



การแยกฟาจจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่อรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ *Escherichia coli* (Colibacillosis) ในไก่เนื้อ

Phage Isolations from Nature and the Environment for Prophylaxis and Treatment of *Escherichia coli* Infection (Colibacillosis) in Broiler Chickens

นริศร นางาม^{1*} และเสรี แข็งแอ¹

¹ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*Corresponding author, E-mail: narnan@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาฟาจที่แยกจากสิ่งแวดล้อมและทดสอบประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรค colibacillosis ในไก่เนื้อ โดยใช้ไก่เนื้อจำนวน 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่แรกเป็นกลุ่มควบคุมเป็นไก่ที่เลี้ยงโดยไม่ได้รับเชื้อ *E. coli* และฟาจ กลุ่มที่สองสเปรย์ฟาจวันละครั้งติดต่อกันสามวัน กลุ่มที่สามสเปรย์เชื้อ *E. coli* 10^5 cfu/ml ครั้งเดียวก่อนแล้วจึงให้ฟาจ 10^{10} pfu/ml เป็นเวลาสามวันติดต่อกัน กลุ่มที่สี่สเปรย์เชื้อ *E. coli* แล้วจึงให้ยา norfloxacin ภายในเวลาสองชั่วโมงโดยใช้ขนาด 10 มก./กก. เป็นเวลาสามวันติดต่อกัน กลุ่มที่ห้าไก่ได้รับสเปรย์เชื้อ *E. coli* ในอากาศอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่าอัตราการป่วยและอัตราการตายต่ำทั้งในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่หนึ่ง) และกลุ่มที่สเปรย์ด้วยฟาจ (กลุ่มที่สอง) คือ 20% 20% กับ 10% 10% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *E. coli* อย่างเดียวมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงคือ 70% กับ 70% ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ได้รับฟาจร่วมกับเชื้อ *E. coli* (กลุ่มที่สาม) หรือได้ยา norfloxacin และเชื้อ *E. coli* (กลุ่มที่สี่) มีอัตราการป่วยและอัตราการตายต่ำใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม, 30%, 10% และ 30% และ 20% ตามลำดับ การศึกษานี้สรุปได้ว่าฟาจไม่เป็นพิษต่อไก่เนื้อ ฟาจยังให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ได้ดีเทียบเท่ากับการให้ยาปฏิชีวนะ norfloxacin ฟาจให้ผลสูงในการป้องกันโรคถึง 44.44% ไก่กลุ่มที่ 3 ได้รับเชื้อและฟาจกับไก่กลุ่มที่ 4 ได้รับเชื้อและยา มีอัตราการป่วยตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

ABSTRACT

The objectives of this study were to isolate and test efficacy of phage for prophylaxis and treatment of *E.coli* causing colibacillosis in broiler chickens. Fifty chickens were divided into 5 groups; the 1st group was a control, given neither organisms nor phage, 2nd group was daily spraying phage for 3 consecutive days without *E. coli*, 3rd group was once spraying 10⁵ cfu/ml of *E. coli* with following 10¹⁰ pfu/ml phage for 3 consecutive days, 4th group was spraying *E. coli* after that administered norfloxacin within 2 hours at a dose of 10 mg/kg for 3 consecutive days, 5th group was given only *E. coli* by aerosol spray. The results in this study showed that the morbidity and mortality rates were low both control (1st group) and spray with phage (2nd group), 20%, 20% and 10%; respectively. The birds exposed aerosol spray with only *E. coli* as 5th group were high morbidity and mortality rates with 70% and 70%. However, the chickens were administered with either phage plus *E. coli* (3rd group) or norfloxacin plus *E. coli* (5th group) were low morbidity and mortality, the same as control group, 30%, 10% and 30% and 20%; respectively. This study concluded that phage was no toxic in the broilerchickens. Phages had provided comparable advantages with norfloxacin for treatment of *E. coli* infection. This phage demonstrated highly significant decreasing pathogenic *E. coli* with 44.44%. Morbidity and mortality rates of 3rd group and 4th group had no significant ($p \geq 0.05$).

คำสำคัญ: ฟาจ อี โคลไล ไก่เนื้อ

Keywords: Phage, *E. coli*, Broiler

บทนำ

bacteriophages หรือ phages (ฟาจ) เป็นไวรัสซึ่งสามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย ในระยะ lytic phages จะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกออกซึ่งจะทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก การใช้ฟาจรักษาโรคเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพซึ่งมีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้รักษาทางคลินิกทั้งในยุโรปและอเมริกา (Pirisien, 2000) ฟาจไวรัสที่อาศัยในเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง ฟาจไวรัสสามารถคัดเลือกและแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำเสีย ทางระบายน้ำเสีย อุจจาระ ดิน น้ำพุ

