาการปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ปวดตามข้อ น้ำหนักลด อัณฑะอักเสบบวม อาจพบภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต ระบบทางเดินอาหารและระบบประสาทร่วมด้วย

การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคแท้งติดต่อในแพะสามารถแบ่งได้เป็น 2 ปัจจัยหลักคือ (1) ปัจจัยจากตัวสัตว์ เช่น อายุ เพศ พันธุ์ ประวัติการตั้งท้อง และประวัติการแท้ง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ก็จะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างกันไปในแพะแต่ละตัว และ (2) ปัจจัยนอกตัวสัตว์ เช่น ขนาดฝูง จำนวนสัตว์ต่อพื้นที่การเลี้ยง การนำแพะเข้าเลี้ยงใหม่ แหล่งที่มาของแพะ การมีสัตว์ชนิดอื่นในฟาร์มหรือการสัมผัสสัตว์ชนิดอื่น (Raksakul, 2009; Abdallah et al., 2015) การเลี้ยงสัตว์ปศุสัตว์ชนิดอื่นในฟาร์มแพะในประเทศเอธิโอเปียพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *Brucella* spp. มากกว่าการไม่เลี้ยงสัตว์ปศุสัตว์ชนิดอื่นในฟาร์มเป็น 2 เท่า (Asmare et al., 2013) และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อจำนวนบ่อยครั้งในฟาร์มแพะในประเทศสเปน จะช่วยลดโอกาสพบผลบวกต่อการติดเชื้อ *Brucella* spp. (Reviriego et al., 2000) ฝูงแพะที่ไม่ทำความสะอาดโรงเรือนและกำจัดมูลจะมีโอกาสพบผลบวกต่อเชื้อ *B. melitensis* เป็น 2.87 เท่า เปรียบเทียบกับฝูงแพะที่มีการทำความสะอาดโรงเรือนและกำจัดมูลออก (Coelhoa et al., 2013)

ในประเทศไทยพบว่า มีความชุกรายตัวของการติดเชื้อ *B. melitensis* ในแพะเท่ากับร้อยละ 1.02 ในช่วงปีพ.ศ. 2551 ถึง 2553 (Chumek et al., 2007) พื้นที่ภาคตะวันตกมีความชุกของเชื้อเท่ากับร้อยละ 5.08 ในปีพ.ศ. 2555 (Antarasena et al., 2013) แต่ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และภาคเหนือยังไม่มีการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ *B. melitensis* งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของโรคแท้งติดต่อและปัจจัยที่เกี่ยวข้องในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

การเลือกตัวอย่างวิจัยและการเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แยกซีรัมบรรจุหลอดไมโครทิวบ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศา

เซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเลือกตัวอย่างวิจัยทำด้วยวิธีการเลือกตัวอย่างแบบแบ่งชั้นภูมิ (stratified sampling) จากประชากรแพะในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ซึ่งมีประชากรแพะอยู่ทั้งสิ้น 1,089 ตัว โดยใช้ฐานประชากรสัตว์ของกรมปศุสัตว์เขต 5 ประจำปี 2558 คำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Win Episcope 2.1,CLIVE, The University of Edinburgh) โดยกำหนดการเกิดโรคในกลุ่มประชากรแพะที่คาดว่ามีความชุกของโรคร้อยละ 50 (expected prevalence) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (level of confidence) จากการคำนวณได้จำนวนกลุ่มตัวอย่างแพะที่ต้องใช้ในงานวิจัยทั้งหมดอย่างน้อย 285 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างจากฟาร์มได้มาก ส่งผลให้จำนวนตัวอย่างเลือดจากแพะทั้งหมดจึงเป็น 500 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

Table 1 A goat samples in each district of Chiang Mai

District	Samples (N)
Chomtong	40
Fang	31
Doi Saket	162
Doi Lo	38
Sankamphaeng	80
San Sai	43
Mueng	33
Mae Rim	13
Mae On	60
Total	500

การทดสอบหาภูมิคุ้มกันต่อโรคแท้งติดต่อ

การทดสอบหาแอนติเจนด้วยวิธี Rose Bengal test (RBT) เป็นแอนติเจนที่ผลิตจากเชื้อ *B. abortus* เชื้อสาย (strain) 1119–3 ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์) การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี RBT ตามที่ OIE (2009) ให้คำแนะนำเป็นการตรวจโดยเบื้องต้น เนื่องจากมีคุณสมบัติของแอนติเจนร่วมกันและมีความไวในการทดสอบต่อโรคแท้งติดต่อในแพะ โดยนำซีรัมและแอนติเจนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบ จากนั้นหยดซีรัมจำนวน 80 ไมโครลิตร และแอนติเจนจำนวน 30 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระเบื้องคนให้เข้ากันเป็นอย่างดี ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร เอียงกระเบื้องไปมาเพื่อให้เข้ากันดี พักไว้ 4 นาที อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดีบนแผ่นกระเบื้องภายในระยะเวลา 8 นาที การแปลผล คือ (1) ผลลบ (negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี (no agglutination) และ (2) ผลบวก (positive) คือ มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี (agglutination) หากซีรัมให้ผลบวกจะทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี complement fixation test (CFT) โดยการส่งตัวอย่างตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน จังหวัดลำปาง มีวิธีการตรวจตามมาตรฐานของ OIE (2009) ซึ่งสามารถใช้ตรวจยืนยันผลทางซีรัมวิทยาของโรคแท้งติดต่อได้ (Mainar-Jaime et al., 2005)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการตรวจซีรัมที่ให้ผลบวกกับทั้ง 2 วิธี นำมาวิเคราะห์หาความชุกโรคแท้งติดต่อ โดยแสดงผลเป็นร้อยละของความชุกทางซีรัม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตัวแปรเอกนาม (Univariate analysis) ต่างๆ ของการพบผลบวกทางซีรัมต่อการติดเชื้อบรูเซลลา โดยใช้วิธีการทางสถิติแบบ Pearson chi square with yates continuity correction ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบทางซีรัมวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. melitensis* ในแพะด้วยวิธี RBT เพื่อการคัดกรอง และตรวจยืนยันซีรัมให้ผลบวกด้วยวิธี CFT บริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงธันวาคม พ.ศ.2559 รวมทั้งหมด 500 ตัวอย่าง จาก 12 ฟาร์ม พบความความชุกรายตัว คิดเป็นร้อยละ 0.60 (3/500) และพบความชุกระดับฟาร์มร้อยละ 16.67 (2/12) (ตารางที่ 2)

Table 2 Seroprevalence of *B. melitensis* Infection in Chiang Mai

	Samples (N)	Positive (N)	Negative (N)	Seroprevalence (%)
Individual	500	3	497	0.60
Herd	12	2	10	16.67

ความชุกรายตัวที่พบในแพะ ในจำนวน 9 อำเภอ จากทั้งหมด 12 ฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่พบว่าตัวอย่างซีรัมจากฟาร์มอำเภอแม่ริม ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 15.38 (2/13) และตัวอย่างซีรัมจากฟาร์มอำเภอฝาง ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 3.23 (1/31) ส่วนฟาร์มในพื้นที่อำเภออื่นๆ ได้แก่ ดอยสะเก็ด สันทราย แม่ออน จอมทอง สันกำแพง เมือง ดอยหล่อ ไม่พบตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกต่อโรคแท้งติดต่อ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปัจจัยของโรคจากแบบสอบถามพบว่า ปัจจัยเสี่ยงรายตัวต่อการพบแอนติบอดีต่อเชื้อ โดยทำการวิเคราะห์แต่ละปัจจัยและแปลผลตามระบาดวิทยาเชิงพรรณนา พบว่า ปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อโรคแท้งติดต่อ ($p<0.05$) ได้แก่ ปัจจัยขนาดฝูง (herd size) ปัญหาระบบสืบพันธุ์ (reproductive problem) แหล่งที่มาของแพะตัวใหม่เข้าฝูง (source of a new animal) การตรวจโรคแพะก่อนนำเข้าฝูง (brucellosis test program) และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อภายในฟาร์ม (disinfection) โดยการแสดงค่าปัจจัยทางสถิติต่างๆ ที่มีการสำรวจในแบบสอบถามดังตารางที่ 4

วิจารณ์

การศึกษาความชุกของโรคแท้งติดต่อโดยการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. melitensis* จากตัวอย่างซีรั่มแพะ ด้วยวิธี RBTและตรวจยืนยันตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี CFT พบว่า ความชุกของโรคแท้งติดต่อ ในระดับรายตัวคิดเป็นร้อยละ 0.60 มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการทดสอบในพื้นที่ทั่วทั้งประเทศ มีค่าความชุกของโรคแท้งติดต่อเท่ากับร้อยละ 1.02 (Chumek et al, 2007; Chumek et al., 2013) ในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 และในภาคตะวันตกร้อยละ 5.08 (Antarasena et al, 2013) ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม ถึง มีนาคม พ.ศ.2555 สำหรับการที่พบความชุกในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ต่ำกว่าบริเวณอื่นนั้นอาจจะเป็นผลมาจากปัจจัย ในด้านของจำนวนเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในพื้นที่ยังมีจำนวนไม่มากเท่ากับภาคอื่น และพื้นที่หรือบริเวณที่เลี้ยงไม่ได้อยู่ในพื้นที่ใกล้กัน ทำให้โอกาสในการสัมผัสกับเชื้อก่อโรคของแพะลดลงไปด้วย ประกอบกับการที่เกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ไม่ได้มีการนำแพะเข้ามาจากบริเวณพื้นที่จังหวัดอื่น ทำให้โอกาสในการนำเชื้อโรคที่ปนเปื้อนกับตัวแพะเข้ามาจากพื้นที่อื่นลดลงไป

Table 3 Seroprevalence of *B.melitensis* Infection in each district of Chiang Mai

District	Farm	Samples (N)	Positive (N)	Negative (N)	Seroprevalence (%)
Doi Saket	Farm A	162	0	162	0
Mae Rim	Farm B	13	2	11	15.38
Fang	Farm C	31	1	30	3.23
San Sai	Farm D	43	0	43	0
Mae On	Farm E	23	0	23	0
Mae On	Farm F	20	0	20	0
Mae On	Farm G	17	0	17	0
Chomtong	Farm H	40	0	40	0
Sankamphaeng	Farm I	60	0	60	0
Sankamphaeng	Farm J	20	0	20	0
Mueng	Farm K	33	0	33	0
Doi Lo	Farm L	38	0	38	0
	Total	500	3	497	0.60

ประกอบกับเกษตรกรมีความเข้าใจและตระหนักถึงความสำคัญของ โรคแท้งติดต่อ และทราบถึงมาตรการการควบคุมป้องกันโรคของกรมปศุสัตว์เป็นอย่างดีอย่างไรก็ตามข้อมูลที่ทำการศึกษา จะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรแพะ และเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะทุกปี เนื่องจากเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ มีการซื้อ ขาย แลกเปลี่ยน มีลูกแพะเกิดใหม่ และมีแพะป่วย ตายอยู่ตลอดเวลา รวมถึงการเลิกเลี้ยงแพะ ซึ่งค่าความชุกทางซีรั่มของโรคแท้งติดต่อที่ทำการศึกษา นั้นเฉพาะในเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการเจาะเลือดแพะเพื่อทดสอบโรคแท้งติดต่อในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่เท่านั้น ไม่ได้เป็นค่าความชุกทางซีรัมของโรคแท้งติดต่อทั้งหมดในจังหวัดเชียงใหม่

ปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบแอนติบอดีของเชื้อ *B. melitensis* ในแพะระดับรายตัว ได้แก่ (1) ขนาดฝูง พบว่าฝูงแพะที่มีขนาดเล็กจะมีความสัมพันธ์ในการเกิดโรคแท้งติดต่อมากกว่าแพะที่มีขนาดฝูงใหญ่กว่า แต่ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเรื่องความหนาแน่นของตัวสัตว์ต่อพื้นที่ในการเลี้ยง จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ขนาดฝูงแพะที่มีความหนาแน่นมากกว่า 3.5 ตารางเมตรต่อตัวนั้นจะมีโอกาสในการเกิดโรคแท้งติดต่อเพิ่มขึ้นถึง 1.7 เท่า (Solorio-Rivera et al., 2007) แต่ในฟาร์มที่มีขนาดพื้นที่ไม่หนาแน่นและมีการจัดการที่ดีจะส่งผลให้เกิดโรคได้น้อยลง (2) ปัญหาระบบสืบพันธุ์ เช่น มีประวัติการแท้ง การผสมไม่ติด ส่งผลให้มีโอกาสที่จะติดเชื้อได้มากกว่า เนื่องจากต้องได้รับการผสมซ้ำและสัมผัสกับสิ่งคัดหลั่งจากอวัยวะเพศมากขึ้น ทำให้มีโอกาสในการเกิดโรคแท้งติดต่อมากขึ้น (Rajala et al, 2016) ฟาร์มแพะที่เคยมีประวัติพบการแท้งมีโอกาสพบผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อ *B. melitensis* สูงเป็น 12.5 เท่า ของฟาร์มที่ไม่เคยพบ (Suddee et al., 2011)

Table 4 Individual risk factors assessed by chi square for *B. melitensis* seropositivity in Chiang Mai

Factors	Categories	Samples		Chi square	P value
		Positive (3)	Negative (497)		
Aged	< 4 Years	0	332	3.127	0.07
	≥ 4 Years	3	165		
Herd size	< 50	3	136	4.637	0.03
	≥50	0	361		
Gender	Male	1	78	0.002	0.967
	Female	2	419		
Reproductive problem	Yes	3	17	49.446	<0.001
	No	0	480		
Previous case of abortion	Yes	2	60	3.833	0.051
	No	1	437		
Breeding Method	AI	0	285	1.981	0.159
	Natural	3	212		
Brucellosis test program	Yes	1	466	8.887	0.002
	No	2	31		
Source of a new animals	Import	2	54	4.689	0.03
	No	1	443		
Mixing species	Yes	3	211	2.003	0.15
	No	0	286		
Contact farm	Yes	0	130	0.136	0.71
	No	3	367		
Sharing rams	Yes	3	477	0.001	1
	No	0	20		
Source of Water	Natural water	3	497	Undefined	Undefined
	Tab water	0	0		
Grazing type	Communal	3	379	0.081	0.776
	Individual	0	118		
Disinfection	Yes	1	468	26.776	<0.001
	No	2	11		

(3) การตรวจโรคแท้งติดต่อเป็นประจำโดยเฉพาะแพะที่เข้าฝูงใหม่ เพื่อเป็นการป้องกันโรคและการจัดการสุขภาพแพะในฟาร์มสามารถช่วยลดการเกิดโรคในฟาร์มได้ อย่างมีนัยสำคัญ (4) แหล่งที่มาของการนำแพะใหม่เข้าฝูงพบว่า ฟาร์มในประเทศจอร์แดนที่มีการนำแพะตัวใหม่เข้ามาในฝูงนั้นจะมีโอกาสที่จะเกิดโรคแท้งติดต่อมากถึง 5.8 เท่าเมื่อเทียบกับฟาร์มที่ไม่ได้มีการนำแพะตัวใหม่เข้ามาภายในฝูง (Musallam et al., 2014) โดยการที่นำแพะตัวใหม่เข้ามาสู่ฝูงนั้นถ้าไม่มีการกักโรคก่อนก็จะยิ่งเพิ่มโอกาสในการเกิดโรคได้มากขึ้นไปอีก ซึ่งแพะที่มีการนำเข้ามาในฝูงอาจจะมาจากแหล่งที่มีการเกิดโรคแท้งติดต่ออยู่หรือแพะมีเชื้อแฝงอยู่ก็จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดภายในฝูงใหม่ได้ (5) การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเป็นประจำภายในฟาร์ม ช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคแท้งติดต่อภายในฟาร์มได้ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในการล้างคอกแพะ สามารถลดโอกาสในการ

เกิดโรคแท้งติดต่อในแพะได้ถึงร้อยละ 63 (Musallam et al, 2014) ซึ่งจากผลที่ได้จากการศึกษาก็พบว่าเป็นไปในทางเดียวกัน

สำหรับปัจจัยอื่น เช่น เพศ วิธีการผสม การใช้งานพ่อพันธุ์และรูปแบบการเลี้ยงพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเช่นเดียวกันกับงานศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่า แพะเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของความเสี่ยงในการเกิดโรคแท้งติดต่อ (Solorio-Rivera et al., 2007; Srinonate et al., 2013) โดยปัจจัยเหล่านี้ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนั้นอาจจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่และรูปแบบการเลี้ยง โดยอาจจะส่งผลต่อการเกิดโรคในแต่ละพื้นที่ได้

สรุป

ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2559 พบความชุกโรคแท้งติดต่อในแพะรายตัวร้อยละ 0.60 และรายฟาร์มร้อยละ 16.67 ปัจจัยขนาดฝูง ปัญหาระบบสืบพันธุ์ การตรวจโรคแพะก่อนนำเข้าฝูง แหล่งที่มาของการนำแพะใหม่เข้าฝูง และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อภายในฟาร์ม เป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแท้งติดต่อในแพะ จากข้อมูลสามารถที่จะนำไปใช้ในการวางแผนจัดการภายในฟาร์มในการควบคุมและป้องกันปัญหาโรคแท้งติดต่อ หากเกษตรกรจัดการทั้ง 5 ปัจจัยนี้ให้เหมาะสมก็จะไม่พบปัญหาโรคแท้งติดต่อในบริเวณพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณานายสัตวแพทย์และเจ้าของฟาร์มแพะภายในจังหวัดเชียงใหม่ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการเก็บตัวอย่างและข้อมูลที่จำเป็นในการทำวิจัย ห้องปฏิบัติการคณะสัตวแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน และขอขอบคุณทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Abdallah, A. A., Elfadil, A. A. M., Elsanosi, E. M., Shuaib, Y. A. 2015. Seroprevalence and risk factors of brucellosis in sheep in North Kordofan State. IOSR-JAVS. 8, 31-39.

Antarasena, C., Paethaisong, T., Chetiyawan, P. 2013. Seroprevalence and risk factors of *Brucella melitensis* and caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the western Thailand. KKU Vet Journal. 23, 61-86.

Asmare, K.B. Megersa, Y. Denbarga, G. Abebe, A. Taye, J. Bekele, T. Bekele, E. Gelaye, E. Zewdu, A. Agonafir, G. A., Skjerve, E.. 2013. A study on seroprevalence of caprine brucellosis under three livestock production systems in southern and central Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod. 45, 555 – 560.

Coelhoa, A.M., Coelhob, A.C., Rodriguesb, J. 2013. Seroprevalence of sheep and goat brucellosis in the northeast of Portugal. Arch. Med. Vet. 45, 167-172.

Chumek, P., Aochareon, B., Thongnoon, P. 2007. Study on Brucellosis status of goats in southern of Thailand during 2004-2006. Thai-NIAH eJournal. 1, 189-195.

Chumek, P., Jeenpun, A. 2012. A serological study on Brucellosis and Melioidosis in goats in southern Thailand. The Proceeding of 50th Kasetsart University Annual Conference. Kasetsart University, Bangkok, pp. 329-338.

Kaewket, W. 2008. Seroepidemiological studies of *Brucella melitensis* antibody in goats and contact goat farmers at Kanchanaburi Province. M.E.Thesis, Mahidol University. Bangkok.

Leong, K.N., Chow, T.S., Wong, P.S, Hamzah, S.H., Ahmad, N., Ch'ng, C.C. 2015. Outbreak of

human brucellosis from consumption of raw goats' milk in Penang, Malaysia. Am J Trop Med Hyg. 93, 539-541.

Mainar-Jaime, R. C., Munoz, P. M., Miguel, M. J., Grillo, M. J., Marin, C. M., Moriyon, I. and Blasco, J. M. 2005. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to Yersinia enterocolitica O:9. Can. Vet.J. 46, 913–916.

Musallam, I.I., Abo-Shehada, M., Omar, M., Guitian, J. 2014. Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, risk factors and spatial distribution in small ruminants and cattle. Prev. Vet. Med. 118, 387-396.

OIE. 2009. Caprine and Ovine Brucellosis (excluding Brucella ovis). In: Manual of Standards for diagnostic Test and Vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees). Chapter 2.7.2. [cited 2016 Dec 5]; p. 1-10. Available from:http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.07.02_caprine_ovine_bruc.pdf

Rajala, E.L, Grahn, C., Ljung, I., Sattorov, N., Boqvist, S., Magnusson, U. 2016. Prevalence and risk factors for Brucella seropositivity among sheep and goats in a peri-urban region of Tajikista. Trop. Anim. Health. Prod. 48, 553–558.

Raksakul, D. 2009. Risk Factor Associated with Seropositive Tests for Brucellosis in Sheep and Goat Populations in Ratchaburi Province, Thailand. M.E.Thesis, Colorado State University. Colorado.

Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Dominguez, L. 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. Prev. Vet. Med. 44, 167-173.

Solorio-Rivera, J.L., Segura-Correa, J.C., Sa´nchez-Gil, L.G. 2007. Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan, Mexico. Prev. Vet. Med. 82, 282–290.

Srinonate, A., Thumpala, W. 2014. Study of sero-prevalence and risk factors of Brucellosis in goat. Journals of Science and Technology Mahasarakham University. 10, 507-512.

Suddee, W., Opaschaitat, P., Sontiphun, S., Boonyo, K., Kasemsuwan, S., Rukkwamsuk, T. 2011. Prevalence and risk factors of brucellosis seropositivity of meat goats in Chainat Province. JKV. 21, 42-50.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 109-115. DOI: 10.14456/cmvj.2017.10

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

Original Article

Brain histopathology and optic lobe atrophy of Short mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) in the Upper Gulf of Thailand

Sinlapachai Senarat[1], Wannee Jiraungkoorskul[2], Theerakamol Pengsakul[3], F. Gerald Plumley[1], Pisit Poolprasert[4], Jes Kettratad[1,*]

[1]*Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400*

[3]*Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110*

[4]*Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Mueang, Phitsanulok, 65000*

Abstract Short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851), is an economically important marine fish in the Gulf of Thailand that is potentially threatened by anthropogenic factors. Fifty specimens were obtained between October 2013 to February 2014 from wild populations, processed using standard histological techniques and stained with Harris's hematoxylin and eosin. The results revealed important histopathological findings in the brain tissues of *R. brachysoma* including optic lobe atrophy with neuronal degeneration, vacuolar degeneration, melanomacrophage centers and cerebellar neuronal cell degeneration (12% prevalence). This preliminary study provided evidence that *R. brachysoma* in the Upper Gulf of Thailand lives under stressful conditions that likely impact brain function and possibly the fish's overall health.

