รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การป้องกันโรคติดเชื้อ ซาลโมเนลล่า ในไก่กระทงด้วยวิธี Competitive Exclusion

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท
สพ 15
006523

โดย

จิโรจ ศศิปรียจันทร์
เกรียงศักดิ์ สายธนู

2537

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การป้องกันโรคติดเชื้อ ซาลโมเนลล่า ในไก่กระทง ด้วยวิธี Competitive Exclusion

โดย

จิโรจ ศศิปรียจันทร์

เกรียงศักดิ์ สายธนู

ธันวาคม 2537

I14952942 13 ม.ค. 2542

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2536 เพื่อสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ งานวิจัยสำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี เพราะความร่วมมือและช่วยเหลือจากบุคลากรของหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และภาควิชาอายุรศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การป้องกันโรคติดเชื้อ ซาลโมเนลล่า ในไก่กระทง ด้วยวิธี Competitive Exclusion
ชื่อผู้วิจัย	จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และ เกรียงศักดิ์ สายธนู
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ธันวาคม 2537

บทคัดย่อ

เตรียม CE-product 2 ครั้ง จากลำไส้ไก่ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่า ในสภาพไร้อากาศ โดยใช้ไก่เนื้ออายุ 7 สัปดาห์ ไก่ไข่อายุ 5 เดือน และไก่พันธุ์เนื้ออายุ 12 เดือน ครั้งแรกเตรียม CE-product ได้ 14 ชนิด ประกอบด้วย CE-product จากไก่เนื้อ 2 ตัว (4 ชนิด) จากไก่ไข่ 4 ตัว (8 ชนิด) และจากไก่พันธุ์เนื้อ 1 ตัว (2 ชนิด) นำ CE-product ทุกตัวมาทดสอบประสิทธิภาพครั้งแรก และเลือก CE-product 2 ตัว จากการทดสอบครั้งแรก มาทดสอบครั้งที่ 2

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product ที่เตรียมไว้ครั้งแรก 14 ชนิด ในลูกไก่ไข่เพศผู้ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่าอายุ 2 วัน พบว่า CE-product 10 ชนิด ทำให้ลูกไก่ตาย อัตราการพบ *Salmonella enteritidis* (SE) ภายหลังการ Challenge สูง 50-100% ผลจากการเลือก CE-product 2 ชนิด มาทดสอบซ้ำในลูกไก่ไข่เพศผู้ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่าอายุ 1 วัน โดยทำให้ CE-product เจือจางลง 50% และใช้ป้อนไก่ตัวละ 0.5 หรือ 1 ซีซี. พบว่า CE-product ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 ซีซี. มีผลทำให้ลูกไก่ตายได้ อัตราการพบเชื้อ SE ภายหลังการ Challenge 10.5-26.3%

เตรียม CE-product ครั้งที่ 2 จากไก่เนื้อและไก่ไข่ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่า ได้ CE-product จากไก่เนื้อและไก่ไข่ประเภทละ 6 ชนิด แต่ได้เลือกนำมาทดสอบประสิทธิภาพเพียงประเภทละ 3 ชนิด ผลการทดสอบประสิทธิภาพในลูกไก่ไข่เพศผู้ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่าอายุ 1 วัน พบว่าไม่ทำให้ไก่ตาย และพบ SE ภายหลังการ Challenge เพียง 2 กลุ่ม ซึ่งอัตราที่พบคือ 4.2% สรุปว่า CE-product ที่เตรียมโดยวิธีที่ 2 มีประสิทธิภาพในการป้องกันการ colonized ของเชื้อ SE ในลูกไก่ไข่อายุ 1 วันได้

Project Title : Protection of Salmonella infection in broiler by Competitive Exclusion

Name of the Investigators : Jiroj Sasipreeyajan and
Kriengsag Saitanu

Year : December, 1994

Abstract

CE-products were prepared from intestinal content of Salmonella-free chickens in anaerobic condition. These chickens were 7-week-old broilers, 5-month-old layers and 12-month-old broiler breeders. At the first preparation, 14 CE-products were prepared from 2 broilers (4 CE-products), 4 layers (8 CE-products) and 1 broiler breedes (2 CE-products). All CE-products were tested for their safty and efficacy to protect against *Salmonella enteritidis* (SE) colonization in 2-day-old Salmonella-free male layer-type chickens. Mortality was observed in 10 groups of chicken after feeding CE-products. SE was isolated 50-100% from challenged chickens. After testing, only 2 CE-products were chosen to retest in 1-day-old Salmonella-free male layer-type chickens. Each CE-product was diluted 50% and 0.5 or 1 ml of each CE-product was fed to each chicken. Mortality was still observed in groups of chicken receiving 1 ml of diluted CE-product. SE was isolated 10.5-26.3% from challenged chickens.

At the second preparation, 12 CE-products were prepared from 6 Salmonella-free broilers and 6 Salmonella-free layers. Only 3 CE-products from each type of chicken were randomly selected for their safety and efficacy in 1-day-old Salmonella-free male layer type chickens. Mortality was not observed in all groups of chicken after they received CE-product. SE was isolated from 2 CE-product tested groups only. The isolation rate was 4.2%. It is concluded that CE-products which were prepared at the second preparation were efficacious in preventing SE colonization in 1-day-old layer-type chickens.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย) iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) iv
รายการแผนภูมิประกอบ vi
รายการตารางประกอบ vii
บทนำ 1
วิธีดำเนินการการวิจัย 2
การเตรียม CE-product 2
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เตรียม CE-product 3
เชื้อซาลโมเนลล่าที่ใช้ในการทดสอบ CE-product 3
การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product 3
ผลการวิจัย 10
การเตรียม CE-product 10
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product 10
การอภิปรายผล 14
สรุป 15
ข้อเสนอแนะ 15
ส่วนอ้างอิง 16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จิฬ
สพ 15
เลขทะเบียน 008523
วัน,เดือน,ปี 7 พ.ย 38

รายการแผนภูมิประกอบ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 : การตรวจหาและพิสูจน์เชื้อซาลโมเนลล่า 5

แผนภูมิที่ 2 : วิธีการเตรียม CE-product 6

แผนภูมิที่ 3 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product
ในการป้องกันโรคติดเชื้อ SE ครั้งที่ 1 7

แผนภูมิที่ 4 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product
ในการป้องกันโรคติดเชื้อ SE ครั้งที่ 2 8

แผนภูมิที่ 5 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product
ในการป้องกันโรคติดเชื้อ SE ครั้งที่ 3 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 1 11

ตารางที่ 2 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 2 12

ตารางที่ 3 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 3 13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การป้องกันโรคติดเชื้อซาลโมเนลล่า ในไก่กระทง ด้วยวิธี Competitive Exclusion

