การแยกเชื้อไวรัสกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่ที่พบในประเทศไทย

Isolation and Identification of Infectious Laryngotracheitis Virus from Chickens in Thailand

*อุราศรี ตันตสวัสดิ์ สพ.บ. (เกียรตินิยม), M.P.H. (Urasri Tantaswasdi)

**สุพจน์ เมธิยะพันธ์ สพ.บ. (เกียรตินิยม) (Supoch Methiyapun)

*วาสนา ภิญโญชนม์ สพ.บ. (เกียรตินิยม) (Wasana Pinyochon)

*สุจิรา วัชรินทร์ชลาลัย สพ.บ. (Sujira W. Chalalai)

*หน่วยไวรัสวิทยา กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

(Virology Section, Division of Veterinary Research, Dept. of Livestock Development)

**หน่วยพยาธิวิทยา กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

(Pathology Section, Division of Veterinary Research, Dept. of Livestock Development)

Abstract

Infectious laryngotracheitis (ILT) virus was isolated from chicksens suspected of ILT in Saraburi, Chachoeng Sao and Nakhon Pathom Province by using 9–11 day-old embryonating chicken eggs. Plaques resulted from proliferation and necrosis of the chorio-allantoic membrane and typical respiratory signs and gross lesions of experimental infected chickens were observed. Histopathology from affected tissues illustrated characteristic acidophilic intranuclear inclusion bodies (Cowdry type A). Finally, electron microscopic study and serum neutralization test revealed an accurate result of ILT in chickens.

คำนำ

โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่ หรือ infectious laryngotracheitis (ILT) เป็นโรคติดต่อชนิดเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจของไก่ทุกอายุ โรคนี้เกิดจาก

เชื้อไวรัส ซึ่งมีผลกระทบกระเทือนต่อเนื้อไก่ ไก่พันธุ์ และไก่ไข่อย่างกว้างขวาง ในรายที่เกิดการระบาดรุนแรง จะมีอัตราการบ่วยในฝูงสูงเกือบ 100% และมีอัตราการตายประมาณ 5—70% ส่วนในไก่ไข่ จะทำให้อัตราการไข่ลดลง (Hofstad *et al*, 1972)

ในต่างประเทศ มีรายงานการระบาดของโรค ILT มาแล้วหลายประเทศทั้งในอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย และเอเชีย (Hofstad *et al*, 1972 and Sharma *et al*, 1976) สำหรับในประเทศไทย ยังไม่เคยมีรายงานการระบาดของโรคนี้ จนกระทั่งเมื่อเดือนมีนาคม พฤษภาคม และสิงหาคม พ.ศ. 2523 กองวิชาการ ได้รับไก่ที่บ่วยและตายด้วยโรคที่สงสัยว่าจะเป็นโรค ILT จากฟาร์มต่างๆ ในเขตจังหวัด สระบุรี ฉะเชิงเทรา และ นครปฐม รวม 4 ราย จึงได้นำมาศึกษาวิจัย เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากซากไก่ดังกล่าวเป็นเชื้อไวรัส ILT จริงหรือไม่

จุดประสงค์ของรายงานนี้ เป็นการรายงานรายละเอียดของการแยกเชื้อไวรัสจากซากไก่ที่นำมาศึกษา ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้เป็นเชื้อไวรัส ILT

อุปกรณ์และวิธีการ

อวัยวะจากซากไก่ทั้ง 4 ราย ที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อ ส่วนใหญ่ได้แก่ กล่องเสียง (larynx) หลอดลม (trachea) และปอด (lung) ของไก่บ่วย ซึ่งตายด้วยโรคที่สงสัยว่าจะเป็นโรค ILT จาก จังหวัดสระบุรี ฉะเชิงเทรา และ นครปฐม โดยส่งผ่านมาจากงานโรคสัตว์ปีก ของกองสัตวรักษ์ กรมปศุสัตว์

ไข่ไก่พัก อายุระหว่าง 9—11 วัน จากหน่วยงานเลี้ยงสัตว์ทดลอง กองวิชาการ ซึ่งเป็นไข่ที่ได้จากพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่เคยเกิดโรคระบาด และไม่เคยฉีดวัคซีนป้องกันโรคใดๆ ไว้