Keywords: histology, histopathology, neuronal cell, short mackerel, Thailand

* **Corresponding author:** Jes Kettratad, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University Bangkok 10330

E-mail: kettratadjes@gmail.com

Article history; *received manuscript: 7 June 2017, accepted manuscript: 14 July 2017, published online: 20 July 2017*

บทความต้นฉบับ

จุลกายพยาธิวิทยาของสมองและการฝ่อของออพติก โลบ ปลาทู *(Rastrelliger brachysoma)* ในบริเวณอ่าวไทยตอนบน

ศิลปชัย เสนารัตน์[1] **วรรณีย์ จิรอังกูรสกุล**[2] **ธีรกมล เพ็งสกุล**[3] F. Gerald Plumley[1]
พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ[4] **เจษฎ์ เกษตระทัต**[1,*]

[1]*ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพ 10330*
[2]*ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400*
[3]*คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ สงขลา 90110*
[4]*สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง พิษณุโลก 65000*

บทคัดย่อ ปลาทู *Rastrelliger brachysoma* จัดเป็นปลาทะเลเศรษฐกิจที่สำคัญในอ่าวไทยที่อาจถูกคุกคามโดยตัวแปรที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมมนุษย์ (anthropogenic factors) ตัวอย่างปลาทูทั้งหมดจำนวน 50 ตัวถูกเก็บระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ.2556 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2557 นำมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมาตรฐานทางมิญชวิทยา (standard histological techniques) และย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ผลการศึกษาพบจุลกายพยาธิของสมองปลาทูที่สำคัญคือ การฝ่อของสมองที่ประกอบด้วยการฝ่อของออบติก โลบ (optic lobe) ร่วมกับการเสื่อมของเนื้อเยื่อประสาท การเสื่อมแบบแวคูโอลา (vacuolar degeneration) การสะสมของเมลาโนแมคโครฟาจ (melanomacrophage centers) และการเสื่อมของเซลล์ประสาทในซีรีเบลลัม (ความชุกร้อยละ 12) การศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้ทำให้ทราบว่าปลาทูในบริเวณอ่าวไทยตอนบนที่อยู่ในสภาวะความเครียดมีผลกระทบต่อหน้าที่ของสมองและปัญหาสุขภาวะโดยรวม

คำสำคัญ มิญชวิทยา จุลกายพยาธิวิทยา เซลล์ประสาท ปลาทู ประเทศไทย

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** เจษฎ์ เกษตระทัต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
อีเมล์: kettratadjes@gmail.com

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 7 มิถุนายน พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 14 กรกฎาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 20 กรกฎาคม พ.ศ.2560*

Introduction

Previous reports showed that the Upper Gulf of Thailand is an economically important region (Sutthakorn, 1998; Sritakon et al., 2006). It is a regionally important bay that receives water from hundreds of small, medium, and large cities and towns, and from numerous fisheries-related activities as well as from aquacultural and industrial areas; four of the largest rivers in Thailand empty into the upper gulf, including the Chaopaya, Tha-Chin, Bangprakong, and Maeklong Rivers. According to previous studies, a wide variety of pollutants, especially heavy metals (e.g., waters enriched with cadmium, iron, mercury and lead) and petroleum hydrocarbons have contaminated the sediment and water for a long time (Hungspreugs and Yuangthong, 1983; Cheevaporn and Menasveta, 2003; Wattayakorn, 2012). High pollution levels in the Upper Gulf of Thailand have potentially serious negative impacts on the entire ecosystem as the health of aquatic organisms in the region are adversely impacted.

Our previous research on the health status of *Rastrelliger brachysona*, an economically important marine fish of the Upper Gulf of Thailand, utilized histopathological biomarker to reveal pathologies in several organs (Hinton et al., 2001; Dietrich and Krieger, 2009; Senarat et al., 2015). Biomarkers are extremely useful tools that are generally used to indicate environmental problems in both sub-lethal and chronic effects (Fatma, 2009; Nikalje et al., 2012). One of the most interesting lesions observed in earlier work (Snearat et al, 2015) was brain atrophy, which was observed in field populations of *R. brachysoma.* These brain lesions require further clarification. In this study, brain histopathological features and brain atrophy of *R. brachysoma* were described in greater detail. Insights from this work provide a better understanding of brain lesions in this fish, as well as deeper insights into the health of this fish and, by extension, the local ecosystem.

Materials and Method

Adult *R. brachysoma* (15 to 18 cm standard length, n=50) were captured by bamboo strake traps from Samut Songkram Province on the Upper Gulf of Thailand (13°16'18.4"N, 100°02'13.4"E), during October 2013 to February 2014. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Science in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals prepared by Chulalongkorn University (Protocol Review No. 1423003). All samples were euthanized by rapidly cooling shock (Wilson *et al*., 2009) and brains were surgically removed. All samples were fixed in Davidson's fixative (about 48 h at room temperature) and processed using standard histological techniques (Bancroft and Gamble, 2002). The brains were sectioned with 5 µm thickness and stained with Harris's hematoxylin and eosin (H&E) (Bancroft and Gamble, 2002). Histopathological alterations of brain and whole-brain atrophy sections were observed under the

light microscope and data recorded as a mean prevalence.

Results and Discussion

Our previous observation included details on the brain of *R. brachysoma* in both gross anatomy and histology (Senarat et al., 2016). This earlier work provided baseline data for the current research, which included fish with several prominent brain lesions (Figures 1-2). Anatomical and histopathological micrographs of the brain of *R. brachysoma* revealed prominent lesions associated with brain atrophy. Optic lobe atrophy in both hemispheres was anatomically diagnosed (4% prevalence, n=2 of 50) (Figures 1A-1B). Histological analysis of the optic lobe revealed prominent neuronal degeneration in the stratum album and griseum (Figures 2A-1B). The results presented in this study reveal the previously undocumented incidence of optic lobe atrophy in *R. brachysoma*. It is noteworthy that the lesion might be related to loss of function/ dysfunction of the optic lobe, which will be further studied.

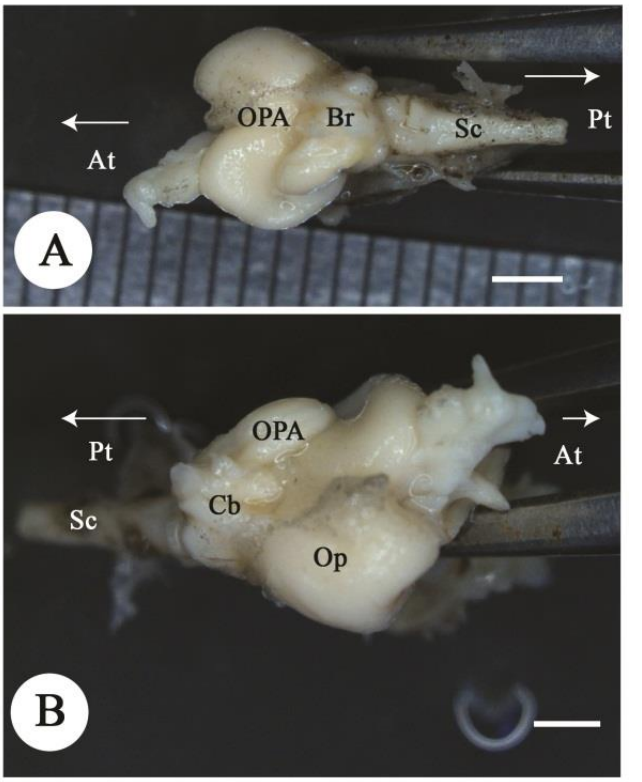


Figure 1. Morphology of the brain (Br) and optic lobe atrophy (OPA) in *R. brachysoma* brain sections (A-B) Labels: anterior part (At), cerebellum (Cb), optic lobe (OP), posterior part (Pt), Spinal cord (Sc). Scale bar A, B=2 mm. (Note: Figure A. Left oblique view, Figure B. Right lateral view)

Prominent histopathological alterations of brain sections included vacuolar degeneration, melanomacrophage centers (MMC) and neuronal cell degeneration of the cerebellum (12% prevalence, n=6 of 50) (Figures 2D-2E). The appearance of vacuolar degeneration of the cerebellum also was observed in this study (Figure 1B). This could be due to the similar effects of a variety of different pollutants such as glyphosate and endosulfan (Sarma et al., 2009; No et al., 2014). Meyers and Hendricks (1985) suggested that vacuolar degeneration might indicate an imbalance in biochemical synthesis, inhibition of protein synthesis, energy depletion, desegregation of microtubules, and shifts in substance utilization. It is possible that the occurrence of MMC in *R. brachysoma* brain was a direct result of fish living under stressful conditions (e.g., overcrowding, excessive noise and aggression) (Alvarez-Pellitero et al., 2007; Sitja-Bobadilla, 2008) and/or poor water quality with contaminants (Patiño et al., 2003). Several investigators (Marty et al., 2003; Van Dyk et al., 2010) have suggested increased MMC in tissues is associated with infectious diseases through the change of environmental quality or stress responses to the exposure to toxicants. Our histological analysis of this lesion could provide a useful tool for monitoring the health status of wild *R. brachysoma* and serve as reference data and warning in regards to deterioration of the environment of the Upper Gulf of Thailand.

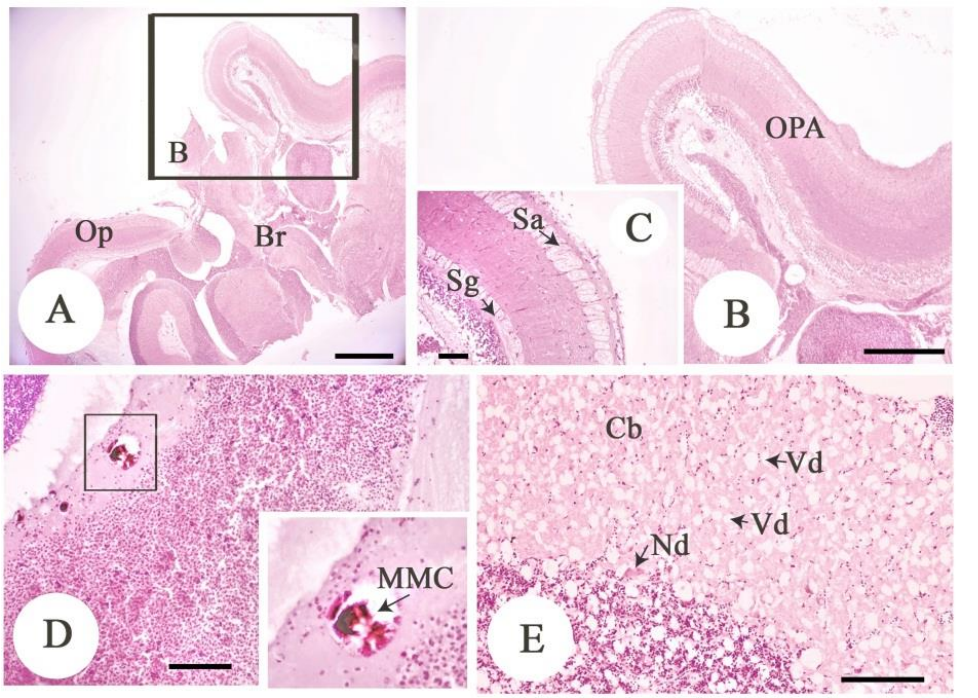


Figure 2. Light photomicrographs of histopathology in *R. brachysoma* brain sections (A-E) Labels: brain (Br), melanomacrophage centers accumulation (MMC), vacuolar degeneration (Vd), neuronal cell degeneration (Nd) of cerebellum (Cb), optic lobe (OP), optic lobe atrophy (OPA) neuronal degeneration in the stratum album (Sa) and griseum (Sg). Scale bar A, B, D, E=50 μm; C=20 μm.