เป็นต้น ฟาจสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ ป้องกันการติดเชื้อได้และสามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะได้ ฟาจที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้จะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เนื่องจากฟาจไวรัสมีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่เป็นแบคทีเรียสูง สามารถให้กิน ทา ฉีด หรือใช้ในขบวนการฆ่าตัดได้ ฟาจไวรัสที่ถูกคัดเลือกให้มีความจำเพาะที่จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคนั้นๆ จะไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อของโฮสต์ และแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในโฮสต์ ไวรัสนี้จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพียงแค่ให้ครั้งเดียว ปริมาณเล็กน้อยก็มีผลเพียงพอต่อการรักษาได้ (Sandeep, 2006; Weber-Dabrowska et al.,

2003) มีรายงานการใช้ฟาจในการรักษาและป้องกันโรคจากแบคทีเรียในสัตว์ทดลองตั้งแต่ปี 1980 ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Matsuzaki et al., 2005)

โรคติดเชื้อ *E. coli* (colibacillosis) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O1, O2, และ O78 เป็นโรคแทรกซ้อนของโรคหลอดลมอักเสบติดเชื้อ และโรคทางเดินหายใจอักเสบเรื้อรัง ความเครียดเป็นปัจจัยโน้มนำ เป็นได้กับไก่ทุกอายุ ในลูกไก่มีอัตราการตายสูงเนื่องจากสะดืออักเสบ และโลหิตเป็นพิษ โรคนี้เป็นโรคที่มีการตรวจพบบ่อย พบในไก่เนื้อมากกว่าไก่ไข่ แต่ในไก่ไข่จะมีอัตราการป่วยเฉลี่ยสูงกว่าไก่เนื้อ ไก่ที่เป็นโรคนี้อายุเฉลี่ยประมาณ 4 สัปดาห์ อัตราการป่วยและตายเฉลี่ยเท่ากับ 11% และ 4.75% ตามลำดับ (<http://www.dld.go.th/niah/AnimalDisease/>) โรค avian cellulitis ในไก่เนื้อถือได้ว่าเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายสูงมากกับอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ โดยจะไปทำให้คุณภาพซากของไก่ไม่ดี ไก่ซากผอม ไก่ติดเชื้อที่ผิวหนัง ผิวหนังของไก่เน่าไม่สวย และพบไก่คัดทิ้งที่โรงเชือดสูงมาก ปัญหาของการเกิด Avian cellulitis นั้น มักจะมีความสัมพันธ์กับ ปัญหาของการเกิดโรค colibacillosis โดยเมื่อไก่เนื้อป่วยด้วยโรคนี้อันแล้ว มันมักจะเหนียวน่าทำให้เกิดปัญหาของโรค avian cellulitis ตามมา (<http://chat-chan-chooo.blogspot.com/2008/04/avian-cellulitis.html>) เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรค avian cellulitis ในไก่เนื้อ จะเป็นเชื้อ

ชนิดเดียวกันที่ปนเปื้อนมากับสิ่งรอนนอนของไก่ ซึ่งก็จะ เป็นเชื้อที่มีการปนเปื้อนอยู่ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป

จากรายงานการศึกษา campylobacter phages ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อ เป็ด และน้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์ ฟาจ 12 ตัวอย่างถูกนำไปทดสอบความสามารถในการติดต่อเข้าไปในเชื้อ campylobacter Penner serotypes ซึ่งก่อโรคในสัตว์ปีกและคนในประเทศเดนมาร์กพบว่าฟาจ 89% สามารถติดต่อเข้าไปใน *Campylobacter jejuni* และ 14% ติดต่อกับ *Campylobacter coli* จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าฟาจเหล่านี้ อยู่ใน family Myoviridae ผลจากการศึกษานี้จะ ถูกนำไปใช้ในการควบคุมโรค campylobacteriosis ในไก่เนื้อในประเทศเดนมาร์ก (Hansen et al., 2007) ได้มีการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของ pseudomonas phages ที่แยกได้จากแม่น้ำที่มีความสกปรกสูงในเมืองโคชิ ประเทศญี่ปุ่นโดยใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แล้วนำมารักษาหนูถีบจักรที่ทดลองติดเชื้อนี้ในระบบทางเดินอาหาร โดยการป้อนฟาจทางปากพบว่าลดอัตราการตายของหนูโดยมีอัตราการรอดตาย 66.70% และ 0% นอกจากนี้จำนวนเชื้อในอุจจาระ Inflammatory cytokines ในเลือด และตับอยู่ในระดับต่ำกว่าหนูที่รับเชื้อและป้อนด้วยน้ำเกลือ แสดงให้เห็นว่าฟาจที่ให้ทางปากมีผลต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระบบทางเดินอาหารของหนูถีบจักร (Watanabe et al., 2007) และได้มีการทดลองใช้ enterococcus phages ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียของเทศบาล แล้วนำมาทดลองรักษาหนูถีบจักรที่ติดเชื้อทางกระแสเลือดจาก *Enterococcus faecium* ที่ดื้อยา vancomycin โดยฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนูถีบจักร 10^9 cfu/ml แล้วฉีดฟาจ 3×10^8