ไก่ทดลองอายุ 3 สัปดาห์ 2 เดือน 4 เดือน และ 8 เดือน จากหน่วยงานเลี้ยงสัตว์ทดลอง กองวิชาการ เป็นไก่ที่ไม่เคยมีการระบาดของโรค ILT และไม่เคยฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้มาก่อน

Positive serum of ILT จาก National Veterinary Services Laboratorics, USDA. ประเทศสหรัฐอเมริกา นำมาเจือจาง 1:10 และ inactivate ที่ 56°C ครึ่งชั่วโมง

วิธีแยกเชื้อไวรัส

บดชิ้นส่วนอวัยวะของซากไก่ แล้วทำ 10% suspension กับ PBS (pH 7.2) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเย็น 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส มาใส่โซเดียม เพนนิซิลิน จี 1000 ยูนิต/ซี.ซี. และสเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 1000 ไมโครกรัม/ซี.ซี. แล้วนำไปฉีดบน chorioallantoic membrane (CAM) ของไข่ไก่ฟักอายุ 9—11 วัน ในขนาดฟองละ 0.1 ซี.ซี. เก็บไข่ไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C และตรวจส่องดูความผิดปกติของไข่ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน

การฉีดสัตว์ทดลอง

ใช้เชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่มาทดลอง หยอดตา และฉีดเข้ากล่องเสียงไก่อายุต่างๆกัน คือ 3 สัปดาห์ 2 เดือน 4 เดือน และ 8 เดือน อย่างละ 2 ตัว ในการหยอดตา ใช้เชื้อหยอดข้างละหยด ส่วนการฉีดเข้ากล่องเสียง ใช้ฉีดตัวละ 0.3 — 0.5 ซี.ซี. โดยมีไก่ควบคุม (control) สำหรับเปรียบเทียบผลแยกไว้ต่างหากกลุ่มละ 2 ตัว สังเกตอาการของไก่ทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

เก็บอวัยวะส่วนหลอดลมจากไก่ที่ป่วยตาย CAM จากไข่ที่มีวิการของจุดเนื้อตาย และหลอดลมจากไก่ที่ทดลองฉีดเชื้อ นำมาแช่ใน 10% ฟอร์มาลิน ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา นำเนื้อเยื่อมาตัดให้หนาในขนาด 4 — 5 ไมครอน แล้วย้อมด้วยสีเมเยอร์เฮมาท็อกซีลิน (Mayer Hematoxylin) และอีโอซีน (Eosin) จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน

นำเชื้อไวรัสที่ได้ผ่านการตรวจดังกล่าวมาฉีดเข้า CAM ของไข่ไก่ฟัก จำนวน 80 ฟอง เก็บส่วน CAM ในวันที่ 5 มาบดแล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นความเย็น 3000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใส แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน ที่สถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

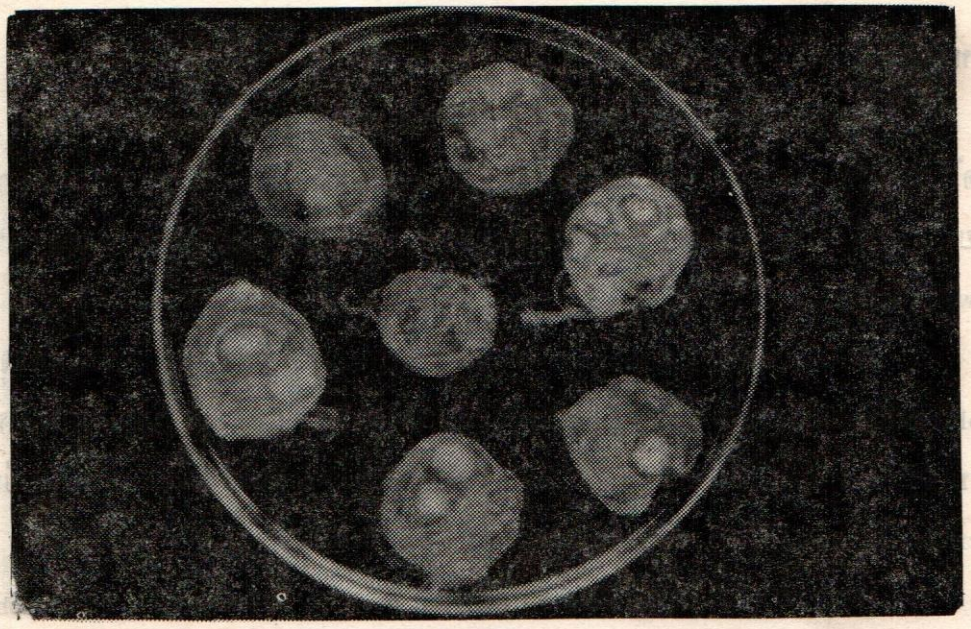
การพิสูจน์โดยวิธีเซรั่มนิวทราลไลเซชั่นเทสต์