1. คำนำ

ไก่และผลิตภัณฑ์เป็นสื่อสำคัญที่ทำให้มนุษย์เป็นโรค Salmonellosis (1,2,3, 4,5, 6,7) ในประเทศไทย โรคไทฟอยด์ (*Salmonella typhi* infection) เคยเป็นโรคที่สำคัญ ในปี 2517-2518 พบเชื้อนี้ถึง 33.1% หลังจากนั้นการพบเชื้อนี้จะลดลง แต่จะพบเชื้อพวก Non-typhoidal Salmonellae มากขึ้น (8) จากสถิติของ WHO National Salmonella and Shigella Center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี 2533, 2534 พบ *S. derby* มากที่สุด รองลงไปคือ *S. weltevreden, S. agona, S. typhimurium* และ *S. blockly* เป็นต้น เชื้อดังกล่าวมักจพบในระบบการผลิตไก่ เช่น จากฟาร์ม อาหารไก่ เนื้อไก่ ไข่ และในโรงฆ่าไก่ เป็นต้น (8,9,10,11,12,13)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการวิจัย เพื่อที่จะควบคุมเชื้อนี้ในระบบการผลิตไก่ วิธีการดังกล่าวใช้หลักการของ Hazard Analysis Critical Control Point System (14) ซึ่งจะเป็นการควบคุมเชื้อ เริ่มจากการผลิตลูกไก่ การเลี้ยง จนถึงโรงงานฆ่าไก่ และการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อจำหน่าย ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแน่ชัดแล้วว่าการปนเปื้อนเชื้อ Salmonellae ในไก่ที่สำคัญที่สุดคือ การปนเปื้อนของเชื้อระหว่างการเลี้ยง โดยเฉพาะการติดเชื้อในลูกไก่เล็ก (อายุ 1-7 วัน) ซึ่งเป็นวัยที่ลูกไก่ติดเชื้อนี้ได้มากที่สุด เชื้อจะอยู่ในไก่ได้ตลอด (15) และเป็นแหล่งแพร่เชื้อในเล้าไปสู่ไก่ตัวอื่น ๆ จากการศึกษาของผู้วิจัยทั้งทางสิ่งตีพิมพ์ การประชุม และติดต่อส่วนตัวกับนักวิชาการต่างประเทศ พอที่จะชี้ให้เห็นว่าวิธี Competitive exclusion น่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมเชื้อนี้ในไก่ (16,17,18,19,20,21,22,23,24)

ในปี ค.ศ. 1973 Nurmi and Rantala (25) ทดลองให้ลูกไก่อายุ 1-2 วัน กินน้ำเกลือซึ่งผสมด้วย gut contents (GC) จากไก่ที่มีอายุมาก หลังจากป้อนเชื้อ *S. infantis* ผลปรากฏว่ากลุ่มที่กิน GC จะปลอดเชื้อนี้ถึง 69-77% (ขึ้นอยู่กับปริมาณ GC ที่กิน) ในขณะที่กลุ่มเปรียบเทียบจะพบเชื้อนี้ 100% วิธีการนี้เรียกว่า Nurmi concept หรือทราบกันทั่วไปคือ Competitive exclusion กลุ่มของ Prof. Nurmi ได้พัฒนาวิธีการเตรียม CE โดยวิธี anaerobic culture จาก gut content ของไก่ และได้จดทะเบียนสิทธิบัตรไว้หลายแห่ง อาทิเช่น ที่แคนาดา (Canadian Patent No. 1, 151, 066) ที่ฟินแลนด์ (Patent No.4689226) และสิทธิบัตรในยุโรป (Patent No. E01 54478 A2 850911 และ EP 0479820 AI 92 0415) ประเทศฟินแลนด์ใช้วิธี CE สามารถลดการปนเปื้อนของซาลโมเนลล่าในไก่จาก 70% เหลือไม่เกิน 10% (21) และประเทศสวีเดนที่ทดลองใช้นานถึง 5 ปี (1981-1985) พบซาลโมเนลล่าในไก่

เพียง 1 เล้าจาก 144 เล้า (24) และเร็ว ๆ นี้ก็มีรายงานว่าการใช้ CE จะป้องกันการติดเชื้อซาล-โมเนลล่าได้ดีมาก อาทิเช่น การทดลองที่ประเทศเปอร์โตริโก โดยนักวิทยาศาสตร์จาก USDA (16) และประเทศอังกฤษ (17) เป็นต้น

Barnes และคณะ (26) ในปี 1980 ทดลองให้ลูกไก่กินสารละลายจากลำไส้ของไก่ที่มีอายุ 40-45 สัปดาห์ ซึ่งปรากฏว่าลูกไก่จะปลอดจากเชื้อ *S. typhimurium* หลังจากให้ไก่กินเชื้อนี้ และจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารละลายดังกล่าวที่ป้องกันลูกไก่จากเชื้อ มีแบคทีเรียดังต่อไปนี้ (ปริมาณเชื้อต่อ มล.) Lactobacilli $2.4x10^8$, coliform $4.6x10^6$, faecal streptococci $4.6x10^4$ และ anaerobes มากกว่า 10^9

Snoeyenbos และคณะ (27) เชื่อว่าเชื้อ anaerobes มีบทบาทสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้ลูกไก่ติดเชื้อซาลโมเนลล่า ทั้งนี้เพราะเชื้อกลุ่ม aerobes ไม่สามารถป้องกันเชื้อนี้ได้และในขณะเดียวกัน bacterial free filtrates ของ faecal suspension ก็ไม่สามารถป้องกันการเกิดเชื้อเช่นกัน Barnes และคณะ (28,29) พบว่าเชื้อ anaerobes 2 ชนิดคือ *Bacteriodes hypermegas* และ *Bifidobacterium spp.* จากเชื้อ anaerobes ที่ศึกษาทั้งหมด 35 ชนิด สามารถทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าในหลอดทดลองได้ แต่จากการศึกษาของ Impey และคณะ (30) ที่ใช้เชื้อถึง 48 ชนิด ก็ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซาลโมเนลล่าในไก่ได้ และจากการศึกษาอีกหลายท่านก็ไม่พบว่าการใช้เชื้อที่ทราบชื่อต่าง ๆ อาทิเช่น Lactobacillus, *Bacteroides vulgatus* หรือ unidentified anaerobes ก็ไม่สามารถป้องกันเชื้อซาลโมเนลล่าได้ (31,32) ซึ่งสรุปได้ว่า artificial culturing ของ caecal contents จากไก่มีอายุและไม่มีเชื้อซาลโมเนลล่าเท่านั้นที่จะป้องกันการติดเชื้อซาลโมเนลล่าได้

ปัญหาสำคัญของการใช้ CE ก็คือการเตรียมผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเป็นการทำ anaerobic culture จาก GC ของไก่มีอายุ แต่ละแห่งจะเตรียมเอง (17,27,33) และเทคโนโลยีการเตรียม CE-product จะไม่มีผู้ใดรายงานละเอียด ในวารสารในปัจจุบันจะมีผลิตภัณฑ์ออกมาจำหน่าย แต่ราคาแพง ประมาณ 4 เพนนี (2 บาท) ต่อไก่ 1 ตัว (17)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีผลิต CE-product ขึ้นในประเทศไทย โดยการทดลองการเพาะ caecal content ของไก่ในสภาพไร้อากาศ (anaerobic)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียม CE-product

ครั้งที่ 1 : ไก่ที่ใช้เตรียม CE-product ประกอบด้วย ไก่เนื้ออายุ 7 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัว ไก่ไข่อายุ 5 เดือน จำนวน 5 ตัว และไก่พันธุ์เนื้ออายุ 12 เดือน จำนวน 3 ตัว