pfu/ml หลังฉีดเชื้อ 45 นาที ครั้งเดียวพบว่าอัตราการรอดตายของหนูถีบจักร 100% (Biswas et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ฟาจในการควบคุมเชื้อที่ก่อโรคในระบบการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ coli phages ในการกำจัดเชื้อ *E. coli* และ salmonella phages ในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นต้น (Withey et al., 2005) มีรายงานการใช้ phage Esc-A ที่แยกได้จากน้ำเสียขนาด 10^5 cfu/ml ให้ไก่กินทุกวันเพื่อรักษาโรคท้องเสียในไก่ที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ 3-1 ไม่พบไก่แสดงอาการท้องเสียใน 2 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้ฟาจ ผลการรักษาให้ผลดีโดยเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ chloromycetin (Xie et al., 2005)

เนื่องจากปัจจุบันเชื้อ *E. coli* ได้มีการพัฒนาตัวยาปฏิชีวนะหลายชนิด จากข้อดีของฟาจไวรัสดังกล่าวมาแล้วและสามารถค้นหาและแยกตัวฟาจจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในบริเวณสัตว์ที่อาศัยอยู่ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแยกหาฟาจและใช้ฟาจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค colibacillosis ในไก่เนื้อในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกัน รักษาและควบคุมโรค colibacillosis ในไก่เนื้อในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือในระยะต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เตรียมห้องปฏิบัติการ วัสดุ อุปกรณ์ และทีมวิจัย ประสานงานกับสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดและเจ้าของฟาร์มไก่เนื้อจำนวน 10 ฟาร์ม รวมทั้งโรงงานชำแหละไก่ จำนวน 5 โรง ออกสำรวจหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฟาร์มไก่เนื้อและโรงงานชำแหละไก่เพื่อเตรียมเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และเตรียมสถานที่ทดลองฟาจในไก่เนื้อจำนวน 50 ตัว ที่สถานีฟาร์ม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

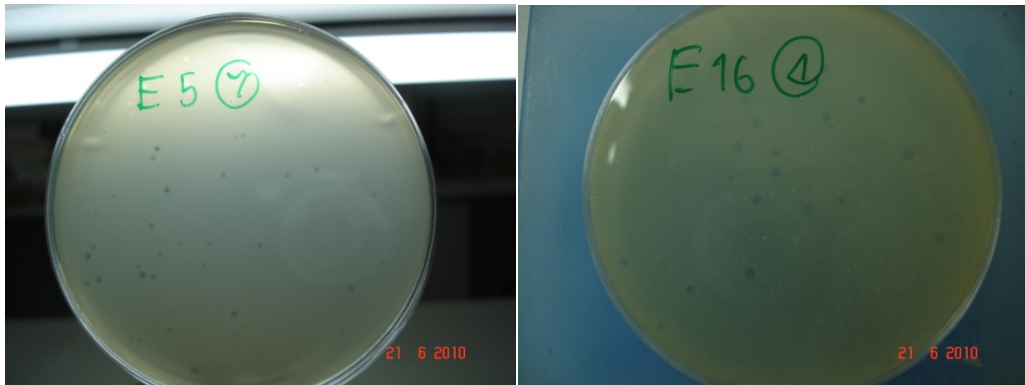
อ. วังสะพุง จ. เลย การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจแยกหาเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่โดยทำ rectal swab น้ำเสียจากฟาร์มไก่ และน้ำเสียจากโรงงานชำแหละไก่ ทุกตัวอย่างทั้งถูกเก็บใส่ในหลอดที่มี transport media (Stuart Transport Medium, HiMedia Laboratories Pvt, Ltd. India) เพื่อนำมาตรวจแยกเชื้อ *E. coli* โดยออกเก็บตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง/สัปดาห์ รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจแยกหาฟาจที่จำเพาะต่อ *E. coli* โดยทำเก็บตัวอย่างอุจจาระและน้ำเสียจากฟาร์มไก่ อุจจาระไก่ และน้ำเสียจากโรงงานชำแหละไก่เพื่อแยกหาฟาจที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* โดยออกเก็บตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง/สัปดาห์ รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

การเพาะแยกเชื้อ *E. coli* โดยใช้ EC Broth (Hardy Diagnostic, USA) และ EMB plate (Hardy Diagnostic, USA) เลือกโคโลนีที่แบน จุดตรงกลางสีดำ มี metallic sheen มา 2 โคโลนี ลงใน plate count agar (PCA) (Hardy Diagnostic, USA) บ่มที่ 37°C ระยะเวลา 24 ชม. นำเชื้อไปย้อมสีแกรมดูรูปร่างของเชื้อ ถ้าพบแบคทีเรียรูปทรงกระบอกสั้นหรือทรงกลม ติดสีชมพูจะนำไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็น *E. coli* และทดสอบแยกชนิดไม่ก่อโรคและก่อโรคโดยใช้ blood agar (BiomarkTM Laboratories, India) และทดสอบการตี้อย่างตามวิธีของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2002)