Conclusion

This report has revealed brain histopathology, especially optic lobe atrophy, in *R. brachysoma* in the Upper Gulf of Thailand. It is tempting to extrapolate these results as an indication that this fish has lived under stressed conditions. Moreover, the brain pathologies observed here are associated with declining fish health related to physiology and/or behavior. This information may be applicable as an early warning for this particular fish in this particular marine ecosystem, but at a wider scale, could serve as a warning for fish health and the environmental damage at large scales.

Acknowledgement

This research was supported by The 100th Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship (to S. Senarat).

References

Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A., 2007. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). Parasitol. Int. 57, 110 –120.

Bancroft, J.D., Gamble, M., 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Oxford.

Cheevaporn, V., Menasveta, P., 2003. Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand. Mar. Pollut. Bull. 47, 43 –51.

Dietrich, D.R., Krieger, H.O., 2009. Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish. John Wiley and Sons, New Jersey, U.S.A.

Fatma, A.S.M., 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. World J. Fish Mar. Sci. World. 1, 29–39

Hinton, D.E., Segner, H., Braunback, T. 2001. Toxic response of liver. In: Shlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), Target organ toxicity in marine and fresh water teleosts, Taylor and Francis, London, UK, pp. 224–268.

Hungspreugs, M., Yuangthong, C., 1983. A history of metal pollution in the Upper Gulf of Thailand. Mar. Pollut. Bull. 14, 465 –469.

Meyers, T.R., Hendricks, J.D., 1985. Histopathology. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), Fundamentals of aquatic toxicology, Hemisphere Publishing Corp, New York, U.S.A, pp 283 –331.

Marty, G.D., Hoffmann, A., Okihiro, M.S., Hepler, K., Hanes, D., 2003. Retrospective analyses: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Mar. Environ. Res. 56, 569 –584.

No, E., Sa, E., Mo, A., EE, E., 2014. Histopathological changes in the brain tissue of Africa catfish expose to glyphosate herbicide. J. Appl. Sci. Environ. Manag. 18, 275–280.

Nikalje, S.B., Muley, D.V., Angadi, S.M., 2012. Histopathological changes in gills of a freshwater major carp, *Labeo rohita* after acute and chronic exposure to textile mill effluent (tme). Int. J. Environ. Sci. 3, 108 – 118.

Patiño, R., Wainscott, M.R., Cruz-Li, E.I., Balakrishnan, S., McMurry, C., Blazer, V.S., Anderson, T.A. 2003. Effects of ammonium perchlorate on the reproductive performance and thyroid follicle histology of zebra fish. Environ. Toxicol. Chem. 22, 1115–1121.

Sarma, D.J., Kenyon, L.C., Hingley, S.T., Shindler, K.S., 2009. Mechanism of primary axonal damage in a viral model of multiple sclerosis. J. Neurosci. 29, 10272–10280.

Senarat S., Kettratad J., Poolprasert P., Boonyoung P., Kangwanrangsan N., Jiraungkoorskul, W., 2015. Hepatic histopathology in *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) from The Upper Gulf of Thailand. APCEAS, Osaka, Japan. 25-27 August, 2015. pp. 369–374.

Senarat, S., Kettretad, J., Jiraungkoorskul, W., 2016. Neuroanatomy and histology of the central nervous system in short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) Walailak J. Sci. & Tech. 13, 531–541.

Sitja-Bobadilla, A., 2008. Fish immune response to myxozoan parasites. Parasitology. 15, 420–425.

Sritakon, T., Chotithammo, S., Vechprasit, S., 2006. Reproductive biology of short mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) and Indian mackerel *R. kanagurta* (Cuvier, 1817) in the Southern Gulf of Thailand. Department of Fisheries, Thailand.

Sutthakorn, P., 1998. Biological aspects of short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) of the Andaman Sea Coast of Thailand. Department of Fisheries, Thailand.

van Dyka, J.C., Marchanda, M.J., Smita, N.J., Pietersea, G.M., 2010. A histology-based fish health assessment of four commercially and ecologically important species from the Okavango Delta panhandle, Botswana. Afr. J. Aquat. Sci. 34, 273–282.

Wattayakorn, K., 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. Coast. Mar. Sci. 35, 234–245.

Wilson, J.M., Bunte, R.M., Carty, A.J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 48, 785–787.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 117-125. DOI: 10.14456/cmvj.2017.11

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

Original Article

Association analysis of candidate gene polymorphisms with egg production in Japanese quails (*Coturnix japonica*)

Ly Thi Thu Lan[1,#], Nguyen Thi Hong Nhan[2,#], Dinh Thi Be Ngoc[2], Tran Trung Tin[2], Luu Huynh Anh[2], Nguyen Hong Xuan[3], Nguyen Trong Ngu[2,*]

[1]*School of Agriculture and Aquaculture, Tra Vinh University, Vietnam*

[2]*College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University, Vietnam*

[3]*College of Food Technology and Biotechnology, Can Tho University of Technology, Vietnam*

[#] *These authors contributed equally to this work*

Abstract This study was conducted to identify genotypes and evaluate the effect of polymorphisms in growth hormone (GH), prolactin (PRL), bone morphogenetic protein receptor-Type IB (BMPR-1B) and melatonin receptor-type 1C (MTNR-1C) genes on egg production of Japanese quail during 20 weeks of egg laying. PCR-RFLP and PCR-SSCP methods were used to determine the genotype of all genes. Our results showed that the genotypes at loci C2161G in PRL and G294A in MTNR-1C were monomorphic as C and A, respectively. For the A237B in GH and A290T BMPR-1B mutations, two alleles were detected, giving three genotypes at each locus. In addition, the 24-bp difference of two genotype patterns provided an Indel-358 mutation in PRL while three alleles were identified at locus A459TC (MTNR-1C). Taken together, the polymorphic sites did not affect egg production except the A459TC locus in MTNR-1C gene (P=0.002), where quails carrying AA and CC genotypes provided the highest egg number (115.6-116.6 eggs/quail). Thus, the A459TC single nucleotide polymorphism is suggested to apply in other populations and it should be considered as a candidate marker for egg production.

Keywords: Egg production, Japanese quail, genotype, mutation

[*]Corresponding author: Nguyen Trong Ngu, College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University, 3/2 street, Can Tho City, Vietnam. Tel: 84-989 828295; E-mail: ntngu@ctu.edu.vn

Article history; *received manuscript: 23 June 2017, accepted manuscript: 25 July 2017, published online: 10 August 2017*

Introduction

Quail farming has many advantages such as low investment costs, less diseases, early puberty, long lifespan of egg laying and high nutritional meat value. Practically, quails are raised for egg production and for meat consumption but the first tendency is more popular (Rogerio, 2009). In Vietnam, Japanese quail (*Coturnix japonica*) raising has been developed in recent years but the problem of quail breeding remains the common concern for most producers. For a long time, breeding industry has still been out of the focus and thus current breeds are facing degenerative phenomenon with decreased and unbalanced productivity, making it impossible to maximize breeding potential. Therefore, the issues of selecting and breeding quail lines for high egg yield are essential in the current period.

Advances in candidate gene approach have been widely applied in the determination of genetic relationship as well as selective breeding of domestic animals with desirable traits (Kulibaba and Podstreshnyi, 2012). Researchers are constantly looking for potential genes affecting productivity and quality of traits in poultry. This approach is promising because the identification of genotypes nowadays can be done quickly and inexpensively thanks to the technologies being developed. Selection based on genetic markers offers several benefits including rapid detection, accuracy, improved productivity and increased ability to adapt to the environment of animals (Liu, 2007). There have been reports on the effects of candidate genes on reproductive characteristics of quails such as Growth Hormone (Nie et al., 2002), Prolaclin (Cui et al., 2006), Bone Morphogenetic Protein Receptor-Type IB (Zhang et al., 2008) and Melatonin receptor-Type 1C (Li et al., 2013). Therefore, it can be remarked that exploiting candidate genes to improve egg production is a potential strategy. Within the scope of this study, six polymorphic sites of the mentioned genes were analyzed to determined frequencies and their association with egg yield of Japanese quails.

Materials and Method

Animal: Japanese quails were raised at an experimental farm in Tra Vinh province, of which two populations of 189 and 120 laying quails (6-26 weeks old) were used, respectively. All quails were individually kept in cages for egg collection. During the experiment, they were fed with diets having metabolizable energy of 2.750 kcal/kg and 20% crude protein and they were vaccinated before and during the study. For determination of egg yield and egg weigh parameters, all eggs from individual quails were collected daily during 20-laying weeks and egg weight was recorded by weighing scale of 0.01g accuracy.

All procedures related to birds submitted in the present expreriments were allowed by the local Department of Animal Husbanry and Veterinary Medicines.

DNA extraction: Genomic DNA was isolated from feathers by phenol/chloroform extraction. In detail, quail feathers were taken,

chopped into small pieces and mixed with lysis buffer for incubation overnight at 37°C. In the next step, 300µl phenol: chloroform: isoamyalcohol (25:24:1) was added into the sample, mixed and centrifuged at 10.000rpm for 5 minutes. The supernatant was then transferred into a 2ml tube and added 700µl phenol:chloroform, swirled and centrifuged at 10.000 rpm for 5 minutes. The supernatant was recovered in a new clean tube with 700µl chloroform, swirled and centrifuged at 10.000rpm for 5 minutes. The upper phase was transferred into a new clean tube containing 300µl 1.2M NaCl; 150µl 2M sodium acetate and 1000µl cold ethanol (100%). Mixed gently by hand and centrifuged at 10.000rpm for 5 minutes to collect DNA pellet. DNA was then washed by adding 1000µl ethanol 75%, air-dried and stored in 1X TE buffer (pH8.0). The sample was subjected for OD measurement and diluted into 50ng/µl for further use.

Establishment of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay: based on published sequences, primer pairs were prepared to amplify GH, PRL2, BMPR-IB, MTNR-1C[a] genes as shown in Table 1. Each polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 10µL containing 25ng of quail genomic DNA, 0.25M each primer, 0.25M each dNTP, 1X PCR buffer, and 1U *Taq* DNA polymerase. PCR products were digested with restriction enzymes overnight at 37°C. The restriction fragments were separated on 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): PCR products amplified by the MTNR-1C[b] primer was denatured and electrophoresed on 10% polyacrylamide gel. To perform DNA denaturation, 8µl of PCR product was mixed well with 10µl loading buffer. The mixture was then heated to 95°C and maintained for 10 minutes to separate the DNA strands into single strands of DNA. Quickly transfered the mixture tube to the ice (about 3°C) and kept at -20°C for 10 minutes. Before electrophoresis, the gel was cooled at 7°C for 30 minutes. The DNA mixture was loaded on gel and run at 10°C for 6 hours at 30 W. After that, the gel was stained in 250ml of TAE 1X solution containing 25µl of ethidium bromide (25mg) in 30 minutes. The bands were recorded from the gel under the UV light.