นำไก่ทั้งหมดมาเพาะหาเชื้อซาลโมเนลล่าตามแผนภูมิที่ 1 ผ่าไก่ที่ตรวจไม่พบซาลโมเนลล่า จากไก่แต่ละตัว แยก cecum เป็น 2 ส่วน นำมาเตรียม CE-product ตามแผนภูมิที่ 2 ดังนั้นไก่ 1 ตัว จะเตรียม CE-product ได้ 2 ชนิด

เหตุผลที่เลือกไก่ชนิดต่าง ๆ เนื่องจากธรรมชาติของการเลี้ยงดูต่างกัน สายพันธุ์ต่างกัน และอายุต่างกัน น่าจะมี GC ที่มีคุณสมบัติต่างกัน

CE-product ที่เตรียมได้จากไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ จะใช้สัญญลักษณ์ B, L และ P ตามลำดับ และตามด้วยหมายเลขว่าเป็นไก่ตัวที่เท่าไร เนื่องจากไก่แต่ละตัวแยก cecum เป็น 2 ส่วน จึงเตรียม CE-product ได้ 2 ชนิด

ครั้งที่ 2 : ไก่ที่ใช้เตรียม CE-product ประกอบด้วยไก่เนื้ออายุ 7 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว และไก่ไข่อายุ 5 เดือน จำนวน 6 ตัว

นำไก่ทั้งหมดมาเพาะหาเชื้อซาลโมเนลล่าตามแผนภูมิที่ 1 นำไก่ที่ตรวจไม่พบซาลโมเนลล่ามาเตรียม CE-product ตามแผนภูมิที่ 2 แต่ในการเตรียมครั้งที่ 2 นี้ จากไก่ 1 ตัว ไม่ต้องแยก cecum เป็น 2 ส่วน จึงเตรียม CE-product ได้ 1 ชนิด และขณะที่ incubate CE-product นำหลอด CE-product ที่ปิดด้วยพาราฟินใส่ใน Generbag anaer (bioMerieux 69280 Marcy l'Etoile, France)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เตรียม CE-product ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Viande Levure (VL) broth (34)

เชื้อซาลโมเนลล่าที่ใช้ในการทดสอบ CE-product ใช้ *Salmonella enteritidis* (SE) สเตรน 1237 ในการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 1 และ 2 และใช้สเตรน 1299 ในการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 3

เชื้อ SE ทั้ง 2 สเตรน เป็นเชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่ และจากลูกไก่ที่ตายเนื่องจากโรค Salmonellosis ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product

ใช้ลูกไก่ไข่เพศผู้อายุ 1-2 วัน ตรวจหาและพิสูจน์เชื้อซาลโมเนลล่าตามแผนภูมิที่ 1 นำลูกไก่ที่ปลอดจากเชื้อซาลโมเนลล่ามาทดสอบ CE-product 3 ครั้ง จำนวน 199 ตัว 120 ตัว และ 199 ตัว ตามลำดับ

<u>การทดสอบครั้งที่ 1</u> (แผนภูมิที่ 3) ใช้ CE-product ที่เตรียมครั้งที่ 1 ป้อนลูกไก่อายุ 2 วัน ตัวละ 1 มล. ป้อนครั้งเดียว โดยใช้ Stomach tube แบ่งไก่ออกเป็น 16 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว ยกเว้นกลุ่มที่ 15 และ 16 มี 16 และ 15 ตัว ตามลำดับ

ไก่กลุ่มที่ 1-4 ได้รับ CE-product ที่เตรียมได้จากไก่เนื้อ (B1.1, B1.2, B2.1, B2.2) ไก่กลุ่มที่ 5-12 ได้รับ CE-product ที่เตรียมได้จากไก่ไข่ (L1.1, L1.2, L2.1,

L2.2, L3.1, L3.2, L5.1, L5.2) ไก่กลุ่มที่ 13-14 ได้รับ CE-product ที่เตรียมได้จากไก่พันธุ์เนื้อ (P3.1, P3.2) ไก่กลุ่มที่ 15-16 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้กิน CE-product

เมื่อไก่อายุ 13 วัน ป้อนเชื้อ SE สเตรน 1237 ให้ไก่กลุ่มที่ 1-15 ตัวละประมาณ $8.5x10^{12}$ เซลล์ เมื่อไก่อายุ 20 วัน ฆ่าไก่กลุ่มที่ 1-8 และ 10-13 กลุ่มละ 6 ตัว ไก่กลุ่มที่ 15-16 กลุ่มละ 8 ตัว เมื่อไก่อายุ 27 วัน ฆ่าไก่ที่เหลือทุกกลุ่ม ทำการตรวจหาและพิสูจน์เชื้อ SE ในลำไส้ของไก่ทุกตัวที่ถูกฆ่า ตามวิธีแผนภูมิที่ 1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวนไก่ที่พบเชื้อ SE

<u>การทดสอบครั้งที่ 2</u> (แผนภูมิที่ 4) จากการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 1 เลือก CE-product จากไก่ไข่ 1 ชนิด คือ L2.1 และเลือก CE-product จากไก่พันธุ์เนื้อ 1 ชนิดคือ P3.1 ลดความเข้มข้นของ CE-product ลงเท่าตัว ป้อน CE-product แต่ละชนิดให้ลูกไก่อายุ 1 วัน ป้อนครั้งเดียว โดยใช้ stomach tube ดังนี้

แบ่งลูกไก่ออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว กลุ่มที่ 1 และ 2 ได้รับ CE-product L2.1 ตัวละ 0.5 และ 1 มล. ตามลำดับ ไก่กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้รับ CE-product P3.1 ตัวละ 0.5 และ 1 มล. ตามลำดับ