การคัดหาแยกฟาจจะใช้เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้มาเพื่อแยกหา *E. coli* phages จากอุจจาระและน้ำเสียจากฟาร์มไก่ อุจจาระไก่และน้ำเสียจากโรงงานชำแหละไก่โดยใช้ตัวอย่างละ 15 ml มาปั่นที่ $3500 \times g$ เวลา 25 นาที ที่ 10°C นำน้ำส่วนบนมารองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μl -pore-size filter แล้วดูตาม

8.6 ml เติม 1 ml 10x LB Broth (Hardy Diagnostic, USA) และ 100 μ l (10^8 cfu) *E. coli* นำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 150 rpm นำไปปั่นแยกเศษของแบคทีเรียที่ 10,000 x g เวลา 10 นาที นำน้ำส่วนบนมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μ l-pore-size filter นำไปวิเคราะห์หาฟาจ โดยใช้ 300 μ l supernatant ที่กรองได้มาทดสอบหา single phage plaques แล้วผสมกับ 200 μ l ของ *E. coli* culture ที่บ่มใน broth ไว้แล้ว 1 คีน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วผสมกับ 2.5 ml molten top

agar (0.6% agar) (Hardy Diagnostic, USA) ที่ 50°C เเทลงบน LB agar plates นำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชม. แล้วนำมาเก็บ phage plaques จาก plate ที่มีลักษณะเป็น single plaques นำไปทำให้บริสุทธิ์ 3 ครั้งกับเชื้อ *E. coli* ตามวิธีของ Xie et al. (2005) การนำ *E. coli* phages ที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดหาความเข้มข้นด้วยวิธีไตเตรด ทำ dilution series และนับ single plaques (รูปที่ 1) คำนวณความเข้มข้นตามวิธีของ Xie et al. (2005)



รูปที่ 1 พลาคว (plaques) ของเฟจชนิด lytic phages ที่ตรวจพบได้จากตัวอย่าง

นำ *E. coli* phages ขนาดความเข้มข้น 10^{10} pfu/ml ที่ได้มาทดสอบความปลอดภัยของฟาจโดยป้อนให้ไก่กินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และศึกษาประสิทธิภาพของฟาจต่อการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ในไก่เนื้อ ใช้ฟาจที่แยกได้ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml เพื่อใช้ทดลองในไก่ที่ติดเชื้อ *E. coli* 10^5 cfu/ml โดยจะแบ่งไก่อายุ 15 วันเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ได้รับเชื้อ *E. coli* และฟาจ กลุ่มที่ 2 ไม่ได้ให้เชื้อ *E. coli* แต่สเปรย์ฟาจที่แยกวันละครั้งติดต่อกัน 3 วัน และอาทิตย์ละครั้งจำนวน 3 ครั้ง กลุ่มที่ 3 จะสเปรย์เชื้อ *E. coli* เข้าไปใน

คอกเลี้ยง 1 ครั้ง และตามด้วยการ สเปรย์ฟาจวันละครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน และอาทิตย์ละครั้งจำนวน 3 ครั้ง กลุ่มที่ 4 สเปรย์เชื้อ *E. coli* และให้ยาปฏิชีวนะ norfloxacin ผสมน้ำให้กินในขนาด 10 มก./กก. ภายใน 2 ชั่วโมง ติดต่อกัน 3 วัน และกลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับสเปรย์เชื้อ *E. coli* อย่างเดียว จะสังเกตอาการของไก่อานาน 3 สัปดาห์ การเก็บตัวอย่างอุจจาระไก่และ เลือดไก่เพื่อตรวจหาเชื้อ *E. coli* และฟาจในสัปดาห์ที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของ treatment ในการทดลองที่มีผลให้ไก่ป่วย-ตายในระหว่างกลุ่มทดสอบโดย

ใช้ chi-square test on $p \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรม OpenEpi (www.OpenEpi.com, updated 2015/05/04, accessed 2015/12/11. Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.03a.)