Statistical analysis: genotype frequencies of candidate genes and the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were estimated using the method of Rodriguez *et al*. (2009). The association between genotype and egg production was analyzed based on General Linear Model of Minitab software version 16.0: $Y_{ij} = \mu + G_i + \xi_{ij}$ (where Y_{ij}: traits observed; μ: general mean, G_i: influence of genotype; ξ_{ij}: random error).

Results and Discussion

In the current study, five single nucleotide polymorphisms (SNPs) and one 24-nucleotide Indel (Insertion/Deletion) of four candidate genes were identified in the population of Japanese laying quails. The number of bands, PCR-RFLP and PCR-SSCP band size, genotype and allele

frequencies of polymorphisms on GH, PRL, BMPR-IB and MTNR-1C genes are shown in Figure 1 and Table 2.

Generally, all mutations did not follow the Hardy-Weinberg law (P<0.05). The imbalance might be due to: (i) the sample size was not large enough and (ii) individuals in the population were not randomly mated. For the GH/*Msp*I polymorphism, two alleles and three genotypes were detected with frequencies of 0.3 (AA), 0.4 (AB) and 0.3 (BB). The present outputs supported the report of Johari *et al.* (2013) on the Q-R quail population where two alleles were found and the correspoding genetic structure was 0.38AA+0.45AB+0.17BB. At the PRL/*Csp*6I (C2161G) and MTNR-1C[a]/*Mbo*I (G294A) loci, only one allele (either C or A) was found in the population, therefore their frequency was considered to 1.0 and further analysis was not performed. Additionally, for the PRL-Indel mutation, two alleles were D (130 bp) and I (154 bp) with corresponding frequencies of 0.31 and 0.69, respectively. Similar results were previously reported by Lotfi et al. (2013) in Japanese quails with frequency ranging from 0.48 (allele D) to 0.52 (allele I).

Table 1. Information regarding the polymorphisms studied

Gene	SNP/ Genbank No	Sequencing primer (5'-3')	Ta (°C)	Enzyme	PCR product (bp)	References
GH	A237B/	F: ATCCCCAGGCAAACATCCTC	52	*Msp*I	776	(Nie et al.,
	EF452679.1	R:CCTCGACATCCAGCTCACAT				2002)
PRL-1	Indel-358/	F: TTTAATATTGGTGGGTGAAGAGACA	54	-	130 or 154	(Cui et al.,
	AB011438.2	R: ATGCCACTGATCCTCGAAAACTC				2006)
PRL-2	C2161G/	F: AGAGGCAGCCCAGGCATTTTAC	57	*Csp6*I	439	(Cui et al.,
	AB011438.2	R: CCTGGGTCTGGTTTGGAAATTG				2006)
BMPR-1B	A290T/ EF530593	F: CCATAGCAAAACAGATTCAG	53	*Hind*III	575	(Zhang et al.,
		R: TCAGGA CAGTTTGGTAGATT				2008)
MTNR-1C[a]	G294A/ JQ249896	F: GGTGTATCCGTATCCTCTAA	55	*Mbo*I	372	(Li et al.,
(PCR-RFLP)		R: GACAGTGGGACAATGAAGT				2013)
MTNR-1C[b]	A459TC/	F: TGCCAGATAAGTGGGTTCCT	55	-	164	This study
(PCR-SSCP)	XM_015860811.1	R: AGCGTCCAGGTCAGACAGAT				

F: Forward primer; R: Reverse primer; Ta: Annealing temperature

MTNR-1C[a] : Primer used for PCR-RFLP; MTNR-1C[b]: Primer used for PCR-SSCP

The associations of GH/*Msp*I (A237B), PRL-1 (Indel-358), BMPR-1B/*Hind*III (A290T) and MTNR-1C[b] (A459TC) with egg weight and egg production are presented in Table 3. Among the polymorphic sites, only A459TC SNP showed significant impact on egg yeild (P=0.002). At this locus, quail with AA and CC genotypes provided highest egg number in five laying months (115.6-116.6 eggs/quail) and the lowest productivity was in quail carrying CT genotype (105.6 eggs/quail).

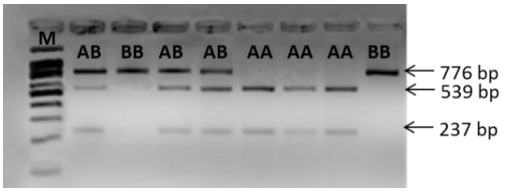
Similar to the present study, in PRL gene there was no association between the Indel-358 locus with egg weight (Lotfi et al., 2013). As shown in Table 3, in all SNPs studied egg weight ranged from 11.4 to 12.0 g/egg, which were slighly higher than those reported by Men and Dinh (2012) (10.4-10.9 g/egg). Previously, it was pointed out by Vali et al. (2006) and Doan and Thanh (2010) that average egg weight of Japanese quails were 11.2 and 11.7 g,respectively.

Table 2. Allele and genotype frequencies of polymorphic sites in Japanese quail

Gene/locus	Observed population									Expected population						HWE
	Genotype			Allele		Genotype										
GH/*Msp*I, A237B	AA		AB		BB	A		B		AA		AB		BB		
(n=196)	0.30		0.40		0.30	0.50		0.50		0.25		0.50		0.25		0.006
PRL-1, Indel-358	II		ID		DD	I		D		II		ID		DD		
(n=189)	0.40		0.58		0.02	0.69		0.31		0.47		0.43		0.10		0.000
BMPR-1B/ *Hind*III	AA		AT		TT	A		T		AA		AT		TT		
A290T (n=122)	0.48		0.36		0.16	0.66		0.34		0.44		0.44		0.12		0.034
MTNR-1C[b]	AA	AT	TT	CT	CC	AC	A	T	C	AA	AT	TT	CT	CC	AC	
A459TC (n=131)	0.18	0.00	0.10	0.14	0.29	0.30	0.32	0.17	0.51	0.11	0.11	0.03	0.18	0.26	0.33	0.000

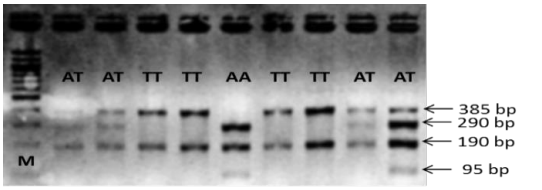
HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium

In chicken, the BMPR-1B primer was designed by Zhang *et al*. (2008) to amplify a PCR product of 581 bp including a part of exon 6, intron 6 and a part of exon 7. The authors identified five SNPs, in which the A287G was recognized by *Hin*III restriction enzyme. This result was later confirmed in Noi chicken by Vu and Ngu (2016). However, in quail this mutation was slightly changed to A290T with similar regconition size of enzyme. Supportedly, the A290T was detected by El-Tarabany *et al.* (2014) in two meat and egg quail lines but the PCR product was shorter compared to that of chicken (575 vs. 581 bp). Moreover, the A287G locus was found to affect egg production in chicken from week 47 to 56. It was previously indicated by Onagbesan et al. (2003) that the activity of BMPR-1B gene was closely related to ovarian folliculogenesis and supposed to influence egg productivity in poultry. Nevertheless, in the present SNP observed in quail, the linkage between allele and egg number was not established in the population.



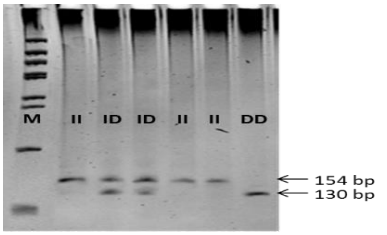
GH/*Msp*I, A237B

AA: 539/237 bp; AB: 776/539/237 bp; BB: 776 bp



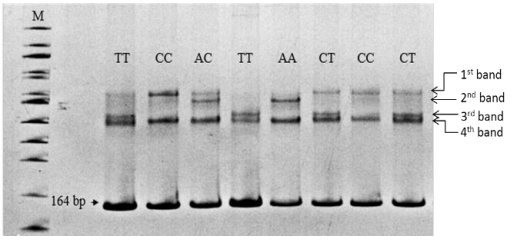
BMPR-1B/ *Hind*III, A290T

AA: 290/190/95 bp; AT: 385/290/190/95 bp; TT 385/190 bp



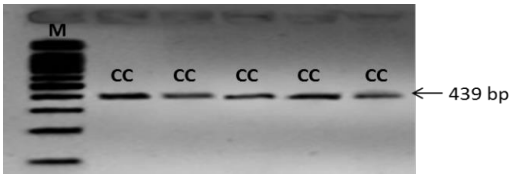
PRL, Indel-358/PCR

II: 154 bp; ID: 154/130 bp; DD: 130 bp



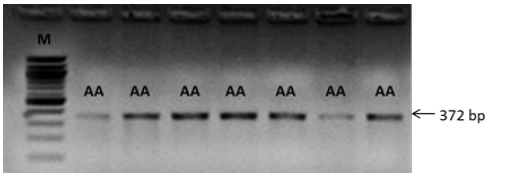
MTNR-1C^{b}/SSCP, A459TC

CC: band 1&4; TT: band 3&4; CT: band 1,3&4; AC: band 1,2&4



PRL/*Csp6*I, A2161G

CC: 439 bp; CG & GG: not available



MTNR-1C^{a}/*Mbo*I, G294A

AA: 372 bp; AG & GG: not available

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR-RFLP and PCR-SSCP profiles of candidate genes (M: 100-bp DNA marker, Fermentas)

Table 3. Association of SNPs with egg weight and egg yield in 20 laying weeks

Gene/locus	Genotype	n	Egg weight (g)	Egg yield
GH/*Msp*I, A237B	AA	63	11.8±0.1	120.3±1.7
(population 1)	AB	74	11.7±0.1	122.8±1.5
	BB	59	11.9±0.1	124.1±1.7
	P		*0.381*	*0.283*
PRL-1, Indel-358	II	75	11.9±0.1	123.7±1.5
(population 1)	ID	110	11.7±0.1	121.3±1.3
	DD	4	12.0±0.4	129.5±6.7
	P		*0.285*	*0.265*
BMPR-1B/*Hind*III, A290T	AA	54	11.5±0.1	111.6±1.5
(population 2)	AT	36	11.6±1.0	113.2±1.9
	TT	15	11.4±0.1	111.7±2.9
	P		*0.498*	*0.786*
MTNR-1C[b], A459TC	AA	20	11.5±0.1	116.6±2.2[a]
(population 2)	TT	11	11.4±0.2	107.0±0.3[ab]
	CT	11	11.8±0.2	105.6±2.9[b]
	CC	29	11.6±0.1	115.9±1.9[a]
	AC	29	11.5±0.1	109.8±1.8[ab]
	P		*0.438*	*0.002*

[a,b] Different letters within a column indicate significant differences at the 5% level.

