รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเกิดโรคติดเชื้อ อี.โคลัย ในไก่ การทดลองโดยการฉีดเชื้อเข้าจมูก และถุงลม.

The E.Coli infection in Respiratory tract of chicken : An experimental Inducing disease by Nasal and Intra airsac injection.

โดย

เกรียงศักดิ์ พูนสุข

เล็ก อัศวพลังชัย

เกรียงศักดิ์ สายธนู

โสมทัต วงศ์สว่าง

เยาวภา เจิงกลิ่นจันทน์

กันยายน 2531

การเกิดโรคติดเชื้อ อี.โคลัย ในไก่ การทดลองโดยการฉีดเชื้อเข้าจมูกและถุงลม

The E.Coli infection in Respiratory tract of chicken: An experimental Inducing disease by Nasal and Intra airsac injection.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข เล็ก อัศวพลังชัย
Kriengsak Poonsuk Lek Ousavaplangchai
เกรียงศักดิ์ สายชนู โสมทัต วงศ์สว่าง
Kriengsag Saitanu Somatat Wongsawang

เยาวภา เจิงกลิ่นจันทน์
Jaowapa Jerngklinchan

ABSTRACT

The identification of 76 strains of E.coli invasiveness isolated from chicken was carried out in November 1986-September 1987. The CR-positive E.coli were found from the E.coli strains isolated from airsac.,liver and pericardium in 98%,100% and 100% respectively.However, the CR-negative strains isolated from the intestine were found in 60%, i.e.in the intestine, the CR-positive E.coli were less than the CR-negative E.coli in number by the ratio 2:3. Besides, LD_{50} of the 55-H E.coli strain was 55.35 x 10^5 cells/ml.The morbidity and mortality rates of chicken injected E.coli via intra-airsac were 100% and 90% respectively. Ferther more, the chicken injected E.coli via intranasal neither got the diseases nor had some lesions in the internal organs of them. Moreover,the morbidity rate of

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติ การแทรกผ่าน (invasiveness) ของเชื้อ อี.โคลัย จำนวน 76 เสตรน พบว่า เสตรนที่แยกได้จากถุงลม, ตับ และถุงหุ้มหัวใจ มีคุณสมบัตินี้คือ ผล CR-positive คิดเป็นร้อยละ 98, 100 และ 100 ตามลำดับ ส่วน เสตรนที่แยกได้จากลำไส้จะมี CR-negative มากกว่า คิดเป็นร้อยละ 60 นั่นคือ CR-positive strain จะน้อยกว่า CR-negative strain อยู่ในอัตราส่วน 2 :3 เสตรน 55—H, มี LD_{50} 55.35 x 10^5 cells/ml. ไก่ที่ฉีดเชื้อเข้าทางถุงลมจะมีอัตราการติดโรค 100 เปอร์เซนต์ อัตราตาย 90 เปอร์เซนต์, เมื่อฉีดเชื้อเข้าโพรงจมูกไม่สามารถทำให้ไก่เกิดโรคได้ และไม่พบรอยโรคที่อวัยวะภายในส่วนไก่ที่ฉีดเชื้อเข้าทางหลอดลมพบว่าสามารถทำให้ไก่เป็นโรคได้ 60 เปอร์เซนต์.

คำนำ

โรคติดเชื้อ อี.โคลัย (E.coli infection) หรือที่เรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่า โคลัยบาซิลโลซิส (Colibacillosis) ในไก่โดยเฉพาะไก่กระทงนั้น นับว่าเป็นโรคหนึ่งที่ทำความสูญเสียอย่างมาก ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่เป็นโรคที่ติดต่อร้ายแรงก็ตาม ซึ่งอาจจะเกิดได้จากเชื้อนี้เป็นสาเหตุเพียงอย่างเดียว หรือเกิดการแทรกซ้อนกับโรคติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ เช่น ร่วมกับเชื้อมัยโคพลาสม่า หรือ โรคนิวคาสเซิลหรือโรคหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นต้น เกรียงศักดิ์ และคณะฯ(2529) ได้รายงานถึงโรคในไก่กระทงที่มีกลุ่มอาการ ถุงลมอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ, ตับอักเสบ ว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อ อี.โคลัย ในการวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาหาอัตราการตายกึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ของเชื้อ อี.โคลัย ที่แยกได้จากการระบาดในท้องที่ นอกจากนี้ยังศึกษากลุ่มอาการและรอยโรคที่อวัยวะต่าง ๆ โดยการฉีดเชื้อ อี.โคลัย เข้าทางถุงลม โพรงจมูก และหลอดลม.

วิธีการ

การทดลองที่ 1.