ผลการวิจัยและอภิปราย

ผลแยกหาเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่ น้ำเสียฟาร์มไก่ และน้ำเสียโรงงานชำแหละไก่ ได้ตัวอย่างเชื้อ 90%, 76.66% และ 86.67% ตามลำดับ และนำเชื้อไปทดสอบความรุนแรงใน blood agar ซึ่งเชื้อที่ก่อความรุนแรงจะเกิด เบต้า ฮีโมไลสิส พบจำนวน 11.11%, 13.04% และ 18.52% ตามลำดับ ผลการทดสอบการต้านยาของเชื้อที่ก่อโรคพบว่าไวต่อยา ofloxacin, polymyxin B, cefotaxime และ colistin (ตารางที่ 3) ตรวจแยกหาฟาจที่จำเพาะต่อ *E. coli* จากตัวอย่างอุจจาระไก่ น้ำเสียฟาร์มไก่ และน้ำเสียโรงงานชำแหละไก่ ได้ตัวอย่างฟาจ จำนวน 7.5%, 16.67% และ 3.33% ตามลำดับ ไก่ที่ได้รับฟาจกลุ่มที่ 3 และ 2 ตายกลุ่มละ 2 ตัว ในอาทิตย์ที่ 1 และ 2 ของการทดลอง ส่วนไก่กลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1 มีไก่ตาย 3 ตัว และกลุ่มที่ 5 ตาย 7 ตัว ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 และ 2 มีสุขภาพปกติตรวจพบฟาจจากอุจจาระของไก่ในอาทิตย์ที่ 2 และ 3 ของการทดลอง (ตารางที่ 1) กลุ่ม 3 ที่สเปรย์ฟาจ ไก่มีอัตราการป่วย 30, 0, และ 0% ตามลำดับ และอัตราการตาย 10, 10 และ 0% ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ไก่มีอัตราการป่วย 10, 10, และ 0% ตามลำดับ และอัตราการตาย 10, 10 และ 0% ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ให้ยา norfloxacin พบไก่มีอัตราการป่วย 30, 20 และ 10% ตามลำดับ และอัตราการตาย 20, 20 และ 0% ตามลำดับ และกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้ให้ทั้งเชื้อ *E. coli* ยาและฟาจพบว่า

ไก่มีอัตราการป่วย 20, 20, และ 0% ตามลำดับและอัตราการตาย 20, 10 และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของ treatment ในการทดลองที่มีผลให้ไก่ป่วย-ตายในระหว่างกลุ่มทดสอบโดยใช้ chi-square test on $p \leq 0.05$ พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับเชื้อและฟาจมีอัตราป่วย-ตายไม่แตกต่างจากกลุ่มไก่ที่ได้รับเชื้อและยา ($p \geq 0.05$) แต่กลุ่มไก่ที่ได้รับเชื้อและฟาจและกลุ่มไก่ที่ได้รับเชื้อและยากับกลุ่มไก่ที่ได้รับเชื้อ *E. coli* อย่างเดียวมีอัตราการป่วย-ตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างพบว่า เชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazoletrimethoprim (95.65%), ampicillin (95.65%), และ kanamycin (91.30%), oxytetracycline (73.91%), tetracycline (71.74%), doxycycline (69.57%), chloramphenicol (60.87%), cephalothin (52.17%), streptomycin (41.30%), enrofloxacin (36.96%), nalidixic acid (36.96%), gentamycin (30.44%), norfloxacin (23.91%), และไวต่อยา ofloxacin (15.22%), polymyxin B (15.22%), cefotaxime (13.0%), และ colistin (10.87%) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การนำฟาจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ (phage therapy) ทั้งในคนและสัตว์ แม้จะได้ผลดีและมีความปลอดภัย แต่ก็ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกของการทำลายเชื้อ โดยเฉพาะทางด้านเภสัชจลศาสตร์ (pharmacokinetics) ทั้งนี้เนื่องจากฟาจมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะเท่านั้น ซึ่งต้องทราบชนิดของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรครก่อน จึงจะนำฟาจนั้นๆ มาใช้ได้ ตลอดจน

ความบริสุทธิ์ และการดำรงชีวิตของฟาจ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของการนำฟาจมาใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตาม การนำฟาจมาประยุกต์ใช้ในการทางวิทยาศาสตร์แพทย์ทางด้านชีวโมเลกุล เช่น ใช้เป็นตัวกลางของการตัดต่อพันธุกรรม (DNA) และการนำมาใช้ควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตอาหาร และการนำมาใช้กับแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สิ่งเหล่านี้ยังคงเป็นประโยชน์ และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาต่อไป

เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นชนิดเชื้อที่ไม่ก่อโรค เชื้อเกิดเบต้า ฮีโมไลสิสบน blood agar 4.22% และไวต่อยา ofloxacin, polymyxin B, cefotaxime และ colistin ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tian et al. (1997) ฟาจที่แยกได้สามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ได้ และมีความปลอดภัยต่อไก่ทดลอง โดยพบว่ากลุ่มไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับสเปรย์ฟาจเข้าในคอกสามารถลดอัตราการป่วยตายของไก่ลงได้มากกว่ากลุ่มไก่ทดลองที่ไม่ได้รับฟาจ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการนำฟาจมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียมีข้อดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหลายประการ เช่น มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย และสามารถเพิ่มจำนวนได้ตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ รวมถึงไม่มีผลข้างเคียง และการดื้อต่อฟาจของแบคทีเรียนั้น จะจำกัดอยู่เฉพาะกับแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น (Matsuzaki et al., 2005) จากรายงานของ Carlton (1999) พบว่ามีการนำฟาจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์ทดลอง ซึ่งให้ผลที่ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งสอดคล้องกับ Capparelli et al. (2007) ได้นำฟาจมารักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* แบบมีหนองที่ปอดและเยื่อหุ้มปอด โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม ให้กลุ่มแรกรักษา