Being different from the other SNPs, three alleles namely A, T and C at locus A459TC were identified in the MTNR-1C gene formulating five genotypes, of which the AT genotype was absent in the population. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) secreted from the pineal gland is an indole hormone that is involved in many functions including seasonal changes in reproduction (Adachi et al., 2002; He et al., 2014). Moreover, it helps activate many receptors in the ovary and signaling pathways on various different cells including theca and granulosa cell (Soarces et al., 2003). According to Sundaresan et al. (2009), MTNR-1C gene was highly expressed in granulosa cells, therefore it is considered to effect on the process of egg formation and egg productivity in poultry. This statement was confirmed in the present work with significantly different egg number produced from quails of different genotypes.

Conclusion

In the populations studied, the A459TC (MTNR-1C) mutation was associated with egg production, of which those baring AA and CC

genotypes provided higher egg number in 20 laying weeks. This SNP is suggested to apply in other populations and it could be considered as a potential marker for egg production in Japanese quails.

Acknowledgement

This project was completed with the support of the Ministry of Education and Training, Vietnam, Code B2014-16-41.

References

Adachi A., Natesan A.K., Whitfield-Rucker M.G., Weigum S.E., Cassone V.M., 2002. Functional melatonin receptors and metabolic coupling in cultured chick astrocytes. Glia. 39, 268-278.

Cui, J.X., Du, H.L., Liang, Y., Deng, X.M., Li, N., Zhang, X.Q., 2006. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. Poult. Sci. 85, 26-31.

Doan, B.H., Thanh, H., 2010. Evaluation of Japanese quail production under household condition in Tu Son – Bac Ninh (In Vietnamese). J. Sci. Devel. 8, 59-67.

El-Tarabany, M.S., Awad, A., El-Bayomi, K.M., 2014. Genetic polymorphism of prolactin, bone morphogenetic protein receptor 1B and Insulin-like growth factor 1 genes in two selected lines of Japanese quail. Life Sci. J. 11, 408-416.

He H., Jiang D., Kang B., Ma R., Bai L., Wang X., Zhao L. 2014. Gene expression profiling of melatonin receptor subtypes in the ovarian hierarchical follicles of the Sichuan white goose. Anim. Reprod. Sci. 145, 62-68.

Kulibaba, R., Podstreshnyi, A., 2012. Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of Ukrainian selection. Cytol. Genet. 46, 390-395.

Li, D., Zhang, L., Smith, D., Xu, H., Liu, Y., Zhao, X., Wang, Y., Zhu, Q., 2013. Genetic effects of melatonin receptor genes on chicken reproductive traits. Czech J. Anim. Sci. 58, 58-64.

Liu, Z., 2007. Aquaculture Genome Technologies. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

Lotfi, E., Zerehdaran, S., Ahani, M., Dehnavi, E., 2013. Genetic polymorphism in Prolactin gene and its association with reproductive traits in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Poult. Sci. J. 1, 29-35.

Men, B.X., Dinh, T.H. 2012. Effect of dietary energy and protein levels on reproductive quail performance raised at household farm in the Mekong delta. In: The first international conference on Animal Production and Environment, Can Tho University, 151-155.

Nie, Q., Ip, S., Zhang, X., Leung, F., Yang, G., 2002. New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. J. Hered. 93, 277-279.

Onagbesan, O., Bruggeman, V., Van As, P., Tona, K., Williams, J., Decuypere, E., 2003. BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and-7 on granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E973-E983.

Rogerio, G., 2009. Quail meat-an undiscovered alternative. World Poult. J. 25, 7-16.

Sundaresan, N., Leo, M.M., Subramani, J., Anish, D., Sudhagar, M., Ahmed, K., Saxena, M., Tyagi, J., Sastry, K., Saxena, V., 2009. Expression analysis of melatonin receptor subtypes in the ovary of domestic chicken. Vet. Res. Commun. 33, 49-56.

Soares J.M. Jr, Masana M.I., Ersahin C. & Dubocovich M.L. 2003. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. J. Pharm. Exp. Ther. 306, 694-702.

Vali, N., Edriss, M., Moshtaghi, H., 2006. Comparison of egg weight between two quail strains. Int. J. Poult. Sci. 5, 398-400.

Vu, C.T., Ngu, N.T., 2016. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with egg production traits in native Noi chicken of Vietnam. Int. J. Pl. An. and Env. Sci. 6, 162-169.

Zhang, N., Tang, H., Kang, L., Ma, Y., Cao, D., Lu, Y., Hou, M., Jiang, Y., 2008. Associations of single nucleotide polymorphisms in BMPR-IB gene with egg production in a synthetic broiler line. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 21(5), 628-632.

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร
Chiang Mai Veterinary Journal
ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)
Website: http://vet.cmu.ac.th/cmuvj

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วัตถุประสงค์ (Objectives)

"**เชียงใหม่สัตวแพทยสาร**" เป็นวารสารเพื่อการเผยแพร่เผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพในลักษณะต่างๆ เช่น บทความต้นฉบับ บทความปริทัศน์ รายงานฉบับย่อ และรายงานสัตว์ป่วย ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary Science) และวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการสัตว์ (Animal Science and Technology) ได้แก่ ชีววิทยา สรีรวิทยา จุลชีววิทยา พยาธิวิทยา โภชนาการศาสตร์ กายวิภาคศาสตร์ พันธุศาสตร์ อายุรศาสตร์ ศัลยศาสตร์ สูติศาสตร์ วิทยาศาสตร์ทางชีวภาพวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ระบาดวิทยาและแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว

บทความที่ได้รับการเผยแพร่ในเชียงใหม่สัตวแพทยสาร เป็นวารสารที่ผ่านการตรวจคุณภาพ โดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 ท่านที่ไม่ทราบชื่อผู้แต่งและผู้แต่งไม่ทราบชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ (Double-blind peer review) ความคิดเห็นของผู้เขียนแต่ละท่าน ทางกองบรรณาธิการไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป กรณีผู้ประสงค์จะนำบทความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่ง (รูป ตาราง ฯลฯ) ที่มีการเผยแพร่ไปแล้ว ต้องได้รับอนุญาตจากกองบรรณาธิการวารสาร "เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แม้ว่าจะเป็นผลงานจากงานของผู้เขียนเองผู้แจ้งให้

การตีพิมพ์ออนไลน์ (Online publication)

ตั้งแต่ฉบับที่ 2 ปีที่ 14 พ.ศ.2559 เป็นต้นไป เชียงใหม่สัตวแพทยสารได้เปลี่ยนการตีพิมพ์เป็นรูปแบบวารสารออนไลน์เท่านั้นโดยจะไม่มีการพิมพ์ออกเป็นรูปเล่มเหมือนที่ผ่านมา เพื่อความรวดเร็วในการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการและเพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายของศูนย์ดัชนีอ้างอิงวารสารภาษาไทย (TCI) ที่สนับสนุนให้วารสารปรับเปลี่ยนเป็นการตีพิมพ์ในรูปแบบออนไลน์ ทั้งนี้ในแต่ละปีทางวารสารยังคงมี 3 ฉบับ ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม และฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม รวมทั้งกำหนดให้มีเลขหน้าเรียงตามเรื่องที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์

บทความที่ได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน มกราคม-เมษายน จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 1

บทความที่ได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 2

บทความที่ได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน กันยายน-ธันวาคม จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 3

รูปแบบของนิพนธ์ต้นฉบับ (Manuscript Format)

บทความต้นฉบับ (Original article) เป็นการรายงานการศึกษาจากงานวิจัยต้นฉบับ (Original research) ซึ่งไม่เคยได้รับการเผยแพร่ที่ใดมาก่อน เนื้อหาประกอบด้วยบทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการศึกษา วิจารณ์ และสรุป

บทความปริทัศน์ (Review article) เป็นบทความทางวิชาการที่เขียนขึ้นเพื่อนำเสนอเรื่องราวที่กำลังเป็นที่สนใจหรือการเขียนบทความเพื่อประโยชน์ในแง่ของการฟื้นฟูวิชาการ

<u>รายงานฉบับย่อ</u> (Short communication) เป็นรูปแบบการรายงานการศึกษาแบบกระชับ อันเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของการศึกษา แต่ยังมีความสมบูรณ์ในเนื้อหาที่นำเสนอ รูปแบบที่เขียนจะเป็นแบบลักษณะคล้ายนิพนธ์ต้นฉบับแต่จะเป็นรายงานแบบย่อ

<u>รายงานสัตว์ป่วย</u> (Case report) บทความประเภทรายงานสัตว์ป่วยในโรคที่พบไม่บ่อย มีการตรวจวินิจฉัยอย่างละเอียดโดยหัวข้อควรประกอบด้วย บทนำ ประวัติและอาการทางคลินิก การวินิจฉัยและการรักษา วิจารณ์และสรุป โดยเป็นการนำเสนอที่แตกต่างจากในหนังสือหรือตำราวิชาการ

การเตรียมนิพนธ์ต้นฉบับ (Manuscript Preparation)

"เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" รับบทความทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยให้จัดพิมพ์ต้นฉบับบนกระดาษขนาด A4 พิมพ์หน้าเดียว โดยพิมพ์แบบเว้นบรรทัด (double space) ใช้ Cordia New ขนาดอักษร 16 ระบุตำแหน่งบรรทัดทุก 5 บรรทัด ต่อเนื่องตลอดทั้งบทความ ในการเขียนบทความเป็นภาษาไทยให้ใช้หลักการเขียนภาษาไทยตามราชบัณฑิตยสถาน (http://www.royin.go.th/) หากคำใดมีการแปลเป็นภาษาไทยแล้วโดยราชบัณฑิตยสถาน ขอให้ใช้ภาษาไทย โดยวงเล็บคำศัพท์ภาษาอังกฤษไว้ครั้งแรกที่เขียนและในที่ต่อไปให้เขียนเป็นภาษาไทย ส่วนคำที่ไม่มีการแปลขอให้พิจารณาใช้คำยืม (อ่านได้จากราชบัณฑิตยสถาน) หากผู้เขียนพิจารณาว่าการใช้คำยืมทำให้การสื่อสารผิดไป สามารถใช้ศัพท์ภาษาอังกฤษได้ แต่ขอให้พิจารณาใช้น้อยที่สุด

ต้นฉบับทั้ง 4 ประเภทจะต้องประกอบด้วย 2 ไฟล์แยกจากกันคือ ไฟล์**ใบหน้าแรก** (title page) และ **ไฟล์ต้นฉบับ** (manuscript)

ใบหน้าแรก (Title page)

ประกอบด้วย

1. ชื่อบทความ (Title) เขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ชื่อบทความควรกะทัดรัด และตรงกับเนื้อเรื่อง
2. ชื่อผู้เขียนทุกคน (Name of author (s)) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตำแหน่ง สถานที่ทำงาน และที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ (สถานที่ทำงาน ถนน ตำบล อำเภอ จังหวัด รหัสไปรษณีย์)
3. ชื่อผู้รับผิดชอบบทความ (Corresponding author) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ สถานที่ทำงาน (สถานที่ทำงาน ถนน ตำบล อำเภอ จังหวัด รหัสไปรษณีย์) เบอร์โทรศัพท์ เบอร์แฟกซ์ ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ และ ที่อยู่ไปรษณีย์อีเลกโทรนิกส์ (Email address)