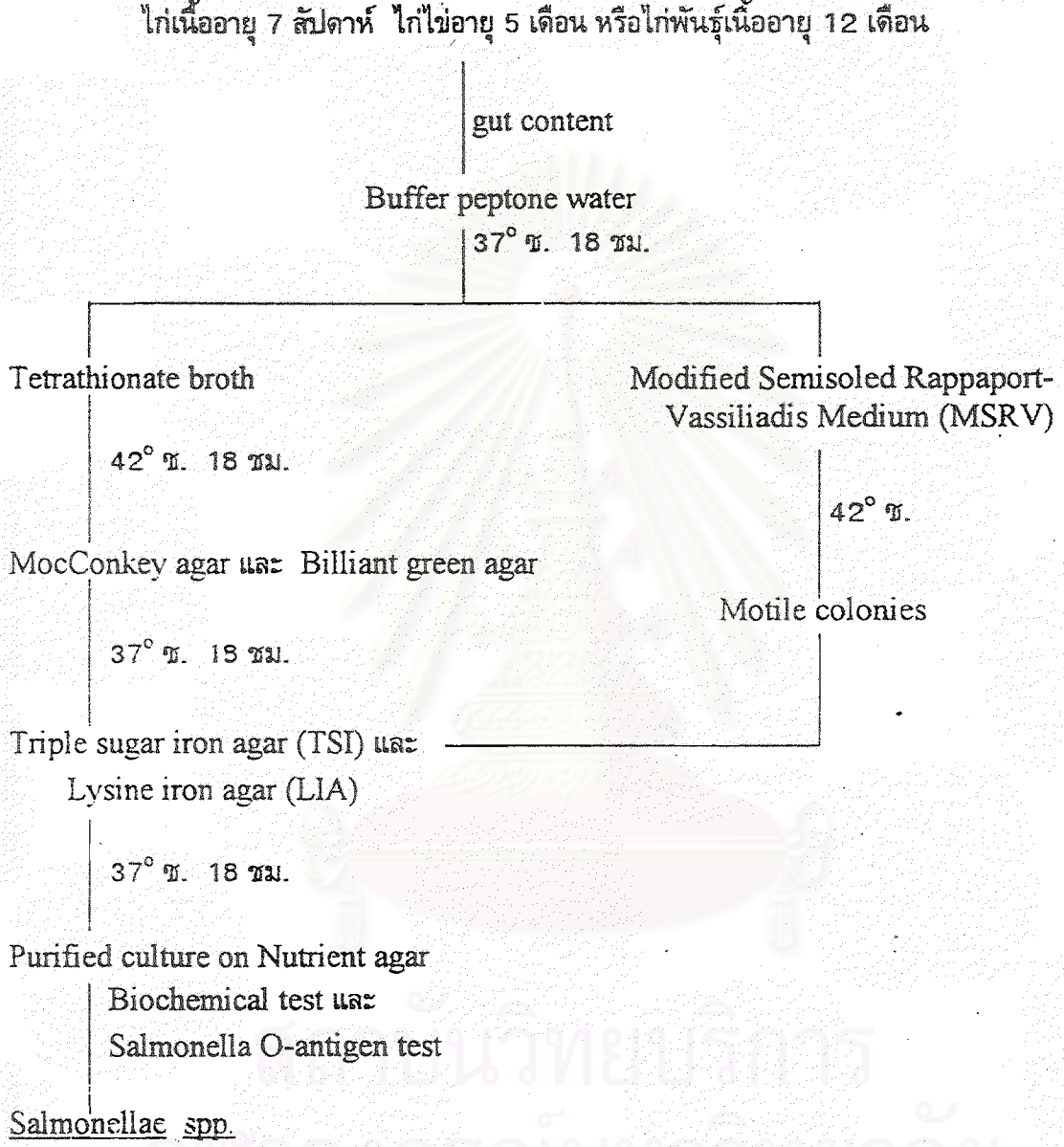
เมื่อไก่อายุ 3 วัน ป้อนเชื้อ SE สเตรน 1237 ให้ไก่ทุกตัวของกลุ่มที่ 1-5 ตัวละประมาณ $3.8x10^{4}$ เซลล์ ส่วนไก่กลุ่มที่ 6 เลี้ยงไว้ตามปกติ เมื่อไก่อายุ 9 วัน ฆ่าไก่ด้วยวิธีดึงคอ ตรวจหาเชื้อ SE ในลำไส้ ตามวิธีแผนภูมิที่ 1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวนไก่ที่พบเชื้อ SE

<u>การทดสอบครั้งที่ 3</u> (แผนภูมิที่ 5) ใช้ CE-product ที่เตรียมครั้งที่ 2 ป้อนลูกไก่อายุ 1 วัน ตัวละ 0.5 มล. ป้อนครั้งเดียว โดยใช้ Stomach tube แบ่งไก่ออกเป็น 8 กลุ่ม ๆ 20-25 ตัว

ไก่กลุ่มที่ 1-3 ได้รับ CE-product ที่เตรียมได้จากไก่เนื้อ (B3, B4, B6) ไก่กลุ่มที่ 4-6 ได้รับ CE-product ที่เตรียมได้จากไก่ไข่ (L2, L4, L6) ไก่กลุ่มที่ 7-8 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้กิน CE-product

เมื่อไก่อายุ 3 วัน ป้อนเชื้อ SE สเตรน 1299 ให้ไก่ทุกตัวของกลุ่มที่ 1-7 ตัวละประมาณ $7x10^{2}$ เซลล์ ส่วนไก่กลุ่ม 8 เลี้ยงไว้ตามปกติ เมื่อไก่อายุ 9 วัน ฆ่าไก่ด้วยวิธีดึงคอ ตรวจหาเชื้อ SE ในลำไส้ ตามวิธีแผนภูมิที่ 1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวนไก่ที่พบเชื้อ SE

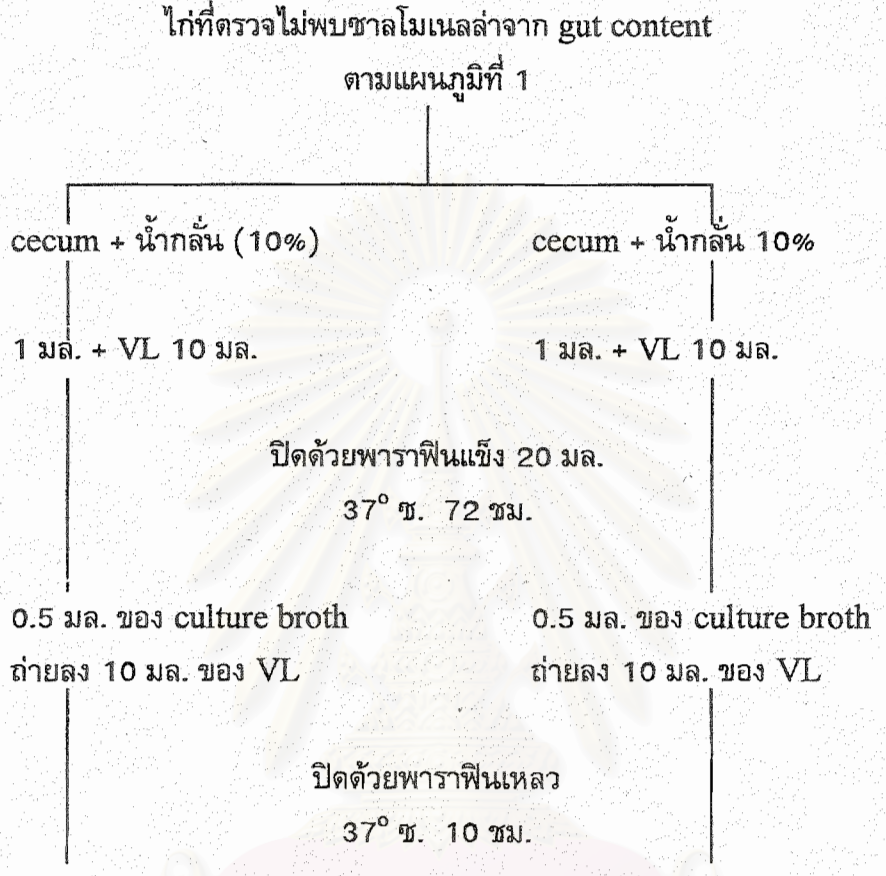
แผนภูมิที่ 1 : การตรวจหาและพิสูจน์เชื้อซาลโมเนลล่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I13952943