ด้วยฟาจ ส่วนกลุ่มที่สองรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ พบว่ากลุ่มที่รักษาด้วยฟาจมีอัตราการหาย 82% ส่วนกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะมีอัตราการหาย 64% เท่านั้น มีการนำฟาจรักษาหนูทดลองที่ติดเชื้อ *E. coli* พบว่ามีอัตราการหาย 92% เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งหายเพียง 33% เท่านั้น (Sandeep, 2006) มีการนำฟาจมาใช้ในการรักษาคนที่ติดเชื้อหลายรูปแบบด้วยกันคือ ให้กินในรูปของยาเม็ดหรือยาน้ำ ขนาด $10^5 - 10^{10}$ pfu/dose ใช้พ่นหรือสเปรย์ (aerosol) ใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำโดยตรง และ ใช้ทาเฉพาะที่ เช่นที่ผิวหนัง ตา หู หรือโพรงจมูก เป็นต้น (Kropinski, 2006) นอกจากนี้ยังมีการนำฟาจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย และสามารถนำมาใช้กับคนได้นั้นอาจเพราะว่าฟาจสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและอาหาร ซึ่งเข้าสู่ร่างกายโดยการกินหรือดื่มตลอดเวลา แต่เนื่องจากฟาจมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสูง จึงไม่มีผลต่อเซลล์ของร่างกายคน หรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Levin and Bull, 1996) จากรายงานขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ที่อนุญาตให้เติมฟาจลงในอาหารเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่อาจปนเปื้อนในอาหารได้ด้วย (Parisien et al., 2008)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษา campylobacter phages ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อ เป็ด และน้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์ ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการติดเชื้อเข้าไปในเชื้อ campylobacter Penner serotypes ซึ่งก่อโรคในสัตว์ปีกและคนในประเทศเดนมาร์กพบว่าฟาจ 89% สามารถติดเชื้อเข้าไปใน *Campylobacter jejuni* และ 14% ติดเชื้อเข้าไปใน *Campylobacter coli* จากการ

ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าฟาจเหล่านี้ อยู่ใน Family Myoviridae ผลจากการศึกษาครั้งนี้ จะถูกนำไปใช้ในการควบคุมโรค campylobacteriosis ในไก่เนื้อในประเทศเดนมาร์ก (Hansen et al., 2007) ได้มีการศึกษาประเมิ นประสิทธิผลของ pseudomonas phages ที่แยกได้จากแม่น้ำที่มีความสกปรกสูงในเมืองโคชิ ประเทศญี่ปุ่นโดยใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แล้วนำมารักษาหนูถีบจักรที่ทดลองติดเชื้อนี้ทางระบบเดินอาหาร โดยการป้อนฟาจทางปากพบว่าลดอัตราการตายของหนูโดยมีอัตราการรอดตาย 66.70% และ 0% ในหนูที่ป้อนด้วยน้ำเกลือ พบนอกจากนี้จำนวนเชื้อในอุจจาระ Inflammatory cytokines ในเลือดและตับอยู่ในระดับต่ำกว่าหนูที่รับเชื้อและป้อนด้วยน้ำเกลือ แสดงให้เห็นว่าฟาจที่ให้ทางปากมีผลต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระบบทางเดินอาหารของหนูถีบจักร (Watanabe et al., 2007) และได้มีการทดลองใช้ enterococcus phages ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียของเทศบาล แล้วนำมาทดลองรักษาหนูถีบจักรที่ติดเชื้อทางกระแสเลือดจาก *Enterococcus faecium* ที่เคื้อยา vancomycin โดยฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนูถีบจักรขนาด 10^9 cfu แล้วฉีดฟาจ ขนาด 3×10^8 pfu หลังฉีดเชื้อ 45 นาที ครั้งเดียว พบว่าอัตราการรอดตายของหนูถีบจักร 100% (Biswas et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้ประยุกต์ใช้ฟาจในการควบคุมเชื้อที่ก่อโรคในระบบการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ coli phages ในการกำจัดเชื้อ *E. coli* และ salmonella phages ในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นต้น (Withey et al., 2005) มีรายงานงานการใช้ phage Esc-A ที่แยกได้