ต้นฉบับ (Original Manuscript)

เป็นส่วนที่ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ (Reviewer) ใช้อ่านเพื่อประเมินเอกสารจึง<u>ไม่มีชื่อและที่อยู่ของผู้เขียนทั้งหมด</u> โดยประกอบด้วย

1. ชื่อบทความ (Title) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

   ชื่อบทความต้องตรงกันทั้งภาษาไทยและอังกฤษในลักษณะคำต่อคำ

2. บทคัดย่อ (Abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

   <u>บทความต้นฉบับ</u>และ<u>บทความปริทัศน์</u> บทคัดย่อมีความยาวไม่เกิน 300 คำ (ยึดจากภาษาอังกฤษ)

รายงานฉบับย่อและรายงานสัตว์ป่วย บทคัดย่อมีความยาวไม่เกิน 200 คำ (ยึดจากภาษาอังกฤษ)
การเขียนบทคัดย่อต้องให้ตรงกันทั้งภาษาไทยและอังกฤษในลักษณะคำต่อคำ

3. คำสำคัญ (Keywords) ให้ระบุคำสำคัญ ท้ายบทคัดย่อ (Abstract) จำนวน 3-5 คำ ทั้งภาษาไทยและอังกฤษ
4. เนื้อหา (Content)*

   บทความต้นฉบับ และ รายงานฉบับย่อ ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับ บทนำ (Introduction) อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ผลการศึกษา (Results) วิจารณ์ (Discussion) สรุป (Conclusion) กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) และ เอกสารอ้างอิง (References)

   รายงานสัตว์ป่วย ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับ บทนำ (Introduction) ประวัติและอาการทางคลินิก (History and Clinical sign) การวินิจฉัยและการรักษา (Diagnosis and Treatment) วิจารณ์และสรุป (Discussion and Conclusion) กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) และ เอกสารอ้างอิง (References)

   *หากมีสมการทางคณิตศาสตร์ให้ใช้โปรแกรม “Microsoft equation editor” หรือโปรแกรม “Math Type”
5. รูปและตารางให้เรียงไว้ท้ายบทความ
6. หากเป็นการทดลองที่มีการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ให้ระบุว่าผ่านการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของหน่วยงานใด วันที่เท่าไหร่ และเลขที่หนังสืออนุญาต (หากมี) ในหัวข้ออุปกรณ์และวิธีการ

รูปภาพ (Figure)

1. คำอธิบายรูปและข้อมูลในรูปให้ใช้ภาษาอังกฤษเท่านั้น
2. ไฟล์รูปภาพจะต้องอยู่ในรูปแบบ TIFF หรือ JPEG (file รูปต้นฉบับจะขอเมื่อต้นฉบับได้รับการตอบรับให้เผยแพร่)
3. ขนาดภาพไม่ต่ำกว่า 480x640 pixels หากต้องการพิมพ์ภาพสีผู้เขียนต้องรับผิดชอบค่าใช้จ่ายด้วยตนเอง
4. ลำดับและรูปแบบของภาพ ให้เป็นไปตามลำดับที่ปรากฏในเนื้อหา
5. หากรูปภาพมีการแสดงมาตรวัด (scale) ให้ใช้เป็น scale bar กำกับไว้
6. คำอธิบายรูปภาพให้เขียนด้านล่าง โดยใช้รูปแบบเดียวกับที่ใช้ในเนื้อหา
7. เจ้าของบทความต้องแสดงเอกสารอนุญาตให้ใช้รูปภาพที่มีลิขสิทธิ์ด้วยทุกครั้ง

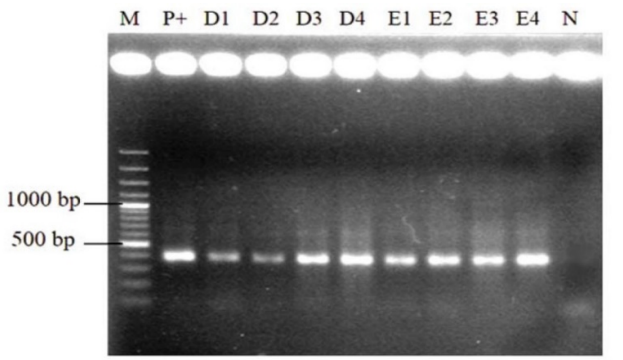


Figure 1 PCR product from fresh bones. M indicates marker, P+ indicates a positive control and N is a negative control. D1-D4 refers to diaphysis, while E1-E4 refers to epiphysis.

ตัวอย่างการเขียนรูปภาพ

ตาราง (Table)

1. ชื่อตารางและคำอธิบายในตารางให้ใช้ภาษาอังกฤษเท่านั้น
2. ลำดับและชื่อตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
3. หลีกเลี่ยงการใช้เส้นตารางแนวตั้ง และใช้เส้นตารางในแนวนอนแบ่งเฉพาะหัวข้อและเนื้อหาเท่านั้น
4. คำอธิบายเพิ่มเติมควรกะทัดรัด และวางใต้ตาราง

Table 1 Primers used for OASL cloning.

Primers	Sequences
F-*suis*_E	5'-AGTCGAATTCATGGCTATTTATCAAAACAT-3'
R-*suis*_N	5'-ATATGCGGCCGCATCATTGAACTCATAAAG-3'
pGAP Forward	5′-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3′
3′*AOX1*	5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′

#*EcoR*I and *Not*I restriction site are underlined.

ตัวอย่างการเขียนตาราง

เอกสารอ้างอิง (References)

การอ้างอิงในเนื้อเรื่องใช้ระบบนาม-ปี ทั้งนี้เอกสารอ้างอิงทั้งหมดต้องพิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ หากเป็นเอกสารอ้างอิงภาษาอื่น ผู้เขียนต้องทำการแปลเป็นภาษาอังกฤษให้ถูกต้อง หากผู้เขียนใช้โปรแกรมจัดการเอกสารอ้างอิงเช่น Endnote, Reference manager หรือ Zotero จะช่วยให้ขั้นตอนในการตรวจเอกสารและเผยแพร่เร็วขึ้น **สามารถ download template ของ Endnote ได้จาก website ของเชียงใหม่สัตวแพทยสาร**

1. เอกสารอ้างอิงทุกรายการในเนื้อหาต้องมีในรายการอ้างอิง
2. การอ้างอิงในเนื้อหาใช้ระบบชื่อและปีที่พิมพ์ เช่น "จากการศึกษาของ Toyoki (2010) ได้แสดงให้เห็นว่า" หรือ "สอดคล้องการการศึกษาในสุนัข (Hirada, 2010) ม้า (Maki and Hida, 2011) ที่พบว่าระดับ"
3. การอ้างอิงผู้เขียนมากกว่า 2 คน ให้ใช้ชื่อคนแรก ตามด้วย et al. เช่น "พบว่าการแสดงออกของยีน Oct-4 สูงใน ตัวอ่อนระยะ blastocyst (Nganvongpanit et al., 2006)"
4. การเรียงเอกสารอ้างอิงให้เรียงตามตัวอักษร
5. เอกสารอ้างอิงโดยผู้เขียนคนเดียวกันและปีเดียวกันให้เรียง 2010a, 2010b
6. ในกรณีที่เอกสารอ้างอิงไม่เป็นภาษาอังกฤษให้แปลเป็นภาษาอังกฤษแต่ต้องได้รับความเห็นชอบจากเจ้าของบทความนั้นๆ
7. งานที่ได้ได้รับการเผยแพร่แล้วแต่ยังอยู่ในระหว่างการเตรียมให้ระบุตอนท้ายว่า "in press".
8. เอกสารอ้างอิงภาษาไทยหรือภาษาอื่น เช่น เยอรมัน จีน ญี่ปุ่น ผู้เขียนต้องทำการแปลเป็นภาษาอังกฤษให้ถูกต้อง และวงเล็บตอนท้ายว่า (in Thai, in German, in China, in Japan) ขึ้นกับภาษาของต้นฉบับนั้น
9. เอกสารที่ไม่ได้รับการเผยแพร่ ไม่นำมาใช้ในการอ้างอิง
10. เอกสารที่เผยแพร่ในรูปแบบ online ไม่มีการระบุเล่มและเลขหน้าให้ระบุหมายเลข Digital Object identifier (DOI)

11. การย่อของชื่อวารสารให้ยึดตาม Title Word Abbreviations: (http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/.)

12. ตัวอย่างการจัดเขียนเอกสารอ้างอิง

11.1. วารสารวิชาการฉบับปกติ

- Maneepitaksanti, W., Worananthakij, W., Sriwilai, P., Laoprasert, T., 20 1 4 . Identification and distribution of gill monogeneans from Nile tilapia and red tilapia in Thailand. Chiang Mai Vet. J. 12, 57–68.
- Tongkamsi, S., Singasa, K., Tubtim, T., Nakbubpa, K., Chansilpa, T., Kayee, S., 2015. Effects of storage time at 32.5°C on amount of *Bacillus cereus* in UHT milk for school in Chonburi province. Chiang Mai Vet. J. 13, 1–6. (in Thai)

11.2. เอกสารประชุมวิชาการ

Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), Bovine Tuberculosis. Vet. Microbiol. 40, 1–4.

11.3 หนังสือ

Armitage, P., Berry, G., 1987. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2015 www.elsevier.com/locate/vetmic 12

11.4 หนังสือเป็นบท

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), The Ruminant Immune System, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

การตรวจการคัดลอกงาน (Plagiarism)

บทความที่ส่งตีพิมพ์เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมดจะถูกตรวจการคัดลอกงานและความซ้ำซ้อนด้วยโปรแกรม Turn it in โดยกองบรรณาธิการและหากพบความซ้ำซ้อนที่บงบอกว่าอาจมีการจงใจคัดลอก กองบรรณาธิการสามารถปฏิเสธบทความดังกว่าวได้

กำหนดการ (Timeline)

เชียงใหม่สัตวแพทยสารเป็นวารสารวิชาการที่เผยแพร่ผลงานวิชาการที่มีคุณภาพและใช้เวลาในการดำเนินการที่รวดเร็วโดยกำหนดว่า

- ระยะเวลาจากที่ผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับครั้งแรกจนถึงการตัดสินครั้งแรก ใช้เวลาเร็วที่สุด 3 สัปดาห์
- ระยะเวลาจากที่ผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับครั้งแรกจนถึงการเผยแพร่ในระบบออนไลน์ ใช้เวลาเร็วที่สุด 4 สัปดาห์

การส่งต้นฉบับ (Manuscript Submission Guideline)

ผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับเป็นแบบ PDF เท่านั้น (file ชนิด word จะส่งเมื่อได้รับการตอบรับให้เผยแพร่) ทาง email มายัง **cmuvetj@gmail.com** โดยประกอบไปด้วย 3 ไฟล์ ดังนี้