ทดสอบคุณสมบัติการแทรกผ่านเนื้อเยื่อ (invasiveness) ของเชื้อ อี.โคลัย (Berkhoff and Vinal, 1986).

เชื้อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 76 เสตรน จากไก่กระทง เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ถุงลม, ถุงหุ้มหัวใจ, ตับ และลำไส้ จำนวน 54,7,10 และ 5 เสตรน ตามลำดับ ซึ่งเชื้อเหล่านี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็น อี.โคลัย โดยการทดสอบ Indol, Methyl red, Voges Prostaeur, Citrate utilization และการเจริญบน EMB agar ซึ่ง อี.โคลัย จะให้ผลดังตารางเปรียบเทียบข้างล่างนี้ กับเชื้อเคลบซีลล่า แอร์โรเจนส์

Reaction / Organ	Indol	M.R.	V.P.	Citrate	EMB
E.coli	+	+	−	−	dark small with metallic luster.
K.aerogenes	−	−	+	+	large mucoid dark incenter.

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ CR-Agar (Congo Red Agar) ตามวิธีของ Berkhoff and Vinal (1985) มีส่วนผสมดังนี้คือ Trypticase soya agar (BBL) 45 กรัม, Congored (Sigma chemical co.) 0.3 กรัม, และ Bile salt 1.5 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มล. ซึ่งส่วนผสมดังกล่าว ใส่หม้อเสตนเลสเติมน้ำจนครบ ต้มบนเตาแก๊ส คนส่ำเสมอจนวุ้นละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล.โดยเติมน้ำกลั่นลงไปอีก แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.2 – 7.4 แบ่งใส่ขวดนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่อง autoclave ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 15 นาที.

อาหารนึ่งเรียบร้อยแล้ว นำไปทำให้เย็นลงโดยใส่ใน water bath 50°ซ. แล้วจึงเทใส่จานเพาะเชื้อ (pourplate) เมื่อวุ้นแข็งตัวดีแล้วนำไปทำให้ผิวหน้าแข็ง (dry) ที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 °ซ. นาน 10–15 นาที อาหารที่เตรียมเสร็จสามารถเก็บใส่ในตู้เย็นแล้วนำมาใช้ได้ตลอดอาทิตย์.

วิธีทำ

เกลี่ย (Streak) เชื้อ อี.โคลัย ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร CR-agar อบเพาะที่ 37 °ซ. นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 48 ชั่วโมง หาก CR-positive E.coli colony ของมันมีขึ้นบนอาหารนี้จะมีสีแดง ส่วนพวก CR- negative colony จะมีสีขาวหรือสีส้ม.

การทดลองที่ 2

การหา LD_{50} ของเชื้อ อี.โคลัย เชื้อที่ใช้ทดสอบ เป็นเชื้อ อี.โคลัย เสตรน 55—H ซึ่งเป็น CR-positive เชื้อนี้เพาะลงใน TSB (Tryptic Soya broth) 24 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบดูดมา 1 มล. เพาะลงในอาหาร TSB (50 มล.) อบเพาะที่ 37 °ซ. นาน 6 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี dilution technic โดยการ pourplate ลงในอาหาร PCA (plate count agar)

พบว่าจำนวนเชื้อที่เพาะไว้ในอาหาร TSB อบนาน 6 ชั่วโมง จะมีจำนวน 8×10^9 CFU/ml. ไก่ทดลอง เป็นไก่กระทงจำนวน 30 ตัว อายุ 32 วัน ทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบแล้ว แบ่งไก่เป็น 6 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว.

การทดลอง

นำเชื้อที่เพาะใน TSB ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้วมาทำ Ten fold dilution เพื่อที่จะเจือจางจำนวนเชื้อลงให้ได้ 10^8, 10^7, 10^6 และ 10^5 cells/ml. ด้วย PDS (Peptone dilution solution) ทั้ง dilution และ stock ดูดมา 0.1 มล. ฉีดเข้า abdominal airsac ในไก่ทดลอง 5 ตัว จากแต่ละ dilution (ดูตาราง)

ไก่ทดลอง	5	5	5	5	5
จำนวนเชื้อที่ฉีด	10^8 (0.1 มล.)	10^7 (0.1 มล.)	10^6	10^5	10^4
ตำแหน่ง	airsac	airsac	airsac	airsac	airsac

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไก่ที่ผ่านการฉีดเชื้อ นำไปเลี้ยงต่อ สังเกตุอาการทุกวันจนถึงวันที่ 5 ของการทดลอง จดจำนวนของไก่ที่ตายในแต่ละวันไว้.