เจือจางเชื้อไวรัสที่แยกได้โดยใช้ ten fold dilution จาก 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วนำไปฉีดเข้า CAM ของไข่ไก่ฟักชุดละ 5 ฟอง ในขณะเดียวกัน แบ่งแต่ละความเจือจางของเชื้อไวรัสมาผสมกับ positive serum ของ ILT จาก USDA ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วนำไปฉีดเข้าไข่ไก่มีเชื้อชุดละ 5 ฟอง เช่นเดียวกัน เพื่อคำนวณหา virus titer, serum titer และ neutralization index (NI) ตามวิธีของ Reed and Muench

ผล

จากการเพาะเชื้อไวรัสบน CAM ของไข่ไก่ฟัก พบว่าคัพภะประมาณ 90 – 95% ปกติ ไม่มีวิการอย่างไร แต่พบลักษณะของเนื้อตายเป็นวงกลมขอบเรียบสีขาวนวลบน CAM ซึ่งเห็นได้ชัดเจนตั้งแต่วันที่ 5–8 หลังการฉีดเชื้อ ตามรูปที่ 1 ประมาณ 5–10% ของคัพภะที่ตายหลังการผ่านเชื้อ อาจจะมีลักษณะแคระแกรนและมีจุดเลือดออกตามตัว บางตัวอาจจะมีจุดเลือดออกและจุดเนื้อตายที่ตับด้วย

ส่วนผลการทดลองในไก่ ปรากฏว่า ทั้งไก่ใหญ่และไก่เล็กที่ได้รับเชื้อ แสดงอาการของโรคเหมือนกัน คือ มีอาการไอ จาม หายใจลำบาก พยายามยืดคอ อ้าปากหายใจและมีเสียงดัง (gasping) ตามรูปที่สอง 50 – 75% ของไก่ที่แสดงอาการแล้วจะตายภายใน 1–2 วัน และไก่ที่รอดตาย จะหายเป็นปกติภายใน 14 วัน ส่วนไก่ในกลุ่มควบคุมไม่พบอาการป่วยแต่อย่างใด



รูปที่ 1 ลักษณะของจุดเนื้อตายบน CAM ของไข่ไก่ฟัก เปรียบเทียบกับ control ซึ่งอยู่ตรงกลาง



รูปที่ 2 อาการป่วยของไก่ทดลอง แสดงการพยายามยืดคออ้าปากหายใจ และมีเสียงดัง (gasping)

ผลทางจุลพยาธิวิทยา

หลอดลมจากไก่ที่ป่วยตาย พบลักษณะของ hemorrhagic tracheitis มีเม็ดโลหิตแดงจำนวนมาก ใน exudate และมี epithelial cell ที่ลอกหลุดปนออกมาด้วย ภายใน epithelial cell พบ acidophilic intranuclear inclusion bodies แบบ Cowdry type A

Chorioallantoic Membrane จากไข่ไก่ฟักพบว่า มีการหนาตัวขึ้นเนื่องจาก proliferation ของ CAM ร่วมกับ infiltration ของ mononuclear cell นอกจากนี้ยังพบลักษณะ active hyperemia และ focal coagulative necrosis ด้วย ภายในหย่อม necrosis มี acidophilic intranuclear inclusion bodies