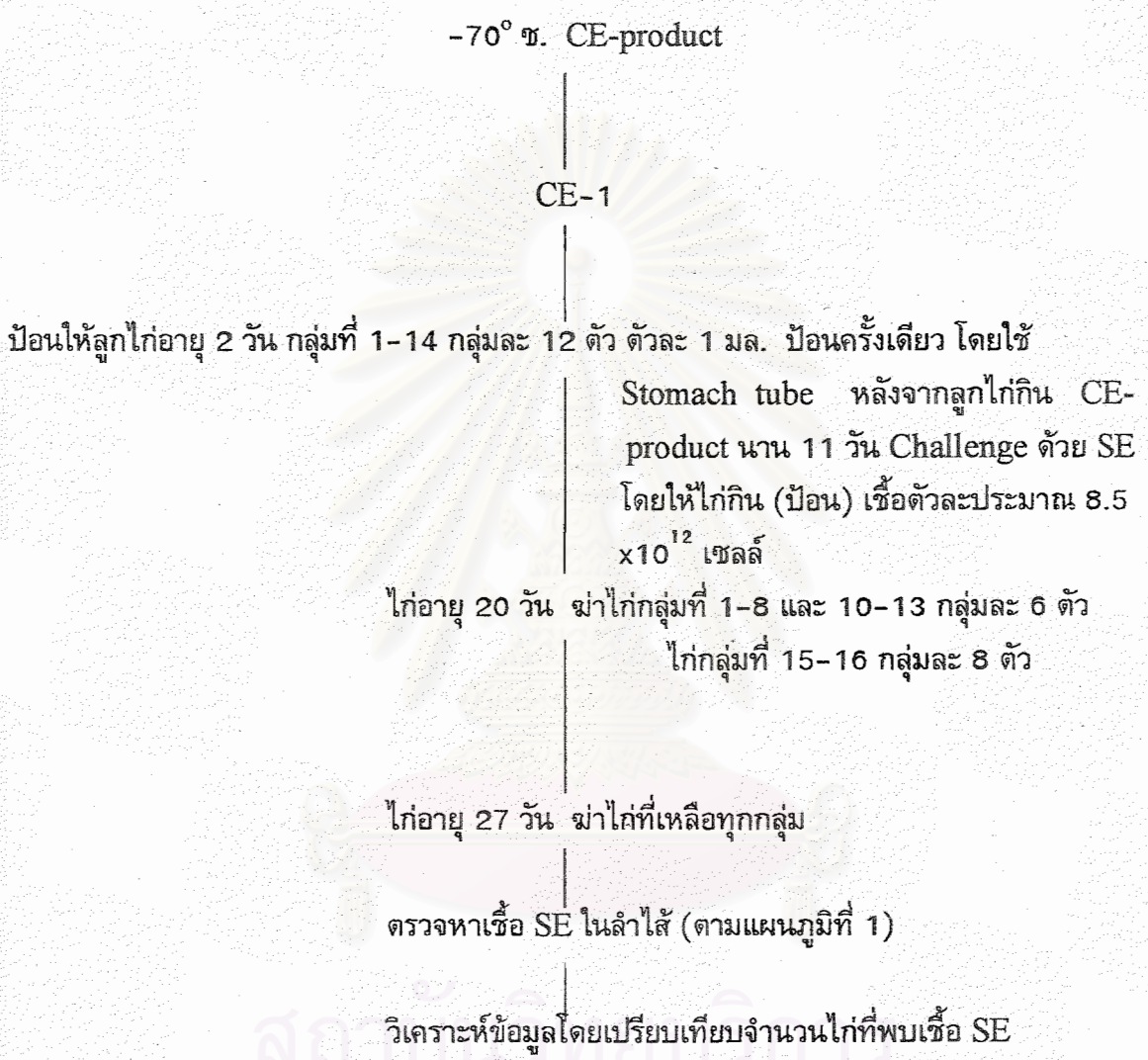
แผนภูมิที่ 2 : วิธีการเตรียม CE-product



CE- product เก็บที่ -70° ซ. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อซาลโมเนลล่า (แผนภูมิที่ 3 และ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 3 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product ในการป้องกันการติดเชื้อ SE ครั้งที่ 1



หมายเหตุ : ไก่กลุ่มที่ 15 และ 16 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้กิน CE-product

แผนภูมิที่ 4 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product ในการป้องกันการติดเชื้อ SE ครั้งที่ 2

-70° ซ. CE-product

Thawed

CE-1 (L2.1 และ P3.1)

ลดความเข้มข้นลงเท่าตัว

ป้อนให้ลูกไก่อายุ 1 วัน กลุ่ม 1-4 กลุ่มละ 20 ตัว ตัวละ 0.5 มล. หรือ 1.0 มล. ป้อนครั้งเดียว โดยใช้ Stomach tube หลังจากลูกไก่กิน CE-product นาน 3 วัน Challenge ด้วย SE โดยให้ไก่กิน (ป้อน) เชื้อตัวละประมาณ 3.8×10^4 เซลล์

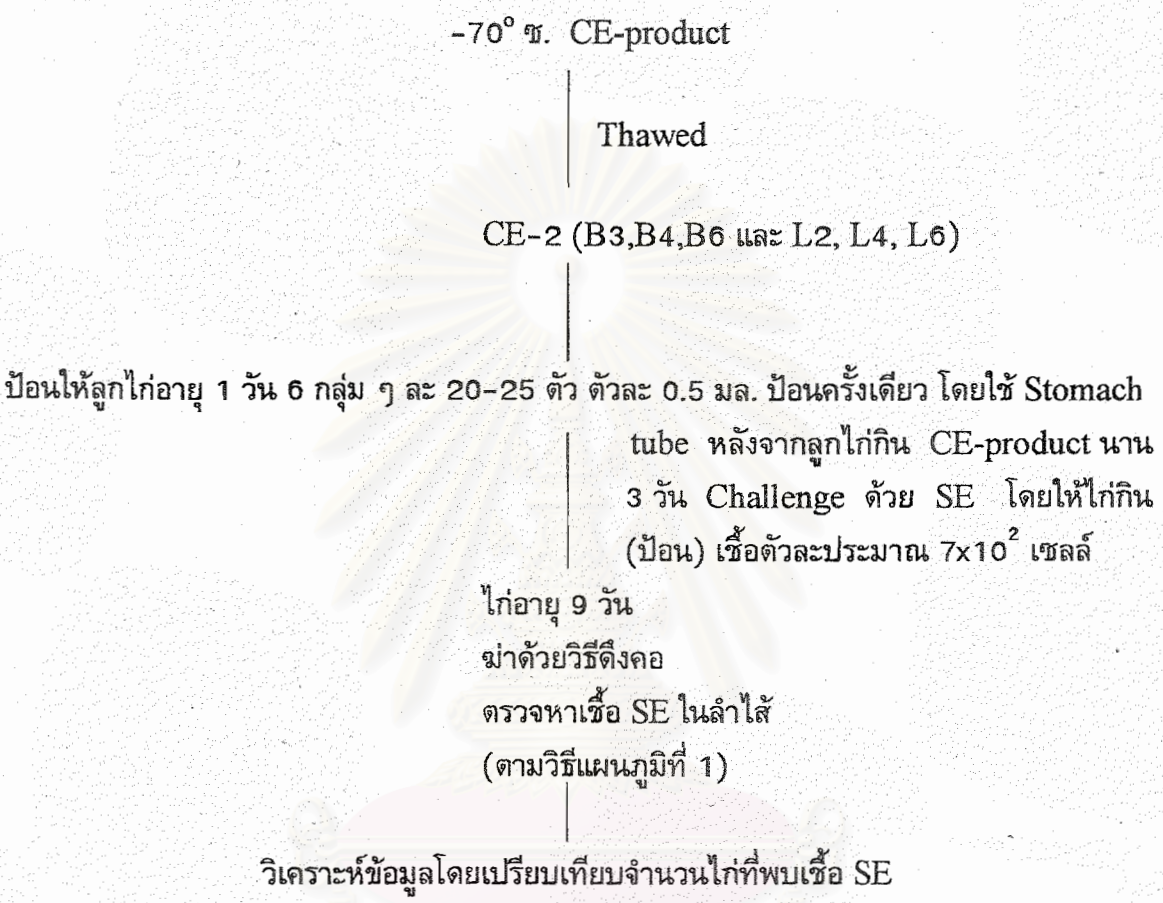
ไก่อายุ 9 วัน
ฆ่าไก่ด้วยวิธีดึงคอ
ตรวจหาเชื้อ SE ในลำไส้
(ตามแผนภูมิที่ 1)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวนไก่ที่พบเชื้อ SE

<u>หมายเหตุ</u> : มีไก่ control 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ไก่กินเชื้อ และกลุ่มเลี้ยงตามปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 5 : การทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product ในการป้องกันการติดเชื้อ SE ครั้งที่ 3



<u>หมายเหตุ</u> : มีไก่ control 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ไก่กินเชื้อ และกลุ่มเลี้ยงตามปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการวิจัย

การเตรียม CE-product

ครั้งที่ 1 : จากไก่เนื้อ 5 ตัว ไก่ไข่ 5 ตัว และไก่พันธุ์เนื้อ 3 ตัว เป็นไก่ปลอดเชื้อซาลโมเนลล่า 2 ตัว 4 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ เนื่องจากไก่ 1 ตัว เตรียม CE-product ได้ 2 ชนิด (ตามแผนภูมิที่ 2) จึงได้ CE-product 4 ชนิด 8 ชนิด และ 2 ชนิด ตามลำดับ นำ CE-product ทุกชนิดที่เตรียมได้มาทดสอบประสิทธิภาพ

ครั้งที่ 2 : จากไก่เนื้อและไก่ไข่ชนิดละ 6 ตัว เป็นไก่ปลอดเชื้อซาลโมเนลล่าทั้งหมด นำมาเตรียม CE-product ได้รวม 12 ชนิด แต่สุ่มตัวอย่าง CE-product ของไก่เนื้อ 3 ชนิด ไก่ไข่ 3 ชนิด เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product

การทดสอบครั้งที่ 1 : จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CE-product ที่เตรียมครั้งที่ 1 จากไก่เนื้อ ไก่ไข่และไก่พันธุ์เนื้อ 14 ชนิด พบมีไก่ตายภายหลังกิน CE-product จำนวน 10 ชนิด อัตราตายตั้งแต่ 1-5 ตัว อัตราการแยกเชื้อ SE ภายหลังการ challenge พบในอัตราที่สูง ยกเว้น L2.1 ครั้งที่ 2 L3.2 ครั้งที่ 2 และ P3.2 ครั้งที่ 1 ที่พบเชื้อ SE เพียง 0,1 และ 1 ตัวอย่าง จากไก่ 4,5 และ 4 ตัว ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

การทดสอบครั้งที่ 2 : เลือก CE-product จากการทดสอบครั้งที่ 1 คือ L2.1 และ P3.1 มาทำการทดสอบซ้ำ โดยลดความเข้มข้นของ CE-product ลงเท่าตัว และ CE-product แต่ละตัว แยกทดสอบไก่ 2 กลุ่ม โดยการให้กินตัวละ 1 มล. และ 0.5 มล. ยังพบไก่ตายในกลุ่มที่ให้ CE-product 1 มล. คือกลุ่ม 1 ตาย 1 ตัว และกลุ่ม 3 ตาย 5 ตัว อัตราการแยกเชื้อ SE ภายหลังการ Challenge พบ 10.5-26.3% ในไก่ที่ได้รับ CE-product ส่วนกลุ่ม positive control พบเชื้อ SE 31.3% ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

การทดสอบครั้งที่ 3 : CE-product ที่ได้จากไก่เนื้อ 3 ชนิด และจากไก่ไข่ 3 ชนิด ป้อนให้ไก่กินตัวละ 0.5 มล. ไม่พบไก่ตายภายหลังการกิน CE-product และการตรวจพบเชื้อ SE ภายหลังการ Challenge พบเฉพาะกลุ่ม 2 และ 5 ในอัตรา 4.2% ส่วนกลุ่ม positive control พบ 27.3% ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 1

กลุ่ม	product	ให้เชื้อ SE	จำนวนไก่ (ตัว)	ไก่ตาย (ตัว)	พบเชื้อ SE			
					ครั้งที่ 1 (20วัน)	ครั้งที่ 2 (27วัน)	รวม	เปอร์เซนต์
1	B1.1	ให้	12	1	6/6 *	5/6	91.7	11/12
2	B1.2	ให้	12	0	6/6	5/6	91.7	11/12
3	B2.1	ให้	12	2	6/6	3/4	90.0	9/10
4	B2.2	ให้	12	1	6/6	5/5	100.0	11/11
5	L1.1	ให้	12	0	6/6	ไม่ได้ทำ	100.0	6/6
6	L1.2	ให้	12	0	5/6	5/6	83.3	10/12
7	L2.1	ให้	12	2	6/6	0/4	50.0	6/12
8	L2.2	ให้	12	2	6/6	4/4	100.0	10/10
9	L3.1	ให้	12	5	ไม่ได้ทำ	4/7	57.1	4/7
10	L3.2	ให้	12	1	5/6	1/5	54.5	6/11
11	L5.1	ให้	12	1	6/6	5/5	100.0	11/11
12	L5.2	ให้	12	2	5/6	4/4	90.0	9/10
13	P3.1	ให้	12	0	5/6	4/6	75.0	9/12
14	P3.2	ให้	12	4	1/4	4/4	62.5	5/8
15	ไม่ได้กิน	ให้	16	0	6/8	5/8	68.8	11/16
16	ไม่ได้กิน	ไม่ให้	15	0	0/8	0/7	0	0/15

* จำนวนที่พบเชื้อ / จำนวนที่ตรวจ

<u>หมายเหตุ</u> : กลุ่ม 15 เป็น challenge control
กลุ่ม 16 เป็น negative control

ตารางที่ 2 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 2

กลุ่ม	CE-product		ให้เชื้อ SE	จำนวนไก่ (ตัว)	ตาย (ตัว)	พบเชื้อ SE	
	ชนิด	ปริมาตร(มล.)				จำนวน *	เปอร์เซนต์
1	L2.1	1	ให้	20	1^{a}	$5/19^{a}$	26.3
2	L2.1	0.5	ให้	20	0^{a}	$2/19^{a}$	10.5
3	P3.1	1	ให้	20	5^{b}	$2/15^{a}$	13.3
4	P3.1	0.5	ให้	20	0^{a}	$3/16^{a}$	18.8
5	ไม่ได้กิน	-	ให้	20	0^{a}	$5/16^{a}$	31.3
6	ไม่ได้กิน	-	ไม่ให้	20	1^{a}	$0/19^{b}$	0

* จำนวนที่พบเชื้อ / จำนวนที่ตรวจ

$^{a, b}$ ที่อยู่ใน column เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : กลุ่ม 5 เป็น challenge control
กลุ่ม 6 เป็น negative control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 : ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 3

กลุ่ม	CE-product	ให้เชื้อ SE	จำนวนไก่ (ตัว)	พบเชื้อ SE	
				จำนวน *	เปอร์เซนต์
1	B3	ให้	20	0/20[a]	0
2	B4	ให้	24	1/24[a]	4.2
3	B6	ให้	23	0/23[a]	0
4	L2	ให้	23	0/23[a]	0
5	L4	ให้	24	1/24[a]	4.2
6	L6	ให้	25	0/25[a]	0
7	ไม่ได้กิน	ให้	22	6/22[b]	27.3
8	ไม่ได้กิน	ไม่ให้	20	0/20[a]	0

* จำนวนที่พบเชื้อ / จำนวนที่ตรวจ

[a, b] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : กลุ่ม 7 เป็น challenge control
กลุ่ม 8 เป็น negative control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

จากการทดสอบ CE-product จำนวน 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 พบว่าลูกไก่ตายภายหลังป้อน CE-product จึงได้ทดสอบซ้ำโดยลดความเข้มข้นของ CE-product และลดปริมาตรเหลือ 0.5 มล. เหมือนผลงานของนักวิจัยอื่น (26,27,35,36,37) ซึ่งพบว่าลูกไก่ที่ได้รับ CE-product 0.5 มล. ไม่ทำให้ไก่ตาย เช่นเดียวกับการทดสอบครั้งที่ 3 ซึ่งใช้ CE-product 0.5 มล. โดยไม่ได้ลดความเข้มข้น

การตายของลูกไก่ภายหลังได้รับ CE-product อาจเนื่องจากปริมาตรของ CE-product 1 มล. มากเกินไปสำหรับลูกไก่อายุ 1-2 วัน หรืออาจจะเนื่องจากการเตรียม CE-product ครั้งที่ 1 ไม่ดีพอ ทำให้อาจมีเชื้อโรคชนิดอื่นปนเปื้อนไปกับ CE-product ด้วย ข้อสนับสนุนอีกประการหนึ่งที่สรุปได้ว่า การเตรียม CE-product ครั้งที่ 1 ไม่ดีพอ คือการแยกเชื้อ SE จากลูกไก่ที่ได้รับการ challenge ด้วยเชื้อ SE มีอัตราแยกเชื้อได้ 50-100% ในการทดสอบครั้งที่ 1 และ 10.5-26.3% ในการทดสอบครั้งที่ 2

ในการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 2 ภายหลังการ challenge พบเชื้อ SE ต่ำกว่าการทดสอบครั้งแรก เนื่องจากจำนวนเชื้อที่ใช้ challenge ครั้งแรก 8.5×10^{12} เซลล์ แต่ครั้งที่ 2 ใช้เพียง 3.8×10^{4} เซลล์ ซึ่งเป็นระดับที่นักวิจัยใช้ในหลายการทดลอง (36,37) หรือบางการทดลองใช้เพียง 10^{3} เซลล์ (26) หรือ 10^{2} เซลล์ (33) ในการทดสอบครั้งที่ 2 นี้ แม้จะมีอัตราพบเชื้อ SE 10.5-26.3% แต่อยู่ในระดับต่ำกว่าไก่ที่เป็น positive control ซึ่งเป็นเชื้อ SE 31.3%

ผลการทดสอบ CE-product ครั้งที่ 3 ซึ่งเป็น CE-product ที่เตรียมครั้งที่ 2 พบ CE-product ป้องกันเชื้อ SE ได้ 100% 4 ชนิด และอีก 2 ชนิด พบเชื้อ SE ชนิดละ 4.2% เท่ากัน ในขณะที่ positive control พบเชื้อ SE 27.3% การที่ได้ CE-product ที่มีประสิทธิภาพ 100% ในการป้องกันเชื้อ SE น่าจะเป็นผลจากการใช้ Generbag anaer ซึ่งเป็นผลให้การเตรียม CE-product ครั้งที่ 2 มีสภาพไร้อากาศมากกว่าการเตรียมครั้งที่ 1 ซึ่งน่าจะเป็นผลให้เชื้อ anaerobes ที่มีใน cecal content เจริญได้ต่างกัน ซึ่งตรงกับรายงานของ Snoeyenbos และคณะ (1978) ที่กล่าวว่าสภาพ strict anaerobes จะช่วยให้เชื้อที่เป็นประโยชน์กับลำไส้ไก่เจริญได้ดี (27)

การทดสอบ CE-product ครั้งที่ 3 พบว่าให้ผลในการป้องกันเชื้อ SE ต่างกัน ซึ่งตรงกับรายงานของ Bailey และคณะ (1988) ที่รายงานว่า CE-product แต่ชนิดป้องกันการ colonize ของเชื้อซาลโมเนลล่าได้ต่างกัน ซึ่งการป้องกันการ colonize ของเชื้อซาลโมเนลล่าในลำไส้ลูกไก่ เป็นผลจากการ colonize ของเชื้อที่มีใน CE-product เกิดขึ้นก่อนที่ลำไส้ จึงมีผลไปยับยั้งการ colonize ของเชื้อซาลโมเนลล่า ที่เข้ามาในลำไส้ลูกไก่ในภายหลัง ซึ่งการป้องกันเชื้อซาลโมเนลล่าของลูกไก่ในลักษณะนี้เรียกว่า "Competitive Exclusion" (38)

สรุป

CE-product ที่เตรียมในสภาพไร้อากาศควบคู่กับการใช้ Genergag anaer ได้ CE-product ที่เหมาะสมสำหรับให้ลูกไก่อายุ 1 วัน ตัวละ 0.5 มล. ลูกไก่ที่ได้รับ CE-product ป้องกันการติดเชื้อ SE เมื่ออายุ 3 วัน ได้ 100%

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปว่า CE-product ที่เตรียมได้นี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในฟาร์ม และจะช่วยลดอุบัติการของโรคติดเชื้อซาลโมเนลล่าได้เพียงใด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง

1. Bryan, F.L. 1980. Foodborne disease in the United States associated with meat and poultry. J. Food Prot. 43 : 140-150.
2. Humphrey, T.Y. and G.C. Head. 1988. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epiden. Inf. 100 : 175-184.
3. Khakhria, R., G. Bejanson, D. Duck and H. Lior. 1983. The epidemic spread of *Salmonella typhimurium* phage type 10 in Canada. (1970- 1979). Can. J. Microbiol. 29 : 1583-1588.
4. Oboegbulem, S.I., W.J. Reilly and D. Munro. 1990. Poultry meat and human salmonella infection : A study of the epidemiological relationship. Proc. World Assoc. Vet. Food Hygienists. Xth (Jubilee) Int. Symp. in Stockholm. 2-7 July 1989. Reblam & Kalalogtryck 1990. 307-313.
5. Perales, I. and A. Aredicana. 1989. The role of hens's eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. Int. J. Food Microbiol. 8 : 175-180.
6. Todd, E.C.D. 1980. Poultry-associated foodborne disease-its occurrence, cost, sources and prevention. J. Food Prot. 43 : 129-139.
7. WHO. 1985. Report of the working group on the WHO Veterinary Public Health programme on prevention and control of salmonellosis. VPH/25.61. WHO. Geneva.
8. พนิดา ชัยเนตร, ศุภวรรณ บุญสวง, อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และดำรงค์ เชี่ยวศิลป์. 1984. ซาลโมเนลล่าในประเทศไทย : จุลชีววิทยาและระบาดวิทยา Rama. Med. J. 11 : 233-245.
9. Daengprom, K., K. Saitanu, J. Jerngklingchan and C. Koowatananukul. 1995. Distribution of Salmonellae in the poultry processing plants. (Submitted for publication).
10. Jerngklinchan, J., C. Koowatananukul, K. Daengprom and K. Saitanu. 1994. Occurrence of Salmonellae in raw broilers and their products in Thailand. J. of Food Protection. 57 : 808-810.
11. Saitanu, K. and J. Jerngklinchan. 1995. Detection of Salmonella from poultry feed and ingredients in Thailand.
12. Saitanu, K., C. Koowatananukul, J. Jerngklinchan and j. Sasipreeyajan. 1994. Detection of Salmonellae in hen eggs in Thailand. Southeast Asian J. Trop Med. Pub. Health. 25 : 324-327.
13. Sasipreeyajan, J., J. Jerngklinchan, C. Koowatanukul and K. Saitanu. 1995. Prevalence of Salmonellae in broiler, layer and breeder flocks in Thailand. Presented at the Exhibition and Symposium of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science , Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand.

14. WHO. 1986. Prevention and control of foodborne salmonellosis through the application of the application of the Hazard Analysis Critical Control Point system. WHO/CDS/VPH/86.65. WHO. Geneva.
15. Gorham, S.L., K. Kadavil, H. Lambert, E. Vaughan, B. Pert and J. Abel. 1991. Persistance of *Salmonella enteritidis* in young chickens. Avian Pathol. 20 : 433-437.
16. Blankenship, L.C. 1992. USDA scientists study competitive exclusion. FSIS Food Safety. 2 : 19.
17. Cook, J. 1990. Sprayed for natural protection. World Poult. 55 : 20-21.
18. Fowler, N.G. and G.C. Mead. 1989. Competitive exclusion-Salmonella in poultry. Vet. Rec. 125 : 512.
19. Goren, E., W. A. De Jong, P. Doornenbal, N.M. Bolder, R.W.A.W. Mulder and A. Jansen. 1988. Reduction of Salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora : A longitudinal study. Vet. Quant. 10 : 249-255.
20. Mead, G.C. and P.A. Banow. 1990. Salmonella control in poultry by "competitive exclusion" or immunization. Letters Appl. Microbiol. 10 : 221-227.
21. Nurmi, E. 1988. Modern methods of public health practice : Exclusion of food-borne pathogens. Acta. Vet. Scand. Suppl. 84 : 49-56.
22. Nurmi, E., J. Hirn, C. Schneij and M. Aho. 1989. Competitive exclusion research and Salmonella control in poultry in Finland. Satellite Sypmosium. World Assoc. Vet. Food Hyg. Xth Symposium. 1989. July 2-7, 1989. Stockholm. 39.
23. Schneitz, C., M. Hakkinen, L. Nuotio, E. Nurmi and G. Mead. 1990. Droplet application for protecting chicks against salmonella colonization by competitive exclusion. Vet. Rec. 126 : 196.
24. Wierup, M., M. Wold - Troell, E. Nurmi and M. Hakkinen. 1988. Epidemiological evaluation of the Salmonella-controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. Poult. Sci. 67 : 1026-1033.
25. Nurmi, E. and M. Rantala. 1973. New aspects of salmonella infection. Nature. 24 : 210-211.
26. Barnes, E.M., C.S. Impey and D.M. Cooper. 1980. Competitive exclusion of salmonellas from the newly hatch chick. Vet. Rec. 106 : 61.
27. Snoeyenbos, G.H., M. Olga Weinack and C.F. Smyser. 1978. Protective chicks and poults from salmonellae by oral administraion of "normal" gut microflora. Avian Dis. 22 : 273-287.
28. Barnes, E.M., C.S. Impey and D.M. Cooper. 1980. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. Am. J. Clin. Nutr. 33 : 2426-2433.

29. Barnes, E.M., C.S. Impey and J.H. Stevens. 1979. Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick. J. Hygine. 82 : 263-283.
30. Impey, C.S., G.C. Mead and S.M. George. 1982. Competitive exclusion of salmonella from the chick caecum using a defined mixture of bacteria isolates from the caecal microflora of an adult bird. J. Hygine. 89 : 479.
31. Adler, H.E. and A.J. Damassa. 1980. Effect of ingested lactobacilli on *Salmonella infantis* and *Escherichia coli* and on intestinal flora, pasted vents and chick growth. Avian Dis. 24 : 868-878.
32. Soerjadi, A.S., S.M. Stelman, G.H. Snoeyenbos. O.M. Weinack and C.F. Smyser. 1981. The influence of lactobacilli on the competitive exclusion of paratyphoid Salmonellae in chicken. Avian Dis. 25 : 1027-1033.
33. Anderson, W. R., W. R. Mitchell, D. A. Barnum and R. J. Julian. 1984. Practical aspects of competitive exclusion for the control of Salmonella in turkeys. Avian Dis. 28 : 1071-1078.
34. Barnes, E. M. and C. S. Impey. 1971. The isolation of the anaerobic bacteria from chicken eaeca with particular reference to members of the Family Bacteroidacae. In : Isolation of Anaerobes, Symposium XIII, pp. 115-123. (D. A . Shapton and R. G. Board, eds.) New York and London. The Society for Applied Bacteriology, Tech. Series No. 5.
35. Bailey, J.S., L.C. Balankenship, N.J. Stern, N.A. Cox and F. McHan. 1988. Effect of anticoccidial and antimicrobial feed additives on protection of Salmonella colonization of chicks treated with anaerobic cultures of chicken feces. Avian Dis. 32, 324-329.
36. Corrier, D.E., A.G. Hollister, D.J. Nisbet, C.M. Scanlan, R.C. Beier and J.R. DeLoach. 1994. Competitive Exclusion of Salmonella enteritidis in Leghorn chicks : comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized Alginate beads. Avian Dis. 38 : 297-303.
37. Nisbet, D. J., D. E. Corrier, and J. R. DeLoach 1993. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on Salmonella typhimurium colonization in broiler chicks. Avian Dis. 37 : 528-535.
38. Lloyd, A.B., R.B. Cumming and R.D. Kent. 1977. Prevention of Salmonella typhimurium infection in poultry by pretreatment of chicks and poults with intestinal exrtacts. Aust. Vet. J. 53 : 82-87.