การทดลองที่ 3

การทดลองเพื่อศึกษาหาอัตราการติดเชื้อ อี.โคลัย และรอยโรคที่เกิดขึ้นภายหลังการฉีดเชื้อเข้า abdominal airsac (Intra airsac)

ไก่ทดลอง เป็นไก่กระทงชุดเดียวกันกับที่แบ่งมาทดสอบหา LD_{50} จำนวน 10 ตัว

จำนวนเชื้อที่ฉีด จาก stock (10^9 cells/ml.) ทำ serial tenfold dilution ให้ได้จำนวน 10^7 cells/ml. ดูดมาแล้วฉีดเข้า abdominal airsac ของไก่ทดลองตัวละ 0.1 มล. (จำนวนเชื้อที่ฉีดประมาณ 1×10^6 cells/ml. ซึ่งใกล้เคียงกับค่า LD_{50} ที่หาได้คือ 55.35×10^5 cells/ml.)

ไก่ที่ฉีดเชื้อแล้วสังเกตุอาการตลอดทุกวัน, ไก่ที่ตายทำการผ่าซากจดรายละเอียดรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ และไก่ที่ยังคงเหลืออยู่จะทำการฆ่าในวันที่ 7 ตรวจหารอยโรคเช่นเดียวกับพวกที่ตาย.

การทดลองที่ 4

วิธีการเช่นเดียวกับในกลุ่มการทดลองที่ 3 แต่ใช้วิธีการหยอดจมูก (Intra nasal) สังเกตุอาการและทำการฆ่าในวันที่ 7 เช่นเดียวกัน.

การทดลองที่ 5.

วิธีการเช่นเดียวกับในกลุ่มที่ 3 แต่ใช้วิธีการฉีดเชื้อเข้าหลอดคอ (Intra trachea) สังเกตุอาการและทำการฆ่าในวันที่ 7 เช่นเดียวกัน.

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

จากการทดสอบเพื่อหาคุณสมบัติการแทรกผ่านของเชื้อ อี.โคลัย จำนวนทั้งหมด 76 เสตรน โดยการเพาะลงบนอาหาร Congo Red พบว่า เสตรนของ อี.โคลัย ที่แยกได้จากอวัยวะภายในจะให้ผล CR-positive เกือบทั้งหมดคือ จากถุงลม,จากถุงหุ้มหัวใจและจากตับคิดเป็น 98,100 และ 100 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนเสตรนที่แยกจากลำไส้พบว่า CR-positive มีน้อยคิดเป็น 40 เปอร์เซนต์(ตารางที่ 1).

ตารางที่ 1 แสดงผลของการทดสอบ CR-test

Organ	Strain test	CR+	CR−
Air sac	54	53 (98)	1 (2)
Pericardium	7	7(100)	0 (0)
Liver	10	10(100)	0 (0)
Intestine	5	2(40)	3 (60)

(−) = เปอร์เซนต์

การทดลองที่ 2 จาก stock ของเชื้อ 8×10^9 cells/ml. จำนวน LD_{50} ของเชื้ออี.โคลัย strain 55 −H พบว่า LD_{50} dilution $= 10^{-3.16}$ cells/ml.และค่า LD_{50} (Bacterial cells/ml.) $= 55.35 \times 10^5$ cells/ml.)

ตารางที่ 2

Dilution	Survival	Death	Cu.Suv.	Cu.Death	Per.Mort.
− 1	0	5	0	13	100.00
− 2	1	4	1	8	88.89
− 3	2	3	3	4	57.14
− 4	4	1	7	1	12.50
− 5	5	0	12	0	0.00

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของไก่ที่ตายจากการฉีดเชื้อ อี.โคลัย

การทดลองที่ 3

การตรวจหารอยโรคที่เกิดขึ้นจากการฉีดเชื้อเข้า airsac พบว่าตลอดระยะเวลาการทดลอง (7 วัน) สามารถตรวจพบอาการอักเสบของอวัยวะภายในหลายอย่าง(ตารางที่ 3) ไก่จะเริ่มตายในวันที่ 3,4 และ 5 ไม่พบไก่ตายหลังวันที่ 6 และในวันที่ 7 แต่ไก่ที่รอดสามารถตรวจพบรอยโรคได้ (เหลือเพียง 1 ตัว).

การทดลองที่ 4

การตรวจหารอยโรคที่เกิดได้จากการหยอดเชื้อเข้ารูจมูก ผลการทดลองไม่พบว่าไก่แสดงอาการและไม่พบรอยโรคเมื่อทำการผ่าชาก (ตารางที่ 3)

การทดลองที่ 5

การตรวจหารอยโรคที่เกิดขึ้นจากการฉีดเชื้อเข้าในหลอดคอ ผลการทดลองพบว่าไก่จะเริ่มแสดงอาการในวันที่ 4, และในวันที่ 6 มีไก่ตายเพียง 2 ตัว จากการผ่าชากพบรอยโรคที่ถุงลม, เยื่อหุ้มหัวใจ,และตับ (ตารางที่ 3).