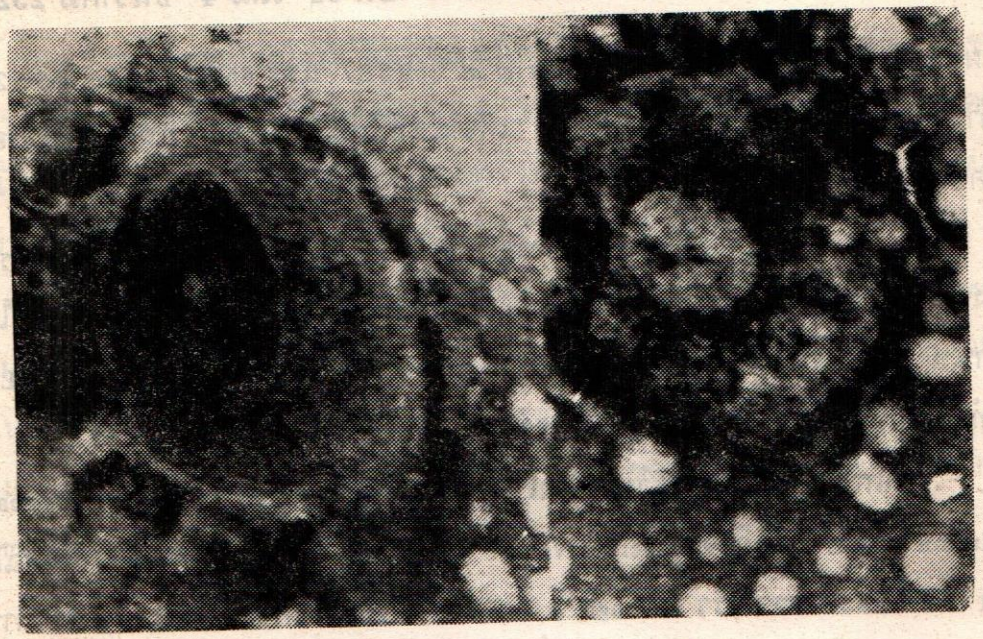
หลอกลมจากไก่ทดลอง พบลักษณะ necrotic inflammation ของ trachea ภายใน necrotic epithelial cell มี acidophilic intranuclear inclusion bodies แบบ Cowdry type A

ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน

ผลการศึกษาเชื้อไวรัสจาก CAM พบไวรัสปาติเคิล มีแคปสิด ลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีทรงเสมอกัน (Icosahedral symmetry) และมีเปลือกหนาขนาดต่าง ๆ ห่อหุ้มอยู่ จากการคำนวณขนาดของเชื้อไวรัสพบว่า เส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนแคปสิด ประมาณ 80 — 90 nm และเส้นผ่าศูนย์กลางของปาติเคิล รวมทั้งเปลือกประมาณ 100 — 200 nm ตามรูปที่ 3

ผลการตรวจพิสูจน์โดยเซรั่มนิวทรัลไลเซชั่นเทสต์

ผลการทดสอบพบว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้จากซากไก่ทั้ง 4 ราย เมื่อผสมกับ positive serum ของ ILT แล้ว ถูก neutralize เกือบหมด เมื่อฉีดเข้าไข่ไก่ฟักแล้วคำนวณหา titer ของไวรัส และเซรั่มโดยวิธีของ Reed and Muench ได้ค่า NI ดังตารางหน้าต่อไป



รูปที่ 1 ไวรัสปาติเคิล แยกจากโรคระบาด ILT × 220,000 ย้อมด้วย 2% uranyl acetate แสดงส่วนแคปสิค ซึ่งอยู่แกนกลาง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80 — 90 nm และมีเปลือกหนาห่อหุ้ม แคปสิคอันหนึ่งเป็นสีดำเข้ม เนื่องจากสีที่ย้อมซึมเข้าไปบรรจุอยู่

ซากไก่จาก	Virus Titer (log_{10} ELD_{50} / ml.)	Virus--Serum Titer	NI
สระบุรี (1)	4.74	1.44	3.3
สระบุรี (2)	4.40	1.00	3.4
ฉะเชิงเทรา	4.50	1.60	2.9
นครปฐม	4.00	1.40	2.6