จากน้ำเสียขนาด 10^5 cfu ให้ไก่กินทุกวันเพื่อรักษาโรคท้องเสียในไก่ที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ 3-1 ไม่พบไก่แสดงอาการท้องเสียใน 2 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช่ฟาจ ผลการรักษาให้ผลดีโดยเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ chloromycetin (Xie et al., 2005) จากรายงานของกาญจนา (2550) พบว่าปริมาณของฟาจของเชื้อ *S. Typhi* เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 จะมีปริมาณลดลงดังนี้ 5.35, 5.15, 4.17, 4.13 และ 3.89 (log pfu/ml) และมีอัตราการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 37, 42, 50, 60 และ 70°C ระยะเวลา 3 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละดังนี้ 94.2, 95.1, 95.2, 82.9 และ 0 (ตรวจไม่พบฟาจ) การทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เกิดจากโปรตีน 2 ชนิดคือ holin ซึ่งเป็น hydrophobic proteins ขนาดเล็ก ที่จะสอดแทรก holing monomer เข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากทางด้านในของเซลล์ และประกอบเป็น holin oligomer ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์ และ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายชั้น peptidoglycan ได้ ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และปลดปล่อยฟาจออกมา อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ซึ่งมีผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น *S. Enteritidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะมีผนังเซลล์ด้านนอกที่กันไม่ให้เอนไซม์ทำงานจากภายนอก แต่เมื่อชั้น lipopolysaccharide ถูกทำลายด้วยการใช้ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ก็สามารถถูกทำลายจากภายนอกได้ด้วยเอนไซม์ endolysin (นิตยา และคณะ, 2553)

ตารางที่ 1 ผลการทดลองฟาจและยาปฏิชีวนะในไก่ทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์

กลุ่มทดลอง	จำนวน/ทั้งหมด	อัตรา (%)
1. ควบคุม		
ป่วย	2/10	20
ตาย	2/10	20
2. สเปรย์ฟาจ		
ป่วย	1/10	10
ตาย	1/10	10
3. สเปรย์ฟาจกับ <i>E. coli</i>		
ป่วย	3/10	30
ตาย	1/10	10
4. ยา norfloxacin ^a กับ <i>E. coli</i>		
ป่วย	3/10	30
ตาย	2/10	20
5. สเปรย์ <i>E. coli</i>		
ป่วย	7/10	70
ตาย	7/10	70

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของ treatment ในการทดลองที่มีผลให้ไก่ป่วย-ตายในระหว่างกลุ่มทดสอบโดยใช้ chi-square test

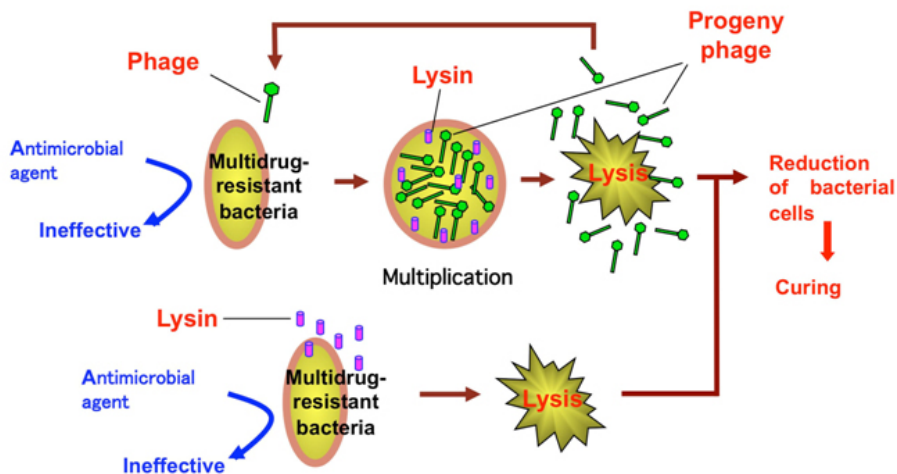
กลุ่มทดลอง	จำนวน/ทั้งหมด	อัตราป่วย-ตาย (%)	P-value ^b
1. ควบคุม			กลุ่ม 1 & 5 = 0.0007
ป่วยและตาย	4/20	20	กลุ่ม 4 ^a & 5 = 0.003
2. สเปรย์ฟาจ			กลุ่ม 3 & 5 = 0.0007
ป่วยและตาย	2/20	10	กลุ่ม 2 & 5 = 0.0003
3. สเปรย์ฟาจกับ <i>E. coli</i>			กลุ่ม 1 & 4 ^a = 0.35
ป่วยและตาย	4/20	20	กลุ่ม 1 & 3 = 0.50
4. ยา norfloxacin ^a กับ <i>E. coli</i>			กลุ่ม 1 & 2 = 0.18
ป่วยและตาย	5/20	25	กลุ่ม 2 & 3 = 0.18
5. สเปรย์ <i>E. coli</i>			กลุ่ม 3 & 4 ^a = 0.35
ป่วยและตาย	14/20	70	

a norfloxacin

b statistical analysis: เปรียบเทียบความแตกต่างของ treatment ในการทดลองที่มีผลให้ไก่ป่วย-ตายในระหว่างกลุ่มทดสอบโดยใช้ chi-square test on $p < 0.05$

ตารางที่ 3 การทดสอบการดื้อยาของ *E. coli* ที่แยกได้

Range (%)	Drug resistance of <i>E. coli</i> (%)
80-100	sulphamethoxazole-trimethoprim (95.65), ampicillin (95.65), และkanamycin (91.30)
60-70	oxytetracycline (73.91), tetracycline (71.74), doxycycline (69.57) chloramphenicol (60.87)
40-59	cephalothin (52.17), streptomycin (41.30)
20-39	enrofloxacin (36.96), nalidixic acid (36.96), gentamycine (30.44) norfloxacin (23.91)
0-19	ofloxacin (15.22), polymyxin B (15.22), cefotaxime (13.0) colistin (10.87)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเฟจแบบ lytic phages (λ phage cycle)

(<http://scientificmuslem.blogspot.com/2010/10/hadith-mengenai-lalat.html>)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2553 และทุนอุดหนุนการวิจัยเฉพาะทาง คณะสัตว แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2551

เอกสารอ้างอิง

กัญญา นิกิต. (2550). เปรียบเทียบ ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ และความคงตัวของแบคทีเรียโอฟาจที่ จำเพาะต่อ *Salmonella Typhi* และ *Shigella*

dysenteriae. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 35(2): 113-122.

นิวัตร จันท์ศิริพรชัย จิโรจ ศศิปรียจันทร์. (2547). ประสิทธิภาพของยานอร์ฟล็อกซาซินในการรักษาโรค ติดเชื้อ อี. โคไล ในไก่เนื้อ. ประชุมวิชาการทางสัตว แพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30; 10-11-12 พฤศจิกายน 2547. 357-362.

นิตยา คำคุ้ม อุมาพร ยอดประทุม และรศนา วงศ์รัตนชีวิน. (2553). แบคทีเรียโอฟาจและการประยุกต์ใช้ในทาง การแพทย์. ศรีนครินทร์เวชสาร 25(1): 47-53.

- อัญชุลี เลิศสงคราม. (2555). แบคทีเรียโอเฟจและประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม 19(3): 16-23.
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Pual, B., et al. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacterimic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Infection and Immunity* 70(1): 204-210.
- Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., and Iannelli, D. (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 51(8): 2765-73.
- Carlton, R.M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. 47(5): 267-74.
- Carter, S.E. and Cole, J.R. (1990). Streptococcus and Related Cocci. In *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*, 5th.ed., California: Academic Press. pp. 211-220.
- Hansen, V.M., Rosenquist, H., Baggesen, D.L., Brown, S., Chistensen, B.B. (2007). Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes. *BMC Microbiology* 7: 90.
- Kropinski, A.M. (2006). Phage Therapy-Everything Old is New Again. *Canadian Journal Infectious Microbiology* 17(15): 297-306.
- Levin, B.R. and Bull, J.J. (1996). Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and Its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 147(6): 881-898.
- Matsuzaki, S., Rashed, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 11(5): 211-9.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2002). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals: Approved Standard M31-A2, 2nd edn. NCCLS, Wayne.
- Nilsson, A.S. (2014). Phage Therapy-Constrains and possibilities. *Uppsala Journal of Medical Science* 117(2): 192-198.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Approved Standards M2-A6. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing 6th.ed. NCCLS, Wayne. 26 p.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., Lan, C.Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104(1): 1-13.
- Parisien A. (2000). "Phage therapy—advance over antibiotic?. *Lancet* 356(9239): 1418.
- Prescott, J. F. and Baggot, J. D. (1993). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 2nd ed. Iowa State University Press, Iowa. 612p.
- Sandeep, K. (2006). Bacteriophage precision drug against bacterial infection. *Current Science* 90(5): 631-633.
- Tian, D. C., Tan, Y. H., and Xu, R. (1997). The survey of the drug-resistant number of pathogenic *E. coli* in chicken in Shandong Province of

- China. Fowl of Shangdong (in Chinese), 4, 8-10.
- Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Sumiyama, Y., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., and Yamaguchi, K. (2007). Efficacy of Bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 51(2): 446-452.
- Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., and Gorski, A. (2003). Bacteriophage as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplantation Proceeding* 35: 1385-1386.
- Withey, S., Cartmell, E., Avery, L.M., Stephenson, T. (2005). Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment* 339: 1-18.
- Xie, H., Zhuang, X., Kong, J., Ma, G. M., Zhang, H. (2005). Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *Journal of General and Applied Microbiology* 51: 159-163.