1 จดหมายนำ (Cover letter) จากผู้รับผิดชอบบทความยืนยันว่าผลงานนี้ไม่เคยได้รับการเผยแพร่มาก่อน รวมทั้งไม่อยู่ในระหว่างการพิจารณาของวารสารอื่น รวมถึงผู้เขียนสามารถแนะนำผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อพิจารณาบทความ จำนวนไม่เกิน 4 ท่าน โดยขอให้ระบุ ชื่อ ที่ทำงาน และ E-mail) เพื่อให้ทางกองบรรณาธิการพิจารณาคัดเลือก ทั้งนี้ผู้ทรงคุณวุฒิต้องไม่มีชื่ออยู่ในบทความที่ส่งพิจารณา

2 ใบหน้าแรก (Title page)

3. ต้นฉบับ (Manuscript)

รายการตรวจสอบก่อนส่งต้นฉบับ (Manuscript submission checklist)

☐ จดหมายนำ (Cover letter) (ต้องมี)

☐ แนะนำผู้ทรงคุณวุฒิ (Suggestion reviewers)

☐ ใบหน้าแรก (Tile page) (ต้องมี)

☐ ต้นฉบับ (Manuscript) (ต้องมี)

☐ รูปแบบของเอกสารอ้างอิง (Reference format) และเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด (ต้องมี)

☐ รูปและตารางเป็นภาษาอังกฤษ ทั้งคำอธิบายและเนื้อหาในรูป/ตาราง (ต้องมี)

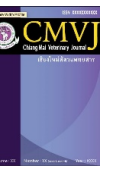
หากมีข้อสงสัยติดต่อสอบถามได้ที่

กองบรรณาธิการ "เชียงใหม่สัตวแพทยสาร"
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: cmuvetj@gmail.com
โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8070
โทรสาร. (66)-5327-4710

หรือ

บรรณาธิการเชียงใหม่สัตวแพทยสาร
รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์
ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: korakot.n@cmu.ac.th
โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8046

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร
Chiang Mai Veterinary Journal
ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)
Website: http://vet.cmu.ac.th/cmuvj



Guide for Authors

Objectives

"Chiang Mai Veterinary Journal" aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as original articles, review article, short communication, and case report in the field of veterinary science and animal science and technology, including biology, physiology, microbiology, pathology, nutrition, anatomy, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, and one health.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board. Any republication of a published article, or any part of published article (figure, table, etc.) must acquire permission from the editorial board of the Chiang Mai Veterinary Journal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University even though the individual who submits the request is the author himself/herself.

Online publication

After volume 14, year, 2016, Chiang Mai Veterinary Journal will end paper publication and will be published online only for prompt publication. This policy is in accordance with Thai-Journal Citation Index Center that supports online publication. Annually, the Journal publishes three issues: the 1st issue during January-April, the 2nd issue during May-August, and the 3rd during September-December. Pages are numbered according to the articles that are accepted for publication.

Articles accepted during January-April will be published in the 1st issue.
Articles accepted during May-August will be published in the 2nd issue.
Articles accepted during September-December will be published in the 3rd issue.

Manuscript Format

The original article is a report of original research which has never been published by any publisher before. The article is composed of introduction, materials and methods, results, discussion, and conclusion.

Review article is an academic article that presents issues of interests or is academically useful.

Short communication is a concise study report due to the limits of the study but is complete in terms of content. The format is similar to the original thesis, but is a brief report instead.

Case report is a report of a rare case of ill animals that are thoroughly diagnosed. The topics include introduction, clinical history and symptoms, diagnosis and treatment, discussion, and conclusion. The case presentation is different from that in textbooks.

Manuscript Preparation

The Chiang Mai Veterinary Journal welcomes Thai and English articles. Manuscripts must be hard-copy printout on A4 papers, single-sided. “Cordia New” font of 16-point type should be used along with double spacing between lines. Manuscripts written in Thai should refer to Thai language principles of the Royal Institute Dictionary (http://www.royin.go.th). For English words that have been translated to Thai by the Royal Society of Thailand, their Thai translations are encouraged with English words within a bracket in the first time that they are mentioned. Thai words should be used in the following times. For the words with no Thai translations, borrowed words are encouraged (please refer to Royal Institute Dictionary). If the author has considered that borrowed words would alter the original meaning, English words are allowed but at as least as possible.

Digital files of all the four types of manuscripts must compose of two separate files: title page and manuscript.

Title Page

Title page is composed of the followings.

1. Title of the article in English and Thai language. The title should be concise and refers to the content of the article.
2. Name of author(s) in English and Thai language, position, workplace, correspondence address (company or organization, street, sub-district, district, province, and postal code).
3. Name of corresponding author in both English and Thai language, workplace (company or organization, street, sub-district, district, province, and postal code), telephone number, fax number, correspondence address, and email address.

Original Manuscript

Original manuscript will be sent to reviewers and will not show name and address of all the author(s). It is composed of the followings.

1. Title in Thai and English language
   Title in Thai and English must be matched word-by-word.
2. Abstract in Thai and English language
   Abstract of the original article and a review article should not exceed 300 words (based on English abstract).
   Abstract of short communication and case report should not exceed 200 words (based on English abstract).
3. Keywords of 3-5 words must be listed below the abstract in Thai and English language.
4. Content
   Original articles and short communication should comprise of the topics respectively as follows: introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgement, and references.
   If there is any mathematical equation, “Microsoft equation editor” or “Math Type” software should be employed.
5. Figures and tables should be listed at the end of the article.
6. If animals were used in the study, permission to use animals for scientific study from the Animal Ethics Committee must be identified. The organization of the Committee, the date of the permit, and license number (if available) must be mentioned under the topic of materials and method.

Figure

1. Figure captions and information in figures should be in English.
2. Digital files of figures should be in TIFF or JPEG format. (Original digital files will be requested when the manuscript is accepted for publication.)
3. Size of figures should be more than 480×640 pixels. The author is responsible for cost of colored print-out of figures.
4. Order and format of the figures should be in order as they appear in the content.
5. If figures display scale, scale bar must be accompanied.
6. Figure captions should be below the figure and in the same format as in the content.
7. The author must show document(s) giving permission to use licensed figure(s).

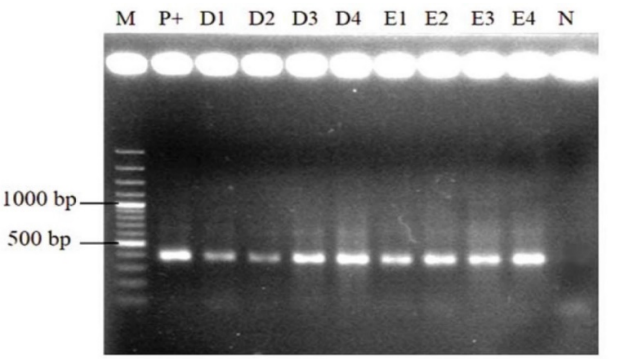


Figure 1 PCR product from fresh bones. M indicates marker, P+ indicates a positive control and N is a negative control. D1-D4 refers to diaphysis, while E1-E4 refers to epiphysis.

Sample figure

Table

1. Table caption and content in the tables must be in English only.
2. Numbers and table captions must be above tables
3. Vertical table lines should be avoided; horizontal lines should be used to separate topics from content.

Table 1 Primers used for OASL cloning.

Primers	Sequences
F-*suis*_E	5'-AGTCGAATTCATGGCTATTTATCAAAACAT-3'
R-*suis*_N	5'-ATATGCGGCCGCATCATTGAACTCATAAAG-3'
pGAP Forward	5′-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3′
3′*AOX1*	5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′

#*EcoR*I and *Not*I restriction site are underlined.

Sample table

References

The name-year system should be employed for in-text citations. All referenced documents should be in English. If referenced documents are in other languages, the author must translate them into English. Authors are welcome to use reference managers such as Endnote, Reference manager, or Zotero, which allow faster proofreading and publishing. **Endnote template is available for downloading from Chiang Mai Veterinary Journal's website.**

1. All in-text citations must have corresponding citations in the reference list.
2. The name - year system must be employed for in-text citations. For example, "Based on the study of Toyoki (2010), it was shown that…" or "… corresponding to the study in canines (Hirada, 2010), horse (Maki and Hida, 2011) which discovered the level…."
3. If citing more than one name of authors, the first author must be cited and followed by *et al*. For example, "… High level of Oct-4 gene expression was discovered in blastocyst (Nganvongpanit *et al*., 2006)"
4. Reference list should be in alphabetical order.
5. References by the same author and same year of publication should be cited, for example, as 2010a, 2010b.
6. If referenced documents are not in English, they must be translated into English, but with permission of the authors of such documents.
7. Studies that have been published but are during preparation should be identified as "in press" at the end of the reference.
8. Referenced documents in Thai or other languages such as German, Chinese, Japanese must be translated into English. Their references must be followed by (in Thai, in German, in China, in Japan) depending on the language of the documents.
9. Studies that have not been published cannot be used as reference.
10. Studies that are published online without volume and page number must be identified by the Digital Object Identifier (DOI).
11. The title abbreviation must, in accordance with Title Word Abbreviations: (http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/.)
12. Sample references

    11.1. Journals

    - Maneepitaksanti, W., Worananthakij, W., Sriwilai, P., Laoprasert, T., 20 1 4 . Identification and distribution of gill monogeneans from Nile tilapia and red tilapia in Thailand. Chiang Mai Vet. J. 12, 57–68.
    - Tongkamsi, S., Singasa, K., Tubtim, T., Nakbubpa, K., Chansilpa, T., Kayee, S., 2015. Effects of storage time at 32.5 ºC on amount of *Bacillus cereus* in UHT milk for school in Chonburi province. Chiang Mai Vet. J. 13, 1–6. (In Thai)

    11.2. Conference reports

Caffrey, J.P., 1 9 9 4 . Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R.,
Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), Bovine Tuberculosis. Vet. Microbiol. 40, 1–4.

    11.3 Books

Armitage, P., Berry, G., 1987. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications,
Oxford, pp. 94–100, 411–416.
AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2015 www.elsevier.com/locate/vetmic 12

    11.4 Chapters from book

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), The Ruminant Immune System, Plenum
Press, New York, pp. 3–55.

Plagiarism

English articles submitted for publication will be checked for plagiarism with Turn it in software by the editorial board. If any duplication that might indicate plagiarism is detected, the editorial board might reject the article.

Timeline

The Chiang Mai Veterinary Journal is a publisher of high quality academic journals and has fast proceedings. The process timeline is as follows.

- Time of proceedings from manuscript submission until the initial decision is at least 3 weeks.
- Time of proceedings from manuscript submission until online publication is at least 4 weeks.

Manuscript Submission Guideline

The author must submit digital files of the article in PDF format (Word files can be submitted after acceptance for publication.) via email at cmuvetj@gmail.com. The submission must include the followings.

1. Cover letter from the corresponding author, assuring that the article has never been published before and also not in consideration of other publishers. The author can suggest a list of no more than four reviewers with their names, company/organization, and email for the editorial board's consideration. The list of reviewers must not be shown in the submitted manuscript.
2. Title page
3. Manuscript

Manuscript submission checklist

☐ Cover letter (Obligatory)
☐ Suggestion of reviewers
☐ Title page (Obligatory)
☐ Manuscript (Obligatory)
☐ Reference format in English (Obligatory)
☐ Figures and tables in English, including captions and content in figures and tables (Obligatory)

The Faculty of Veterinary Medicine
Chiang Mai University

Address : Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100
Thailand
Website : http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj
Email : cmuvetj@gmail.ac.th