วิจารณ์

การตรวจแยกเชื้อไวรัส ILT โดยวิธีฉีดเชื้อบน CAM ของไข่ไก่ฟักและตรวจดูวิการของจุดเนื้อตายบน CAM นั้น เป็นวิธีตรวจที่ได้ผลแม่นยำ และมีความไวมากวิธีหนึ่ง แม้ว่าจะมีจำนวนไวรัสไม่มากก็ตาม จากผลการศึกษาทดลองครั้งนี้

ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Hitchner *et al* (1958) และ Shibley *et al* (1962) กล่าวคือสามารถเพาะไวรัสในไข่ไก่ฟัก ได้จากซากไก่ทั้ง 4 ราย และให้วิการของโรคชัดเจน

ส่วนการทดลองฉีดเชื้อในไก่อายุต่าง ๆ กัน แล้วพบไก่แสดงอาการของโรคทางระบบหายใจ โดยเฉพาะอาการ gasping ซึ่งเห็นได้ชัดเจนทั้งในไก่ใหญ่ และไก่เล็กนั้น ให้ผลสนับสนุนกับผลการทดลองผ่านเชื้อในไข่ฟัก เนื่องจากเชื้อไวรัส ILT จะทำให้ไก่ทุกอายุเป็นโรค และมีอาการของ gasping (Hofstad *et al*, 1972)

ในการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของโรค ILT จะให้ลักษณะเฉพาะของ intranuclear inclusion bodies ที่เกิดจาก herpes virus ลักษณะเฉพาะนี้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค ILT ได้สะดวกรวดเร็ว (Gough *et al*, 1977 and Purcell, 1971) จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาของหลอดลมไก่ทั้งที่ป่วยและตายโดยธรรมชาติ และที่ได้รับเชื้อโดยการฉีด พบลักษณะของ acidophilic intranuclear inclusion bodies ใน tracheal epithelial cells ที่ลอกหลุด ส่วนใน CAM ก็พบ inclusion bodies เช่นกัน แต่ไม่พบการแยกตัวของ inclusion จาก nuclear membrane อย่างชัดเจนเหมือน inclusion bodies ที่พบใน trachea

การใช้เทคนิคจุลทรรศน์อิเลคตรอน เพื่อตรวจดูรูปร่าง ลักษณะ และขนาดของไวรัส ปาติเคิล แม้ว่าจะต้องใช้ไวรัสจำนวนมาก ต้องใช้เทคนิคและอุปกรณ์ในการทำให้ไวรัสเข้มข้นและบริสุทธิ์ แต่ก็ช่วยได้มากในการยืนยันสาเหตุของโรคได้ว่าเกิดจากไวรัสในกลุ่มใด จากการศึกษานี้พบว่า รูปร่างลักษณะของไวรัสส่วนแคปสิคและรวมทั้งส่วนเปลือก เป็นลักษณะเฉพาะของ herpes virus ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงมากกับที่ Cruickshank *et al.* (1963) และ Watrach *et al.* (1963) ได้รายงานไว้

เนื่องจากเชื้อไวรัสที่นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนครั้งนี้ เตรียมจาก CAM ของไข่ซึ่งมีโปรตีนปนอยู่มาก จำเป็นต้องใช้กรรมวิธีบั่นพิเศษเพื่อแยกโปรตีนออกหลายครั้ง ซึ่งอาจมีผลกระทบกระเทือน ทำให้ขนาดของไวรัสเปลี่ยนแปลงและจำนวนลดน้อยลงด้วย

การพิสูจน์โรคไวรัส โดยใช้เทคนิคทางเซรั่มวิทยา จำเป็นต้องมีแอนติเซรั่มจำเพาะสำหรับตรวจ ต้องใช้ไข่จำนวนมาก และต้องใช้เวลาพอสมควร ดังนั้นเทคนิคนี้จึงใช้เฉพาะในรายที่ต้องการศึกษาการตรวจพิสูจน์โรคให้ละเอียดเท่านั้น ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการทำการชันสูตรโดยทั่วไป

ผลจากการทดลองทางเซรั่มนิวทราลไลเซชั่นเทสต์ พบว่า positive serum ILT ของประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถ neutralize เชื้อไวรัสที่แยกได้จากซากไก่ในเขตท้องที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย เนื่องจาก NI เกิน 2 ทุกราย (Tripathy and Hanson, 1975) แสดงว่า viral strain ILT ของอเมริกา และของไทยน่าจะมี immunologic property คล้ายคลึงกัน

สรุป

จากการแยกเชื้อไวรัสในไก่ที่บ่วยตายด้วยโรคที่สงสัยว่าจะเป็นโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในเขตจังหวัดสระบุรี ฉะเชิงเทรา และ นครปฐม รวม 4 ราย โดยนำมาฉีดในไข่ไก่ฟักอายุระหว่าง 9—11 วัน พบลักษณะของจุดเน็อตายบน chorio—allantoic membrane และเมื่อฉีดเชื้อไวรัสเข้าไก่ทดลอง จะพบอาการ และ/หรือ วิการของโรคชัดเจน ในการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของไก่ที่บ่วยตายและวิการจากไข่ไก่ฟัก พบ acidophilic intranuclear inclusion bodies (Cowdry type A inclusion) เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน และพิสูจน์โดยวิธีเซรั่มนิวทราลไลเซชั่น-เทสท์ ให้ผลยืนยันว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้ เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้รายงานขอขอบคุณ Dr. Carbrey, E.A. หัวหน้า Diagnostic Virology Laboratory ของ National Veterinary Services Laboratories แห่ง USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ได้ supply positive serum of ILT

ขอขอบคุณแพทย์หญิง ชื่นฤดี ไชยวสุ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ สุรางค์ สงวนวงศ์ และนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปราณี ตันติสวัสดินันท์ แห่งสถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ช่วยศึกษาลักษณะของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน

ท้ายสุดนี้ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นส.พ. บุญมี สัญญสุจจารี ที่ช่วยยืนยันการอ่านผลทางจุลพยาธิวิทยา

เอกสารอ้างอิง

(1) Cruickshank, J.G., Berry, D.M., and Hay, B. 1963 : The Fine Structure of Infectious Laryngotracheitis Virus. Virology *20* : 376 – 378.

(2) Gough, A.W., Pettit, J.R., Gagnon, A. and Weber, L.J. 1977 : An Outbreak of Infectious Laryngotracheitis in Commercial Poultry Flocks in Ontario. Can. J. Comp. Med. *41* : 146 – 151.

(3) Hitchner, S.B., Shea, C.A., and White, P.G. 1958 : Studies on Serum Neutralization Test for the Diagnosis of Laryngotracheitis in Chickens. Avian Dis *2* : 258 – 269.

(4) Hofstad, M.S., Calnek, B.W., Helmboldt, C.F., Reid, W.M. and Yoder, H.W. 1972 : In : Diseases of Poultry. 6th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p 607 – 618.

(5) Purcell, D.A. 1971 : Histopathology of Infectious Laryngotracheitis in Fowl Affected by an Aerosol. J. Comd. Path. *81* : 421 – 431,

(6) Sharma. M.M. and Mehrotra, P.N. 1976 : Incidence of Infectious Laryngo tracheitis (ILT) of Poultry in Rajasihan. Indian Vet. J. *53* : 495 – 499.

(7) Shibley, G.P., Luginbuhl, R.E. and Helmboldt, C.F. 1962 : A Study of Infectious Laryngotracheitis Strains. I. Comparison of Serological and Immunogenic Properties. Avian Dis. *6* : 59 – 71.

(8) Tripathy, D.N. and Hanson, L.E. 1975 : In : Isolation and Identification of Avian Pathogens. Hitchner, S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G. adn Williams, J.E. (eds.) Arnold Printing Corporation, Ithaca, N.Y. p 227 – 234.

(9) Watrach. A.M., Hanson, L.E. and Watrach, M.A. 1963 : The Structurc of Infectious Laryngotracheitis Virus. Virology *21* : 601 – 608.