ตารางที่ 3 แสดงรอยโรคที่พบในไก่ทดลองที่ฉีดเชื้อเข้าถุงลม หยอดจมูก และฉีดเข้าหลอดลม.

Routes / Gross lesion	Intra-airsac	Intra-nasal	Intra-trachea
Air-saculitis	10(100)	0 (0)	5 (50)
Pericarditis	9(90)	0 (0)	3 (30)
Perihepatitis	9(90)	0 (0)	2 (20)
Enteritis	4(40)	0 (0)	0 (0)
Peritonitis	2(20)	0 (0)	0 (0)
Morbidity rate	10(100)	0 (0)	6 (60)
Mortality rate	9(90)	0 (0)	2 (20)
Re-isolation	10(100)	ND	7 (70)

ND = Not done

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการทดสอบเชื้อ อี.โคลัย เพื่อหาเสตรนที่เป็น invasiveness ได้ผลใกล้เคียงกันกับที่ Berkhoff and Vinal (1986) ได้เคยรายงานไว้กล่าวคือ พบว่าเสตรนส่วนใหญ่ที่แยกได้จากอวัยวะภายในเกือบทั้งหมดจะให้ผล CR-positive ส่วนเสตรนที่แยกได้จากลำไส้และอุจจาระส่วนใหญ่จะให้ CR-negative นอกจากนี้ยังพบว่าพวกเสตรนที่ CR-positive เมื่อฉีดเข้าลูกไก่แล้ว จะทำให้ลูกไก่มีอัตราการเป็นโรคและตายได้สูงเมื่อเทียบกับเสตรนที่ CR-negative ไม่พบว่าไก่แสดงอาการรุนแรงหรือตายได้ Kloryga, (1986) ได้ทดลองเปรียบเทียบ rough mutants กับ smooth E.coli พบว่าพวก rough mutant สามารถทำให้ลูกไก่ฟักตายได้ ส่วนพวก smooth ไม่พบ Goren (1978) ได้ทำการทดลองฉีดเชื้อ อี.โคลัย เข้าในหลอดลมและผสมในน้ำดื่มติดต่อกัน 3 วัน พบว่าเชื้อ อี.โคลัย ที่ให้โดยผสมในน้ำดื่มไม่สามารถที่จะทำให้ไก่เกิดโรคได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับการฉีดเข้าหลอดลม พบว่า เสตรน 0.78 K 80 สามารถทำให้ไก่แสดงอาการและพบรอยโรคได้ที่ถุงลม เยื่อหุ้มหัวใจ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเป็นโรคจะสูงขึ้นอย่างมาก เมื่อฉีดไวรัสหลอดลมอักเสบร่วมกับเชื้อ อี.โคลัยเมื่อเปรียบเทียบการทดลองเท่าที่มีรายงานมาแล้ว แสดงว่าการทำให้ไก่เกิดการติดเชื้อ อี.โคลัย ด้วยการฉีดเข้าถุงลมและหลอดลมสามารถทำให้ไก่เกิดโรคได้ ส่วนการหยอดจมูกนั้นไม่สามารถทำให้ไก่แสดงอาการเป็นโรคติดเชื้อ อี.โคลัยได้ในสภาพและวิธีการทดลองครั้งนี้ ส่วนการติดเชื้อในฝูงเมื่อเกิดการระบาดนั้นเป็นเรื่องที่จะต้องมีการติดตามทดลองต่อไป.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ บริษัท เวลโนว์น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ อี.โคลัย และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้งบประมาณสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้.

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู, โสมทัต วงศ์สว่าง และ สุรศักดิ์ ศิริโชคชัชวาล(2529). "โรค ซี.อาร์ ดี ในไก่ 1. สาเหตุของโรคมัยโคพลาสม่า กัลลิเซพติคุ่ม หรืออีโคลัย" เวชสารสัตวแพทย์ ปีที่ 16 ฉบับที่ 3 กันยายน 2529 หน้า 131–143.

Berkhoff,H.A. and A.C.Viral (1986). Congo Red Medium to Distinguish Between Invasive and Non-Invasive Escherichia coli Pathogenic for Poultry Avian Dis.Vol.3, No.1

Cowan,S.T. and Steel,K.J.(1965);Manual for the identification of Medical Bacteria.Cambridge at the University Press,London.

Gowen,E.(1978) Observations on Experimental Infection of Chicks with Escherichia coli. Avian Path. 7:213-224.

Kloryga,M.A.(1986); Pathogenicity of five Mutants of Escherichia coli isolates from Broilers. Avian Path. 15:749-759.

พระมหาสุกฤษฎาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย