บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

โรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera) จัดได้ว่าเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้บ่อยในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงเป็ดหรือห่านอย่างหนาแน่นและการสุขาภิบาลไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าไก่ ไก่งวง เป็ดและห่าน เป็นสัตว์ปีกที่มีความไวต่อการเกิดโรคนี้ได้เช่นเดียวกัน สาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pasteurella multocida* serogroup A สำหรับประเทศไทยพบซีโรไทป์ A:1, A:3 และ A:4 ตามแหล่งน้ำที่เลี้ยงเป็ดและตามพื้นของโรงเรือน มีเป็ดที่ป่วยด้วยโรคนี้แบบเรื้อรัง คน หนู แมลง และรถอุปกรณ์ที่ใช้ภายในฟาร์มเป็นตัวแพร่กระจายโรค สัตว์ปีกติดเชื้อชนิดนี้ได้จากทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว อาจพบอาการป่วยภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังได้รับเชื้อและสามารถพบเชื้อได้ในกระแสเลือด (bacteremia) ในภาวะเฉียบพลันมักพบว่าเป็ดป่วย ซึม มีไข้สูง มีน้ำมูกน้ำตาไหล และมักมีอาการท้องเสียร่วมด้วย เป็ดจะตายอย่างรวดเร็วภายหลังจากแสดงอาการไม่นานเนื่องจากติดเชื้อทั่วร่างกาย (septicemia) ส่วนใหญ่จะพบอัตราตายสูง หากไม่ตายมักจะป่วยเรื้อรังและซูบผอมหรือผลผลิตไข่ลดลงอย่างมากทั้งปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้จะยังเป็นตัวอมโรคในฝูงและแพร่เชื้อต่อไป

ในการควบคุมและป้องกันโรคนั้น การใช้วัคซีนเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย โดยหลักการทั่วไปของการผลิตวัคซีน คือ การยังคงสภาพการเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเชื้อด้วยการผสมกับแอดจูแวนท์ที่เหมาะสม (Rimler and Glisson, 1997) วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกชนิดแบคทีริน (bacterins) ได้รับการพัฒนาเชิงการค้าและใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย แต่มีจุดอ่อนในเรื่องการให้ภูมิคุ้มกันข้ามกัน (cross immunity) จึงทำให้มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกชนิดเชื้อเป็น (live attenuated) ขึ้นมาทดแทน ซึ่งสามารถให้ภูมิคุ้มกันข้ามกัน (cross immunity) ที่ดีกว่าและสะดวกในการใช้งานเนื่องจากเป็นการฉีดเพียงหนึ่งครั้ง แต่มักพบ

PAYAP UNIVERSITY

ปัญหาการกลับมาก่อความรุนแรงของโรคจากเชื้อที่นำมาทำให้อ่อนกำลังลง (reversion of virulence) นอกจากนั้นวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่พัฒนาจากเชื้อที่คัดแยกจากเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ (cultivated *in vivo*) โดยการทำให้อ่อนกำลังด้วยการใช้ formaldehyde ยังสามารถให้ภูมิคุ้มกันข้ามกันได้ดีอีกด้วย (Rimler and Glisson, 1997) ดังนั้นแอนติเจนหรือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ภูมิคุ้มกันแบบข้ามกันและไม่สามารถกลับมาก่อความรุนแรงได้นั้นจะเป็นที่ต้องการในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในอนาคต

เนื่องจากเป็ดส่วนใหญ่ถูกเลี้ยงในพื้นที่เปิดและไม่มีโรงเรือนปิดชัดเจน ทำให้ง่ายต่อการได้รับเชื้อก่อโรค ซึ่งนกหรือสัตว์ปีกในธรรมชาติจะเป็นตัวแพร่เชื้อโรคได้ดี (Rimler and Rhoades, 1989) ตามข้อกำหนดของสำนักงานโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties: OIE) ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคอหิวาต์สัตว์ปีกนั้น ได้แนะนำให้ใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเครื่องมือเฝ้าระวังโรค ซึ่งในปัจจุบันมีชุดตรวจแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้เฉพาะในไก่และไก่งวงเท่านั้น แต่ยังไม่มีชุดตรวจสำหรับเป็ด และเพื่อให้มีเครื่องมือที่ใช้สำหรับเฝ้าระวังโรค รวมทั้งประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สำหรับเป็ด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดีต่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในเป็ดที่เหมาะสม

จากการศึกษาในเบื้องต้น พบว่าโปรตีนลูกผสม outer membrane protein (Omp) H ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 สามารถเหนี่ยวนำให้ไก่หรือกระต่ายสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อการยับยั้งการจับเกาะของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 ที่เป็นสายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกได้ (Borrathybay et al., 2003a; Thanasarasakulpong, 2013) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า OmpH เป็นปัจจัยหลักในการจับเกาะของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นหากสามารถเหนี่ยวนำให้ร่างกายสัตว์สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นด้วยวิธี Western blot ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาวัคซีนอหิวาต์สัตว์ปีกในสัตว์ต่อไป แล้วส่งต่อให้ภาคอุตสาหกรรมนำไปผลิตเพื่อจำหน่ายเป็นทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่ง

PAYAP UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *P. multocida* ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรค

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

โปรตีนลูกผสม Omp H ของเชื้อ *P.multocida* สายพันธุ์ X-73 สามารถเหนี่ยวนำให้เป็ดสร้างแอนติบอดีจำเพาะที่ทำปฏิกิริยาต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่คัดแยกจากสัตว์ป่วย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีของเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม outer membrane protein (Omp) H ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 ต่อ whole cell lysate ของสายพันธุ์ CMU-73 (สายพันธุ์พื้นเมือง) หรือ X-73 (สายพันธุ์อ้างอิง) ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบคุณสมบัติพื้นฐานของแอนติบอดีของเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H สำหรับประเมินประสิทธิภาพของโปรตีนในการพัฒนาไปเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคอหิวาต์สัตว์ปีกในเป็ด

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

พาสจูเรลล่า มัลโตซิดา (*Pasteurella multocida*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera) จากการสำรวจพบว่าเชื้อ *P. multocida* ชนิด

PAYAP UNIVERSITY

capsular serogroup A และ somatic serotype 1, 3 หรือ 4 เป็นสาเหตุหลักของโรคอหิวาต์สัตว์ปีก (Brogden and Packer, 1979; Rhoades and Rimler, 1987; Sawada et al., 1999) ไก่ ไก่งวง เป็ดและห่าน เป็นสัตว์ปีกที่มีความไวต่อการเกิดโรคนี้ จากการศึกษาพบว่าไก่งวงจะมีความไวต่อการเกิดโรคมากที่สุด ปัจจัยของเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ประกอบด้วยหลายส่วน ได้แก่ bacterial endotoxins, adhesins proteins และ capsules เป็นต้น (Boyce et al., 2000, 2006; Harper et al., 2006; Homhuan et al., 2004; Luo et al., 1997; Rimler and Glisson, 1997) ตัวเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายสัตว์จากบริเวณทางเดินหายใจส่วนต้น ทำให้สัตว์ปีกมีอาการเริ่มตั้งแต่ติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนต้นไปจนถึงอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต ทั้งนี้ (Ibrahim et al., 1998) พบว่าปัจจัยก่อโรคของเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ แคปซูล (bacterial capsule) ซึ่งมี hyaluronic acid เป็นองค์ประกอบสำคัญ ที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับผนังเยื่อบุทางเดินหายใจของสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังมีส่วนของ outer membrane protein (Omp) H หรือ porin H ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 39 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้ตัวเชื้อยึดเกาะกับโฮสต์ (Bötcher et al., 1991; Pruimboom et al., 1996) และจากรายงานการศึกษาเบื้องต้นพบว่าทั้งแคปซูลและ Omp ของเชื้อนั้น มีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Antigenicity) ที่ดีอีกด้วย (Sthitmatee et al., 2008)

PAYAP UNIVERSITY